

יישום שיטת ריצוף כלל אקסומי לאבחון מחלות גנטיות: ניסיון המכון הגנטי במרכז הרפואי רבין

תקציר:

הקדמה: ריצוף כלל אקסומי (WES) מהווה שיטה המאפשרת לרצף במקביל ובמהירות גבוהה יחסית כ-20,000 גנים, לאיתור שינויים גנטיים העלולים להיות קשורים במצבי חולי. במאמר זה מסוכמות תוצאות הריצוף האקסומי של דנ"א ממטופלים לא מאובחנים שהופנו למכון הגנטי במרכז הרפואי רבין בשל חשד למחלה גנטית.

שיטות: הפקת דנ"א בשיטות מקובלות, העשרת חלקים מקודדים בגנום (אקסונים) באמצעות ערכה Nextera Rapid Capture Expanded Exome, וריצוף באמצעות מכשיר HiSeq 2500 של חברת Illumina. סינון ובחירת שינויים גנטיים נדירים באמצעות אנליזה ביו-אינפורמטית, אימות בשיטת סנגר ובדיקת הפרדה (סגרציה) בבני משפחה.

תוצאות: בקרב 39 מטופלים שהופנו בחשד למחלה מונוגנית לא ידועה בוצעה בדיקת ריצוף אקסומי. הנבדקים הופנו בשל סימנים קליניים מגוונים, כאשר ב-80% מהם הסימנים העיקריים היו נירולוגיים.

בקרוב 51.3% (20/39) מהמטופלים נתקבלה תוצאה חיובית – קבלת שינוי גנטי שנראה כי הוא מסביר בסבירות גבוהה את הסימנים הקליניים. בקרב 28% מהחולים התגלה שינוי בגן ידוע שדווח עליו בעבר כי הוא גורם למחלה, וב-23% מהמטופלים התגלה שינוי בגן חדש שלא תואר בעבר כי הוא קשור לפנוטיפ. מתוך 20 המקרים שפוענו ב-12 מטופלים – התגלתה צורת תורשה אוטוזומית רצסיבית, ב-7 מטופלים – תורשה אוטוזומית שולטנית (דומיננטית) ובנבדק אחד – תורשה בתאחיזה ל-X.

מסקנה: עבור למעלה ממחצית מהמטופלים שהופנו אלינו לריצוף אקסומי בחשד למחלה גנטית, נעשה אבחון מולקולארי. תוצאה זו מוכיחה כי WES היא שיטת אבחון יעילה לאיתור הגורם הגנטי בקרב חולים עם חשד למחלה מונוגנית ללא אבחנה שנקבעה. פרט לאבחנה שנקבעה, שיש בה לעיתים הקלה רבה למטופל ובני משפחתו, למציאת הבסיס המולקולארי יש תרומה רבה: קביעת אבחנה מולקולארית יכולה לחסוך המשך בירור רפואי, לאפשר להעריך את סיכון ההישנות במשפחה, לבצע אבחון טרום לידה ולהתאים את המעקבים והטיפול לחולה.

ליאור כהן^{3,2,1}
נעמה אורנשטיין^{3,1}
מוניקה וייס-הובשמן^{3,2,1}
לילי בזק¹
בלה דוידוב¹
אייל ריינשטיין⁸
שי צור⁶
דורון בהר⁷
פולה סמירין-יוסף^{5,4}

¹המכון לגנטיקה רפאל וקאנטי, מרכז רפואי רבין-מרכז רפואי בילינסון, פתח תקווה
²הפקולטה לרפואה סאקלר, אוניברסיטת תל אביב
³היחידה לגנטיקה קלינית ילדים, בית חולים שניידר לילדים, פתח תקווה
⁴המכון למחקר רפואי פלזנשטיין, הפקולטה לרפואה סאקלר, אוניברסיטת תל אביב
⁵המעבדה לביו אינפורמטיקה גנומית, המחלקה לביולוגיה מולקולארית, אוניברסיטת אריאל בשומרון, אריאל
⁶המעבדה לביולוגיה מולקולארית, קמפוס רמב"ם, חיפה
⁷המכון לגנטיקה רפואית, המרכז הרפואי שערי צדק, ירושלים
⁸מרכז רפואי מאיר, כפר סבא

גילוי נאות: ד"ר דורון מהר מכהן כרופא הראשי של חברת Gene by Gene. לשאר המחברים אין קשר מסחרי לנושא המאמר

מילות מפתח:
KEY WORDS

ריצוף כלל אקסומי; ריצוף מהדור החדש.
Whole exome sequencing (WES); Next-generation sequencing; Detection rate

הקדמה

השלמת פרויקט הגנום האנושי בתחילת המאה ה-21 בעלות אדירה של שלושה מיליארד דולרים, פרצה את הדרך לכל תחומי הרפואה והטביעה את המונח "רפואה מתואמת אישית" (Personalized medicine), הענקת טיפול רפואי המתאים ביותר לפרופיל הגנטי של המטופל.

הגנום האנושי מורכב מ-3.2 ביליון בסיסים אך רק כ-1.5% ממנו מקודד לחלבונים. אזורי הגנים המקודדים לחלבונים מכונים אקסונים (Exons) ואילו החלקים המשועתקים לרנ"א, אך אינם מתורגמים לחלבון אינטרונים (Introns). השם הכולל לרצף כל האקסונים בגנום נקרא אקסום (Exome). ריצוף אקסומי כולל (Whole Exome Sequencing – WES) אינו מונח מדויק, שכן הוא מאפשר לקרוא באיכות טובה כ-95% בממוצע מהאקסונים של 20,000 הגנים והאזורים הסמוכים להם ולא 100% (כיסוי ממוצע של 95%). כוחה של שיטה זו הוא באיתור שינוי בגן יחיד בהקשר למחלות המועברות בתורשה מנדליאנית. בדיקת ריצוף אקסומי אינה עוד בחזקת בדיקה במסגרת מחקר בלבד, ומוצעת מזה מספר שנים כשירות קליני על ידי

מספר מעבדות בישראל ובעולם, כחלק מבירורן של מחלות גנטיות. כשמתעורר חשד למחלה גנטית אצל מטופל, הדרך עד לאבחון גנטי היא לעיתים ארוכה ומפותלת. הבירור כולל בדרך כלל אנמנזה אישית ומשפחתית, בדיקה גופנית, בדיקות מעבדה יקרות (כולל בירור מטבולי), בדיקות דימות וביקות גנטיות הכוללות קריוטיפ, בדיקת "שבב גנטי" (Chromosomal microarray – CMA), ריצוף של גנים בודדים או בדיקת מערך גנים (Genes panel) [3-1]. אבחון גנטי עשוי לשפוך אור על האבחנה, לסייע בקביעת הפרוגנוזה, להוביל למעקבים מסוימים, ובחלק מהחולים אף למציאת טיפול מיטבי ולאבחון טרום לידה. למרות הבירור הנרחב, קיים קושי להגיע לאבחנה, אשר נובע מסימנים קליניים שאינם סגוליים במרבית המחלות וממעורבותם של גנים רבים אשר שינויים בהם יוצרים חפיפה קלינית [4].

תהליך ריצוף אקסומי מסווג לשלב מעבדה ושלב ביו-אינפורמטיקה. שלב המעבדה כולל הפקת דנ"א לרוב מתאי דם לבנים ובחלק מהמקרים מפיברובלסטים, שבירת הדנ"א למקטעים קטנים, העשרת אזורי המטרה המקודדים וקביעת הרצף הגנטי של עשרות מיליוני מקטעים קטנים (לרוב באורך ממוצע של 150 בסיסים)

מטרה

המטרה היא לסכם את תוצאות בדיקת ריצוף כלל אקסומי במסגרת מחקר בקרב 39 מטופלים שהופנו למרכז הרפואי בילינסון/בית חולים לילדים שניידר בין השנים 2012–2015.

שיטות

שלושים ותשעה מטופלים אותרו במסגרת הפנייתם לבירור במירפאה הגנטית במרכז הרפואי רבין/ בית חולים שניידר לילדים החל משנת 2012.

הקריטריונים להכללת חולים במחקר:

- הסימנים הקליניים או האנמנזה המשפחתית מכוונים לאטיולוגיה גנטית, אך הסימנים הקליניים אינם מספיקים כדי להמליץ על בדיקה גנטית סגולית.
- החולה מציג מחלה גנטית ידועה, שבה יכולים להיות מעורבים גנים רבים (הטרוגניות), כך שאנליזת ריצוף אקסומי היא מעשית יותר מריצופם של גנים בודדים.
- החולה מציג סימנים קליניים המתאימים למחלה גנטית, אך לא הושגה אבחנה באמצעות בדיקות גנטיות סגוליות (ספציפיות) המתאימות לפנוטיפ.

במחקר לא הוכללו חולים עם שינויים כרומוזומיים או הסתמנות של מחלה/סימנים קליניים שבה התורשה השכיחה היא רבת גורמים (Multifactorial inheritance). לא הוכללו במחקר קטינים אשר בהכללתם אין משום תרומה לזיהוי הגן במשפחה, במצבים שבהם המחלה מתבטאת בגיל המבוגר. כל החולים עברו הערכה על ידי מומחה בגנטיקה רפואית הכוללת אנמנזה אישית, אנמנזה משפחתית ובדיקה גופנית. הבדיקה בוצעה לאחר החתמת ההורים ו/או הנבדקים על כתב הסכמה מדעת במסגרת מחקר שקיבל אישור ועדת הלסינקי.

הפקת דנ"א גנומי מדם חולים או בני משפחה נוספים נעשתה על פי פרוטוקולים מקובלים. תהליך ההעשרה בוצע באמצעות ערכה מסחרית Nextera Rapid Capture Expanded Exome Kit (FC-140-1006) על פי הוראות היצרן. ריצוף (Sequencing) בוצע בחברת Gene By Gene באמצעות מכשיר חברת Illumina מדגם HiSeq 2500. התאמת הרצפים לרצף הגנום האנושי (גירסת hg19). סינון השינויים הגנטיים נעשה באמצעות ניתוח בירואינפורמטי הכולל את כל שלבי האנליזה – התאמת הרצפים לגנום, מציאת השינויים וסינונם.

שינויים שכיחים באוכלוסייה הכללית או שינויים ללא משמעות קלינית, שינויים שאינם משנים את החומצה האמינית בחלבון (Synonymous variants) מסוננים לרוב בשלב הראשון. בשלב הבא סוננו שינויים ללא משמעות קלינית ונשמרו אלו הידועים כפתוגניים. בנוסף נעשתה השוואה בין השינויים שאותרו בין החולה לבני משפחה אחרים, לרוב ההורים, על פי מאגרי מידע ועל פי צורת התורשה במשפחה. תהליך סינון זה מצמצם באופן משמעותי את רשימת השינויים הגנטיים החשודים שמתוכם מאתרים את השינוי הגנטי המסביר את הסימנים הקליניים. החיפוש נעשה על ידי רופא גנטיקאי וביוראינפורמטיקאי על סמך צורת התורשה הסבירה ביותר לפי האנמנזה, איתור שינויים נדירים באוכלוסייה (ששכיחותם קטנה מ-1%) ואיתור שינויים שפוגעים במבנה או בתפקוד החלבון (Truncating variants). כל השינויים הפתוגניים אומתו בשיטת סנגר (Sanger sequencing) והשינויים נבדקו גם בבני משפחה קרובים (Cosegregation).

עם חפיפה ביניהם (Sequence reads). השלב הבירואינפורמטי כולל מיפוי והרכבת המקטעים למפת ייחוס של הגנום האנושי (Sequence Read Mapping/ Alignment), זיהוי השינויים הגנטיים באמצעות השוואה לרצף הייחוס (Variant calling) ולבסוף אפיון שמי של כל וריאנט (Variant annotation). בהמשך מתבצע ניתוח לצורך איתור השינוי הפתוגני על ידי סינון שינויים ראשוני, בהתאם לשכיחותם באוכלוסייה הכללית וסיווג הפתוגניות. שיעור האבחון באמצעות WES תלוי במספר גורמים, כגון: במידת הכיסוי הכולל (מספר המקטעים באותו אזור גנומי) של הגנים, ביכולת האלגוריתמית בתהליך הבירואינפורמטי ובעבודת הניתוח שלאחר מכן.

ההתמודדות עם היקף מידע עצום המתקבל בריצוף מהווה אתגר גדול. בעבודה שפורסמה לאחרונה נמצא, כי ההניעה (המוטיבציה) הגבוהה של המעבדות להגדלת רגישות הבדיקה עלולה לגרום לסינון לא נכון של שינויים שנמצאו בגנים שלא אופיינו כאחראים לסימנים הקליניים. עבודה שיטתית, אימות ניתוח הנתונים על ידי גורם נוסף (Analytic validity), תיקוף קליני (Clinical validity) באמצעות בדיקת בני משפחה נוספים לשינוי זה, ומציאת חולים ללא קרבת משפחה עם סימנים קליניים דומים ושינוי באותו גן, מצמצמים את שיעור התוצאות החיוביות הכוזבות (False positive) [5]. חיזוק נוסף נעשה באמצעים בירואינפורמטיים לבחינת השפעת המוטציה על מבנה החלבון, במחקר הבוחן את הפנוטיפ של חיות מודל (עכבר, דג זברה, זבוב פירות וכדומה) לאחר פגיעה סגולית (ספציפית) בגן החשוד, וכן בשיטות מולקולאריות שונות במעבדה המיועדות לאמוד את השפעת המוטציה שזוהתה על פעילותו של החלבון.

מעבדות קליניות החלו להציע את השירות – ריצוף ופענוח WES החל משנת 2011. השירות יכול לכלול ריצוף אקסומי יחיד של המטופל (Singleton) או של מספר נבדקים (המטופל ובני משפחה אחרים, לרוב שני ההורים הביולוגיים). אסטרטגיה אפשרית נוספת כיום היא להתחיל בריצוף אקסומי קליני אצל המטופל עצמו, לבדיקת כ-4,600 גנים הידועים כגורמים למחלות ואם הבדיקה שלילית להמשיך לבדיקת 20,000 גנים [5]. יחד עם זאת, בשל עלייה תלולה באפיונם הקליני של גנים חדשים (הכפלת המידע OMIM לגבי מחלות שאופיינו מולקולארית בשש השנים האחרונות) [6], מגמה זו משתנה להעדפת בדיקת ריצוף אקסומי כולל על פני בדיקת אקסום קליני או בדיקת הרכב (פאנל) גנים ידועים. גילויים של גנים חדשים רבים מבליט את החשיבות בחזרה על האנליזה בבדיקות שליליות, כחלק מסקירה מחודשת לנוכח מאגרי מידע וספרות עדכניים. בדיקת ריצוף אקסומי אינה כלולה כיום בסל הבריאות הממלכתית ואינה ממומנת על ידי מרבית ביטוחי הבריאות הפרטיים. שיעור הנבדקים שלא אובחנו בשיטות גנטיות "מסורתיות" ומפוענחים בזכות בדיקת WES הוא 25%–40%.

כוחה של בדיקת ריצוף אקסומי הוא ביכולת לבדוק אלפי גנים במקביל ובאיתור שינוי ברצף הבסיסים, בעיקר החלפת בסיס אחד בבסיס אחר ואיתור חסרים או תוספות קטנים 8–10 בסיסים או פחות. הבדיקה פחות מדויקת באיתורם של שינויים גנטיים אחרים. מגבלות הבדיקה כוללות: חוסר יכולת לגלות שינויים גנטיים עמוק בתוך אינטרונים ורצפי בקרה, ריצוף אקסומי כולל לרוב את הגנום בגרעין התא אך לא את הגנום המיטוכונדרי, אי גילוי שינויים מבניים בגנום כטרנסלוקציות או אינברסיות ללא שינוי ברצף (בחלק מהתוכנות הקיימות כיום יש את היכולת לזהות מבנים בגנום באזורים מקודדים), אי גילוי מחלות הקשורות להרחבת מספר ההכפלות של רצף חוזרני כתסמונת ה־x השביר, יכולת מוגבלת בזיהוי שינויים כמותיים (Copy number variants), מחלות הנגרמות מהורשה של שני האללים מהורה אחד (Uniparental disomy או שינויים בביטוי גנים (שינויים אפיגנטיים)).

ההוריות הרפואיות העיקריות לביצוע הבדיקה: בכ-79.5% מהחולים (31/39) סימנים נירולוגיים, כולל איחור התפתחותי וליקוי קוגניטיבי, ב-10.2% (4/39) מחלות אנדוקריניות, ב-10.2% (4/39) מחלות עור וב-15.3% (6/39) מחלות עיניים (טבלה 1).

תוצאה חיובית (Likely pathogenic/Pathogenic) התקבלה ב-51.3% מהחולים (20/39). מתוכם, ב-33% (13/20) אנליזת אקסום בוצעה בחולה בלבד (Singleton), ב-33% בחולה ובבן משפחה קרוב מדרגה ראשונה (Double), וב-33% בבדק ושני ההורים (Trio). ב-55% מהנבדקים (11/20) התקבל שינוי בגן ידוע שתואר בספרות כקשור לסימנים הקליניים, ב-45% (9/20) השינוי נמצא בגן חדש שלא תואר בעבר, שהפנוטיפ קשור לשינוי בו (טבלה 2). מתוך כל השינויים החיוביים שהתקבלו – 60% (12/20) היו מסוג החלפת חומצה אמינית אחת באחרת (-2) מסוג חסר קטן (Indel, 9 מסוג Missense, 1 מסוג Missense/Indel), 20% (4/20) מסוג Nonsense (מוטציית פסק בתרגום החלבון), מוטציה אחת באזור בקרה (Splicing) ושלושה שינויים שלא היה מידע לגביהם. מתוך 20 תוצאות חיוביות שהתקבלו, 35% (7/20) היו בגנים בתורשה אוטוזומית שולטנית (דומיננטית), חמישה מתוכם היו שינויים חדשים שמקורם בשינוי בתאי המין/בעובר, 12 מקרים היו בגנים בתורשה אוטוזומית רצסיבית (60%), כאשר נבדק אחד ירש שני שינויים שונים בגן (Compound heterozygote), ואחד בתורשה רצסיבית בתאחיזה ל-א (5%) (טבלה 3).

שיעור האבחון היה כמעט כפול באנליזה של החולה ובני משפחה נוספים – 61.5% (Double, Trio) לעומת ריצוף יחיד – 30.7% (Singleton). כאשר משווים בין שיעור האבחון בנבדקים שבנוסף להם ביצעו אנליזה לבן משפחה נוסף (Double) לעומת בדיקת Trio – שיעור המאובחנים היה גבוה יותר בבדיקת ה-Double – 69% לעומת בדיקת ה-Trio – 53%.

טבלה 1: סיכום נתונים לגבי הנבדקים שהופנו לבדיקת ריצוף כלל אקסומי		
מספר הנבדקים עם תוצאה חיובית* מסך הנבדקים (באותה קטגוריה [%])	סך החולים שהופנו לבדיקה מסך 39 החולים [%]	מאפיינים דמוגרפיים / קליניים
		קרבת משפחה
10/17 (58.8)	17 (43.5)	קרובים
10/19 (52.6)	19 (48.7)	אינם קרובים
	3 (7.6)	ללא פרטים
		מין
6/17 (35.2)	17 (43.5)	זכר
14/22 (63.6)	22 (56.5)	נקבה
		גיל הנבדק
1/3 (33.3)	3 (7.6)	עד גיל שנה
17/32 (53.1)	32 (82.0)	1-18 שנים (כולל)
2/4 (50)	4 (10.2)	מעל גיל 18
		סיווג לפי מערכות נירולוגיה
16/31 (51.6)	31 (79.5)	שיריר / שלד
1/3 (33.3)	2 (5.1)	עיניים
4/6 (66.6)	6 (15.3)	עור
1/4 (25)	4 (10.2)	לב וכלי דם
1/1 (100)	1 (2.5)	אנדוקרינולוגיה
3/4 (75)	4 (10.2)	מימצאים אורולוגיים
1/1 (100)	1 (2.5)	המטולוגיה
1/1 (100)	1 (2.5)	מערכת עיכול
1/2 (50)	2 (5)	שמיעה / א"ג
0	1 (2.5)	ריאות
		סימנים
14/27 (51.8)	27 (69.2)	ליקוי קוגניטיבי/איחור התפתחותי
2/6 (33.3)	6 (15.3)	מימצא חיובי ב-MRI
4/6 (66.6)	6 (15.4)	מומים מלידה
3/6 (50)	6 (15.4)	פרכוסים/כפיון (אפילפסיה)
2/2 (100)	2 (5)	אי ספיקת שחלה מוקדמת
1/5 (20)	5 (12.8)	דיספלזיה אקטודרמית/ מחלת עור אחרת
5/7 (71)	7 (17.9)	בעיית שגשוג

*תוצאה חיובית כוללת שינוי פתוגני (pathogenic) או בעל סבירות לפתוגניות (likely pathogenic)

דיון

עבודה זו ממחישה את כוחה ויעילותה של בדיקת ריצוף אקסומי לגילוי הבסיס המולקולארי בקרב חולים עם מחלות גנטיות נדירות עם תורשה מנדליאנית, העונים על הקריטריונים שצינו. היכולת לרצף במקביל 20,000 גנים ולאתר שינויים הופכת את בדיקת הריצוף האקסומי לשיטה אבחונית יעילה עם סיכויי הצלחה של 50%-25%. נודעת חשיבות לכך שגם רופאים שאינם גנטיקאים יכירו את ההוריות הרפואיות לריצוף אקסומי כדי להפנות מטופלים עם הסיכוי הרב ביותר להגיע לאבחנה. בחירת הנבדקים המתאימים לבדיקה תגדיל את שיעור ההצלחה של אבחון מולקולארי ותצמצם את מספר הבדיקות השליליות או התוצאות עם משמעות קלינית שאינה ברורה – תוצאות הכרוכות באי ודאות וחרדה לנבדקים. בדיקת WES עשויה לחסוך הוצאות של בירור יקר כולל בירור מטבולי, דימות ובדיקות פולשניות (כגון ביופסיית שריר).

אם נשווה את שיעור התוצאות החיוביות בעבודה זו לעומת עבודות אחרות, שיעור האבחנות שקיבלו סיווג פתוגני בעבודה זו היה 38.4% לעומת 25% – השיעור הממוצע המדווח בספרות. שיעור השינויים בגנים חדשים היה גבוה כמעט פי שלושה (45%) מהמדווח בעבודות אחרות. ניתן להסביר את ההבדלים בכך שהמשפחות נבחרו בקפידה במסגרת מימון של מחקר, כך שהסיכוי למציאת שינוי בגן חדש או גן ידוע הוא מלכתחילה גבוה יותר. מתוך כל הגנים בהם נמצא שינוי, שלושה גנים הופיעו ברשימות גנים ששינויים גנטיים בהם יותר שכיחים מגנים אחרים בקבוצה של 500 נבדקים, כגון: ANKRD11 הקשור ב-KBMG syndrome, KMT2A (MLL) הקשור ב-Wiedmann-Steiner syndrome ו-KCNQ2 הקשור במחלת פרכוסים

השינויים סווגו לארבע קבוצות:

- **פתוגני (Pathogenic)** – שינוי בגן ידוע שמסביר את הסימנים הקליניים על פי הספרות או תוכנות חיזוי (Polyphen-2, SIFT, Mutation taster) במידת ודאות גבוהה; **סביר שהוא פתוגני (Likely pathogenic)**
- **שינוי בגן שעל פי תוכנות החיזוי נראה כפתוגני ושנראה על פי תפקיד הגן שיכול להסביר את הסימנים הקליניים** – יחד עם זאת, לא נמצא תיעוד בספרות לגבי נבדקים עם סימנים קליניים דומים נושאים מוטציה בגן זה;
- **לא ברור (Uncertain)** – שינוי שאין די נתונים כדי לקבוע את משמעותו הקלינית;
- **שלילי** – לא אותר שינוי שנמצא קשור למימצאים הקליניים.

תוצאות

סך הכול, 39 דגימות נשלחו ל"ריצוף כלל אקסומי" מתוכן 17 עם קרבת משפחה ידועה (43%) ועברו אנליזה במרכז הרפואי בילינסון.

טבלה 2:
סיכום תוצאות הבדיקה

סוג התוצאה	סך הנבדקים מסך 39 המקרים (%)	סך הנבדקים מסך 20 הנבדקים עם תוצאה חיובית* (%)	סך הנבדקים מתוך 13 שבצעו ריצוף בודד (Singleton)	סך הנבדקים מתוך 13 שבצעו ריצוף נוסף אחד לבן משפחה (Double)	סך הנבדקים מתוך 13 שבצעו ריצוף נוסף לשני בני משפחה (Trio)
תוצאה חיובית	20 (51.3)	20 (100)	4 (30.7)	9 (69.2)	7 (53.8)
גן ידוע	11 (28.2)	11 (55)	-	-	-
כתוגני	15 (38.4)	15 (75)	4 (30.7)	6 (46.1)	5 (38.5)
סביר כפתוגני	5 (12.8)	5 (25)	-	3 (23.0)	2 (15.4)
גן חדש	9 (23)	5 (45)	-	-	-
תוצאה שלילית	19 (48.7)	-	9 (69.2)	4 (30.7)	6 (46.1)

*תוצאה חיובית כוללת שינוי פתוגני (pathogenic) או בעל סבירות לפתוגניות (likely pathogenic)

מימצאים משניים שאינם קשורים לסיבה שבגינה בוצעה הבדיקה (Secondary findings), ואם כן – מתי לדרוש. כיום אין עדיין תמימות דעים בקהילה הגנטית, אך האיגוד האמריקאי לגנטיקה התווה קווים מנחים לגבי דיווח על מימצאים משניים [8].

לסיכום

תוצאות עבודה זו ממחישות את כוחה של בדיקת ריצוף כלל אקסומי באיתור שינויים ברצף הדנ"א, לאחר שעבור למעלה ממחצית מהחולים שהופנו אלינו נתקבלה תוצאה חיובית (51.3%). הבדיקה יעילה בעיקר בקרב חולים עם פנוטיפ מורכב שאינו מתאים לתסמונת מוכרת, ולמחלות הטרוגניות עם תורשה מנדליאנית. חשוב להכיר את מגבלות הבדיקה לעומת בדיקות אחרות, בכלל זה קושי לזהות הפרעות כרומוזומיות מסוימות, חסר באקסונים שלמים, שינויים אפיגנטיים, חוסר יכולת לגלות "מחלות של חזרות" כתסמונת x השביר ומחלת הנטיגטון. הקטנת עלות הבדיקה והכללתה במסגרת סל הבריאות בהוריות מסוימות תרחבנה את היקף ביצוע הבדיקה ותסייענה לפענח בדיקות של חולים רבים שטרם אובחנו.

מחבר מכותב: ליאור כהן

המכון לגנטיקה על שם רפאל רקאנטי
מרכז רפואי רבין, רחוב ז'בוטינסקי 39, פתח תקווה, 4941492
טלפון: 03-9376416
דוא"ל: liorco1@clalit.org.il

ביבליוגרפיה

- Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B & al, The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. Genet Med Off J Am Coll Med Genet, 2014;16:176-82.
- Iglesias A, Anyane-Yeboah K, Wynn J & al, The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice. Genet Med Off J Am Coll Med Genet, 2014;16:922-31.
- Srivastava S, Cohen JS, Vernon H & al, Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. Ann Neurol, 2014;76:473-83.
- Yang Y, Muzny DM, Reid JG & al, Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis

טבלה 3:

סיכום תוצאות חיוביות לפי דפוס תורשה

צורת תורשה	סך הנבדקים עם התוצאה בקטגוריה מסך 20 הנבדקים עם תוצאה חיובית (%)
אוטוזומית שולטנית (דומיננטית)	7 (35)
שינוי חדש (De-Novo)	5 (25)
מורש	1 (5)
לא ידוע	1 (5)
אוטוזומית רצסיבית	12 (60)
הומוזיגוט	11 (55)
הטרוזיגוט מורכב 3	1 (5)
רצסיבית בתאחיזה ל-4x	1 (5)

¹תוצאה חיובית כוללת שינוי פתוגני (Pathogenic) או בעל סבירות לפתוגניות (Likely pathogenic)
²כולל חולה עם מוזאיקה (Mosaicism)
³Compound heterozygote
⁴מורש מהאם

בינקות [7]. ריצוף כלל אקסומי עשוי לסייע בפתרון של מטופלים במצב מורכב, כגון לגלות שתי אבחנות בחולה הגורמות לפנוטיפ מורכב (Dual molecular diagnosis) או לגלות צורת תורשה שונה מהצפוי. לדוגמה, באחד מסך 39 האירועים שנחקרו נמצא שינוי בגן COL6A2 הקשור למחלת שריר המועברת בתורשה אוטוזומית שולטנית, למרות שההנחה הראשונית הייתה שצורת התורשה היא אוטוזומית רצסיבית עקב העובדה שההורים בריאים וקרובי משפחה. במטופל זה, השינוי הורש מהאב שנמצא כי הוא נושא פסיפס (מוזאיקה) לשינוי הגנטי, אך היה ללא סימנים קליניים. בעבודות קודמות נמצא, כי שיעור האבחון בקרב חולים שעברו בדיקת Trio היה 37.3% (82/220) לעומת שיעור האבחון בחולים שעברו בדיקה בודדת 20.6% (14/68) עם מובהקות של P<0.01. אף בעבודה זו הוכח, כי שיעור הבדיקות החיוביות גבוה יותר בבדיקה של החולה ובני משפחה נוספים לעומת בדיקת החולה היחיד. יתרונות ביצוע ריצוף אקסומי ב-Trio, פרט להגדלת הסיכוי להגיע לאבחון מולקולרי, הם: צמצום שיעור השינויים שמשמעותם הקלינית אינה ברורה, קיצור משך ניתוח השינויים על ידי העדפת שינויים חדשים (De-Novo) במקרה יחיד במשפחה, והפחתת מספר השינויים אשר עבורם נדרש לבצע סגרגציה. אחת השאלות המתעוררות בריצוף כלל אקסומי היא האם יש חובת דיווח לגבי

- of mendelian disorders. N Engl J Med, 2013;369:1502-11.
5. Atwal PS, Brennan M-L, Cox R & al, Clinical whole-exome sequencing: are we there yet? Genet Med Off J Am Coll Med Genet, 2014;16:717-9.
6. Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE & MacKenzie AE, Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. Nat Rev Genet, 2013;14:681-91.
7. Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D & al, Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. Genet Med Off J Am Coll Med Genet, 2014 Nov 6.
8. Green RC, Berg JS, Grody WW & al, ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. Genet Med Off J Am Coll Med Genet, 2013;15:565-74.