

PRIMJENA SEKVENCIRANJA NOVE GENERACIJE U PEDIJATRIJSKOJ DIJAGNOSTICI

BORUT PETERLIN, ALEŠ MAVER*

Dijagnostika rijetkih bolesti u pedijatriji predstavlja veliki izazov. Složenost dijagnostike proizlazi iz velikog broja rijetkih genetskih bolesti, nedostatnog kliničkog iskustva, kliničke i genetske heterogenosti bolesti, te ograničene dostupnosti genetičkog testiranja. Sekvenciranje nove generacije (NGS) omogućava testiranje od nekoliko do svih gena u jednom genetičkom testu. Ova iznimno moćna metoda se učinkovito može primijeniti za potvrđivanje dijagnostičke hipoteze, kao i za utvrđivanje dijagnoze u slučajevima bez specifične dijagnoze ili s neispravnom dijagnozom. Za učinkovitu primjenu NGS tehnologije važno je uspostaviti kliničke indikacije i smjernice, te dobru suradnju između liječnika koji upućuje pacijenta na genetičku obradu, liječnika medicinskog genetičara, laboratorijskog medicinskog genetičara i liječnika specijalista u različitim kliničkim područjima.

Deskriptori: SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE, DIJAGNOSTIČKI TEST, SMJERNICE, RIJETKE BOLESTI, PEDIJARIJA

UVOD

Značajan dio patologije u pedijatriji predstavljaju genetske bolesti, i obratno, značajan dio genetskih bolesti javlja se u pedijatrijskoj dobi. Genetske bolesti su rijetke, neke iznimno rijetke, stoga medicinski stručnjaci u tercijarnim centrima često nemaju dovoljno iskustva. Dodatni problem predstavlja klinička heterogenost genetskih bolesti. Simptomi i znakovi bolesti često nisu specifični, ovisno o starosnoj dobi djeteta, te unutar jedne obitelji mogu značajno varirati. U većini slučajeva nisu dostupne specifične dijagnostičke metode, potrebno je kombinirati brojne, uključujući i invazivne metode, što predstavlja veliko opterećenje za dijete i obitelj. Osim toga, pretrage su obično dugotrajne i skupe. Stoga se liječnici često nađu u slijepoj ulici, bez specifične dijagnostičke hipoteze. Ukoliko kliničar postavi dijagnostičku hipotezu,

izazov može predstavljati i odabir dijagnostičke metode / metode za potvrdu dijagnoze. Kada je vjerojatna genetska etiologija bolesti, genetski dokaz mutacije je pouzdana metoda za potvrdu, odnosno utvrđivanje dijagnoze.

DIJAGNOSTIKA GENETSKIH BOLESTI

Klasični pristup dijagnostike genetskih bolesti temelji se na specifičnoj dijagnostičkoj hipotezi i posljedično odabranoj dijagnostičkoj metodi. Na primjer, ukoliko postoji sumnja na cističnu fibrozu, analiziraju se mutacije u CFTR genu. Genetičko testiranje se ponekad provodi i u slučajevima kada nije postavljena specifična dijagnostička hipoteza, ali se može povezati s genetičkim uzrokom, na primjer kariotip ili aCGH u slučajevima teške mentalne retardacije ili multiplih razvojnih nepravilnosti koje ne možemo povezati s određenim sindromom.

S obzirom da su kariotipizacija i aCGH postale rutinske metode u medicinskoj genetici i pedijatriji, veliki dijagnostički izazov predstavljaju brojne Mendelske genetske bolesti (preko 7000). Utvrđivanje dijagnoze najmanje polovice svih poznatih genetskih bo-

lesti predstavlja problem čak i velikim zemljama s razvijenim zdravstvenim sustavima. Složenost postupaka pri financiranju dijagnostike u inozemstvu je često velika prepreka prekograničnoj suradnji. Dodatni problem je genetska heterogenost bolesti. Ista genetska bolest u podlozi može biti povezana s mutacijama u više različitih gena. Klasični pristup testiranja više različitih gena u više navrata povezuje se s malim dijagnostičkim uspjehom i neprihvatljivo visokim troškovima genetskog testiranja.

NGS DIJAGNOSTIKA

Metoda masivnog paralelnog sekvenciranja je omogućila sekvenciranje neograničenog broja gena u jednom genetičkom testu. Pri NGS testiranju genetskih panela unaprijed se odabiru geni koji će se testirati, dok se sekvenciranjem eksoma analiziraju sekvence svih gena koji su povezani s genetskim bolestima (kliničko eksomsko sekvenciranje) ili svih gena u genomu (eksomsko ili genomsko sekvenciranje).

Interpretacija rezultata NGS testiranja trenutno predstavlja značajan dijagnostički izazov. Dijagnostički je najjednostavnije kada je utvrđena po-

*Clinical Institute of Medical Genetics
University Medical Centre Ljubljana

Adresa za dopisivanje:
Professor Borut Peterlin, MD, PhD
Clinical Institute of Medical Genetics
University Medical Centre Ljubljana
1000 Ljubljana, Šlajmerjeva 3, Slovenia
E mail: borut.peterlin@guest.arnes.si

znata patogena mutacija u genu koji je prethodno već bio povezan s testiranom genetskom bolesti. Često se nađu genetske varijante koje još nisu bile opisane. U procjeni utjecaja utvrđene varijante gena na njegovu funkciju, odnosno patogenost mutacije, važnu ulogu imaju bioinformatičke metode i analiza segregacije varijante u obitelji. Ovisno o načinu nasljeđivanja, osim samog ispitanika mogu se NGS metodom testirati roditelji ili drugi članovi obitelji ispitanika, što općenito može olakšati dijagnostiku, ali je i učiniti skupljom.

Sekvenciranjem eksoma možemo otkriti i mutacije novih gena koji još nisu povezani s ispitivanim poremećajem. U takvim slučajevima je potrebno potvrditi utjecaj gena u drugim, nezavisnim obiteljima i/ili dokazati promijenjenu funkciju gena i njegovu uključenost u patofiziologiju bolesti na eksperimentalnoj razini. U interpretaciji rezultata je važno poštovati ograničenja tehničkog pristupa NGS (1). Važno je uzeti u obzir mogućnost slučajnih nalaza tijekom procesa dijagnostike i genetskog savjetovanja, posebno u pedijatrijskoj dobi (2).

PRAKTIČNA PRIMJENA NGS U KLINIČKOJ DIJAGNOSTICI

Iskustvo na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku je pokazalo da stručna i racionalna uporaba NGS značajno doprinosi dijagnostici rijetkih bolesti u pedijatrijskoj dobi. Ne samo da NGS učinkovito identificira mutacije

u slučajevima gdje molekularni mehanizam mutacije zahtijeva kompleksan pristup dijagnostici (npr. iznimno veliki geni, genetska heterogenost bolesti), već se mogu dijagnosticirati (ultra) rijetke genetske bolesti za koje, s obzirom na kliničke metode, nije bilo moguće postaviti dijagnostičku hipotezu ili je ona bila neispravna (3, 4). Stoga su u mnogim bolestima savjetuje promijeniti prioritet dijagnostičkih postupaka, jer su dosadašnji dijagnostički algoritmi često povezani s brojnim (nespecifičnim), često neugodnim (npr. biopsija mišića), dugotrajnim i skupim dijagnostičkim postupcima.

Za učinkovitu primjenu NGS tehnologije je potrebno uspostaviti kvalitetne kliničke smjernice. Medicinske indikacije za pojedine pretrage moraju biti jasno definirane; moraju se poštovati nacionalne ili međunarodne preporuke, mora biti postavljena utemeljena sumnja na genetsku etiologiju bolesti. Iznimno je važna dobra suradnja između zdravstvenih djelatnika; liječnika koji upućuje pacijenta na genetičku obradu, liječnika medicinskog genetičara, laboratorijskog medicinskog genetičara i liječnika specijalista u drugim kliničkim područjima. Za jasnu interpretaciju NGS nalaza često je potrebna daljnja klinička obrada. Jasno definiran nalaz NGS testiranja te dobra komunikacija između medicinskog genetičara i liječnika koji upućuje pacijenta na genetičku obradu su iznimno važni za klinički odgovarajuću interpretaciju nalaza.

NOVČANA POTPORA/FUNDING
Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL
Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST
Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

1. Maver A, Peterlin B. Next generation sequencing - towards translation into clinical practice. *Paediatr Croat* 2013; 57: 295-300.
2. Hehir-Kwa JY, Claustres M, Hastings RJ, van Ravenswaaij - Arts C, Christenhusz G, Genuardi M et al. Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing. *Eur J Hum Genet.* 2015; 23: 1601-6.
3. Maver A, Lovrecic L, Volk M, Rudolf G, Writzl K, Blatnik A et al. Phenotype-driven gene target definition in clinical genome-wide sequencing data interpretation. *Genet Med*, in press.
4. Blinc A, Maver A, Rudolf G, Tasič J, Pretnar Oblak J, Berden P, Peterlin B. Clinical Exome Sequencing as a Novel Tool for Diagnosing Loeys-Dietz Syndrome Type 3. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015; 50: 816-21.

Summary

CONTRIBUTION OF NEXT GENERATION SEQUENCING APPROACH IN PAEDIATRIC DIAGNOSTICS

B. Peterlin, A. Maver

Diagnostics of rare genetic diseases in paediatric period is challenging. It is complex due to the large number or rare genetic diseases, limited clinical expertise, clinical and genetic heterogeneity of diseases as well as due to limited access to genetic testing. Next generation sequencing provides possibility of testing several up to all genes in one genetic test. It is a powerful tool for diagnostic hypothesis confirmation but also may lead to diagnosis establishment in cases with no specific or wrong diagnostic hypothesis. For the efficient use of NGS in clinical practice it is important to follow clinical indications for testing and to establish a clinical pathway with good collaboration among referring physician, clinical geneticist, laboratory medical geneticists as well as various medical specialist for potential further phenotyping.

Descriptors: NEXT GENERATION SEQUENCING, DIAGNOSTIC TEST, GUIDELINES, RARE DISEASES, PEDIATRICS

Primljeno/Received: 16. 3. 2016.

Prihvaćeno/Accepted: 31. 3. 2016.