



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ
ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ ΣΤΟΝ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ»
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΑΡΑΤΗΣΙΔΟΥ ΒΕΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ,

2023

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Η ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΟΛΔΑΤΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ,**
ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
- 2. ΣΥΡΟΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΟΜΟΤΙΜΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- 3. ΛΑΔΟΜΕΝΟΥ ΦΑΝΗ, MD PhD ΕΠΙΜΕΛΗΤΡΙΑ Α ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ,**
ΒΕΝΙΖΕΛΕΙΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

**«THE UTILITY OF MOLECULAR DIAGNOSTIC TESTING
FOR PRIMARY IMMUNE DEFICIENCY DISORDERS IN
PEDIATRIC PATIENTS»**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	12
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ	12
1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ	12
1.3 ΣΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	13
1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ	13
1.5 ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	15
2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	15
2.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΚΑΤΑ SANGER	15
2.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ DNA (NGS, NEXT GENERATION SEQUENCING)	16
2.4 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ Ή ΠΑΝΕΛ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (TGP, TARGETED GENE PANELS)	16
2.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΕΞΟΝΙΩΝ (WES, WHOLE EXOME SEQUENCING)	17
2.6 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ (WGS, WHOLE GENOME SEQUENCING)	18
2.7 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (CMA, CHROMOSOMAL MICROARRAY ANALYSIS)	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ	20
3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ	20
3.2 ΤΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ	20
3.3 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	20
3.4 ΠΟΤΕ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	21
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	23
4.1 ΣΚΟΠΟΣ	23
4.2 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ	23

4.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	23
4.4 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΕΝΤΑΞΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΩΝ.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	26
5.1 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	26
5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ	27
5.3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΗΘΙΚΑ ΔΙΛΗΜΜΑΤΑ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου για την κριτική, την καθοδήγηση και την υποστήριξη στη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην Διευθύντρια της Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Γριβέα Ιωάννα για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχω στο παρόν μεταπτυχιακό πρόγραμμα, καθώς και την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Σολδάτου Αλεξάνδρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών για την βοήθεια που μου προσέφερε στην εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την καθοδήγηση και τη βοήθεια τους κατά την περίοδο της συγγραφής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η εισαγωγή της χρήσης των μοριακών τεχνικών στον τομέα των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στον παιδιατρικό πληθυσμό έχει βελτιώσει τα ποσοστά διάγνωσης, συμβάλλοντας στην πρόιμη αναγνώριση τους κατά την προγεννητική και νεογνική ηλικία, την δυνατότητα οικογενειακής συμβουλευτικής στις οικογένειες των ασθενών και των φορέων, αλλά και στην εξέλιξη των εξειδικευμένων και προσωποποιημένων θεραπευτικών προσεγγίσεων (γονιδιακές θεραπείες, βιολογικοί παράγοντες).

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης είναι η περιγραφή των μοριακών τεχνικών και η συμβολή τους στην διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στον παιδιατρικό πληθυσμό.

Υλικό-Μεθοδολογία: Βιβλιογραφική ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων PubMed και Google Scholar με λέξεις κλειδιά: πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, μοριακή διάγνωση, γενετικός έλεγχος, αλληλούχιση νέας γενιάς και κριτήρια αποκλεισμού: α) τη δημοσίευση σε άλλη γλώσσα, β) σε διεθνές περιοδικό εκτός της περιόδου 2013-2023, γ) θεματολογία επικεντρωμένη στην χρήση άλλων εργαστηριακών τεχνικών για την διάγνωση των ανοσοανεπαρκειών δ) θεματολογία σχετικά με την χρησιμότητα των μοριακών τεχνικών στην διάγνωση άλλων νοσημάτων, ε) δείγματα που στην πλειονότητα τους απαρτίζονται από ενήλικες ασθενείς, στ) αριθμός δείγματος <100 άτομα. Κατά την βιβλιογραφική ανασκόπηση έγινε αξιολόγηση των άρθρων σε επίπεδο τίτλου, περίληψης και ολόκληρου του κειμένου, ενώ απορρίφθηκαν τα άρθρα χωρίς προσβασιμότητα.

Αποτελέσματα: Κατά την αναζήτηση στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων ανευρέθηκαν 1081 άρθρα εκ των οποίων 55 πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν τις μοριακές τεχνικές που επιλέγονται τόσο στο ερευνητικό όσο και στο κλινικό κομμάτι διερεύνησης και διάγνωσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, υπέδειξαν αύξηση του ποσοστού διάγνωσης με τη χρήση των μοριακών τεχνικών και τα προτερήματα που προσφέρουν οι μοριακές τεχνικές στη διαφοροποίηση της πρωταρχικής κλινικής διάγνωσης, την τροποποίηση της θεραπευτικής προσέγγισης, τη δυνατότητα διάγνωσης πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών κατά την προγεννητική και νεογνική περίοδο, αλλά και τη δυνατότητα οικογενειακής συμβουλευτικής και

εξειδικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης. Πέρα από τα προτερήματα, υπέδειξαν ακόμα τους περιορισμούς και τα ηθικά διλήμματα των μοριακών τεχνικών.

Συμπεράσματα: Οι εξελίξεις στον τομέα των μοριακών τεχνικών για την διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών προσέφεραν μεγαλύτερα ποσοστά διάγνωσης, ειδικά με την εισαγωγή των τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς, αλλά και την καλύτερη κατανόηση τόσο του ανοσιακού συστήματος όσο και των γενετικών αιτιών δυσλειτουργίας του. Τα ποσοστά βελτίωσης είναι μεγαλύτερα σε ασθενείς με τυπικούς φαινοτύπους ανοσοανεπαρκειών και θετικό οικογενειακό ιστορικό, από εκείνους με άτυπα σημεία και συμπτώματα και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό, υποδηλώνοντας τη δυνατότητα εξέλιξης στον τομέα της ανοσολογίας και των ανοσοανεπαρκειών.

SUMMARY

Introduction: Genetic testing in patients with suspected immunodeficiency has improved the percentage of diagnosis in the pediatric population, allowing for early diagnosis during the prenatal and the neonatal period, enabling family counselling for patients and carriers, and promoting advances in management and therapy procedures (gene therapy, medications).

Aim: The aim of the present review of the literature is the description of current genetic testing and its utility in the diagnosis of inborn errors of immunity in the pediatric population.

Methodology: A review of the literature was conducted through the electronic database PubMed and Google Scholar using the key words: genetic testing, inborn errors of immunity, primary immunodeficiency disorders, molecular diagnosis, next generation sequencing. The exclusion criteria included a) publication in another language b) publication outside the period 2013-2023 c) content regarding the use of other laboratory tests in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases d) content regarding the use of molecular technology in the diagnosis of other diseases e) study samples that consist mainly adults, f) study sample sizes <100. During the process of evaluation, articles were dismissed based on the title, the summary, and the content. Articles without access were also dismissed.

Results: While researching the electronic databases 1081 articles were found, 55 of which fulfilled the criteria and were used in the study. The review of the literature demonstrated which molecular techniques are used for both research and diagnostic purposes in the field of primary immunodeficiency disorders, the improvement in the diagnosis of inborn errors of immunity due to their usage and the reconsiderations or alterations of the clinical diagnosis and therapy they evoke. At the same time genetic testing enabled the diagnosis of immunodeficiencies during the prenatal and neonatal period, while offering the possibility for family counseling to predict inborn errors of immunity, as well as personalized and targeted therapy. The review also demonstrated the limitations of molecular diagnosis and the ethical dilemmas.

Conclusions: The advances in the field of genetic testing for the diagnosis of inborn errors of immunity have increased diagnosis quota, especially with the conduction of

next generation sequencing, as well as better understanding of the immune system and genetic causes of its dysregulation. Greater improvements have been observed in patients with typical phenotypes and a positive family history, and smaller in those with atypical signs and symptoms and a negative family history, indicating the potential for future advances in the field of immunology and inborn errors of immunity.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες θεωρούνταν σπάνιες νόσοι με επιπολασμό 1:10,000 – 1:50,000 γεννήσεις. Οι πρόσφατες εξελίξεις των γενετικών ερευνών όμως, δείχνουν ότι οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες είναι πιο συχνές απ' ό,τι θεωρούνταν στο παρελθόν (1% του πληθυσμού). Αυτή η σημαντική εξέλιξη στον τομέα των πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών προέκυψε παράλληλα με την έρευνα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος και την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών αλληλούχισης DNA (NGS, Next-Generation Sequencing), οι οποίες επέτρεψαν τη διερεύνηση μεγάλου αριθμού γονιδίων την ίδια χρονική στιγμή, συμπεριλαμβανομένων των τεχνικών διερεύνησης του συνόλου των εξονίων (WES, whole exome sequencing) και ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος (WGS, whole genome sequencing).(1)

Τόσο η Αμερικανική Ακαδημία Αλλεργιολογίας, Άσθματος και Ανοσολογίας, όσο και ο Σύλλογος Κλινικής Ανοσολογίας υποστηρίζουν τη χρήση των μοριακών τεχνικών για τη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών γιατί τα αποτελέσματά τους, σχετικά με τη μοριακή αιτία της ασθένειας, μπορεί να μεταβάλουν την πρωταρχική διάγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση. Οι ιατροί πρέπει να διαθέτουν την απαραίτητη κλινική γνώση για να συμβουλέψουν τους ασθενείς τους σχετικά με τη χρήση των μοριακών τεχνικών, τα πιθανά γονίδια που υποστηρίζουν τη διάγνωση και θα έπρεπε να εξεταστούν, αλλά και την καταλληλότερη μοριακή τεχνική με σκοπό την αύξηση της πιθανότητας μοριακής διάγνωσης της νόσου.(2)

Η παρούσα διπλωματική εργασία συνίσταται αρχικά στο εισαγωγικό μέρος, στο οποίο γίνεται μια περιγραφή των πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών, των τύπων των μοριακών τεχνικών και του τρόπου χρήσης τους στη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών.

Στη συνέχεια, στο ειδικό μέρος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης όπου αναλύονται τα διαφορετικά είδη των μοριακών τεχνικών, τα μεμονωμένα και συγκριτικά προτερήματα και μειονεκτήματα τους, ενώ διερευνάται και η συνεισφορά τους στην αύξηση των ποσοστών διάγνωσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών. Τέλος, αναλύονται τα πλεονεκτήματα και τα ηθικά διλήμματα που παρουσιάζει η γενετική διάγνωση της νόσου με τη χρήση των μοριακών τεχνικών.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες προκαλούνται από βλάβες σε κάποιο γονίδιο (γονιδιακή μετάλλαξη) κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης των γεννητικών κυττάρων. Κλινικά παρουσιάζονται με αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις, αυτοανοσία, αυτοφλεγμονώδη νοσήματα, αλλεργίες, ανεπάρκεια του μυελού των οστών και/ή κακοήθειες.(3) Η σοβαρότητα των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών ποικίλει με ορισμένες μορφές να είναι απειλητικές για την ζωή κατά τη διάρκεια της βρεφικής ηλικίας, και άλλες λιγότερο βαριές που διαγιγνώσκονται ακόμη και κατά την ενήλικη ζωή, ή διαλάθουν της διάγνωσης.(4)

Ο επιπολασμός των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών σε παγκόσμιο επίπεδο υπολογίζεται σε 1:10.000 γεννήσεις, ένα ποσοστό που υποεκτιμά τον αριθμό των ασθενών λόγω της περιορισμένης πρόσβασης σε εξειδικευμένες διαγνωστικές τεχνικές και της διαγνωστικής πρόκλησης που παρουσιάζουν οι ασθενείς με άτυπες κλινικές εκδηλώσεις.(5) Η πρόσφατη εξέλιξη στις πλατφόρμες γενετικών ερευνών σε συνδυασμό με τις νέες γνώσεις στον τομέα της ανοσολογίας οδήγησαν σε νέα ερευνητικά δεδομένα, που δείχνουν ότι οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες είναι τελικά πιο συχνές απ' ό,τι είχε αρχικά εκτιμηθεί, με 1% του πληθυσμού να φέρει κάποια μορφή.(1)

1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ

Οι ανοσοανεπάρκειες χωρίζονται σε δέκα κατηγορίες:(3)

1. Συνδυασμένη ανεπάρκεια χυμικής και κυτταρικής ανοσίας
2. Συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια με συνοδά/ συνδρομικά χαρακτηριστικά
3. Ανεπάρκειες κυρίως αντισωμάτων
4. Νοσήματα ανοσολογικής δυσλειτουργίας
5. Συγγενείς διαταραχές των φαγοκυττάρων (αριθμός/λειτουργικότητα)
6. Διαταραχές ενδογενούς/ έμφυτης ανοσίας
7. Αυτοφλεγμονώδη νοσήματα
8. Ανεπάρκειες συμπληρώματος
9. Μυελική ανεπάρκεια
10. Φαινότυποι πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας

1.3 ΣΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Γενικά, τα προειδοποιητικά σημεία για να αναγνωριστεί ένα παιδί με πιθανή πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια έχουν καθοριστεί με βάση την ευαισθησία σε πολλαπλές ή σοβαρές λοιμώξεις. Συχνές, επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, σοβαρές λοιμώξεις που απαιτούν νοσηλεία, χρήση ενδοφλέβιων αντιβιοτικών, καθυστέρηση στη λύση της νόσου (και πρόσφατα, λοιμώξεις από ασυνήθιστα παθογόνα ή περιορισμένη ευαισθησία σε συγκεκριμένα παθογόνα) αναγνωρίζονται παγκοσμίως ως “red flags” για τις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στην κλινική κατανόηση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών επέτρεψαν την καλύτερη κατηγοριοποίηση των μη λοιμογόνων εκδηλώσεων των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Οι εκδηλώσεις αυτές αποτελούν το πρώτο σημείο της νόσου σε περίπου 10% των ασθενών.(6)

1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Η αρχική διερεύνηση των ασθενών με την κλινική υποψία πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας περιλαμβάνει τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές αναλύσεις του ανοσιακού συστήματος, στις οποίες περιλαμβάνονται εξετάσεις για:

- Ποιοτική και ποσοτική εξέταση των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων
- Διερεύνηση της λεμφοκυττάρωσης
- Μέτρηση των επιπέδων ανοσοσφαιρινών και των ειδικών τίτλων αντισωμάτων μετά από ανοσοποίηση (εμβολιασμό)
- Αξιολόγηση των επιπέδων του συμπληρώματος και της λειτουργίας του
- Εξετάσεις για συγκεκριμένα μονοπάτια (Λειτουργία των Toll-like υποδοχέων, αναπνευστική έκρηξη ουδετερόφιλων, ή οδούς μετάδοσης σήματος των T υποδοχέων).

Αυτή η προσέγγιση αποτελεί μία ακριβή και χρονοβόρο διαδικασία, που απαιτεί βιώσιμα κύτταρα από τον ασθενή και εξειδικευμένο προσωπικό σε ένα μεγάλο εύρος εργαστηριακών τεχνικών. Επιπλέον η αποστολή αίματος του ασθενούς σε εξειδικευμένα κέντρα οδηγεί σε εξασθένηση της κυτταρικής απάντησης και βιωσιμότητας τα οποία μπορεί να υπονομεύσουν την ακρίβεια των διαγνωστικών εξετάσεων.(5)

1.5 ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ

Η δημοσίευση της ειδικής επιτροπής παγκόσμιας ένωσης ανοσολογίας το 2022(3) πρόσθεσε 55 νέες γονιδιακές βλάβες, αυξάνοντας τον αριθμό των ανοσοανεπαρκειών σε 485. Με τον τρόπο αυτό αναδείχθηκε η σημασία των μοριακών τεχνικών αλληλούχισης DNA και επιβεβαιώθηκε η πιθανότητα οι υποψήφιες παθολογικές αλληλουχίες να:

1. Αναγνωρίζουν νέες γονιδιακές βλάβες υπεύθυνες για συγκεκριμένες ασθένειες
2. Διασαφηνίζουν τους υπεύθυνους μηχανισμούς παθογένεσης των ασθενειών.
3. Καθορίζουν τις λειτουργίες σημαντικών γονιδίων στην ανάπτυξη των ανοσιακών κυττάρων, άμυνα του οργανισμού και ρύθμιση του ανοσιακού συστήματος.
4. Διευρύνουν τους ανοσολογικούς και κλινικούς φαινοτύπους των ανοσοανεπαρκειών.
5. Συνεισφέρουν στην εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας.

Αυτές οι θεμελιώδεις εξελίξεις τονίζουν την συνεισφορά των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στην γενικότερη κατανόηση τόσο της ανοσολογίας όσο και της ιατρικής σε μοριακό και γενετικό επίπεδο.(3)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η χρήση των μοριακών τεχνικών στην διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών εφαρμόζεται με πολλές διαφορετικές μορφές τα τελευταία 30 χρόνια, σκοπεύοντας στην πρόιμη διάγνωση, θεραπεία και αποτροπή σοβαρών και θανάσιμων επιπλοκών. Η πρώτη χρήση των μοριακών τεχνικών για τη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών πραγματοποιήθηκε το 1993, με την αναγνώριση των μεταλλάξεων στο γονίδιο BTK (τυροσινική κινάση του Bruton), περισσότερο από 40 χρόνια μετά την πρώτη περιγραφή της Φυλοσύνδετης Αγαμμασφαιριναιμίας.(7) Από τις αρχές του 2000 η τεχνολογία NGS αποτελεί την μοριακή τεχνική της νέας χιλιετίας, περιλαμβάνοντας τεχνολογίες με τη μορφή στοχευμένων γονιδιακών πάνελ (TGP, targeted gene panels), τεχνολογία αλληλούχισης του συνόλου των εξονίων (WES, whole exome sequencing) και όλου του γονιδιώματος (WGS, whole genome sequencing).(8)

2.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΚΑΤΑ SANGER

Η τεχνολογία αλληλούχισης Sanger αποτελεί την πρώτη μοριακή τεχνική που έχει περιγραφεί και αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Αν και χρησιμοποιείται ακόμα ευρέως, παρουσιάζει σημαντικό περιορισμό στη χρήση της τα τελευταία χρόνια.(1) Στη μοριακή τεχνική Sanger ένας εκκινητής προσδένεται στη γενετική περιοχή που διερευνάται και με γνώμονα τις 4 νουκλεοτιδικές βάσεις που χρησιμοποιούνται για τη δόμηση του DNA, επεκτείνει τον εκκινητή χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την υπάρχουσα DNA αλληλουχία του ασθενή. Η κατασκευή της συμπληρωματικής αυτής αλληλουχίας διακόπτεται όταν τριφωσφατάσες της δεοξυνουκλεοσίδης σηματοδοτημένες με φλουροσκεΐνη ενσωματώνονται στη διαδικασία της επιμήκυνσης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται κομμάτια DNA διαφόρων μεγεθών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάγνωση της DNA αλληλουχίας την τελευταία σηματοδοτημένη βάση από το μεγαλύτερο στο μικρότερο κομμάτι. Αυτό οδηγεί σε αντιγραφή της αλληλουχίας του DNA του ασθενούς η οποία συγκρίνεται με μία αλληλουχία αναφοράς.

Η τεχνική Sanger προσφέρει τη δυνατότητα αναγνώρισης των σημείων μετάλλαξης σε εξόνια και ιντρόνια, απαλείψεις και διπλασιασμούς. Σημαντικό περιορισμό αποτελεί η πιθανή παράλειψη ορισμένων απαλείψεων και η μη αναγνώριση ορισμένων περιοχών ιντρονίων.(2) Εξαιτίας των χαρακτηριστικών αυτών, παρουσιάζει υψηλό κόστος για

κάθε εξεταζόμενο γονίδιο, δεν μπορεί να αυτοματοποιηθεί και αποτελεί μία αρκετά επίπονη και χρονοβόρο τεχνική.(1) Στην περίπτωση όμως των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών με ένα υπεύθυνο παθογόνο γονίδιο (πχ. BTK γονίδιο), αποτελεί μία αξιόπιστη μέθοδο διάγνωσης, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διερεύνηση γονιδίων που φέρουν ψευδογονίδια, και στη διερεύνηση των μελών μίας οικογένειας με θετικό ιστορικό πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας. Τέλος είναι απαραίτητη για την κλινική επιβεβαίωση αλληλόμορφων που ανακαλύπτονται με τη χρήση της τεχνικής WES.(7)

2.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ DNA (NGS, NEXT GENERATION SEQUENCING)

Οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες περιλαμβάνουν μερικές εκατοντάδες μεταλλάξεις που επηρεάζουν διάφορα μονοπάτια του ανοσιακού συστήματος. Για το λόγο αυτό οι μοριακές τεχνικές αλληλούχισης DNA (NGS) αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο στη διάγνωση τους. Η τεχνολογία της NGS δημιουργήθηκε με βάση την ανάγκη αυτοματοποίησης της διαδικασίας της μοριακής αλληλούχισης, επιτρέποντας την ταυτόχρονη εξέταση μεγάλου αριθμού γονιδίων, ενώ προσφέρει και τη δυνατότητα ανεύρεσης νέων μεταλλάξεων.(8)

Η μοριακή τεχνική NGS αναφέρεται σε μία ομάδα από πλατφόρμες αλληλούχισης, οι οποίες όπως η αλληλούχιση κατά Sanger, επεξεργάζονται τμήματα DNA αλληλουχιών με τη βοήθεια εκκινητών, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το DNA του ασθενή. Σε αντίθεση όμως με την αλληλούχιση κατά Sanger, η διαδικασία δεν απαιτεί τη χρήση τζελ για τον διαχωρισμό των τμημάτων. Αντιθέτως χρησιμοποιεί μία συσκευή CCD [Charge Coupled Device (αναγνώριση και σύλληψη εικόνων με τη μετατροπή των φωτονίων σε ηλεκτρόνια)] για την αναγνώριση των νουκλεοτιδικών βάσεων που είναι σεσημασμένα με φλουροσκεΐνη. Η αλληλούχιση NGS έχει χαμηλότερο κόστος από την αλληλούχιση κατά Sanger, η οποία όμως παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και είναι λιγότερο επιρρεπής σε λάθη.(2)

2.4 ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ Ή ΠΑΝΕΛ ΓΟΝΙΔΙΩΝ (TGPs, TARGETED GENE PANELS)

Τα στοχευμένα πάνελ γονιδίων, προσφέρουν μία στοχευμένη προσέγγιση, μέσα από την ταυτόχρονη διερεύνηση μίας καθορισμένης ομάδας γονιδίων. Τα TGPs που είναι διαθέσιμα στην κλινική πράξη δίνουν τη δυνατότητα διαγνωστικής προσέγγισης σε ασθενής με συγκεκριμένους φαινοτύπους (πχ. βαριά μεικτή ανοσοανεπάρκεια [SCID,

severe combined immunodeficiency]), σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας ([BMFS, bone marrow failure syndromes]), ή καλύπτουν μεγαλύτερο φάσμα περιλαμβάνοντας την πλειονότητα των γνωστών γονιδίων των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Εξαιτίας της υψηλής κάλυψης των γονιδίων που περιλαμβάνονται σε αυτά τα πάνελ, μπορούν να εντοπίσουν μωσαϊκισμούς, απαλείψεις και διπλασιασμούς στο επίπεδο των εξονίων ως τη μοριακή αιτία πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών και γνωστές μεταλλάξεις ιντρονίων. Τα TGP's περιορίζονται σε προεπιλεγμένα γονίδια και για το λόγο αυτό έχουν χαμηλότερο κόστος, μειωμένη πολυπλοκότητα ανάλυσης δεδομένων και είναι λιγότερο πιθανόν να περιλαμβάνουν τυχαία ευρήματα. Παρ' όλα αυτά μπορεί να παρουσιάζουν χαμηλότερη διαγνωστική αποτελεσματικότητα αν δεν περιλαμβάνουν νεότερα γονίδια που σχετίζονται με νόσους, δεν έχουν τη δυνατότητα αναγνώρισης αλλαγών στη δομή των γονιδίων (πχ μεγάλες προσθήκες ή απαλείψεις, μετατοπίσεις και αναστροφές) και παρουσιάζουν φτωγή κάλυψη περιοχών που συγγενεύουν με ψευδογονίδια.(8)

2.5 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΕΞΟΝΙΩΝ (WES, WHOLE EXOME SEQUENCING)

Η μοριακή τεχνική WES διερευνά περίπου το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος, που είναι υπεύθυνο για την σύνθεση πρωτεϊνών του ανθρώπινου σώματος (δηλαδή των εξονίων). Τα εξόνια αλληλουχούνται χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεϊκούς αισθητήρες οι οποίοι προσδένονται στο εξόνιο και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την ολοκλήρωση της αλληλούχισης. Η μοριακή τεχνική NGS χρησιμοποιείται για την αλληλούχιση του συνόλου των τμημάτων που προκύπτουν από τους αισθητήρες και στη συνέχεια τα τελικά μικρά τμήματα ευθυγραμμίζονται χρησιμοποιώντας πολύπλοκους ψηφιακούς αλγορίθμους.

Ιδανικά η τεχνική WES πραγματοποιείται ως μέρος μία τριάδας δειγμάτων, τόσο του ασθενή όσο και των δύο βιολογικών γονέων, με σκοπό τον καθορισμό της προέλευσης του παθολογικού γονιδίου, αλλά και του τρόπου κληρονομικότητας του.

Με το 85% των μεταλλάξεων που ακολουθούν τη Μενδελική κληρονομικότητα να βρίσκονται σε κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος (εξόνια) η μοριακή τεχνική WES αποτελεί μια πολύτιμη τεχνική τόσο στην κλινική διάγνωση όσο και στην ανεύρεση νέων υπεύθυνων γονιδίων (9,10), ενώ μπορεί να αξιολογεί παράλληλα και άλλα γενετικά μονοπάτια, όπως γονίδια που σχετίζονται με τον κίνδυνο κακοηθειών,

νευρολογικών και καρδιαγγειακών νόσων. Για το λόγο αυτό η γενετική συμβουλευτική των ασθενών και των οικογενειών τους πριν και μετά τη χρήση της μοριακής τεχνικής WES είναι κρίσιμης σημασίας.(2) Οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από την τεχνική WES πρέπει να επιβεβαιώνονται χρησιμοποιώντας την αλληλούχιση κατά Sanger.(7)

2.6 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ (WGS, WHOLE GENOME SEQUENCING)

Η μοριακή τεχνική WGS αλληλουχεί όλο το DNA, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονίων και των εξονίων. Στον τομέα των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση νέων νόσων.(1)

Η τεχνική WGS αξιολογεί το 99% του περιεχομένου του γονιδιώματος, το οποίο έχει παραλειφθεί από τη μοριακή τεχνική WES. Επιπρόσθετα η μοριακή τεχνική WES παρουσιάζει περιορισμούς, όπως η πιθανή αδυναμία αναγνώρισης ενός νέου εξονίου (άγνωστης αλληλουχίας), ή περιοχών που δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς, με αποτέλεσμα να μην προσφέρει πλήρη κάλυψη του συνόλου των εξονίων. Τους περιορισμούς αυτούς καλύπτει η μοριακή τεχνική, προσφέροντας τη δυνατότητα καλύτερης αξιολόγησης των μη κωδικοποιητικών περιοχών (μεταλλάξεις ιντρονίων, μεταλλάξεις σε περιοχές συρραφής γονιδίων και άλλες ρυθμιστικές μεταλλάξεις σε περιοχές εκτός εξονίων) όπως και απαλείψεις και διπλασιασμούς που μπορεί να παραλειφθούν από την τεχνική WES. Προς το παρόν, η μοριακή τεχνική WGS δεν χρησιμοποιείται ευρέως κλινικά, λόγω των περιορισμών που παρουσιάζει.(7)

2.7 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (CMA, CHROMOSOMAL MICROARRAY ANALYSIS)

Η χρωμοσωμική μικροσυστοιχία ανάλυσης, αναγνωρίζει χρωμοσωμικά ελλείμματα και προσθήκες [αριθμός αντιγράφων αλληλουχιών, (CNV, copy number variations)] κατά μήκος του γονιδιώματος. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω υπολογισμού της ποσότητας του DNA σε μία περιοχή και σύγκριση της διαφοράς στις εντάσεις του υβριδισμού ανάμεσα στο DNA του ασθενή και του υγιή μάρτυρα. Η τεχνική CMA επιτρέπει την ανίχνευση CNV, μικροδιαγραφές, μικροδιπλασιασμούς, τις περισσότερες αναδιατάξεις χρωμοσωμικών δομών (μεταθέσεις κτλ.), αλλά και την έλλειψη ετεροζυγωτίας. Παρόλα αυτά η μοριακή τεχνική CMA δεν μπορεί να ανιχνεύσει μικρούς διπλασιασμούς και απαλείψεις μέσα σε ένα μόνο γονίδιο ή μεταλλάξεις μίας μόνο βάσης.(2)

Η μοριακή τεχνική CMA χρησιμοποιείται συχνά για την διάγνωση του συνδρόμου DiGeorge,(7) αλλά και σε συνδυασμό με την μοριακή τεχνική WES ή WGS καθώς προσφέρει την δυνατότητα ανίχνευσης περιοχών που παρουσιάζουν ελλιπή ετερογένεια, ενώ αναγνωρίζει προσθήκες και διαγραφές που μπορεί να παραλειφθούν από την WES.(2)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ

3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Η αλληλούχιση του γενετικού υλικού περιγράφει τη μελέτη των ζευγών των νουκλεοτιδικών βάσεων που αποτελούν το ανθρώπινο DNA.(1) Όταν ζητείται γενετική αξιολόγηση ενός ασθενούς είναι σημαντικό να γίνεται γνωστός ο σκοπός αυτής της αξιολόγησης, καθώς υπάρχουν πολλές διαφορετικές μοριακές τεχνικές οι οποίες ανταποκρίνονται σε διαφορετικούς ερευνητικούς σκοπούς και μπορούν να διερευνήσουν διαφορετικό αριθμό γονιδίων.(1)

3.2 ΤΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Με γνώμονα ότι οι περισσότερες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, οφείλονται σε βλάβη ενός γονιδίου και σε κάποιες περιπτώσεις δύο γονιδίων, η χρήση των μοριακών τεχνικών είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση και επιβεβαίωση της διάγνωσης. Η ταχεία εξέλιξη στον τομέα των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών τονίζει την φαινοτυπική ετερογένεια των νοσημάτων και την γενετική ποικιλομορφία τους,(11) με τη διερεύνηση και τον καθορισμό της γενετικής βάσης αυτών των ασθενειών να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για τη στρατηγική αντιμετώπισης και θεραπείας τους.(8)

3.3 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Παρά τις σημαντικές εξελίξεις που έχουν προσφέρει οι μοριακές τεχνικές στον τομέα της ανοσολογίας, δεν είναι εφικτή η γενετική κατηγοριοποίηση όλων των ασθενών, ενώ για πολλές πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες δεν έχει βρεθεί ακόμα η γενετική αιτία.(13) Είναι πιθανό, ότι αυτό οφείλεται σε άλλους αιτιολογικούς παράγοντες όπως διαφορές στο μονοπάτι της μεταγραφής ή της μεθυλίωσης του DNA (επιγενετικοί παράγοντες), οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση της νόσου. Παρ' όλα αυτά, οι ασθενείς με υποψία ανοσοανεπάρκειας και ενισχυτικά της διάγνωσης εργαστηριακά ευρήματα πρέπει να αντιμετωπίζονται συμπτωματικά και να μην περιμένουν την μοριακή διάγνωση. Η λήψη λεπτομερούς ιστορικού και η πλήρης κλινική εξέταση με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων εργαστηριακών λειτουργικών και μοριακών εξετάσεων παραμένει υψίστου σημασίας, για την ασφαλή, αποτελεσματική και εξατομικευμένη φροντίδα του συμπτωματικού ασθενούς.(2)

3.4 ΠΟΤΕ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η απόφαση για την διεξαγωγή γενετικού ελέγχου και η κατάλληλη χρονική στιγμή διεξαγωγής του εξαρτάται από μία πληθώρα παραγόντων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται το ατομικό ιστορικό του ασθενούς, το οικογενειακό ιστορικό, η πρόσβαση σε βασικές και εξειδικευμένες ανοσολογικές εξετάσεις, η κάλυψη του κόστους του γενετικού ελέγχου και η επιθυμία του ασθενούς για την πραγματοποίησή του. Αν και ο γενετικός έλεγχος δεν προϋποθέτει την ολοκλήρωση άλλων εργαστηριακών εξετάσεων, είναι σημαντική η συνεκτίμηση ενός λεπτομερούς ατομικού και οικογενειακού ιστορικού, μαζί με τα αποτελέσματα βασικών εργαστηριακών και ανοσολογικών εξετάσεων, με σκοπό την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων του γενετικού ελέγχου και των πληροφοριών που προκύπτουν από αυτόν. Επιπρόσθετα ο γενετικός έλεγχος δεν πρέπει να αντικαθιστά τη λογική κλινική και ανοσολογική αξιολόγηση του ασθενούς. Η σοβαρή κλινική συμπτωματολογία πρέπει να αντιμετωπίζεται, ακόμα και χωρίς την παρουσία γενετικού αποτελέσματος.(8)

Τέλος για ορισμένες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, δίνεται η δυνατότητα γονιδιακής θεραπείας, όταν υπάρχει μοριακή διάγνωση της νόσου. Το κόστος της μοριακής διάγνωσης όμως παραμένει απαγορευτικό για τους περισσότερους ασθενείς και η διαθεσιμότητα περιορισμένη ανά τον κόσμο.(8) Για παράδειγμα στην Αλγερία μόνο 16% των ασθενών με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες έφεραν γενετική διάγνωση λόγω της χαμηλής προσβασιμότητας σε μοριακές τεχνικές(14) ενώ στην Ιαπωνία το 64%.(15)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 ΣΚΟΠΟΣ

Οι πρωτεύοντες σκοποί της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης περιλαμβάνουν τη χρήση των μοριακών τεχνικών ως μέσο διάγνωσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στον παιδιατρικό πληθυσμό, την αποτελεσματικότητα τους στη διάγνωση των ανοσοανεπαρκειών και τους παράγοντες από τους οποίους αυτή επηρεάζεται.

Επιπλέον δευτερεύον σκοπός της βιβλιογραφικής ανασκόπησης είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της γενετικής διάγνωσης με την χρήση των μοριακών τεχνικών ως προς τη θεραπευτική προσέγγιση, την πρόληψη και την οικογενειακή συμβουλευτική.

4.2 ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

Στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση τέθηκαν τα παρακάτω ερευνητικά ερωτήματα:

1. Ποιες μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται στην διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στον παιδιατρικό πληθυσμό;
2. Ποια η αποτελεσματικότητα τους στη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών;
3. Ποιοι παράγοντες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των μοριακών τεχνικών στην διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών;
4. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και τα διλήμματα του καθορισμού της γενετικής αιτίας με τη χρήση των μοριακών τεχνικών για τον ασθενή και την οικογένεια του;

4.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας και αναζήτηση μελετών που δημοσιεύτηκαν τη τελευταία δεκαετία 2013-2023.

Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων PubMed και Google Scholar. Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν στην αγγλική ορολογία ήταν: genetic testing, inborn errors of immunity, primary immunodeficiency disorders,

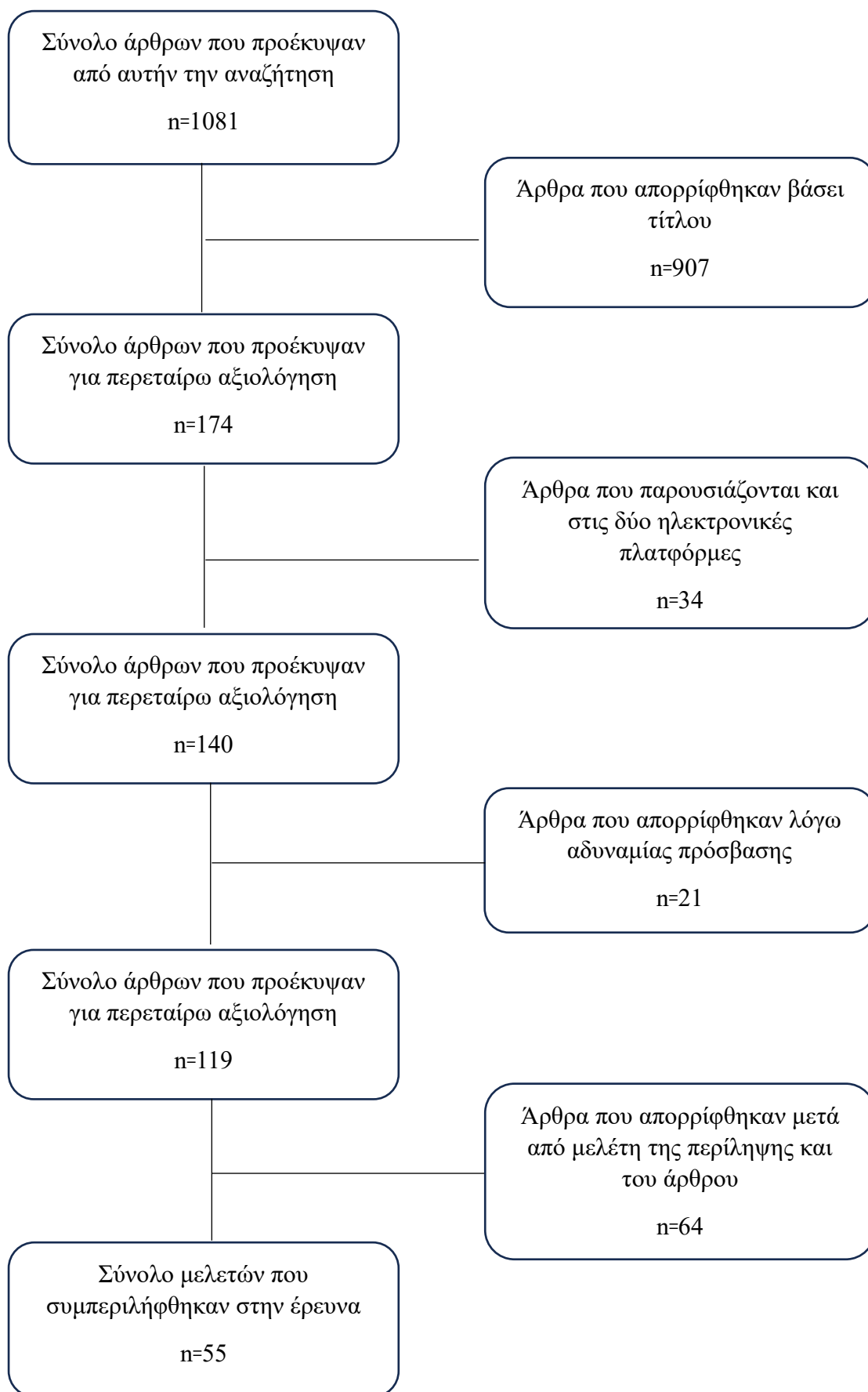
molecular diagnosis και next generation sequencing. Η ανασκόπηση διενεργήθηκε στο διάστημα μεταξύ Μαΐου-Αυγούστου.

Πιο συγκεκριμένα αναζητήθηκαν μελέτες δημοσιευμένες στην Αγγλική Γλώσσα σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά, από παγκόσμιους κρατικούς φορείς, ερευνητικά κέντρα και πανεπιστημιακά ιδρύματα, με τη χρονολογία έκδοσης τους να εμπίπτει εντός του χρονικού διαστήματος 2013-2023. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση αφορούσε και πρωτογενείς και δευτερογενείς μελέτες που περιλάμβαναν τόσο ενήλικες όσο και παιδιατρικούς ασθενείς καθώς η ανεύρεση μελετών αποκλειστικά παιδιατρικών ασθενών είναι ιδιαίτερα περιορισμένη.

Ως κριτήρια επιλογής ορίστηκαν: α) η δημοσίευση στην αγγλική γλώσσα, β) σε διεθνές περιοδικό το χρονικό διάστημα 2013-2023, γ) θεματολογία σχετικά με την συνεισφορά των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση των ανοσοανεπαρκειών και την αποτελεσματικότητα της γενετικής διάγνωσης στη θεραπευτική προσέγγιση, πρόληψη και οικογενειακή συμβουλευτική των ασθενών, δ) το δείγμα των μελετών να αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από παιδιατρικό πληθυσμό.

Ως κριτήρια αποκλεισμού ορίστηκαν: α) η δημοσίευση σε άλλη γλώσσα, β) σε διεθνές περιοδικό εκτός της περιόδου 2013-2023, γ) θεματολογία επικεντρωμένη στην χρήση άλλων εργαστηριακών τεχνικών για την διάγνωση των ανοσοανεπαρκειών δ) θεματολογία σχετικά με την χρησιμότητα των μοριακών τεχνικών στην διάγνωση άλλων νοσημάτων, ε) δείγματα που στην πλειονότητα τους απαρτίζονται από ενήλικες ασθενείς στ) αριθμός δειγμάτων <100.

4.4 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΕΝΤΑΞΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΩΝ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την αρχική αναζήτηση προέκυψαν 1081 μελέτες, μέσα από τις ηλεκτρονικές πλατφόρμες αναζήτησης PubMed και Google Scholar, 848 και 233 αντίστοιχα. Μετά τον έλεγχο σε επίπεδο τίτλου απέμειναν 174 μελέτες, 34 εκ των οποίων ήταν κοινές και 21 μη προσβάσιμες. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος σε επίπεδο περίληψης και ολόκληρου του άρθρου, με την ανεύρεση 55 ερευνών που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής.

5.1 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση ανευρέθηκαν 29 μελέτες (15 πειραματικές και 14 που προέκυψαν από μελέτη ανασκόπησης), οι οποίες διερευνήθηκαν για τις μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Πιο συγκεκριμένα 5 μελέτες χρησιμοποίησαν μόνο την τεχνική WES και 11 εξ' αυτών χρησιμοποίησαν στοχευμένα πάνελ γονιδίων. Στις υπόλοιπες μελέτες χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός μοριακών τεχνικών (WES και Sanger 1 μελέτη, WES και CMA 4 μελέτες, WES και πάνελ γονιδίων 3 μελέτες, WES, Sanger και CMA 1 μελέτη, Πάνελ γονιδίων και Sanger 2 μελέτες, Πάνελ γονιδίων και CMA 1 μελέτη, WES και WGS 1 μελέτη,) με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων τους ή την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της διάγνωσης. (13,21,23-25,27,28,30,33,34, 37-39,42-44)

Οι εξελίξεις στον τομέα των μοριακών τεχνικών αλληλούχισης DNA (NGS) έχουν φέρει επανάσταση τόσο στον τομέα της έρευνας όσο και της κλινικής διάγνωσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, με τις μοριακές τεχνικές αλληλούχισης DNA (NGS) να είναι υπεύθυνες για το 40-45% των νέων γονιδιακών ανακαλύψεων. (16,17) Πιο συγκεκριμένα τα πάνελ γονιδίων με τεχνολογία NGS και η τεχνολογία WES αποτελούν τα πρωτεύοντα μέσα διερεύνησης και διάγνωσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών (13/29 και 11/29 μελέτες αντίστοιχα). Για την ταυτοποίηση μίας νέας μετάλλαξης ορισμένες έρευνες προτείνουν ως πρώτο βήμα τα πάνελ γονιδίων και εν συνέχεια τις μοριακές τεχνικές WES/WGS σε περίπτωση που το υπεύθυνο γονίδιο δεν αναγνωριστεί (12,18,), λόγω του περιορισμού που μπορεί να παρουσιάζουν τα πάνελ γονιδίων ως προς τα συμπεριλαμβανόμενα γονίδια (39,43,44), αλλά και στη διερεύνηση των άτυπων φαινοτύπων των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών (42). Επιπρόσθετα, τα πάνελ γονιδίων με τεχνολογία NGS αποτελούν μία οικονομικότερη λύση με λιγότερα ηθικά διλήμματα, όσον αφορά τη γενετική πληροφορία σε σχέση με

τη μοριακή τεχνική WES (μεγαλύτερη πιθανότητα ανεύρεσης γονιδίων που δε σχετίζονται με τις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες αλλά με άλλες ασθένειες). (39,42)

Σε έναν σημαντικό αριθμό μελετών (13/29) χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός μοριακών τεχνικών, με κυριότερους σκοπούς την επιβεβαίωση της μοριακής διάγνωσης και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των πρωτευόντων μοριακών τεχνικών. Οι βασικότερες μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν επικουρικά για τους σκοπούς αυτούς ήταν η Sanger και η CMA. (13,21,23,24,25,30,37,38)

Τέλος η μοριακή τεχνολογία αλληλούχισης κατά Sanger αποτελεί το πρωτεύον διαγνωστικό εργαλείο για ασθενείς με τυπικούς φαινοτύπους μονογονιδιακών πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών.(25,34)

5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΩΝ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΩΝ

Στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση ανευρέθηκε ένας μεγάλος αριθμός μελετών που υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Επιπρόσθετα ανευρέθηκαν οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα ποσοστά αποτελεσματικότητας, όπως είναι η μοριακή τεχνική που χρησιμοποιήθηκε, η συγγένεια εξ αίματος, η ηλικιακή ομάδα και η δημογραφική κατανομή.

Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της χρήσης των μοριακών τεχνικών WES και WGS, ανέδειξε ποσοστό διάγνωσης μέχρι και 60% για ασθενείς με συγγένεια εξ αίματος και κλινική υποψία πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας.(19) Η αποτελεσματικότητα της μοριακής τεχνικής WES ανευρέθηκε υψηλότερη για ορισμένους τύπους πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας όπως η βαριά μεικτή ανοσοανεπάρκεια και οι συνδρομικές ανοσοανεπάρκειες, φτάνοντας έναν μέσο όρο της τάξης του 40%.(20,21)

Αντίθετα σε πειραματικές μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν πάνελ γονιδίων το ποσοστό μοριακής διάγνωσης ανερχόταν σε 15.3-31% με το μεγαλύτερο ποσοστό να παρουσιάζουν ασθενείς με συγγένεια εξ αίματος ή θετικό οικογενειακό ιστορικό νόσου.(37-43)

Βιβλιογραφικές και πειραματικές μελέτες ανά τον κόσμο ανέδειξαν παρόμοιο ποσοστό μοριακής διάγνωσης της τάξης του 33.1%-43.9% (Ιράν, Ιαπωνία, Αμερική, Νορβηγία).(15,22,23) Αντιθέτως όσον αφορά τις κατηγορίες των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών τα ποσοστά παρουσιάζουν σημαντική δημογραφική διαφοροποίηση. Πιο συγκεκριμένα σε μελέτη που περιλάμβανε ασθενείς από 22 διαφορετικές χώρες μεγαλύτερο ποσοστό μοριακής διάγνωσης παρουσίασαν οι φαινότυποι της Βαριάς Μεικτής Ανοσοανεπάρκειας (100%), της μυελικής ανεπάρκειας (55%) και της ανοσοανεπάρκειας με συνδρομικά χαρακτηριστικά (53%).(13,24,25) Σε αντίστοιχη βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε στο Ιράν η μοριακή διάγνωση κυμαινόταν από 0% (ανεπάρκειες συμπληρώματος) σε 85% (αυτοφλεγμονώδη νοσήματα),(26) ενώ στη Γερμανία η κατηγορία της ανοσιακής δυσλειτουργίας παρουσίαζε μοριακή διάγνωση στο 40%, η ανεπάρκεια αντισωμάτων 20%, και οι συγγενείς διαταραχές φαγοκυττάρων 20%.(27)

Σημαντική διαφοροποίηση του ποσοστού ανεύρεσης της μοριακής διάγνωσης παρουσιάστηκε και σε παιδιατρικούς ασθενείς στην Νότια Κίνα, τόσο ως προς τις κατηγορίες των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, όσο και ως προς τον τύπο κληρονομικότητας τους, με τη φυλοσύνδετη νόσο να κυριαρχεί σε ποσοστό 45,7% και την αυτοσωμική υπολειπόμενη να έρχεται σε δεύτερη θέση 30%. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με τα χαμηλά ποσοστά συγγένειας εξ αίματος του πληθυσμού. (28)

Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες έρχεται μία που πραγματοποιήθηκε στο Κουβέιτ με συνολικό ποσοστό μοριακής διάγνωσης πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών 70%. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η WES σε συνδυασμό με την αλληλούχιση κατά Sanger. Το δείγμα παρουσίασε συγγένεια εξ αίματος σε ποσοστό 81% και θετικό οικογενειακό ιστορικό σε 55%, ενώ ο τύπος κληρονομικότητας που επικρατούσε ήταν ο αυτοσωμικός υπολειπόμενος.(29) Η συσχέτιση του υψηλού ποσοστού μοριακής διάγνωσης και συγγένειας εξ αίματος υποδεικνύεται και από 2 ακόμα πειραματικές μελέτες. Η πρώτη πειραματική μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στο Ιράν, ανέδειξε μοριακή διάγνωση στο 70% των ασθενών με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες. Το δείγμα παρουσίαζε συγγένεια εξ αίματος στο 66%.(30) Η δεύτερη πειραματική μελέτη αφορά τον προγεννητικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε σε 112 οικογένειες με γνωστό ιστορικό πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας (77 εξ αυτών υπεβλήθησαν σε μοριακό έλεγχο). Τα αποτελέσματα

ανέδειξαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στα έμβρυα γονέων που είχαν συγγένεια εξ αίματος (33%) σε σχέση με εκείνους που δεν είχαν (22%).(31)

Ένας δεύτερος παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μοριακής διάγνωσης είναι η ηλικιακή ομάδα του δείγματος. Πειραματικές μελέτες σε Ολλανδία, Γερμανία και Ρωσία ανέδειξαν μεγαλύτερα ποσοστά μοριακής διάγνωσης στον παιδιατρικό πληθυσμό (24.6%-86% των παιδιών με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια, ενώ μόλις 9-12% των ενηλίκων ασθενών).(27,32,33)

Πειραματικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πάνελ γονιδίων με μοριακές τεχνικές αλληλούχισης DNA (NGS) σε ασθενείς <20 ετών (η πλειονότητα των οποίων εμφάνισε συμπτώματα κατά την παιδική ηλικία) γενετική διάγνωση επιτεύχθηκε στο 42.4%-50% των ασθενών. Μεγαλύτερο ποσοστό διάγνωσης ανευρέθηκε σε εκείνους με κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας (59-78%) και μικρότερο σε εκείνους που παρουσίαζαν μόνο κλινική υποψία (8-15.4%).(34-36)

Η μεγάλη διαφοροποίηση στην διαγνωστική αποτελεσματικότητα των μοριακών τεχνικών οφείλεται κυρίως στην μεγάλη ποικιλομορφία των ασθενών και της σοβαρότητα της νόσου. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των μελετών, με μερικές έρευνες να επικεντρώνονται σε συγκεκριμένες υποκατηγορίες πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών και άλλες να πραγματοποιούν πιο γενικευμένη διερεύνηση. Παράδειγμα αποτελούν οι ασθενείς με βαριά Μεικτή Ανοσοανεπάρκεια, οι οποίοι παρουσιάζουν πρόωμη έναρξη σοβαρής συμπτωματολογίας και είναι πιθανότερο να φέρουν μονογονιδιακές μεταλλάξεις. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλά ποσοστά γενετικής διάγνωσης (70-79%) όπως αναδεικνύεται σε μελέτες ασθενών με βαριά μεικτή ανοσοανεπάρκεια. Τέλος πληθυσμιακές ομάδες που παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά συγγένειας εξ αίματος είναι πιο πιθανόν να φέρουν ομόζυγες μεταλλάξεις, οι οποίες αναγνωρίζονται ευκολότερα από τη μοριακή τεχνική WES.(16)

5.3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΗΘΙΚΑ ΔΙΛΗΜΜΑΤΑ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει την κλινική αξία των μοριακών τεχνικών όχι μόνο στη διάγνωση αλλά και την θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με πρωτοπαθείς

ανοσοανεπάρκειες. Πιο συγκεκριμένα η χρήση των μοριακών τεχνικών μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της αρχικής κλινικής διάγνωσης και των κλινικών αποφάσεων σε ποσοστό 37-55%, ενώ αλλαγές στη θεραπευτική προσέγγιση έχουν διαπιστωθεί σε 13-39% των ασθενών.(19,21,24,33,44)

Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιαπωνία. Στην μελέτη αυτή 2392 νεογνά υποβλήθηκαν σε μοριακές τεχνικές αλληλούχησης DNA (NGS). Από τα 51 νεογνά που διαγνώστηκαν με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια τα 35 (68.6%) θεραπεύτηκαν ή παρουσίασαν βελτίωση της πρόγνωσης τους μετά τη διάγνωση.(45)

Σημαντικοί τομείς στους οποίους μπορούν να εφαρμοστούν οι μοριακές τεχνικές είναι κατά την προεμφύτευση του εμβρύου και μετά την σύλληψη του, με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων σε οικογένειες με ιστορικό γενετικά καθορισμένης πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας. Για παράδειγμα, σε μια οικογένεια με βαριά μεικτή ανοσοανεπάρκεια που οφείλεται στην IL2RG, οι μοριακές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάγνωση του εμβρύου τόσο πριν την εμφύτευση, εφαρμόζοντας γονιμοποίηση in vitro, όσο και μετά τη σύλληψη του χρησιμοποιώντας χοριακές λάχνες ή αμνιοπαρακέντηση. Αντίστοιχα, σε γονείς που φέρουν την απαλοιφή στο 22q11.2 μπορεί να εφαρμοστεί χρωμοσωμική μικροσυστοιχία ανάλυσης στο DNA των ελεύθερων εμβρυϊκών κυττάρων, τα οποία μπορεί να προέρχονται είτε από το ίδιο το έμβρυο είτε από το μητρικό αίμα.(7)

Η γνώση της μοριακής βάσης της πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προγνωστική συμβουλευτική της οικογένειας και την αποτελεσματικότερη χρήση προληπτικών μέτρων, όπως η εξειδικευμένη θεραπευτική προσέγγιση με σκοπό τη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας μετά τη γέννηση. Παρ' όλα αυτά η χρήση των μοριακών τεχνικών προγεννητικά δεν αποτελεί αξιόπιστο μέσο για οικογένειες με συμπτώματα πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας χωρίς καθορισμένη μοριακή διάγνωση, όπως σε πολλές περιπτώσεις κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας.(7)

Ο νεογνικός έλεγχος για τη βαριά μεικτή ανοσοανεπάρκεια, αποτελεί τον πρώτο διαγνωστικό έλεγχο πρωτοπαθών ανοσοανεπάρκειών που εφαρμόζεται στο γενικό πληθυσμό, ενώ αποτελεί και τον πρώτο νεογνικό έλεγχο που χρησιμοποιεί μοριακές τεχνικές ανάλυσης στο DNA νεογνών που προέρχεται από την κάρτα Guthrie.(46)

Βιβλιογραφικά, ο επιπολασμός των περιστατικών της SCID θεωρούνταν περίπου 1:50,000–1:100,000 γεννήσεις, παρ' όλα αυτά, δεδομένα από την εφαρμογή των προγραμμάτων νεογνικού ελέγχου στην Αμερική δείχνουν ότι ο επιπολασμός είναι υψηλότερος, με την Καλιφόρνια να παρουσιάζει επιπολασμό 1:33.000 (48) και τη Νέα Υόρκη 1:48.000 (47).

Τα νεογνά που υπάγονται σε περαιτέρω διερεύνηση μετά το νεογνικό έλεγχο ανέρχονται σε 1:5.536 – 1:20.000 στις διάφορες χώρες του κόσμου (Γερμανία, Πολωνία, Ηνωμένες Πολιτείες, Σουηδία). (49,50) Επιπρόσθετα, έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Νέα Υόρκη ανέδειξε την παρουσία σοβαρής ανοσιακής βλάβης μετά από παθολογικό αποτέλεσμα κατά το νεογνικό έλεγχο σε 1:5.000 νεογνά.(47)

Με τη χρήση των TREC (T cell receptor excision circles, ανίχνευση προϊόντων αποδόμησης των υποδοχέων των T-λεμφοκυττάρων με PCR) κατά το νεογνικό έλεγχο για τη διάγνωση της Βαριάς Μεικτής Ανοσοανεπάρκειας, αυξήθηκε το ποσοστό πρόωμης διάγνωσης των νεογνών πριν την ανάπτυξη σοβαρών επιπλοκών από τις λοιμώξεις. Σε μελέτη που περιλάμβανε 11 προγράμματα νεογνικού ελέγχου το ποσοστό επιβίωσης των νεογνών με Βαριά Μεικτή Ανοσοανεπάρκεια ήταν 87% (στο ποσοστό αυτό συμπεριλαμβανόταν και τα νεογνά που δεν υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων).(51)

Νέα έρευνα στην Αμερική μετά από 6,5 χρόνια εφαρμογής του νεογνικού ελέγχου σε περισσότερα από 3 εκατομμύρια νεογνά, ανέδειξε 50 περιπτώσεις SCID με 96% επιβίωση.(52,53) Βελτίωση παρουσίασε και ο χρόνος αναμονής για θεραπεία με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, π.χ. σε έρευνα της Μασαχουσέτης ήταν 6.5 μήνες πριν τον νεογνικό έλεγχο και 3.4 μήνες μετά την εφαρμογή του νεογνικού ελέγχου.(54)

Παρά τις σημαντικές εξελίξεις στον τομέα του νεογνικού ελέγχου, ο διαχωρισμός της αιτίας απώλειας των T κυττάρων παραμένει δυσχερής. Στην διαφοροδιάγνωση της αληθούς SCID περιλαμβάνονται και άλλες διαταραχές, που απαιτούν διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση όπως η αγενεσία του θύμου, η οποία δεν υπόκειται σε θεραπεία με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.(7) Σε νεογνά με μεμονωμένη ανεπάρκεια T- κυττάρων, είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψιν, το σύνδρομο Di George, άλλες μορφές θυμικής δυσλειτουργίας ή η πλήρης απώλεια του θύμου αδένος. Αυτό συνεπάγεται σημαντικές μεταβολές στην αντιμετώπιση των ασθενών καθώς η κοινή

θεραπεία στη SCID είναι η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ στην περίπτωση της συγγενούς έλλειψης του θύμου αδένος, η μεταμόσχευση του.(2) Πιθανή είναι η παρουσία χαμηλότερων επιπέδων TREC στα πρόωρα νεογνά κατά το νεογνικό έλεγχο, γεγονός που τονίζει την ανάγκη επανελέγχου τους.(55)

Για την επίλυση των περιορισμών που παρουσιάζει ο νεογνικός έλεγχος, πολλά προγράμματα έχουν εφαρμόσει τη χρήση των μοριακών τεχνικών ως επικουρικό μέσο της ανάλυσης TREC. Πιο συγκεκριμένα η χρήση μοριακών τεχνικών DNA (NGS) με πάνελ γονιδίων στο αίμα του νεογνού που λαμβάνεται από την κάρτα Guthrie, μπορεί να οδηγήσει στην καθοριστική μοριακή διάγνωση της πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας και να προσφέρει πληροφορίες που θα επηρεάσουν τη θεραπευτική αντιμετώπιση του νεογνού. Επιπλέον μειώνουν τον χρόνο λήψης των αποτελεσμάτων από εβδομάδες με μήνες σε 3-4 εργάσιμες ημέρες. Η συνδυαστική εφαρμογή μίας υψηλότερης παθολογικής τιμής TREC σε συνδυασμό με τη χρήση των μοριακών τεχνικών NGS επιτρέπει την ανίχνευση άτυπης ή leaky SCID, με αποτέλεσμα την πρόωπη αντιμετώπιση με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Η επιτυχής εφαρμογή της μοριακής τεχνικής NGS στο νεογνικό έλεγχο ως επικουρικό μέσο, ανέδειξε την πιθανή δυνατότητα χρήσης της ως πρωταρχική μέθοδο ανίχνευσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών.(56)

Τα πλεονεκτήματα του πρώιμου νεογνικού ελέγχου μπορεί πολλές φορές να γίνονται αντιληπτά με διαφορετικό τρόπο από τους γονείς και τους ιατρούς. Οι γονείς πιστεύουν ότι η δυνατότητα πρώιμης διάγνωσης μπορεί: (α) με γρήγορη παρέμβαση να αυξήσει την πιθανότητα ενός υγιούς νεογνού, (β) να περιορίσει τη χρονοβόρο και επίπονη διαγνωστική διερεύνηση και, (γ) να προσφέρει περισσότερες επιλογές στους γονείς όσον αφορά τις επόμενες εγκυμοσύνες. Αντίθετα για το ιατρικό προσωπικό, η χρησιμότητα του νεογνικού ελέγχου μπορεί πολλές φορές να περιορίζεται στον τρόπο προσέγγισης και διαχείρισης των ασθενών με σκοπό την βελτίωση της πρόγνωσης τους.(56)

Πολλά ηθικά ερωτήματα προκύπτουν τόσο μετά την εφαρμογή του νεογνικού ελέγχου όσο και γενικά των μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι:

1. Η ανίχνευση νοσημάτων χωρίς διαθέσιμη θεραπεία (πχ Αταξία-Τηλαγγειεκτασία),

2. Η ανεύρεση πιθανών παθολογικών αλληλουχιών, οι οποίες όμως δεν φέρουν κάποια αποδεδειγμένη συσχέτιση με τον φαινότυπο πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας.
3. Η προστασία της γενετικής πληροφορίας και ο σεβασμός της ως προσωπικό δεδομένο του ασθενή, τόσο κατά την επεξεργασία της όσο και κατά την αποθήκευση της στις βάσεις δεδομένων.
4. Η δυνατότητα πρόσβασης όλων ανεξαρτήτως των πληθυσμιακών ομάδων, αλλά και η δυνατότητα ασφαλιστικής κάλυψης του κόστους του γενετικού ελέγχου.(57)

Η ανεύρεση μεταλλάξεων υπεύθυνων για τον φαινότυπο ενός ασθενής με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη πρόβλεψη της κλινικής πορείας της νόσου. Παράδειγμα πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας με συσχέτιση γονότυπου/φαινοτύπου είναι το σύνδρομο Wiskott-Aldrich (WAS). Το σύνδρομο WAS αποτελεί ένα σημαντικό παράδειγμα πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας με ποικιλομορφία των κλινικών φαινοτύπων και διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση για καθ' έναν από αυτούς. Πιο συγκεκριμένα, μετάλλαξη που οδηγεί σε γενικευμένη απώλεια έκφρασης πρωτεΐνης αντιστοιχεί σε βαριά κλινική πορεία με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης αυτοανοσίας και κακοήθειας. Αντιθέτως, μετάλλαξη που επιτρέπει την μερική παραγωγή της πρωτεΐνης WASp, πιθανόν αντιστοιχεί στον φαινότυπο της φυλοσύνδετης θρομβοκυτταροπενίας και όχι εκείνον της βαριάς μορφής της νόσου. Ο διαχωρισμός αυτός οδηγεί σε διαφορετική πρόγνωση και διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση.(7)

Η επίτευξη της γενετικής διάγνωσης με την χρήση μοριακών τεχνικών, διευκολύνει τους ιατρούς να προσφέρουν καλύτερη συμβουλευτική σχετικά με την πορεία της νόσου και σε ασθενείς με άτυπη συμπτωματολογία. Επιτρέπει ακόμα την αποφυγή περιττών διαγνωστικών εξετάσεων και οδηγεί σε εξατομικευμένη θεραπευτική φροντίδα. Παράδειγμα αποτελούν ασθενείς που παρουσιάζουν βαρύτερες μορφές της κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με τη βαριά μεικτή ανοσοανεπάρκεια. Η μοριακή διάγνωση προσφέρει τη δυνατότητα ανεύρεσης της αιτίας της βαριάς συμπτωματολογίας τους αλλά και την καλύτερη ενημέρωση των ασθενών.(7)

Όσον αφορά την θεραπεία των ασθενών, αναμένεται πως οι συσχετίσεις μεταξύ γονοτύπου/φαινοτύπου θα αυξηθούν, με την αποκάλυψη ολοένα και περισσότερων γενετικών μηχανισμών, οδηγώντας σε εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Αυτό θα οδηγήσει στη σταδιακή μείωση των περιορισμών που προκύπτουν στη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με βάση το φαινότυπο. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς με μεταλλάξεις που προκαλούν αυξημένη λειτουργικότητα, θα έχουν τη δυνατότητα εφαρμογής στοχευμένων και εξατομικευμένων θεραπειών, μέσα από την αναγνώριση των βλαβών στο ανοσιακό σύστημα.(58)

Πολλές πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες εκτός της βαριάς μεικτής ανοσοανεπάρκειας αντιμετωπίζονται με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Η σημασία της μοριακής διάγνωσης πριν τη μεταμόσχευση έγκειται στη χρήση εξατομικευμένων υποστηρικτικών μέσων. Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας με ανεπάρκεια LRBA(lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein) για την οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο βιολογικός παράγοντας abatacept, η rapamycin στην απλοανεπάρκεια CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) και ο βιολογικός παράγοντας anakinra στην ανεπάρκεια του υποδοχέα του ανταγωνιστή της ιντερλευκίνης-1.(7)

Οι περισσότερες πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες αποτελούν δια βίου ασθένειες με συνεχή ανάγκη θεραπευτικής παρέμβασης. Για το λόγο αυτό, καθυστέρηση ή διακοπή της θεραπείας εν αναμονή των αποτελεσμάτων των μοριακών εξετάσεων μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την υγεία των ασθενών. Παράδειγμα αποτελεί η φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία. Η φυλοσύνδετη αγαμμασφαιριναιμία προκαλείται από μεταλλάξεις στην τυροσινικής κινάσης Bruton και χαρακτηρίζεται από πλήρη έλλειψη των Β-κυττάρων. Αυτό οδηγεί σε αδυναμία παραγωγής ανοσοσφαιρινών και αντισωμάτων με αποτέλεσμα βαριές βακτηριακές λοιμώξεις και ορισμένες ιογενείς. Η ανοσιακή αυτή ανεπάρκεια αντιμετωπίζεται αποτελεσματικά μέσω της δια βίου θεραπείας υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη, καθώς δεν υπάρχει πιθανότητα αυτόματης βελτίωσης στην παραγωγή των Β-κυττάρων. Η ανεύρεση του ελλείματος τόσο των Β-κυττάρων όσο και της πρωτεΐνης BTK με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής σε έναν άρρενα ασθενή είναι διαγνωστική. Για τον λόγο αυτό δεν απαιτείται μοριακή διάγνωση της νόσου για την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης, καθώς αυτό μπορεί να καθυστερήσει τη θεραπευτική της αντιμετώπιση.(7)

Άλλες μορφές ανοσοανεπάρκειας που απαιτούν δια βίου θεραπεία και δεν απαιτούν την χρήση μοριακών τεχνικών για την διάγνωση τους είναι η χρόνια κοκκιωματώδης νόσος και το σύνδρομο Wiskott-Aldrich. Συμπερασματικά, η καθυστέρηση ή διακοπή της θεραπείας εν αναμονή της γενετικής διάγνωσης δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση των ασθενειών αυτών και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας τους.(7)

Τα πλεονεκτήματα της μοριακής διάγνωσης επεκτείνονται πέρα από τον ίδιο τον ασθενή, λόγω της δυνατότητας που προσφέρουν στην ανεύρεση φορέων πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών και στην εφαρμογή της γενετικής συμβουλευτικής. Στις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες περιλαμβάνονται τόσο φυλοσύνδετες όσο και αυτοσωμικές υπολειπόμενες μορφές (π.χ. χρόνια κοκκιωματώδης νόσος). Ο διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών μορφών κληρονομικότητας μπορεί να επηρεάσει την οικογένεια του ασθενούς, μέσω της διερεύνησης τους για πιθανή φορεία της νόσου. Παράδειγμα αποτελεί η φυλοσύνδετη μορφή της χρόνιας κοκκιωματώδους νόσου. Πολλοί από τους φορείς της χρόνιας κοκκιωματώδους νόσου παρουσιάζουν χαρακτηριστικά σημεία και συμπτώματα, ενώ φέρουν τον κίνδυνο ανάπτυξης συμπτωμάτων της ίδιας της νόσου σε περίπτωση αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος. Αντιθέτως στον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας, τα φαγοκύτταρα των φορέων παρουσιάζουν φυσιολογική λειτουργία με φυσιολογικές εργαστηριακές εξετάσεις λειτουργικότητας.(7)

Οι διαφορές αυτές τονίζουν τη σημασία της μοριακής διάγνωσης των φορέων και του τύπου κληρονομικότητας των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών με σκοπό την κατανόηση του πιθανού κινδύνου σε περίπτωση εγκυμοσύνης, την οικογενειακή συμβουλευτική και τη λήψη αποφάσεων που μπορούν να μειώσουν σημαντικά τόσο τον κίνδυνο απόκτησης νοσούντων απογόνων αλλά και το υγειονομικό κόστος που αυτό επιφέρει.(7)

Ανεξαρτήτως των πλεονεκτημάτων που προσφέρει μία μοριακή διάγνωση είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψιν η πιθανότητα αυτή να μην είναι επιθυμητή από τον ασθενή τόσο για προσωπικούς όσο και για επαγγελματικούς λόγους. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη τόσο η συμβουλευτική του ασθενή όσο και η λήψη γραπτής συγκατάθεσης πριν από την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών.(7)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν τις μοριακές τεχνικές που επιλέγονται τόσο στο ερευνητικό όσο και στο κλινικό κομμάτι διερεύνησης και διάγνωσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, με τις μοριακές τεχνικές αλληλούχισης DNA (NGS) να κυριαρχούν. Επιπρόσθετα, υπέδειξαν ότι η χρήση των μοριακών τεχνικών οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού διάγνωσης των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, ιδιαίτερα σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών. Παράλληλα η μοριακή διάγνωση μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της πρωταρχικής κλινικής διάγνωσης αλλά και της θεραπευτικής προσέγγισης, ενώ προσφέρει τη δυνατότητα διάγνωσης ορισμένων τύπων πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών κατά την προγεννητική και νεογνική περίοδο, τη δυνατότητα οικογενειακής συμβουλευτικής για την πρόληψη τους με βάση το μοντέλο κληρονομικότητας τους και εξειδικευμένες θεραπευτικές μεθόδους. Παρ' όλα αυτά οι μοριακές τεχνικές χαρακτηρίζονται από ορισμένους περιορισμούς, ιδιαίτερα όσον αφορά την προσβασιμότητα στα εξειδικευμένα εργαστήρια και το κόστος, αλλά και σημαντικά ηθικά διλήμματα όπως η χρήση της γενετικής πληροφορίας.

Στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση διερευνήθηκαν οι διαφορετικοί τύποι των μοριακών τεχνικών, τα μεμονωμένα και συγκριτικά προτερήματα και μειονεκτήματα που παρουσιάζουν, πχ η αλληλούχιση κατά Sanger, η οποία εξακολουθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών αλλά και στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μετά τη χρήση των νεότερων μοριακών τεχνικών αλλά μειονεκτεί σε σχέση με την αλληλούχιση νέας γενιάς, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών πιθανών υπεύθυνων γονιδίων, και την ανεύρεση νέων γονιδιακών μεταλλάξεων. (1,2,8)

Μέσα από την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας τους στη διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, ανευρέθηκαν πολλές μελέτες που παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στο ποσοστό διάγνωσης με την χρήση των μοριακών τεχνικών, το οποίο σε πρόσφατες έρευνες φτάνει στο 60%-70%. Το υψηλό αυτό ποσοστό παρουσιάζεται σε συγκεκριμένες ομάδες πληθυσμών με ορισμένα χαρακτηριστικά (τυπικούς φαινοτύπους, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας, συγγένεια εξ αίματος, θετικό οικογενειακό ιστορικό)(5,19,29,30,32), σε συγκεκριμένες κατηγορίες πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών (πχ SCID)(16) και σε συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες (παιδιατρικός πληθυσμός).(16,27,32-36,45)

Με γνώμονα τα παραπάνω είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι το ποσοστό των γάμων μεταξύ συγγενών εξ αίματος στην Μέση Ανατολή φτάνει το 65%, σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με εκείνο της Ευρώπης, των περιοχών του Δυτικού Ειρηνικού και της Λατινικής Αμερικής (5.6, 2.3, and 0.96%, αντίστοιχα). Αυτό έχει ως συνέπεια, η επίπτωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών στη Μέση Ανατολή να είναι 20 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη Νότια Αμερική και την Ευρώπη.(5) Επιπρόσθετα όσον αφορά την ηλικιακή ομάδα, η πιθανότητα ανεύρεσης μονογονιδιακής μετάλλαξης στους ενήλικες ασθενείς με ηπιότερα συμπτώματα είναι χαμηλότερη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μείωση της διαγνωστικής αποτελεσματικότητας. Πιθανά αίτια αποτελούν η πολυγονιδιακή κληρονομικότητα, η επίκτητη ανοσοανεπάρκεια ή οι περιβαλλοντικοί παράγοντες.(16)

Οι μοριακές τεχνικές επιτρέπουν ακόμα (α) την ανεύρεση του τρόπου κληρονομικότητας της νόσου, με την αυτοσωμική υπολειπόμενη να κυριαρχεί στην πλειονότητα των μελετών, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στα υψηλά ποσοστά συγγένειας εξ αίματος(28,29), (β) τους τύπους των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών που επικρατούν στις διάφορες χώρες του κόσμου(13,24,25,27). Επιπλέον μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβολή της αρχικής κλινικής διάγνωσης (έως και 55%) και των κλινικών αποφάσεων (έως και 39%).(19,21,24,33,44)

Τέλος μέσα από την βιβλιογραφική ανασκόπηση παρουσιάστηκαν και τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η γενετική διάγνωση με την χρήση των μοριακών τεχνικών, αλλά και τα ηθικά διλήμματα που δημιουργεί. Πιο συγκεκριμένα, η εφαρμογή μοριακών τεχνικών ως επικουρικό μέσο της ανάλυσης TRECs κατά τον νεογνικό έλεγχο, προσφέρει μεγαλύτερη διαγνωστική αποτελεσματικότητα και δυνατότητα εξατομικευμένης θεραπείας.(56) Η εφαρμογή του γενετικού ελέγχου με την χρήση μοριακών τεχνικών προγεννητικά επιτρέπει την προγνωστική συμβουλευτική της οικογένειας και την αποτελεσματικότερη χρήση προληπτικών μέτρων, όπως η εξειδικευμένη θεραπευτική προσέγγιση με σκοπό την μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας μετά την γέννηση. Επιπλέον προσφέρει τη δυνατότητα καθορισμού της πρόγνωσης της νόσου, οικογενειακής συμβουλευτικής αλλά και εφαρμογής προσωποποιημένης και εξειδικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης.(7)

Σημαντικό κομμάτι της χρήσης των μοριακών τεχνικών αποτελούν και τα ηθικά διλήμματα που παρουσιάζουν ιδιαίτερα όσον αφορά την προσβασιμότητα και το κόστος τους, αλλά και την χρήση και αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας των ασθενών.(56,57). Για τον λόγο αυτό η πλήρης ενημέρωση και η λήψη γραπτής συγκατάθεσης αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διαδικασίας.(7)

Ακόμα πρέπει να επισημανθεί ο περιορισμός της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης, η οποία περιλαμβάνει μελέτες με δείγματα τόσο ενήλικων όσο και παιδιατρικών ασθενών, καθώς οι μελέτες με αποκλειστικά παιδιατρικό πληθυσμό ήταν ιδιαίτερα περιορισμένες.

Επομένως, η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση αναδεικνύει την ανάγκη περαιτέρω μελετών για την αποτελεσματικότητα της χρήσης των μοριακών τεχνικών, προγεννητικά, στη νεογνική, βρεφική και παιδική ηλικία. Επίσης πώς η ανεύρεση της γενετικής αιτίας επηρεάζει, την ποιότητα ζωής των νεαρών ασθενών, την πρόγνωση τους, τη θεραπευτική τους προσέγγιση και τη δυνατότητα εφαρμογής εξειδικευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων (γονιδιακή θεραπεία, βιολογικοί παράγοντες) είναι ερωτήματα που αναμένουν να απαντηθούν.

Συμπερασματικά, οι εξελίξεις στον τομέα των μοριακών τεχνικών για την διάγνωση των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών προσέφεραν μεγαλύτερα ποσοστά διάγνωσης, ειδικά με την εισαγωγή των μοριακών τεχνικών αλληλούχισης DNA (NGS), αλλά και την καλύτερη κατανόηση τόσο του ανοσιακού συστήματος όσο και των γενετικών αιτιών δυσλειτουργίας του. Τα ποσοστά αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη βελτίωση σε ορισμένες μόνο ομάδες ασθενών μαρτυρώντας με τον τρόπο αυτό τη δυνατότητα εξέλιξης στον τομέα της ανοσολογίας και των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών. Σημαντική βελτίωση έχει επιτευχθεί ακόμα μέσα από τη χρήση των μοριακών τεχνικών στον προγεννητικό και νεογνικό έλεγχο των πρωτοπαθών ανοσοανεπαρκειών, στην οικογενειακή συμβουλευτική και στη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών. Παρά τα αυξημένα ποσοστά διάγνωσης στον παιδιατρικό πληθυσμό, ο περιορισμένος αριθμός μελετών που να τον αφορούν εξ ολοκλήρου, αναδεικνύει την ανάγκη περαιτέρω ερευνών για την αποτελεσματικότητα της χρήσης των μοριακών τεχνικών στον παιδιατρικό πληθυσμό και τις επιπτώσεις που έχει η ανεύρεση της γενετικής αιτίας στην πρόγνωση, τη θεραπευτική προσέγγιση και την ποιότητα ζωής των μικρών ασθενών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Segundo GRS. Genetic-molecular characterization in the diagnosis of primary immunodeficiencies. Vol. 97, *Jornal de Pediatria*. Elsevier Editora Ltda; 2021. p. S3–9.
2. Heimall J. Genetic Testing to Diagnose Primary Immunodeficiency Disorders and to Identify Targeted Therapy. Vol. 39, *Immunology and Allergy Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2019. p. 129–40.
3. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2022 Oct 1;42(7):1473–507.
4. Michael Keller M. Inborn errors of immunity (primary immunodeficiencies): Overview of management. Up To Date [Internet]. 2023 Feb 13 [cited 2023 Jul 24]; Available from: <https://www.uptodate.com/contents/inborn-errors-of-immunity-primary-immunodeficiencies-overview-of-management>
5. Seleman M, Hoyos-Bachiloglu R, Geha RS, Chou J. Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primary immunodeficiencies. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
6. Costagliola G, Peroni DG, Consolini R. Beyond Infections: New Warning Signs for Inborn Errors of Immunity in Children. Vol. 10, *Frontiers in Pediatrics*. Frontiers Media S.A.; 2022.
7. Heimall JR, Hagin D, Hajjar J, Henrickson SE, Hernandez-Trujillo HS, Tan Y, et al. Use of Genetic Testing for Primary Immunodeficiency Patients. *J Clin Immunol*. 2018 Apr 1;38(3):320–9.
8. Lee K, Abraham RS. Next-generation sequencing for inborn errors of immunity. *Hum Immunol*. 2021 Nov 1;82(11):871–82.
9. Bucciol G, Van Nieuwenhove E, Moens L, Itan Y, Meyts I. Whole exome sequencing in inborn errors of immunity: Use the power but mind the limits. Vol. 17, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 421–30.
10. Meyts I, Bosch B, Bolze A, Boisson B, Itan Y, Belkadi A, et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. Vol. 138, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc.; 2016. p. 957–69.
11. Bucciol G, Meyts I. Recent advances in primary immunodeficiency: From molecular diagnosis to treatment. Vol. 9, *F1000Research*. F1000 Research Ltd; 2020.
12. Zhang K, Wang L, Alexander Valencia C, Marsh RA. Next-generation sequencing based clinical molecular diagnosis of primary immunodeficiency diseases. In: *Next Generation Sequencing Based Clinical Molecular Diagnosis of Human Genetic Disorders*. Springer International Publishing; 2017. p. 89–112.

13. Heimall J. Now Is the Time to Use Molecular Gene Testing for the Diagnosis of Primary Immune Deficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2019 Mar 1;7(3):833–8.
14. Belaid B, Lamara Mahammed L, Drali O, Oussaid AM, Touri NS, Melzi S, et al. Inborn Errors of Immunity in Algerian Children and Adults: A Single-Center Experience Over a Period of 13 Years (2008–2021). *Front Immunol*. 2022 Apr 21;13.
15. Mitsui-Sekinaka K, Sekinaka Y, Endo A, Imai K, Nonoyama S. The Primary Immunodeficiency Database in Japan. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
16. Vorsteveld EE, Hoischen A, van der Made CI. Next-Generation Sequencing in the Field of Primary Immunodeficiencies: Current Yield, Challenges, and Future Perspectives. Vol. 61, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Springer; 2021. p. 212–25.
17. French MA, Tangye SG. The next generation of diagnostic tests for primary immunodeficiency disorders. Vol. 221, *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2020. p. 1232–4.
18. Yamashita M, Inoue K, Okano T, Morio T. Inborn errors of immunity—recent advances in research on the pathogenesis. Vol. 41, *Inflammation and Regeneration*. BioMed Central Ltd; 2021.
19. Chinn IK, Orange JS. A 2020 update on the use of genetic testing for patients with primary immunodeficiency. Vol. 16, *Expert Review of Clinical Immunology*. Taylor and Francis Ltd.; 2020. p. 897–909.
20. Richardson AM, Moyer AM, Hasadsri L, Abraham RS. Diagnostic Tools for Inborn Errors of Human Immunity (Primary Immunodeficiencies and Immune Dysregulatory Diseases). Vol. 18, *Current Allergy and Asthma Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2018.
21. Similuk MN, Yan J, Ghosh R, Oler AJ, Franco LM, Setzer MR, et al. Clinical exome sequencing of 1000 families with complex immune phenotypes: Toward comprehensive genomic evaluations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022 Oct 1;150(4):947–54.
22. Abolhassani H, Kiaee F, Tavakol M, Chavoshzadeh Z, Mahdavian SA, Momen T, et al. Fourth Update on the Iranian National Registry of Primary Immunodeficiencies: Integration of Molecular Diagnosis. *J Clin Immunol*. 2018 Oct 1;38(7):816–32.
23. Beers BJ, Similuk MN, Ghosh R, Seifert BA, Jamal L, Kamen M, et al. Chromosomal microarray analysis supplements exome sequencing to diagnose children with suspected inborn errors of immunity. *Front Immunol*. 2023;14.
24. Stray-Pedersen A, Sorte HS, Samarakoon P, Gambin T, Chinn IK, Coban Akdemir ZH, et al. Primary immunodeficiency diseases: Genomic approaches delineate heterogeneous Mendelian disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017 Jan 1;139(1):232–45.

25. Chinn IK, Bostwick BL. The role of genomic approaches in diagnosis and management of primary immunodeficiency. Vol. 30, *Current Opinion in Pediatrics*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018. p. 791–7.
26. Latif AH, Tabassomi F, Abolhassani H, Hammarström L. Molecular diagnosis of primary immunodeficiency diseases in a developing country: Iran as an example. Vol. 10, *Expert Review of Clinical Immunology*. 2014. p. 385–96.
27. Elsink K, Huibers MMH, Hollink IHIM, Simons A, Zonneveld-Huijssoon E, van der Veken LT, et al. Implementation of Early Next-Generation Sequencing for Inborn Errors of Immunity: A Prospective Observational Cohort Study of Diagnostic Yield and Clinical Implications in Dutch Genome Diagnostic Centers. *Front Immunol*. 2021 Dec 21;12.
28. Xia Y, He T, Luo Y, Li C, Lim CK, Abolhassani H, et al. Targeted next-generation sequencing for genetic diagnosis of 160 patients with primary immunodeficiency in south China. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2018 Dec 1;29(8):863–72.
29. Al-Herz W, Chou J, Delmonte OM, Massaad MJ, Bainter W, Castagnoli R, et al. Comprehensive genetic results for primary immunodeficiency disorders in a highly consanguineous population. *Front Immunol*. 2019;10(JAN).
30. Simon AJ, Golan AC, Lev A, Stauber T, Barel O, Somekh I, et al. Whole exome sequencing (WES) approach for diagnosing primary immunodeficiencies (PIDs) in a highly consanguineous community. *Clinical Immunology*. 2020 May 1;214.
31. Yadav RM, Gupta M, Dalvi A, Bargir UA, Hule G, Shabrish S, et al. Prenatal Diagnosis for Primary Immunodeficiency Disorders—An Overview of the Indian Scenario. *Front Immunol*. 2020 Dec 7;11.
32. Mukhina AA, Kuzmenko NB, Rodina YA, Kondratenko I V., Bologov AA, Latysheva T V., et al. Primary Immunodeficiencies in Russia: Data From the National Registry. *Front Immunol*. 2020 Aug 6;11.
33. Yska HAF, Elsink K, Kuijpers TW, Frederix GWJ, van Gijn ME, van Montfrans JM. Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review. *J Clin Immunol*. 2019 Aug 15;39(6):577–91.
34. Arunachalam AK, Maddali M, Aboobacker FN, Korula A, George B, Mathews V, et al. Primary Immunodeficiencies in India: Molecular Diagnosis and the Role of Next-Generation Sequencing. *J Clin Immunol*. 2021 Feb 1;41(2):393–413.
35. Yubero D, Brandi N, Ormazabal A, Garcia-Cazorla À, Pérez-Dueñas B, Campistol J, et al. Targeted next generation sequencing in patients with inborn errors of metabolism. *PLoS One*. 2016 May 1;11(5).
36. Ghosh A, Schlecht H, Heptinstall LE, Bassett JK, Cartwright E, Bhaskar SS, et al. Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing. *Arch Dis Child*. 2017 Nov 1;102(11):1019–29.

37. Fusaro M, Rosain J, Grandin V, Lambert N, Hanein S, Fourrage C, et al. Improving the diagnostic efficiency of primary immunodeficiencies with targeted next-generation sequencing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021 Feb 1;147(2):734–7.
38. Stoddard JL, Niemela JE, Fleisher TA, Rosenzweig SD. Targeted NGS: A cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs. *Front Immunol*. 2014;5(NOV).
39. Okano T, Imai K, Naruto T, Okada S, Yamashita M, Yeh T wen, et al. Whole-Exome Sequencing-Based Approach for Germline Mutations in Patients with Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2020 Jul 1;40(5):729–40.
40. Woon ST, Ameratunga R. Comprehensive genetic testing for primary immunodeficiency disorders in a tertiary hospital: 10-year experience in Auckland, New Zealand. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. 2016 Dec 7;12(1).
41. Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM, Al-Tassan N, Al-Ghonaium A, Al-Saud B, et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016 Jun 1;137(6):1780–7.
42. Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, Zoccolillo M, Ferradini V, Petricone D, et al. Targeted NGS platforms for genetic screening and gene discovery in primary immunodeficiencies. *Front Immunol*. 2019;10(APR).
43. Sogkas G, Dubrowinskaja N, Schütz K, Steinbrück L, Götting J, Schwerk N, et al. Diagnostic Yield and Therapeutic Consequences of Targeted Next-Generation Sequencing in Sporadic Primary Immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;1–13.
44. Arts P, Simons A, Alzahrani MS, Yilmaz E, Alidrissi E, Van Aerde KJ, et al. Exome sequencing in routine diagnostics: A generic test for 254 patients with primary immunodeficiencies. *Genome Med*. 2019 Jun 17;11(1).
45. Khalturina EO, Degtyareva ND, Bairashevskaja AV, Mulenkova AV, Degtyareva AV. Modern diagnostic capabilities of neonatal screening for primary immunodeficiencies in newborns. *Clin Exp Pediatr*. 2021 Oct 1;64(10):504–10.
46. Kobrynski LJ. Newborn Screening in the Diagnosis of Primary Immunodeficiency. Vol. 63, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Springer; 2022. p. 9–21.
47. Vogel BH, Bonagura V, Weinberg GA, Ballow M, Isabelle J, Diantonio L, et al. Newborn screening for SCID in New York State: Experience from the first two years. *J Clin Immunol*. 2014;34(3):289–303.
48. Gaspar HB, Hammarström L, Mahlaoui N, Borte M, Borte S. The case for mandatory newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID). Vol. 34, *Journal of Clinical Immunology*. Springer New York LLC; 2014. p. 393–7.

49. Gizewska M, Durda K, Winter T, Ostrowska I, Oftarzewski M, Klein J, et al. Newborn Screening for SCID and Other Severe Primary Immunodeficiency in the Polish-German Transborder Area: Experience From the First 14 Months of Collaboration. *Front Immunol.* 2020 Oct 16;11.
50. Barbaro M, Ohlsson A, Borte S, Jonsson S, Zetterström RH, King J, et al. Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden—a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening Study. *J Clin Immunol.* 2017 Jan 1;37(1):51–60.
51. Buelow BJ, Verbsky JW, Routes JM. Newborn screening for SCID: lessons learned. Vol. 9, *Expert Review of Hematology.* Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 579–84.
52. Dorsey MJ, Puck JM. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in the United States: Lessons Learned. Vol. 39, *Immunology and Allergy Clinics of North America.* W.B. Saunders; 2019. p. 1–11.
53. Farmer JR, Mahajan VS. Molecular Diagnosis of Inherited Immune Disorders. Vol. 39, *Clinics in Laboratory Medicine.* W.B. Saunders; 2019. p. 685–97.
54. Hale JE, Platt CD, Bonilla FA, Hay BN, Sullivan JL, Johnston AM, et al. Ten Years of Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in Massachusetts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice.* 2021 May 1;9(5):2060-2067.e2.
55. Adams SP, Rashid S, Premachandra T, Harvey K, Ifederu A, Wilson MC, et al. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *J Clin Immunol.* 2014;34(3):323–30.
56. Blom M, Bredius RGM, van der Burg M. Future perspectives of newborn screening for inborn errors of immunity. Vol. 7, *International Journal of Neonatal Screening.* MDPI; 2021.
57. King JR, Grill K, Hammarström L. Genomic-Based Newborn Screening for Inborn Errors of Immunity: Practical and Ethical Considerations. *Int J Neonatal Screen.* 2023 Apr 11;9(2):22.
58. Ziegler JB, Ballou M. Primary Immunodeficiency: New Approaches in Genetic Diagnosis, and Constructing Targeted Therapies. Vol. 7, *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice.* American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; 2019. p. 839–41.