

Racionalni pristup suvremenoj genetskoj dijagnostici

Sanda Huljev Frković^{1,2}

Mogućnosti genetskog testiranja veće su nego ikada ranije zahvaljujući brzom razvoju tehnologija, novim spoznajama, dostupnosti i sve manjim troškovima. Ova ekspanzija znanja i mogućnosti značajno je promijenila i naš pristup dijagnostici, od toga koga testiramo, kada i na koji način, te kako tumačimo dobivene rezultate. Navedeno utječe na indikacije za testiranje, odabir metode testiranja radi postavljanja dijagnoze, te mogućnosti procjene genetskih rizika za učestale kompleksne bolesti, što u konačnici osigurava personaliziranu skrb o svakom bolesniku. Iako su nove metodologije postale izbor za dijagnosticiranje većine genetskih stanja, ne treba zaboraviti da u određenim situacijama tradicionalne tehnike još uvijek predstavljaju vrlo učinkovit alat, kada je primijenjen na pravi način. U skladu s tim, nezaobilazna je uloga genetičara u procesu dijagnostike, od postavljanja radne dijagnoze na temelju anamneze, kliničkog statusa, dosadašnjeg tijeka bolesti te nalaza ranije učinjene obrade, zatim preporuke adekvatnog genetskog testa i razumijevanja njegovih prednosti i ograničenja, do pravilnog tumačenja nalaza bitnih za budućnost pacijenta i njegove obitelji.

Ključne riječi: GENETIKA; GENETSKO TESTIRANJE; SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE; PERSONALIZIRANA MEDICINA; GENETSKO SAVJETOVANJE

Otkrivanje genetskog uzroka neke bolesti može imati značajan utjecaj na praćenje i liječenje pacijenata. Genetski potvrđena dijagnoza otklanja psihičku neizvjesnost zahvaćenih obitelji koje ponekad dugo tragaju za uzrokom bolesti. Na tom putu pacijenti često bivaju izloženi brojnim, često i nepotrebnim, dijagnostičkim procedurama. Ponekad je odgovor na pitanje “zašto” primarna motivacija obitelji za provođenje genetskog testiranja. Precizna dijagnoza omogućuje usmjerenu skrb na specifično stanje, a može biti vrlo važna i u otkrivanju skrivenih ili očekivanih komorbiditeta. Osiguravanje genetske dijagnoze omogućuje i pravilno genetičko informiranje, procjenu rizika ponavljanja bolesti, utvrđivanje mogućih nositelja

te savjetovanje vezano za reproduktivne opcije i planiranje obitelji. Definitivna dijagnoza također omogućuje pacijentima s rijetkim bolestima i njihovim obiteljima uključivanje u mrežu potrebne podrške u zajednici, u našoj zemlji, ali i u cijelom svijetu (1, 2).

Razvoj tehnika genetskog testiranja promijenio je pristup pacijentu u kliničkoj praksi, u smislu odmicanja od tradicionalnog pristupa postavljanja dijagnoze temeljenog na fenotipu i značajnijeg oslanjanja na različite tehnologije analize genotipa. Ipak, odabir pravog genetskog testa ili dijagnostičkog pristupa može predstavljati izazov, a krivi izbor dovesti do dugotrajnog čekanja na točnu

¹KBC Zagreb, Klinika za pedijatriju, Zavod za genetiku i bolesti metabolizma

²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

dijagnozu ili čak do propuštene dijagnostičke prilike (2).

Prije petnaestak godina, nasuprot ranije korištenoj standardnoj ili klasičnoj kariotipizaciji, u praksi i preporuke za dijagnostiku uvedena je molekularna kariotipizacija metodom komparativne hibridizacije genoma na mikromreži (*aCGH* ili *arrayCGH*, engl. *comparative genomic hybridization*). Ova molekularna metoda analize kromosoma omogućila je na razini cijelog genoma određivanje malih delecija (manjka) ili duplikacija (viška) određenog odsječka DNA koje nazivamo varijante u broju kopija (CNV, engl. *copy number variations*). CNV-ovi su premali da bi bili vidljivi pod mikroskopom standardnim pruganjem kromosoma, koje nam je omogućavalo detekciju promjena veličine iznad 5 do 10 Mb (3, 4). *ArrayCGH*, kao tehnika visoke rezolucije s mogućnošću detekcije promjena od oko 10 do 20 kb, značajno je pridonijela postavljanju dijagnoze, posebno u skupinama pacijenata s razvojnim poremećajem, dismorfijom i prirođenim anomalijama, točnije 15 do 20 % u odnosu na klasičnu kariotipizaciju i njen učinak od 3 do 5 % (2, 5). Metoda *aCGH* je prije više od deset godina bila prvi izbor u preporukama za genetsko testiranje osoba s navedenim stanjima uključujući i izolirani autizam (5,6, 7). Vrsta *array* s dodatkom proba koje obuhvaćaju polimorfizme jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*), tzv. *SNP array*, može osim detekcije CNV-a detektirati i gubitak heterozigotnosti (LOH, engl. *loss of heterozygosity*), uniparentalnu disomiju (UPD, engl. *uniparental disomy*) i poliploidiju (3, 4). Značenje promjena nađenih *array* metodom tumači se u skladu s veličinom odstupanja, kliničkom slikom, obuhvaćenim genima, informacijama iz baza podataka i literaturom (2, 3). Pronalazak promjene u broju kopija nejasnog kliničkog značenja ili izvan kliničke indikacije izazov je u tumačenju nalaza, o čemu će biti govora u nastavku teksta vezano za interpretaciju nalaza varijanti dobivenih sekvenciranjem.

Kliničar koji indicira *aCGH* treba biti svjestan što je moguće, a što nije moguće vidjeti ovom metodologijom analize kromosoma, koja se vrsta *arraya* koristi u laboratoriju u koji se šalje uzorak te, radi interpretacije dobivenih rezultata i njihovog značenja, dostaviti detaljnu medicinsku dokumentaciju. Metoda molekularne kariotipizacije ne može otkriti uravnotežene promjene kromosoma kao

što su balansirane translokacije ili inverzije, ne može se utvrditi kromosomski mozaik niskog udjela niti vrlo male promjene broja kopija unutar gena i točkaste mutacije gena (2, 3). Ukoliko tražimo za balansiranom kromosomskom promjenom, npr. u parova koji imaju ponavljane spontane pobačaje, neplodnost ili translokaciju već poznatu u obitelji, indicirano je učiniti klasičnu kariotipizaciju i fluorescentnu *in situ* hibridizaciju (FISH), odnosno konvencionalne metode analize kromosoma, koje ovdje imaju svoju primjenu unatoč značajnim tehnološkim iskoracima današnjice. FISH je tehnika koja povezuje klasičnu i molekularnu citogenetiku u kojoj se koriste DNA obojene fluorescentne probe koje se vežu isključivo na određene dijelove kromosoma, ovisno o tome za koji dio DNA je proba kreirana i tako omogućuje ciljanu identifikaciju nekog odsječka DNA. Standardna kariotipizacija može pomoći i u preciznoj vizualizaciji promjena nađenih *aCGH* - om, u točnoj lokalizaciji ili orijentaciji utvrđenih delecija ili duplikacija. Stoga je važno naglasiti da konvencionalna kariotipizacija još uvijek ima svoje mjesto u dijagnostici, a preporučuje se kao prvi dijagnostički test u postnatalnoj dijagnostici kod poznatih aneuploidija autosoma i spolnih kromosoma, na primjer kod sumnje na trisomiju 21 ili Turnerov sindrom te kod traganja za balansiranim kromosomskim promjenama (2, 3, 7).

Uz *arrayCGH*, submikroskopske kromosomske promjene s poznatim kliničkim slikama, kao što su mikrodelecijski / mikroduplicacijski sindromi (npr. Williamsov ili DiGeorgeov sindrom), mogu se dijagnosticirati FISH metodom ili metodom višestrukog umnažanja vezanih sonda (MLPA, engl. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). MLPA je lako dostupna molekularna metoda za procjenu broja kopija putem komercijalnih kompleta, koja omogućuje otkrivanje submikroskopskih promjena određenih, ciljanih regija genoma, ovisno o tome koje su probe obuhvaćene MLPA setom. U odnosu na FISH i MLPA, prednost *aCGH* metode je u definiranju točne veličine promjene, određivanju preciznih točki loma i zahvaćenih gena (2, 3), dok su MLPA i FISH financijski ponekad dostupnije i brže, ovisno o realnoj situaciji u nekoj ustanovi.

Zadnjih desetak godina, kliničku genetičku praksu, ali i pogled na medicinu uopće, promijenilo je

uvođenje metoda sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. *next generation sequencing*) u rutinsku dijagnostiku (2, 8). NGS omogućuje sekvenciranje desetaka do tisuća gena odjednom, na vremenski i troškovno učinkovit način. Prednost NGS-a je testiranje bilo kojeg, određenog broja gena u jednom genetskom testu (2, 6). Pri tome može biti riječ o odabranom broju gena za koje se zna da su povezani sa simptomima zbog kojih se pacijent testira i tada govorimo o genskom panelu. Primjerice, ukoliko se radi o epilepsiji, može se učiniti „Panel za epilepsiju“. Ako se putem komercijalnog panela testiraju samo geni povezani s poznatim bolestima koje su navedene u bazi Mendelski nasljednih bolesti (OMIM, engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*) riječ je o sekvenciranju kliničkog egzoma (CES, engl. *Clinical Exome Sequencing*). Ako su testom obuhvaćene regije u genomu koje kodiraju proteine, što čini 1 – 2 % genoma, govorimo o cjeloegzomskom sekvenciranju ili sekvenciranju cijelog egzoma (WES, engl. *Whole Exome Sequencing*). Ako se analizira kompletni genom, riječ je o sekvenciranju cijelog genoma (WGS, engl. *Whole Genome Sequencing*) (2, 9, 10).

Tumačenje rezultata i nađenih genskih varijanti dobivenih sekvenciranjem temelji se na smjernicama Američkog koledža medicinske genetike i genomike (ACMG, engl. *American College of Medical Genetics and Genomics*) iz 2015. godine (11). Ovim smjernicama standardizirani su kriteriji za klasificiranje varijanti u patogene, vjerojatno patogene, varijante nejasnog značenja (VUS, engl. *variant of unknown significance*), vjerojatno benigne ili benigne varijante. Varijante koje su klasificirane kao patogene ili vjerojatno patogene smatraju se uzorkom bolesti s vjerojatnošću koja je veća od 90 % (12). Tumačenje varijanti temeljeno je na čimbenicima koji uključuju učestalost u populaciji, tip varijante (npr. gubitak funkcije), položaj u genu i ostalo. Za učinkovitu interpretaciju dobivenih rezultata važno je istaknuti značaj detaljnog unosa kliničkih podataka, za što je najoptimalnije pacijenta prije testiranja uputiti na pregled kliničkom genetičaru. Dijagnostički učinak je veći kod analiza kao što su WES/WGS ako se zajedno uz uzorak probanda učini i testiranje roditeljskih uzoraka (tzv. *trio* analize) (9, 10).

Klinički nalaz VUS-a uvijek predstavlja dilemu, budući da u trenutku analize uloga varijante koja je

klasificirana kao VUS nije jasno poveziva s uzrokom bolesti. Za razliku od patogenih ili vjerojatno patogenih varijanti, kliničko odlučivanje ne bi trebalo biti temeljeno na varijantama koje su klasificirane kao VUS. Stoga se preporučuje praćenje pacijenta od strane kliničkog genetičara s nalazom koji je klasificiran kao VUS, s ciljem ponovne klasifikacije varijante u slučaju pojave dokaza koji bi promijenili njezino značenje. Generalno, varijante klasificirane kao VUS se češće reklasificiraju u benigne ili vjerojatno benigne nego u patogene ili vjerojatno patogene (12, 13, 14).

U interpretaciji nalaza sekvenciranja ne treba odbacivati neke varijante samo zbog toga što neka značajka bolesti nije prisutna ili je kod pacijenta prisutno neuobičajeno obilježje. Naime, nove tehnologije testiranja otkrivaju nam blage kliničke prezentacije bolesti i pridonose našim spoznajama o tzv. „fenotipskom spektru“, a ne isključivo klasičnoj prezentaciji različitih poremećaja. Tehnikama poput WES/WGS mogu se naći i varijante locirane u genima čije značenje/uloga nije poznata (GUS, engl. *genes of unknown significance*). Ovakve se varijante klasificiraju kao VUS i važne su jer mogu dovesti do otkrića novih gena povezanih s bolešću. Procjenjuje se da se svake godine otkrije oko 250 novih gena povezanih s bolešću, stoga je moguća, a ponekad i indicirana, reanaliza podataka dobivenih ranijim sekvenciranjem (9, 10).

Kao i kod molekularne kariotipizacije nužno je biti svjestan ograničenja pojedinih NGS metoda. Ciljani genski paneli često su korišteni NGS testovi, dizajnirani tako da osiguraju dobru (dublju) pokrivenost gena, obuhvaćajući sve regije od interesa u svrhu otkrivanja uzroka bolesti, što je od velike pomoći kliničarima kod genetski heterogenih poremećaja slične kliničke prezentacije. Testiranje na temelju panela uvelike je istisnulo testiranje pojedinog gena. Upotreba panela za specifične kliničke slike općenito se preferira radi nižih troškova analize, kraćeg vremena obrade te manjeg udjela nejasnih ili slučajnih rezultata. Međutim, kvaliteta panela ovisi o njegovom sastavu, zbog čega može imati ograničenu vrijednost u otkrivanju novih gena ili povezivanju poznatih gena s određenim kliničkim fenotipom. Prema literaturi, dijagnostički prinos testiranja genetskih poremećaja putem panela je do 28,5 %, a za neke fenotipove poput epileptičke encefalopatije i veći (15, 16). Za

poremećaje sa značajnom genetskom heterogenošću i manje jasnim fenotipom, šira pokrivenost putem sekvenciranja egzoma predstavlja superiorniju opciju u odnosu na testiranje putem panela, jer WES omogućuje analizu svih kodirajućih regija u jednom postupku i identifikaciju varijanti u genima koji nisu bili povezani s nekim određenim fenotipom. Dijagnostički doprinos WES - a je od oko 29 - 55 % kod neurorazvojnih poremećaja, odnosno 26 - 58 % za neselektirane kohorte u kojima postoji sumnja na genetsku etiologiju (10, 17). Tehnološki, WES ima ograničenja kao što su nepokrivenost nekodirajućih dijelova genoma, često niti mitohondrijske DNA i nemogućnost detekcije ekspanzijskih mutacija. U slučaju sumnje na mitohondropatiju uzrokovanu mutacijom mitohondrijske DNA treba voditi računa o uključenosti iste u analizu, kao i jesu li u analizu uključeni CNV-ovi (2, 3).

Sekvenciranje cijelog genoma, koje je danas sve više komercijalno dostupno, predstavlja najopsežniji klinički genomski dijagnostički test te će najvjerojatnije u skorijoj budućnosti zamijeniti WES. Njime se analizira ukupni genski materijal, kodirajuće i nekodirajuće regije genoma, varijante u broju kopija i strukturne preuredbe uključujući i uravnotežene promjene (9, 10). U srpnju 2021. godine objavljene su smjernice ACMG - a koje preporučuju WES/WGS kao prvu ili drugu liniju genetskog testiranja za pacijente s razvojnim zaostajanjem, intelektualnim odstupanjem i višestrukim anomalijama s obzirom na veći dijagnostički doprinos ovih metoda u odnosu na druge metodologije te činjenicu da ova dijagnostika doprinosi vrlo ranom postavljanju dijagnoze (6, 9). Pri tome je jasno da ovu preporuku ograničavaju troškovi, ali se smatra da će cijena ovih tehnologija s vremenom biti još niža te da će zdravstveni sustav u konačnici uštedjeti, jer će rano postavljanje dijagnoze i izostanak prethodne prakse postupnog pristupa genetskom testiranju donijeti značajne kliničke i ekonomske prednosti. Za napomenuti je da navedenom preporukom nisu obuhvaćeni pacijenti s izoliranim poremećajem iz autističnog spektra. Dijagnostički doprinos WGS - a je, prema različitim izvorima u odnosu na WES, oko 40 - 60 % (10, 17, 18, 19).

Važno je naglasiti da arrayCGH i NGS analize ne smiju biti alternativa temeljitom kliničkom pre-

gledu kao ni nekom jednostavnijem testu koji nas vodi ka pravoj dijagnozi (2, 3). Za pacijenta s kliničkom slikom koja upućuje na neki određeni sindrom, ima pozitivnu obiteljsku anamnezu za neki određeni poremećaj ili njegova klinička slika govori u prilog dijagnozi za koju sekvenciranje sljedeće generacije ne mora i nije prva metoda izbora, preporučuje se učiniti testiranje u skladu s kliničkom sumnjom ili anamnezom. Kao primjere možemo navesti Prader-Willijev i Angelmanov sindrom zbog specifičnog obrasca metilacije, fragilni X sindrom kod kojeg očekujemo produljenje slijeda tripleta CGG unutar gena *FMR1* ili analizu poznate obiteljske varijante u genu za kardiomiopatiju. Također, iako je identifikacija varijanti u genu distrofin za Duchenneovu i Beckerovu mišićnu distrofiju (DMD/BMD) moguća primjenom NGS tehnika, kod dječaka s kliničkom slikom ove bolesti racionalnije je i ekonomski opravdano prvo učiniti MLPA analizu. U ovom slučaju MLPA će biti dijagnostički izbor u 70 % bolesnika, s obzirom na činjenicu da DMD/BMD u 60 % zahvaćenih uzrokuje delecije u genu za distrofin, a u 10 % je prisutna duplikacija gena.

Prije bilo kojeg genetskog testiranja uputno je pacijentu pojasniti značenje testa, po mogućnosti od strane kliničkog genetičara. Kao dio procesa informiranog pristanka potrebno je raspraviti moguće rezultate testa ili očekivane ishode, moguće koristi i ograničenja testiranja, te mogućnosti nejasnih, slučajnih ili sekundarnih nalaza, odnosno nalaza zbog kojih bolesnik nije testiran, a vezani su uz neke po zdravlje važne rizike. Unatoč naprednim NGS tehnologijama i kliničkoj slici koja sugerira genetsku etiologiju, dio pacijenta imat će negativan rezultat testiranja. Uzroci mogu biti različiti, od tehničkog ograničenja metode, preko mozaicizma do prisutnosti somatskih patogenih varijanti. Stoga pacijent i obitelj moraju biti upućeni i u mogućnost negativnog rezultata prije genetskog testiranja (20, 21, 22).

Zaključno, razumijevanje osnovnih načela suvremenih dijagnostičkih mogućnosti u genetici kao i njihovih ograničenja važno je kako bi se odabrao optimalan način dijagnostike. Pri tome je iznimno važna suradnja s kliničkim i laboratorijskim genetičarima. Odabir između različitih dostupnih metoda testiranja, kao što su molekularna kariotipizacija, analiza ciljanog gena ili mutacije, korištenje

genskog panela, sekvenciranja egzoma ili genoma nije uvijek jednostavan. Potrebno je voditi računa o više čimbenika, specifičnosti fenotipa, diferencijalnoj dijagnozi, dostupnosti pretrage, žurnosti postavljanja genetske dijagnoze i troškovima pretrage. U kratkom vremenu sekvenciranje genoma postat će ili već postaje dio standardne skrbi s ciljem ranog utvrđivanja genetske osnove bolesti i primjene novih terapijskih mogućnosti. Pred vratima kliničke prakse su metodologije sekvenciranja RNA, optičkog mapiranja genoma, sekvenciranja dugog čitanja i epigenetskog profiliranja koje će u bliskoj budućnosti povećati udio uspješno dijagnosticiranih pacijenata, ali uvijek uz nužan racionalni klinički pristup i razumijevanje onoga što nam nove dijagnostike pružaju (22).

Kratice:

arrayCGH (engl. *comparative genomic hybridization*) – molekularna kariotipizacija metodom komparativne hibridizacije genoma na mikromreži

DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleinska kiselina

RNA (engl. *ribonucleic acid*) – ribonukleinska kiselina

CNV (engl. *copy number variations*) – varijante u broju kopija

SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizmi jednog nukleotida

LOH (engl. *loss of heterozygosity*) – gubitak heterozigotnosti

UPD (engl. *uniparental disomy*) – uniparentalna disomija

FISH (engl. *fluorescence in situ hybridization*) – fluorescentna *in situ* hibridizacija

MLPA (engl. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) – metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda

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

OMIM (engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*) – online baza Mendelski nasljednih bolesti

CES (engl. *Clinical Exome Sequencing*) – sekvenciranje kliničkog egzoma

WES (engl. *Whole Exome Sequencing*) – sekvenciranje cijelog egzoma

WGS (engl. *Whole Genome Sequencing*) – sekvenciranje cijelog genoma

ACMG (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics*) – Američki koledž

medicinske genetike i genomike

VUS (engl. *variant of unknown significance*) – varijanta nejasnog kliničkog značenja

GUS (engl. *genes of unknown significance*) – geni čije značenje/uloga nije poznata

LITERATURA

- Horton RH, Lucassen AM. Recent developments in genetic/genomic medicine. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133:697-708.
- Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic diagnosis for pediatric disorders: revolution and evolution. *Front Pediatr*. 2020;8:373.
- Narayanan DL, Girisha KM. Genomic testing for diagnosis of genetic disorders in children: chromosomal microarray and next-generation sequencing. *Indian Pediatr*. 2020;57(6):549-54.
- Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*. 2010;12:742-5.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86:749-64.
- Manickam K, McClain MR, Demmer LA, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2021;23:2029-37.
- South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG standards and guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med*. 2013;15(11):901-9.
- Eren K, Taktakoğlu N, Pirim I. DNA sequencing methods: from past to present. *Eurasian J Med*. 2022;54(Suppl1):47-56.
- Bagger FO, Borgwardt L, Jespersen AS, et al. Whole genome sequencing in clinical practice. *BMC Med Genomics*. 2024;17(1):39.
- Nurchis MC, Altamura G, Riccardi MT, et al. Whole genome sequencing diagnostic yield for pediatric patients with suspected genetic disorders: systematic review, meta-analysis, and GRADE assessment. *Arch Public Health*. 2023;81:93.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. *Genet Med*. 2015;17:405-24.

12. Walsh N, Cooper A, Dockery A, O'Byrne JJ. Variant reclassification and clinical implications. *J Med Genet.* 2024;61(3):207-11.
13. Westphal DS, Burkard T, Moscu-Gregor A, Gebauer R, Hessling G, Wolf CM. Reclassification of genetic variants in children with long QT syndrome. *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(9):e1300.
14. Davies B, Bartels K, Hathaway J, et al. Variant reinterpretation in survivors of cardiac arrest with preserved ejection fraction (the Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry) by clinicians and clinical commercial laboratories. *Circ Genom Precis Med.* 2021;14(3):e003235.
15. Fellner A, Goldberg Y, Basel-Salmon L. Ordering genetic testing by neurologists: points to consider. *J Neurol.* 2023;270:3714-22.
16. Kothur K, Holman K, Farnsworth E, et al. Diagnostic yield of targeted massively parallel sequencing in children with epileptic encephalopathy. *Seizure.* 2018;59:132-40.
17. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med.* 2018;3:16.
18. Mattick JS, Dinger M, Schonrock N, Cowley M. Whole genome sequencing provides better diagnostic yield and future value than whole exome sequencing. *Med J Aust.* 2018;209(5):197-9.
19. Lionel AC, Costain G, Monfared N, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med.* 2018;20:435-43.
20. Miller DT, Lee K, Gordon AS, et al.; ACMG Secondary Findings Working Group. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2021 update: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2021;23(8):1391-8.
21. Schobers G, Schieving JH, Yntema HG, et al. Reanalysis of exome negative patients with rare disease: a pragmatic workflow for diagnostic applications. *Genome Med.* 2022;14(1):66.
22. Wortmann SB, Oud MM, Alders M, et al. How to proceed after "negative" exome: A review on genetic diagnostics, limitations, challenges, and emerging new multiomics techniques. *J Inherit Metab Dis.* 2022;45(4):663-81.

Adresa za dopisivanje:

Sanda Huljev Frković

KBC Zagreb, Klinika za pedijatriju, Zavod za genetiku i bolesti metabolizma

Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

e-mail: shuljev@kbc-zagreb.hr

SUMMARY

Rational approach to modern genetic diagnostics

Sanda Huljev Frković

Thanks to the accelerated advancement of technologies, increased knowledge, and falling prices, the potential of genetic testing has never been greater. The expansion of knowledge and possibilities has dramatically altered our diagnostic methods, including who we test, when we test, the methods used, and how we interpret the obtained results. This influences the criteria for conducting tests, the selection of diagnostic testing methods, and the potential for evaluating genetic risk factors for common complex conditions, ultimately resulting in tailored care for each individual patient. New methods have become the preferred approach for diagnosing genetic conditions, yet it's essential to remember that traditional techniques remain a highly effective option when used appropriately. The geneticist plays a vital role in the diagnostic process, from formulating a working diagnosis based on the patient's medical history, current condition, disease progression, and previous treatment outcomes, to recommending appropriate genetic testing, understanding its benefits and drawbacks, and accurately interpreting relevant findings that impact the patient's and their family's future.

Key words: GENETICS; GENETIC TESTING; HIGH-THROUGHPUT NUCLEOTIDE SEQUENCING; PRECISION MEDICINE; GENETIC COUNSELING