

# Retrospektivna studija dijagnostičkog sekvenciranja sljedeće generacije na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci od 2017. do 2021. godine

---

Poslon, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:644634>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Željka Poslon

**RETROSPEKTIVNA STUDIJA DIJAGNOSTIČKOG SEKVENCIRANJA SLJEDEĆE  
GENERACIJE NA ZAVODU ZA MEDICINSKU BIOLOGIJU I GENETIKU  
MEDICINSKOG FAKULTETA U RIJECI OD 2017. DO 2021. GODINE**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Željka Poslon

**RETROSPEKTIVNA STUDIJA DIJAGNOSTIČKOG SEKVENCIRANJA SLJEDEĆE  
GENERACIJE NA ZAVODU ZA MEDICINSKU BIOLOGIJU I GENETIKU  
MEDICINSKOG FAKULTETA U RIJECI OD 2017. DO 2021. GODINE**

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Nina Pereza, dr. med.

Diplomski rad ocijenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Saša Ostojić, dr. med.
2. Prof. dr. sc. Smiljana Ristić, dipl. ing.
3. Doc. dr. sc. Sanja Dević Pavlić, dipl. sanit. ing.

Rad sadrži 33 stranice, 1 sliku, 5 tablica, 16 literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Nini Perezi na nesebičnom i strpljivom prenošenju znanja te savjetima prilikom izrade ovog rada, kao i povjerenju, pomoći i razumijevanju, koji su bili potpuni i bezrezervni.*

*Također, hvala svom osoblju Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci na pruženoj pomoći prilikom prikupljanja podataka.*

*Svojoj dragoj obitelji i prijateljima zahvaljujem na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjernej vjeri u moj uspjeh.*

## **Popis skraćenica i akronima**

GTG (engl. *G-bands by trypsin using Giemsa*) - kariotipizacija

FISH - fluorescentna in situ hibridizacija

QF-PCR (engl. *Quantitative fluorescent polymerase chain reaction*) - kvantitativna fluorescentna lančana reakcija polimerazom

aCGH (engl. *microarray-based comparative genomic hybridization*) - komparativna genomska hibridizacija na mikročipu

PCR (engl. *polymerase chain reaction*)- lančana reakcija polimerazom

TP-PCR (engl. *triplet repeat primed PCR*) - lančana reakcija polimerazom s tri početnice

MLPA (engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) - metoda istovremenog umnažanja vezanih proba

NGS (engl. *next generation sequencing*) – sekvenciranje sljedeće generacije

WGS (engl. *whole genome sequencing*) - sekvenciranje cjelokupnog genoma

WES (engl. *whole exome sequencing*) - sekvenciranje cjelokupnog egzoma

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Genetičko testiranje .....	2
1.1.1. Podjela genetičkog testiranja prema indikacijama.....	2
1.1.2. Metode genetičkog testiranja .....	3
1.1.2.1. Metode citogenetike .....	4
1.1.2.2. Metode molekularne genetike .....	5
1.2. Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS).....	6
1.2.1. NGS platforme.....	7
1.2.2. Metodologija NGS-a.....	8
1.2.2.1. Priprema matrice .....	8
1.2.2.2. Sekvenciranje i snimanje.....	9
1.2.2.3. Analiza podataka.....	10
1.2.3. Klasifikacija varijanti sekvence prema kliničkom značaju .....	10
1.2.4. Primjena NGS-a u praksi .....	11
1.2.5. Vrste NGS-a u dijagnostičkom genetičkom testiranju.....	11
1.2.6. Primjena NGS-a na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.....	12
2. SVRHA RADA.....	14
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	15
3.1. Statistička analiza .....	15
4. REZULTATI.....	16
4.1. Ukupan broj pretraga .....	16
4.2. Omjer pozitivnih i negativnih nalaza testiranja pomoću NGS metode .....	17
4.2.1. Analiza varijanti sekvenci u pozitivnih rezultata .....	17

4.2.2. Indikacije za NGS pretragu .....	18
4.2.3. Analiza potvrđenih indikacija u nalaza s patogenim i vjerojatno patogenim varijantama sekvence .....	18
4.2.4. Analiza indikacija u negativnim nalazima .....	19
4.3. Omjer pozitivnih i negativnih nalaza testiranja pomoću sekvenciranja po Sangeru .....	19
5. RASPRAVA.....	21
5.1. Ukupan broj pretraga .....	21
5.2. Omjer pozitivnih i negativnih nalaza testiranja pomoću NGS metode .....	22
5.3. Indikacije za NGS pretragu i analiza potvrđenih i promijenjenih indikacija.....	23
6. ZAKLJUČAK.....	25
7. SAŽETAK .....	26
8. SUMMARY.....	28
9. LITERATURA.....	30
10. ŽIVOTOPIS.....	33



## 1. UVOD

Medicinska genetika spada u najbrže razvijajuće medicinske specijalizacije. Zahvaljujući intenzivnom i brzom napretku u razvoju novih sveobuhvatnih metoda genetičkog testiranja dolazi do integracije medicinske genetike u brojne dijelove medicine, uključujući farmakogenomiku, dijagnostiku dismorfnih sindroma, prenatalnu dijagnostiku te personaliziranu medicinu (1).

Proširivanjem znanja o ulozi gena i genetičkih promjena u zdravlju i bolesti, genetičko testiranje dobiva sve značajniju ulogu u medicinskoj praksi, budući da se uviđa kako su i genetičke bolesti njen integralni dio (2). Stoga je genetičko testiranje posljednjih godina evoluiralo u sveobuhvatno genomsko testiranje, koje se više ne koristi samo za znanstvena istraživanja, već i u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Razvojem genetike i napretkom genetičkog testiranja javlja se potreba za podizanjem razine genetičke pismenosti u liječnika, studenata i opće populacije. Osim zahtjeva za adekvatnom edukacijom, javlja se i potreba etičke te zakonodavne regulacije navedenog (1). Intenzivan i brz napredak osigurao je sve veću dostupnost genetičkih testova, ali i otvorio nova važna pitanja, kao što je pravilna indikacija i pravilna uporaba genetičkog testiranja (2).

Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*) je relativno brza dijagnostička metoda genetičkog testiranja, koja pruža uvid u pregled cjelokupnog ljudskog genoma ili specifičnih gena od interesa. Tako doprinosi značajnom napretku u znanstvenoj, ali i kliničkoj praksi te ujedno omogućava bolji uvid u bolest i pruža selektivnije metode liječenja te personaliziran terapijski pristup (3). Zbog svega navedenog predstavlja važnu metodu u dijagnostičkom genetičkom testiranju u brojnim medicinskim specijalizacijama, kao što su pedijatrija, ginekologija i porodništvo, neurologija, interna medicina, onkologija, dermatologija i oftalmologija.

## 1.1.Genetičko testiranje

Genetičko testiranje je medicinsko testiranje, kojim se utvrđuju promjene u DNA molekuli, kromosomima ili metabolitima te služi kao potvrda ili isključenje određenog genetičkog poremećaja.

### 1.1.1. Podjela genetičkog testiranja prema indikacijama

Prema indikacijama razlikujemo nekoliko vrsta genetičkog testiranja, a to su dijagnostičko testiranje, prediktivno testiranje, određivanje statusa nositelja, probir u populaciji i farmakogenomsko testiranje.

*Dijagnostičko testiranje* je indicirano u osoba s izraženim kliničkim ili biokemijskim obilježjima mogućeg genetičkog poremećaja, a cilj testiranja je potvrda ili isključenje radne dijagnoze. Značajno je prilikom planiranja intervencija ili liječenja simptomatskih pacijenata, informiranja pojedinca ili članova obitelji o genetičkom poremećaju te određivanja rizika ponovnog javljanja i donošenja reproduktivnih odluka.

U asimptomatskih osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom za određeni autosomno dominantni genski poremećaj s kasnijim nastupom indicirano je *prediktivno testiranje*, čiji je cilj utvrditi genetički status prije pojave simptoma i znakova bolesti zbog izračuna rizika za razvoj bolesti. Ishod prediktivnog testiranja je važan prilikom odabira intervencija ili terapija koje smanjuju morbiditet/ mortalitet, informiranja o poremećaju te donošenja reproduktivnih odluka.

*Određivanje statusa nositelja* indicirano je u asimptomatskih osoba koje imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu određenog recesivnog genskog poremećaja ili balansiranih strukturnih kromosomskih aberacija. Cilj te vrste testiranja je utvrđivanje recesivnih genskih mutacija u

heterozigotnom obliku ili balansiranih strukturnih kromosomskih aberacija, a značaj se očituje u informiranju pacijenata o rizicima za potomstvo.

*Probir u populaciji* se provodi u asimptomatskih osoba koje imaju povećan rizik od razvoja određenog genetičkog poremećaja zbog pripadnosti određenoj populaciji, neovisno o obiteljskoj anamnezi. Cilj ovog testiranja je otkrivanje genetičkih poremećaja čiji se simptomi i znakovi pravovremenom intervencijom mogu odgoditi, spriječiti ili liječiti. U populaciji razlikujemo dvije vrste probira, a to su nereproduktivni i reproduktivni probir. Nereproduktivni probir je novorođenački probir, koji označava sustavno i organizirano traganje za nekim prirođenim bolestima u sve novorođenčadi određene populacije s ciljem njihovog prepoznavanja prije nego što izazovu posljedice po zdravlje djeteta. U program novorođenačkog probira u Republici Hrvatskoj uvrštene su sljedeće bolesti: fenilketonurija, prirođena hipotireoza i prirođena gluhoća. Reproductivni probir označava prenatalni probir i biokemijski ili genomski probir nositelja u rizičnim populacijama. Za probir u populaciji koriste se većinom biokemijski i fizikalni testovi, koji ukazuju samo na povišen rizik od bolesti, za dokazivanje koje su potrebni naknadni dijagnostički testovi.

*Farmakogenomsko testiranje* je vrsta genetičkog testiranja koje se izvodi u asimptomatskih osoba koje planiraju uzimati ili simptomatskih osoba koje ne odgovaraju primjereno na lijek za čiji metabolizam u organizmu postoje dokazi o utjecaju genskih varijanti. Cilj testiranja je otkrivanje načina odgovora organizma na određene lijekove, izbjegavanje nuspojava i prilagođavanje doze.

#### *1.1.2. Metode genetičkog testiranja*

Genski i kromosomski poremećaji ne nastaju na iste načine niti zahvaćaju istu veličinu nasljednog materijala te zbog toga zahtijevaju i posebne metode za analizu (4). Ovisno o

tome je li riječ o kromosomskom ili genskom poremećaju, razlikujemo citogenetičke i molekularne genetičke metode testiranja.

#### *1.1.2.1. Metode citogenetike*

U dijagnosticiranju strukturnih i numeričkih promjena kromosoma, kao što su mikroleucije, trisomije i subtelomerne translokacije te prilikom identifikacije podrijetla marker-kromosoma i promjena gena u tumorskim stanicama, veoma je važna klinička primjena metoda citogenetike (5). U citogenetičke metode ubrajamo metode oprugavanja kromosoma (GTG metoda/ kariotipizacija) i metode molekularne citogenetike (fluorescentna in situ hibridizacija, kvantitativna fluorescentna lančana reakcija polimerazom i komparativna genomska hibridizacija na mikročipu) (4).

*GTG metoda (kariotipizacija)* je metoda kojom se detektiraju kromosomske promjene veće od 5 Mb. Naziva se još i metodom oprugavanja kromosoma jer obuhvaća pripremu kromosomskih preparata pomoću neke od metoda pruganja kromosoma (najčešće se radi o G pruganju) te njihovu vizualizaciju i analizu pod svjetlosnim mikroskopom (6).

*Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)* je metoda koja se koristi za analizu prisutnosti ili odsutnosti dijela kromosomske DNA (te broj kopija) veličine > 1000 pb na interfaznim jezgrama ili metafaznim kromosomima (4). Upotrebljava se kao brzi test za detekciju aneuploidija. Analiza se provodi pomoću fluorescentnog mikroskopa.

*Kvantitativna fluorescentna lančana reakcija polimerazom (QF-PCR)* je metoda kojom se umnažaju specifični dijelovi DNA (mikrosatelitne sekvence, engl. *short tandem repeats*) i potom se kvantificira količina DNA koja se u tim dijelovima nalazi. Kao i FISH, upotrebljava se kao brzi test za detekciju aneuploidija (4). Analiza se provodi pomoću računala.

*Komparativna genomna hibridizacija na mikročipu (aCGH)* je metoda koja se koristi za otkrivanje duplikacija ili delecija, posebice onih manjih od 5 Mb. Uzorak (pacijentov genom) i referentna DNA obilježavaju se različitim fluorescentnim bojama, a zatim se istodobno hibridiziraju na mikročipove s probama (oligonukleotidima), koji su sačinjeni od umjetno sintetiziranih nukleotida, specifičnog redoslijeda u genomu te označavaju jedinstven odsječak humanog genoma. Razlika u intenzitetu boja uzorka i referentnog genoma detektira se kao razlika u hibridizaciji i predstavlja osnovu za identifikaciju pojavnosti promjene u broju kopija segmenta genoma (6). Analiza se provodi pomoću računala.

#### *1.1.2.2. Metode molekularne genetike*

Molekularne genetičke metode se s obzirom na kliničku primjenu dijele na ciljane (lančana reakcija polimerazom i njezine modifikacije te sekvenciranje po *Sangeru*) i sveobuhvatne (genomske) metode (sekvenciranje sljedeće generacije).

*Lančana reakcija polimerazom (PCR reakcija)* je metoda, kojom umnažamo željeni odsječak DNA molekule mnogo puta, kako bismo dobili dovoljnu količinu za daljnje analize. PCR reakcija odvija se ponavljanjem ciklusa koji uključuju razdvajanje dvolančane DNA molekule pod visokom temperaturom i potom umnažanje svakog lanca pod niskom temperaturom. Svi koraci PCR reakcije se odvijaju u posebnim uređajima u kojima se automatski kontroliraju promjene temperature i trajanje pojedinih koraka reakcije (4). Koristi se za detekciju supstitucija, insercija i delecija. Ograničenje ove metode očituje se u tome što ne može odrediti redoslijed nukleotida već samo prisustvo ili odsustvo ciljanog slijeda.

*Sekvenciranje po Sangeru* je molekularna metoda koja započinje PCR-om, gdje se jedan DNA odsječak umnaža tako da se osim normalnih nukleotida u novi lanac nasumično ugrađuju i posebno obilježeni nukleotidi, označeni svaki svojom bojom. Ugradnja takvih posebnih nukleotida zaustavlja daljnju sintezu odsječka te nastaje velik broj odsječaka

različitih veličina. Razdvajanje dobivenih odsječaka uz pomoć elektroforeze po veličini i detekcijom obilježenih nukleotida, pomoću računala, generira se konačna sekvenca (4). Metoda se koristi za otkrivanje supstitucija, insercija i delecija. Međutim, metoda je spora i ne može detektirati trinukleotidna ponavljanja.

*Sekvenciranje sljedeće generacije (NGS)* započinje razbijanjem genomske DNA molekule na manje odsječke, njihovim umnažanjem (PCR) te pripremom virtualne knjižnice svih dobivenih odsječaka. Potom se dodaju nukleotidi te slijedi detekcija ugradnje svakog pojedinog nukleotida u komplementarni lanac odsječka, tj. čitanje sekvence. Konačnu sekvencu genomske DNA slaže računalni program iz svih očitanih sekvenci različitih odsječaka (4). Ova metoda služi za utvrđivanje supstitucija, insercija i delecija, ali nema mogućnost očitavanja trinukleotidnih ponavljanja.

## **1.2. Sekvenciranje sljedeće generacije**

Sekvenciranje nukleinskih kiselina je proces utvrđivanja redoslijeda nukleotida prisutnih u određenoj DNA ili RNA molekuli i predstavlja jednu od osnovnih metoda na kojima počiva genetičko testiranje (7). U posljednjem se desetljeću upotreba sekvenciranja nukleinskih kiselina eksponencijalno povećala jer je, zbog financijske isplativosti, sekvenciranje postalo dostupno istraživačkim i kliničkim laboratorijima diljem svijeta. (8)

Fred Sanger je 1977.godine prvi opisao tehniku dodavanja dideksinukleotida kojom se osim ljudskoga genoma, sekvencirala i većina genoma modelnih organizama. Razvojem automatizacije omogućeno je efikasnije i brže sekvenciranje cijelog genoma, a konačno, 2003.godine uspješno je u potpunosti sekvenciran i ljudski genom (8). Unatoč velikom napretku i robusnoj automatizaciji, sekvenciranje ovom metodom bilo je skupo i sporo, stoga je sekvenciranje čitavog ljudskog genoma trajalo punih 13 godina uz enorman trošak od oko 3 milijarde dolara. Daljnjim napretkom razvijene su nove metode sekvenciranja, nazvane "next-

generation sequencing" odnosno sekvenciranje sljedeće generacije. Njegovim su razvojem značajno smanjeni troškovi te povećana brzina sekvenciranja genoma (9).

Sekvenciranje sljedeće generacije (masivno paralelno sekvenciranje) odnosi se na sekvenciranje DNA molekule, a uključuje nekoliko različitih metoda u kojima se milijuni predložaka (engl. *template*) istodobno sekvenciraju u jednoj reakciji (9).

*Prednosti sekvenciranja sljedeće generacije su:*

- brzina ( omogućava sekvenciranje čitavog genoma u roku kraćem od jednog dana)
- cijena (jeftinije u odnosu na tradicionalne tehnike- sekvenciranje po Sangeru )
- sekvenciranje kompletnog egzoma ili genoma
- potrebna je manja količina DNA molekule u odnosu na sekvenciranje po Sangeru (7).

*Nedostaci i ograničenja sekvenciranja sljedeće generacije su:*

- velika količina dobivenih podataka, čija analiza može biti dugotrajna i kompliciranija u odnosu na sekvenciranje po Sangeru
- potreba za sofisticiranim bioinformatičkim softverima za analizu podataka, kao i brzim računalnim sustavima za pohranjivanje i procesuiranje dobivenih podataka
- komplicirana interpretacija dobivenih rezultata, osobito prilikom analize kliničkih parametara zbog mnogobrojnih varijanti nepoznatog kliničkog značaja.
- iako je jeftinije od sekvenciranja po Sangeru, još uvijek je preskupo za mnoge laboratorije (7).

### *1.2.1. NGS platforme*

U posljednjem je desetljeću razvijeno nekoliko NGS platformi, koje pružaju relativno jeftino masivno paralelno sekvenciranje. Dvije najčešće korištene platforme u istraživačkim i

kliničkim laboratorijima danas jesu Ion Torrent PGM™ (*Life Technologies, Carlsbad, CA*) i MiSeq™ (*Illumina, San Diego, Kalifornija*) (8). Iako konkurentne, obje platforme imaju veoma sličnu specifičnost, produktivnost i osjetljivost (7).

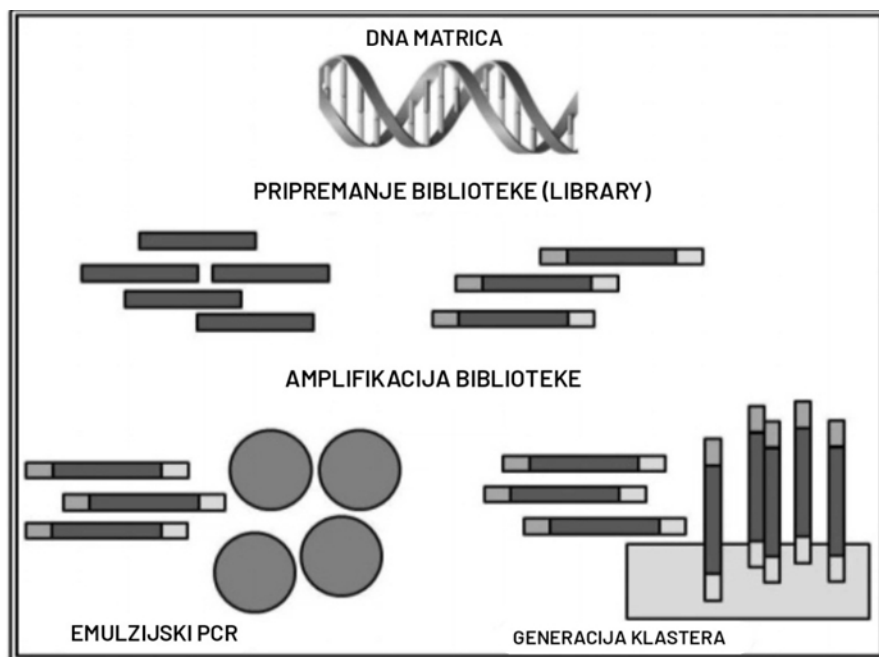
### *1.2.2. Metodologija NGS-a*

Iako je svaka NGS platforma jedinstvena u načinu postizanja sekvenciranja, Ion Torrent PGM i Illumina MiSeq imaju sličnu osnovnu metodologiju, koja uključuje pripremu matrice, sekvenciranje i snimanje te analizu podataka. Unutar svakog generaliziranog koraka, među pojedinim platformama postoje metodološke, koje ih čine jedinstvenim (8).

#### *1.2.2.1. Priprema matrice*

Priprema matrice za sekvenciranje sastoji se od izgradnje virtualne knjižnice (engl. *library*) fragmenata nukleinskih kiselina (DNA ili komplementarne DNA) i njihovog umnožavanja. Knjižnice sekvenciranja se konstruiraju fragmentacijom uzorka DNA (ili cDNA) i vezivanjem adapterskih sekvenci (sintetski oligonukleotidi poznate sekvence) na krajeve fragmenata DNA. Tako nastala knjižnica se klonalno amplicifira (SLIKA 1). Ion Torrent PGM koristi emulzijski PCR na OneTouch sustavu za amplifikiranje pojedinačnih fragmenata biblioteke, dok *Illumina* MiSeq koristi generaciju klastera (7).





**SLIKA 1 – Priprema matrice za NGS**

*Preuzeto:* Lojo-Kadrić N., Pojskić N., Pojskić L.: Laboratorijski tehnologije u molekularnoj biologiji, Fakultet u Sarajevu- Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sarajevo, 2018.

#### 1.2.2.2. Sekvenciranje i snimanje

Sekvenciranje se, kod obje platforme, vrši sintezom na način da fragmenti u knjižnici djeluju kao matrica preko koje je sintetiziran novi DNA fragment. Ciklusima prelijevanja DNA fragmenta suspenzijom DNA polimeraze i nukleotida određenim redoslijedom vrši se sekvenciranje. Kako se nukleotidi ugrađuju u rastući lanac DNA, digitalno se snimaju kao slijed nukleotida. Ion Torrent PGM koristi mjerenje pH vrijednosti nakon svakog ciklusa prelijevanja nukleotidima, dok se *Illumina* MiSeq oslanja na detekciju fluorescencije generirane ugradnjom fluorescentno obilježenih nukleotida u rastući lanac DNA. (8)

### 1.2.2.3. Analiza podataka

Analiza podataka predstavlja najzahtjevniju fazu sekvenciranja, jer se u konačnici, kao rezultat, dobiva velika količina podataka. Za provođenje analize koriste se posebni sofisticirani bioinformatički softveri, kao i posebno educirano osoblje, kvalificirano za rad na takvim softverima. Sekvence moraju proći nekoliko etapa analize, u kojima se uklanjaju adapter sekvence i sekvence niske kvalitete čitanja, kao i poravnanje s referentnom sekvencom ili de novo poravnanje (7).

Svaka analiza sekvenciranog genoma se provodi tako da se sekvenca uspoređuje s referentnim genomom i drugim bazama podataka klinički relevantnih varijanti sekvence (poput ClinVar). Pojam referentnog genoma ili "normalnog" redoslijeda nukleotida označava digitalnu internetsku bazu podataka sastavljenu pomoću sekvenciranja DNA nekoliko zdravih pojedinaca. Stoga, referentni genom ne predstavlja niti jednog pojedinca, već čini mozaik više osoba. Jedinstveni konsenzusni prikaz genoma čovjeka određuje Genome Reference Consortium, a trenutno važeća inačica referentnog genoma je GRCh38.p14 (10). Referentni redoslijed nukleotida u mitohondrijskoj DNA naziva se revidiranom Cambridge referentnom sekvencom (11). Haploidni jezgri genomi sastoji se od  $3,1 \times 10^9$  parova baza, a genom mitohondrija 16.569 parova baza (12,13).

### 1.2.3. Klasifikacija varijanti sekvence prema kliničkom značaju

Zbog iznimnog napretka tehnologije sekvenciranja tijekom prošlog desetljeća i otkrivanja sve većeg broja novih varijanti sekvenci tijekom genetičkog testiranja, pojavila se potreba za razvojem smjernica, koje bi kliničkim laboratorijskim genetičarima olakšale interpretaciju utvrđenih varijanti. Takve smjernice i najrelevantnije standarde propisuju *American College of Medical Genetics and Genomics* i *Association for Molecular Pathology* (14).

Prema navedenim preporukama, postoji pet različitih kategorija varijanti sekvence prema kliničkom značaju. Benigne i vjerojatno benigne varijante sekvence, koje ne predstavljaju uzrok bolesti niti se opisuju u nalazima genetičkog testiranja, označavaju se kao klasa 1 i klasa 2. Vjerojatno patogenu varijantu označava klasa 4, a patogenu klasa 5. Obje predstavljaju mogući uzrok bolesti te se, kao takve, opisuju u nalazima genetičkog testiranja. U navedenim smjernicama definirani su i dodatni kriteriji za razlikovanje klase 1 od klase 2 i klase 4 od klase 5. Najbrojnija, ali ujedno i najzahtjevnija klasa varijanti za interpretaciju je klasa 3, koja označava varijante nejasnog značaja. Naime, za navedenu klasu u trenutku utvrđivanja ne postoji dovoljno dokaza koji bi mogli potvrditi njezinu patogenost i svrstati ju u ostale klase, međutim takve se varijante sekvence opisuju u nalazima genetičkog testiranja s ciljem reinterpretacije za dvije godine. Ipak, ne koriste se u kliničkom donošenju odluka.

#### *1.2.4. Primjena NGS-a u praksi*

Sekvenciranje sljedeće generacije nam omogućuje istraživanje bioloških sustava na sasvim novoj razini, zahvaljujući svojoj iznimnoj brzini i kapacitetu (15). Čini se da je primjena NGS-a gotovo bezgranična, što omogućuje brz napredak u mnogim područjima povezanim s biomedicinskim znanostima. (8)

NGS se dominantno koristi u dijagnostičkom testiranju genskih bolesti, iako se može upotrebljavati i u genomskim probirima u populaciji, primjerice proširenom genomskom probiru nositelja i neinvazivnom prenatalnom testiranju.

#### *1.2.5. Vrste NGS-a u dijagnostičkom genetičkom testiranju*

S obzirom na opseg pretraživanja ljudskog genoma, razlikujemo nekoliko vrsta NGS testiranja. To su sekvenciranje cjelokupnog genoma (eng. *whole genome sequencing* - WGS), sekvenciranje cjelokupnog egzoma (eng. *whole exome sequencing* – WES) i klinički egzom, kojeg čine egzoni odabranih gena, odnosno multigenski paneli (3).

*Sekvenciranje cjelokupnog genoma (WGS)* je vrsta NGS-a koja obuhvaća sve egzone i nekodirajuće regije. Služi za detekciju prisutnosti varijacija u ljudskom genomu, kao što su supstitucije baza, delecije, insercije, inverzije i translokacije. Unatoč brojnim prednostima, zasad se dominantno primjenjuje u znanstvene svrhe, zbog ekonomske neisplativosti u odnosu na metodu kliničkog egzoma (3).

*Sekvenciranje cjelokupnog egzoma (WES)* je metoda koja obuhvaća egzone svih gena. Egzom obuhvaća nešto više od 1% genoma, pa je stoga mnogo isplativiji za sekvenciranje od cijelog genoma. Glavni razlozi zbog kojih bi se pacijent podvrgnuo WES-u umjesto WGS-u su novac i vrijeme (3).

*Klinički egzom* je dijagnostički test, koji utvrđuje postojanje varijanti sekvence u već predodređenim genima, za koje je poznato da njihove promjene utječu na etiologiju bolesti. Važni su za potvrđivanje uputne dijagnoze, personaliziranu terapiju i prognoziranje tijeka bolesti (3). Metoda je brza i financijski pristupačna jer pokriva više regija od interesa, pa tako smanjuje troškove i vrijeme sekvenciranja. Multigeniski paneli ciljaju samo željene genomske regije, žarišta mutacija i uzroke bolesti (8).

#### *1.2.6. Primjena NGS-a na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci*

Sekvenciranje sljedeće generacije, uključujući sekvenciranje kliničkog egzoma, sekvenciranje cijelog egzoma i genoma uvedeno je na Zavod za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci 2017. godine i provodi se u suradnji s Kliničkim institutom za genomsku medicinu u Ljubljani, koji koristi *Illumina* NovaSeq 6000 (*Illumina* Inc) NGS platformu.

Za potrebe dijagnostike NGS metodom provodi se sekvenciranje kliničkog egzoma. Od pacijenata, upućenih iz Kliničkog bolničkog centra Rijeka, uzima se uzorak venske krvi s

EDTA antikoagulansom, potreban za analizu, a prosječno trajanje analize iznosi četiri mjeseca. Nakon dobivanja nalaza, pacijentima se preporuča genetičko savjetovanje, koje se na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku provodi telegenetički ili uživo, u suradnji sa specijalistima medicinske genetike iz Kliničkog instituta za genomsku medicinu u Ljubljani.

## 2. SVRHA RADA

Cilj ovog retrospektivnog istraživanja je bio provesti sveobuhvatnu analizu broja provedenih NGS testova te utvrditi indikacije i rezultate testiranja, provedenih u razdoblju od 2018. do 2021. godine na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta Rijeka. Dodatni cilj istraživanja bio je provesti analizu broja sekvenciranja po *Sangeru*, s obzirom na to da se ono koristi kao metoda u prediktivnom genetičkom testiranju i određivanju statusa nositelja nakon pozitivnog nalaza NGS metode.

Rezultati ove studije pridonijet će donošenju zaključaka temeljenih na dokazima o prikladnosti određenih indikacija za NGS i posljedičnog unaprjeđenja dijagnostičkog učinka ove metode u kliničkoj praksi.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

U svrhu pisanja ovog rada provedena je retrospektivna studija koja obuhvaća vremensko razdoblje od 2017. do 2021. godine. Tijekom 2017. godine te u siječnju, veljači i ožujku 2018. godine radilo se na uspostavi sustava te su se, u tu svrhu, organizirale brojne edukacije i razgovori s kliničarima. U retrospektivno istraživanje uključena su 134 pacijenta, liječena u Kliničkom bolničkom centru Rijeka, koji su s određenom indikacijom upućeni na genetičko testiranje metodom NGS u razdoblju od travnja 2018. do prosinca 2021. godine.

Kao izvor podataka korištena je medicinska dokumentacija molekularno -genetičkog laboratorija Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Informacije koje su se koristile za analizu su indikacija za genetičko testiranje, metoda testiranja i nalaz pretrage (uzročni gen, promjena transkripta, vrsta varijante sekvence, zigotnost i konačna dijagnoza). Svi podaci su uneseni u Microsoft Office Excel program, gdje su pripremljeni za daljnju statističku obradu.

#### **3.1. Statistička analiza**

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program Excel for Windows i Statistica for Windows inačica 13.3 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD). U analizi su korištene metode deskriptivne statistike. Razlike u učestalosti kategoričkih varijabli izračunate su koristeći Hi-kvadrat ( $X^2$ ) test. Statistički značajna razlika postavljena je na  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ukupan broj pretraga

U razdoblju od travnja 2018. do prosinca 2021. godine u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci provedene su ukupno 134 pretrage. Njih 56/134 (42 %) indicirano je od strane neurologa, 54/134 (40 %) od strane pedijatarata, dok su u 24/134 (18 %) slučajeva indikacije pristizale iz područja drugih specijalizacija poput kardiologije, ginekologije, oftalmologije i gastroenterologije. U 118/134 (88 %) slučajeva radilo se o dijagnostičkom testiranju NGS metodom. U preostalih 16/134 (12 %) slučajeva prediktivno testiranje i određivanje statusa nositelja se provodilo metodom sekvenciranja po *Sangeru*, kojom su testirani članovi obitelji pacijenata, čiji su rezultati NGS testiranja bili pozitivni. Od navedenih 16 slučajeva, u 6 (37 %) je provedeno prediktivno testiranje, dok se u 10 (63 %) slučajeva radilo o određivanju statusa nositelja.

Broj provedenih dijagnostičkih pretraga po godinama prikazan je u tablici 1. Najveći broj pretraga učinjen je u 2020. godini (48). Od 2018. godine broj pretraga raste za 425 % u 2019. godini, od 2019. do 2020. za 141 %, te od 2020. do 2021. pada za 8 %. Unatoč rastu ukupnog broja naručenih pretraga po godinama, nema statistički značajne razlike po godinama u broju naručenih NGS testova ( $X^2=0,08$ ,  $P=0,994$ ), sekvenciranja po *Sangeru* ( $X^2=0,15$ ,  $P=0,985$ ), kao niti promjene u omjeru broja naručenih NGS testova i sekvenciranja po *Sangeru* ( $X^2=0,22$ ,  $P=0,975$ ).



**Tablica 1.** Broj provedenih genetičkih testiranja metodama NGS i sekvenciranja po Sangeru, po godinama, na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku u Rijeci

<b>Broj pretraga</b>				
<b>Godina</b>	<b>Ukupno N (%)</b>	<b>NGS N (%)</b>	<b>Sanger N (%)</b>	<b>X<sup>2</sup>, P</b>
<b>2018.</b>	8 (6)	8 (100)	0 (0)	0,22; 0,975
<b>2019.</b>	34 (25)	29 (85)	5 (15)	
<b>2020.</b>	48 (36)	42 (88)	6 (12)	
<b>2021.</b>	44 (33)	39 (89)	5 (11)	
<b>Ukupan broj:</b>	<b>134 (100)</b>	<b>118 (88)</b>	<b>16 (12)</b>	

#### 4.2. Omjer pozitivnih i negativnih nalaza testiranja pomoću NGS metode

Od sveukupnog broja provedenih testiranja, pomoću NGS metode, pozitivni rezultati (u kojima je pronađena određena varijanta nejasnog značaja, patogena ili vjerojatno patogena varijanta sekvence) dobiveni su u 53/118 (45 %) slučajeva, dok u 65/118 (55 %) slučajeva genetička aberacija nije pronađena. Nadalje, broj pozitivnih i negativnih nalaza po godinama prikazan je u tablici 2, a broj pozitivnih i negativnih nalaza ne mijenja se kroz godine ( $X^2=0,11$ ,  $P=0,990$ ).

**Tablica 2.** Broj pozitivnih i negativnih nalaza u usporedbi s ukupnim brojem traženih NGS pretraga

<b>Godina</b>	<b>Broj ukupno traženih NGS pretraga N (%)</b>	<b>Broj negativnih nalaza N (%)</b>	<b>Broj pozitivnih nalaza N (%)</b>	<b>X<sup>2</sup>, P</b>
<b>2018.</b>	8 (7)	4 (50)	4 (50)	0,11; 0,990
<b>2019.</b>	29 (25)	16 (55)	13 (45)	
<b>2020.</b>	42 (35)	23 (55)	19 (45)	
<b>2021.</b>	39 (33)	22 (56)	17 (44)	
<b>Ukupan broj:</b>	<b>118 (100)</b>	<b>65 (55)</b>	<b>53 (45)</b>	

#### 4.2.1. Analiza varijanti sekvenci u pozitivnih rezultata

Pozitivni rezultati potvrđeni su u 53/118 (45 %) slučajeva. Od toga, varijante nejasnog značaja (klasa 3) identificirane su u 13/53 (24 %) slučajeva, dok su vjerojatno patogene i patogene varijante (klasa 4 i 5) utvrđene u 40/53 (76 %) slučajeva. U tablici 3 prikazani su pozitivni rezultati po godinama. Nema statistički značajne razlike između broja utvrđenih varijanti nejasnog značaja i vjerojatno patogenih i patogenih varijanti sekvence po godinama ( $X^2=0,11$ ,  $P=0,990$ ).

**Tablica 3.** Broj varijanti nejasnog značaja i (vjerojatno) patogenih varijanti s obzirom na broj pozitivnih nalaza

Godina	Broj pozitivnih nalaza N (%)	Varijanta nejasnog značaja (klasa 3) N (%)	Vjerojatno patogena varijanta (klasa 4) N (%)	Patogena varijanta (klasa 5) N (%)
<b>2018.</b>	4 (8)	1 (25)	1 (25)	2 (50)
<b>2019.</b>	13 (24)	5 (38)	1 (8)	7 (54)
<b>2020.</b>	19 (36)	6 (32)	6 (32)	7 (37)
<b>2021.</b>	17 (32)	1 (6)	6 (35)	10 (59)
<b>Ukupan broj:</b>	<b>53 (100)</b>	<b>13 (25)</b>	<b>14 (26)</b>	<b>26 (49)</b>

#### 4.2.2. Indikacije za NGS pretragu

U vremenskom intervalu od 2017. do 2021. godine, od ukupno provedenih 118 NGS testiranja, najčešće indikacije bile su neuromišićne bolesti i to u 48/118 (41 %) slučajeva, zatim kardiomiopatije u 23/118 (19 %) slučajeva, multiple prirođene anomalije u 18/118 (15 %) slučajeva te ostale indikacije u 29/118 (25 %) slučajeva.

4.2.3. *Analiza potvrđenih indikacija u nalaza s patogenim i vjerojatno patogenim varijantama sekvence*

S obzirom na ukupan broj nalaza s patogenim i vjerojatno patogenim varijantama sekvence, uputna dijagnoza potvrđena je u 40/53 (75 %) slučajeva. Nema statistički značajne razlike u potvrđenim i promijenjenim dijagnozama po godinama ( $X^2= 5,07$ ,  $P=0,167$ ).

**Tablica 4.** Rezultati pozitivnih nalaza i broj potvrđenih i promijenjenih uputnih dijagnoza s obzirom na broj pozitivnih nalaza

Godina	Broj pozitivnih nalaza N (%)	Broj potvrđenih uputnih dijagnoza N (%)	Broj promijenjenih uputnih dijagnoza N (%)	$X^2$ , P
2018.	4 (8)	3 (75)	1 (25)	5,07; 0,167
2019.	13 (24)	8 (62)	5 (38)	
2020.	19 (36)	13 (68)	6 (32)	
2021.	17 (32)	16 (94)	1 (6)	
<b>Ukupan broj:</b>	<b>53 (100)</b>	<b>40 (75)</b>	<b>13 (25)</b>	

4.2.4. *Analiza indikacija u negativnim nalazima*

Najčešće indikacije koje nisu bile potvrđene bile su neuromišićne bolesti i to u 31/65 (48 %) slučajeva, kardiomiopatije u 15/65 (23 %) slučajeva te pozitivna obiteljska anamneza neuroloških bolesti u 6/65 (9 %) slučajeva. Ostale indikacije javljale su se sporadično, u 13/65 (20 %) slučajeva.

### 4.3. Omjer pozitivnih i negativnih nalaza testiranja pomoću sekvenciranja po *Sangeru*

U tablici 6. prikazan je broj pozitivnih i negativnih nalaza u usporedbi s ukupnim brojem traženih pretraga pomoću metode sekvenciranja po *Sangeru*. Od sveukupnog broja provedenih testiranja, pozitivni nalazi utvrđeni su u 8/16 (50 % slučajeva). Najveći broj pretraga učinjen je 2020. godine, kad je dobiveno najviše pozitivnih rezultata. Najviše negativnih rezultata dobiveno je 2019. godine. Broj pozitivnih i negativnih nalaza ne mijenja se statistički značajno po godinama ( $X^2=2,67$ ,  $P=0,264$ ). Određivanje statusa nositelja provedeno je u 10/16 (63 %) slučajeva, a prediktivno testiranje je izvršeno u 6/16 (37 %) slučajeva.

Najčešće indikacije bile su pozitivna obiteljska anamneza neuroloških bolesti u 10/16 (63 %) slučajeva te pozitivna obiteljska anamneza kardiomiopatija u 4/16 (25 %) slučajeva. Ostale indikacije pojavile su se sporadično u 2/16 (12 %) slučajeva.

**Tablica 5.** Broj pozitivnih i negativnih nalaza u usporedbi s ukupnim brojem traženih pretraga pomoću metode sekvenciranja po *Sangeru*

Godina	Broj ukupno traženih pretraga sekvenciranja po <i>Sangeru</i>	Broj negativnih nalaza N (%)	Broj pozitivnih nalaza N (%)	$X^2$ , P
2018.	0	0	0	2,67; 0,264
2019.	5 (31)	4 (80)	1 (20)	
2020.	6 (38)	2 (33)	4 (67)	
2021.	5 (31)	2 (40)	3 (60)	
<b>Ukupan broj:</b>	<b>16 (100)</b>	<b>8 (50)</b>	<b>8 (50)</b>	

## **5. RASPRAVA**

Sekvenciranje sljedeće generacije postaje sve važnija dijagnostička metoda u brojnim medicinskim specijalizacijama, kao što su pedijatrija, ginekologija i porodništvo te neurologija i interna medicina. Sve veća dostupnost genetičkih testova otkriva i važna pitanja, kao što su pravilna uporaba i pravilna indikacija genetičkog testiranja.

Izuzev karakteristika koje ima svaki laboratorijski test, genetički test posjeduje i određene posebnosti. Za razliku od većine laboratorijskih pretraga, nalaz genetičkog testiranja je konačan; utvrđena promjena ostaje u nasljednom zapisu čitav život. Nadalje, u određenim slučajevima, ta promjena zahvaća i članove obitelji, a može se prenijeti i na buduće potomstvo. Primjena genetičkog testiranja je vrlo kompleksna, jer zahtjeva postavljanje racionalnih indikacija, izbor adekvatnog testa, pravilnu interpretaciju rezultata te dobro poznavanje ograničenja i specifičnosti testa, kao i etičkih, zakonitih i socijalnih odrednica testiranja (2).

S obzirom na složenost, ograničenja, i dugotrajne napore za interpretaciju podataka dobivenih NGS metodom, ključan je odabir bolesnika s odgovarajućim indikacijama za testiranje. Stoga je cilj ove retrospektivne studije provođenje sveobuhvatne analize broja pretraga, indikacija i rezultata NGS testiranja, koje se provodi od 2017. godine na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku u Rijeci, u suradnji sa Kliničkim institutom za medicinsku genetiku u Ljubljani.

### **5.1. Ukupan broj pretraga**

Tijekom 2017. godine uvedena je NGS pretraga te su provedene brojne pripreme u svrhu njezina provođenja. U razdoblju od travnja 2018. do prosinca 2021. godine u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci provedena su 134 genetička testiranja i to 118

dijagnostičkih testiranja pomoću NGS metode te 16 sekvenciranja po Sangeru, za članove obitelji pacijenata, čiji su rezultati NGS testiranja bili pozitivni. Sekvenciranjem po Sangeru dominantno se, prema dobivenim rezultatima, određivao status nositelja (63 % slučajeva), tj. utvrđivala se prisutnost recesivnih mutacija u heterozigotnom stanju kod zdravih osoba kod kojih postoji veća mogućnost za postojanje mutacije zbog pozitivne obiteljske anamneze. U manjem broju slučajeva, tom se metodom provodilo prediktivno genetičko testiranje (37 %), koje se provodi prije pojave znakova bolesti u zdravih pojedinaca, s velikim obiteljskim rizikom za nasljeđivanje bolesnog gena.

Naši rezultati pokazuju kako dolazi do porasta broja dijagnostičkih NGS testiranja tijekom godina. Od 2018. godine broj pretraga raste za 425 % u 2019. godini, od 2019. do 2020. za 141 %, te od 2020. do 2021. pada za 8 %, što upućuje na bolju osviještenost i osjetljivost kliničara prema pacijentima s genetičkim poremećajima. Međutim, ukupan udio NGS pretraga i sekvenciranja po *Sangeru*, po godinama nije statistički značajno različit.

Slični rezultati dobiveni su i retrospektivnom studijom dijagnostičkog sekvenciranja sljedeće generacije u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Sveučilišta u Minnesoti, u vremenskom periodu od kolovoza 2012. do prosinca 2017. godine. Ukupno je provedeno 2509 pretraga, a najveći porast broja zaprimljenih uzoraka i obavljenih pretraga uočen je tijekom prve tri godine od implementacije NGS testiranja. Od 2012. godine broj pretraga raste za 328 % u 2013. godini, od 2013. do 2014. za 195 %, te od 2014. do 2015. za 133 %. Od 2015. godine broj provedenih pretraga se stabilizirao (16).

## **5.2. Omjer pozitivnih i negativnih nalaza testiranja pomoću NGS metode**

Nažalost, rezultati ukazuju kako je većina nalaza dobivenih NGS pretragom tijekom svih pet godina zapravo negativna. Negativni rezultati utvrđeni su u 65/118 (55 %) slučajeva. Tijekom 2018. godine utvrđena su 4 takva nalaza, 2019. njih 16, 2020. nađeno je njih 23, a

2021. godine 22 negativna nalaza, što upućuje na važnost i potrebu dodatne edukacije kliničara za prepoznavanje pacijenata s genetičkim poremećajima.

Nadalje, od sveukupno 118 provedenih NGS testiranja, pozitivni rezultati dobiveni su u 53/118 (45 %) slučajeva. Naši rezultati pokazuju da su većinom (u 34% slučajeva) identificirane vjerojatno patogene i patogene varijante (klasa 4 i 5), dok su u malom broju slučajeva (11 %) nađene varijante nejasnog značaja (klasa 3), što je posljedica napretka i dostupnosti velikog broja genetičkih informacija, koje omogućuju precizniju klasifikaciju rijetke varijante.

U usporedbi s prethodno spomenutom retrospektivnom studijom, provedenom u Minnesoti, rezultati su slični. Prema tom istraživanju, pozitivni nalazi utvrđeni su u 34 % slučajeva, a varijante nejasnog značaja potvrđene su u 9,56 % slučajeva, s time da se udio varijanti nejasnog značaja u dobivenim rezultatima, tijekom godina smanjivao (16).

### **5.3. Indikacije za NGS pretragu i analiza potvrđenih i promijenjenih indikacija**

Iz tablice 4. vidljivo je kako je s obzirom na broj pozitivnih rezultata, potvrđeno 40/53 (75 %) uputnih dijagnoza. U manjem broju slučajeva (25 %) došlo je do promjene uputne dijagnoze nakon pristizanja rezultata NGS testiranja.

Međutim, uspoređujući broj potvrđenih i promijenjenih dijagnoza s obzirom na broj ukupno traženih pretraga (tablica 5.) uviđa se kako je ispravna indikacija za NGS testiranje postavljena u relativno malom broju slučajeva (34 %).

Najčešće indikacije za NGS testiranje na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku u Rijeci bile su neuromišićne bolesti (distonije, neuropatije), kardiomiopatije ( sindrom dugog QT intervala, Brugada sindrom) te multiple prirođene anomalije. Od ostalih indikacija, koje su se pojavljivale sporadično, moguće je izdvojiti prirođene metaboličke bolesti, senzorne

poremećaje (vida i sluha), poremećaje rasta, pozitivnu obiteljsku anamnezu na neurološke bolesti i nasljedne oblike raka te koagulopatije i pobačaje.

Iako su najčešći razlog upućivanja na NGS testiranje, neuromišićne bolesti, kao i pozitivna obiteljska anamneza neuroloških bolesti bile su najučestalije indikacije koje nisu potvrđene i to u čak 37/65 (57 %) slučajeva. Također, uputna dijagnoza kardiomiopatija nije potvrđena u 15/65 (23 %) slučajeva. Dobiveni rezultati upućuju na važnost edukacije unutar specifičnih specijalizacija, kao što su neurologija i pedijatrijska kardiologija, odakle je prispjelo najviše pacijenata upućenih na dijagnostičko testiranje NGS metodom, a najveći broj indikacija nije potvrđen.

Najčešće potvrđene uputne dijagnoze bile su multiple prirodene anomalije, poremećaji rasta te prirodene metaboličke bolesti (30 % potvrđenih dijagnoza), što upućuje na povećanu svijest pedijatara u prepoznavanju tih poremećaja.

Rezultati retrospektivne studije provedene u Minnesoti također pokazuju da je najveći broj zahtjeva za dijagnostičko testiranje NGS metodom pristigao od neurologa i pedijatara, međutim specijalizacije s najvećom dijagnostičkom točnosti bile su dermatologija i oftalmologija (16).

Važnost naše studije istaknuta je kroz dokazivanje kako široka dostupnost genetičkog testiranja i njegova primjena u svakodnevnoj kliničkoj praksi zahtijeva poznavanje kompleksnosti upotrebe genetičkog testiranja, jer je osim racionalne indikacije, važan i izbor odgovarajućeg testa, pravilna interpretacija rezultata te njihove etičke i socijalne odrednice. Stoga je nužno osigurati adekvatnu edukaciju iz medicinske genetike širim medicinskim krugovima, kako bi osposobili liječnike za pravovremeno prepoznavanje i liječenje pacijenata s genetičkim poremećajima, na korist svih koji sudjeluju u procesima dijagnostike i liječenja.



## 6. ZAKLJUČAK

Nakon provedene retrospektivne studije dijagnostičkog sekvenciranja sljedeće generacije na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci u razdoblju od 2018. do 2021. godine, zaključci su sljedeći:

- Sekvenciranje sljedeće generacije, uključujući sekvenciranje kliničkog egzoma te sekvenciranje cijelog egzoma i genoma uvedeno je na Zavod za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci 2017. godine i provodi se u suradnji s Kliničkim institutom za genomsku medicinu u Ljubljani. Tijekom 2017. godine radilo se na uspostavi sustava te su se, u tu svrhu, organizirale brojne edukacije i razgovori s kliničarima.
- Od travnja 2018. do prosinca 2021. provedeno je 118 NGS testiranja, a pozitivan rezultat (varijante sekvence 3-5) je potvrđen u 53 (45 %) slučajeva.
- Dobiveni rezultati ukazuju na porast broja provedenih dijagnostičkih NGS testiranja tijekom promatranog razdoblja. Najveći broj pretraga učinjen je u 2020. godini (48). Od 2018. godine broj pretraga raste za 425 % u 2019. godini, od 2019. do 2020. za 141 %, te od 2020. do 2021. pada za 8 %.
- Najčešće indikacije za testiranje bile su neuromišićne bolesti (41 %), kardiomiopatije (19 %) i višestruke kongenitalne anomalije (15 %).
- Od ukupnog broja pozitivnih nalaza (53) potvrđeno je 75 % uputnih dijagnoza, a s obzirom na broj ukupno traženih pretraga, ispravna indikacija za NGS testiranje je postavljena u samo 34 % slučajeva.
- Nažalost, veliki broj pogrešnih indikacija za genetičko testiranje upućuje na nužnost genetičke edukacije kliničara, s ciljem senzibilizacije i osposobljavanja liječnika za pravovremeno prepoznavanje i liječenje pacijenata s genetičkim poremećajima.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*; NGS) postaje sve važnija dijagnostička metoda u brojnim medicinskim specijalizacijama. Cilj ovog istraživanja bio je provesti sveobuhvatnu analizu broja NGS testova te utvrditi indikacije i rezultate testiranja provedenih na Medicinskom fakultetu u Rijeci od uvođenja te dijagnostičke metode.

**Materijali i metode:** Ovom retrospektivnom studijom obuhvaćeno je vremensko razdoblje od 2017. do 2021. godine, a uključuje analizu uputnih dijagnoza i rezultata NGS testova pacijenata, upućenih iz Kliničkog bolničkog centra Rijeka na genetičko testiranje na Medicinski fakultet u Rijeci. NGS je izveden u suradnji s Kliničkim institutom za medicinsku genetiku u Ljubljani (Slovenija), koristeći Illumina NovaSeq 6000 (Illumina Inc.).

**Rezultati:** Tijekom 2017. godine radilo se na uspostavi sustava te su se, u tu svrhu, organizirale brojne edukacije i razgovori s kliničarima. Od travnja 2018. do prosinca 2021. godine je provedeno ukupno 118 dijagnostičkih NGS-a, od čega 8 u 2018. (7 %), 29 u 2019. (25 %), 42 u 2020. (35 %) i 39 u 2021. godini (33 %). Od 2018. godine broj pretraga raste za 425 % u 2019. godini, od 2019. do 2020. za 141 %, te od 2020. do 2021. pada za 8 %. Najčešće indikacije za testiranje bile su neuromišićne bolesti (41 %), kardiomiopatije (19 %) i multiple prirođene anomalije (15 %). Pozitivni rezultati dobiveni su u 53/118 (45 %) slučajeva, od kojih je utvrđeno 14 (26 %) vjerojatno patogenih i 26 (49 %) patogenih varijanti sekvence te 13 (25 %) varijanti nejasnog značaja. U 65/118 (55 %) slučajeva nije pronađena genetička aberacija. Od ukupnog broja pozitivnih nalaza, potvrđeno je 75 % uputnih dijagnoza te samo 34 % od ukupnog broja nalaza.

**Zaključak:** Dobiveni rezultati ukazuju na porast broja provedenih dijagnostičkih NGS testiranja u razdoblju od 2017. do 2021. godine, što odražava povećanu svijest kliničara o

potrebi genetičkog testiranja u kliničkoj praksi. Nažalost, veliki broj pogrešnih indikacija za genetičko testiranje upućuje na nužnost genetičke edukacije kliničara, u svrhu boljeg dijagnostičkog učinka.

**Ključne riječi:** genetička edukacija, genetičko testiranje, sekvenciranje sljedeće generacije

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Next generation sequencing (NGS) is becoming increasingly important in numerous medical specialties. The aim of this study was to determine the number, indications and results of diagnostic NGS tests performed at the Faculty of medicine in Rijeka, Croatia since its implementation.

**Materials and Methods:** A retrospective study was performed from 2017 to 2021 and included the analysis of referral diagnoses and NGS test reports of patients who were referred to the Faculty of Medicine in Rijeka for diagnostic NGS testing from Clinical Hospital Center Rijeka. NGS was performed in collaboration with the Clinical Institute of Genomic Medicine in Ljubljana (Slovenia), using Illumina NovaSeq 6000 (Illumina Inc).

**Results:** During 2017 was worked on the establishment of the system, and for this purpose, numerous educations and interviews with clinicians were organized. From April 2018 to December 2021, a total of 118 diagnostic NGS were performed, including 8 in 2018 (7 %), 29 in 2019 (25 %), 42 in 2020 (35 %) and 39 in 2021 (33 %). From 2018, the number of NGS testing increase by 425% in 2019, from 2019 to 2020 by 141%, from 2020 to 2021 it decrease by 8%. The most common indications for testing were neuromuscular diseases (41 %), cardiomyopathies (19 %) and multiple congenital anomalies (15 %). Positive test results were obtained in 53/118 (45 %) cases in whom likely pathogenic (26 %) or pathogenic sequence variants (49 %) were determined. Class 3 sequence variants were identified in 13 (11 %) cases. In 65/118 (55 %) cases no genetic aberration could be found. Out of the total number of positive findings, 75 % of referral diagnoses were confirmed and only 34% of the total number of findings.

**Conclusion:** Our results show an increase in the number of diagnostic NGS tests from 2017 to 2021, which reflects the increased awareness of clinicians for the need of genomic testing in

clinical practise. Unfortunately, the large number of incorrect indications for genetic testing, indicates that genetic education of clinicians is needed for an improved diagnostic yield.

**Keywords:** genetic education, genetic testing, next generation sequencing

## 10. LITERATURA

- (1) Čargonja P. Usporedba znanja i stavova o medicinskoj genetici u studenata Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci prije i nakon edukacije iz istoimenog obaveznog kolegija [Internet]. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2020. [citirano 28.05.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:013936>
- (2) Rudolf G, Peterlin B. DNA testiranje u medicini. Medicina [Internet]. 25.5.2009. [citirano 28.05.2022.]; 2009;45(1):38-43. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/34687>
- (3) Jurković I. Genetsko testiranje u pedijatrijskoj neurologiji [Internet]. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2020. [citirano 08.06.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:438985>
- (4) Pereza N. i sur. Priručnik s prikazima slučajeva iz medicinske genetike za studente pete godine integriranog preddiplomskog i diplomskog sveučilišnog studija Medicina. 1. izd. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2020.
- (5) Vraneković J. Primjena tehnika molekularne citogenetike u detekciji kromosomskih promjena. Medicina [Internet]. [citirano 29.05.2022.]; 2004;42(4):247-55. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:749526>
- (6) Barbalić M. Prenatalna dijagnostika [Internet] Split. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu [citirano: 08.06.2022.] Dostupno na: [https://neuron.mefst.hr/docs/katedre/biologija/Prenatalna%20dijagnostika\\_nastavni%20text\\_Maja%20Barbali%C4%87.pdf](https://neuron.mefst.hr/docs/katedre/biologija/Prenatalna%20dijagnostika_nastavni%20text_Maja%20Barbali%C4%87.pdf)
- (7) Lojo-Kadrić N, Pojskić N, Pojskić L. Laboratorijske tehnologije u molekularnoj biologiji. Sarajevo: Fakultet u Sarajevu- Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju; 2018.

- (8) Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *J Invest Dermatol* [Internet]. [citirano 29.05.2022.]; 2013;133(e11). Dostupno na: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)36383-1/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)36383-1/fulltext)
- (9) Gunjača, Ivana, prevoditeljica. Sekvenciranje sljedeće generacije. U: Cooper GM, Hausman RE. *The Cell- A Molecular Approach*, 7. ed [Internet]. Sunderland: Sinauer; 2016. str. 164-167. [citirano 30.05.2022.] Dostupno na: [https://neuron.mefst.hr/docs/katedre/biologija/NGS\\_Cooper\\_prijevod.pdf](https://neuron.mefst.hr/docs/katedre/biologija/NGS_Cooper_prijevod.pdf)
- (10) Genome Reference Consortium [Internet]. Genome Reference Consortium; 2022 [citirano 08. 06. 2022.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc>
- (11) Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers LN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* [Internet]. 10. 1999. [citirano 08. 06. 2022.]; 1999;23(10):147. Dostupno na: [https://www.nature.com/articles/ng1099\\_147](https://www.nature.com/articles/ng1099_147)
- (12) Human assembly and gene annotation. U: Ensembl [Internet]. Hinxton: Ensembl; 2022. [citirano: 08.06.2022.] Dostupno na: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Annotation](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Annotation)
- (13) Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* [Internet]. 01. 05. 2005. [citirano 08. 06. 2022.]; 2005;6(5):389-402. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/nrg1606>
- (14) Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J i sur. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [Internet][citirano: 11.06.2022.] *Genetics in Medicine*. 2015 May;17(5):405-24. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25741868/>

- (15) Kemomed d.o.o: Sekvenciranje nove generacije [Internet]. Zagreb: Kemomed d.o.o.; 2022. [citirano 30.05.2022.] Dostupno na: <http://kemomed.si/hr/products/2-oprema-i-urezaji/22-Illumina/195-Sekvenciranje>
- (16) Hartman P, Beckman K, Silverstein K, Yohe S, Schomaker M, Henzler C, et al. Next generation sequencing for clinical diagnostics: Five year experience of an academic laboratory. Mol Genet Metab Rep [Internet]. 01.03. 2019. [citirano 08.06.2022.]; 2019; 19: 100464. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6403447/>



## 11. ŽIVOTOPIS

Željka Poslon rođena je 12. rujna 1996. u Zagrebu. Obrazovanje započinje u Osnovnoj školi Augusta Cesarca u Krapini, a zatim upisuje opću gimnaziju u Srednjoj školi Krapina. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisuje *Integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine* na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Tijekom fakultetskog obrazovanja demonstrira na *Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku, Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Zavodu za opću patologiju i patološku anatomiju* te *Katedri za internu medicinu*. Koautorica je dva kongresna priopćenja na Međunarodnom kongresu „*4th International congress of multidisciplinary studies in medical sciences*“ (Antalya, Turska) i *Osječkom studentskom kongresu- OSCON 2022*, međunarodnom kongresu translacijske medicine studenata i mladih liječnika. Od 2016. volontira u sklopu projekta *Bolnica za medvjediće*, čija je temeljna ideja kroz igru približiti medicinsku okolinu djeci, otklanjajući eventualne nelagodnosti i strahove. Od 2021., kao student genetički edukator, sudjeluje u projektu *Slagalica nasljeđa*, čiji je cilj upoznati djecu s osnovnim pojmovima genetike, principima nasljeđivanja i važnosti poštivanja različitosti između ljudi i drugih živih bića. Kao koautorica objavljuje dva znanstvena članka (izvorni znanstveni članak i uvodnik) u znanstvenom časopisu *Frontiers in Genetics* te u svibnju, 2022. godine dobiva Rektorovu nagradu za studentski znanstveni rad u kategoriji biotehničkih znanosti te medicine i zdravstva.