

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. Veronika Krulišová

**Optimalizace novorozeneckého screeningu cystické fibrózy
v České republice**

**Optimization of newborn screening for cystic fibrosis
in the Czech Republic**

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Milan Macek jr., DrSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Felix Votava, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 10.07.2014

MUDr. Veronika Krulišová

Identifikační záznam:

KRULIŠOVÁ, Veronika. *Optimalizace novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v České republice. [Optimization of newborn screening for cystic fibrosis in the Czech Republic]*. Praha, 2014, 135 stran. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky. Vedoucí závěrečné práce prof. MUDr. Milan Macek jr., DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svým školitelům prof. MUDr. Milanu Mackovi jr., DrSc. a doc. MUDr. Felixi Votavovi, Ph.D. za příležitost věnovat se novorozeneckému screeningu cystické fibrózy. Dále bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc a podporu v průběhu celého mého postgraduálního studia.

Děkuji RNDr. Bohumíru Procházkovi, CSc. za pomoc se statistickým zpracováním dat.

Za cenné odborné rady a přátelství děkuji MUDr. Miroslavě Balaščakové, Ph.D., MUDr. Tereze Piskáčkové a MUDr. Veronice Skalické.

Děkuji také svým kolegům z pracoviště za vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Velmi děkuji své rodině, zejména manželovi za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Novorozenecký screening cystické fibrózy umožňuje diagnostikovat pacienty s cystickou fibrózou v preklinickém stadiu nebo v době, kdy ještě nejsou klinické příznaky plně vyjádřeny. Na základě včasné diagnostiky pak mohou být pacienti s cystickou fibrózou léčeni již před vznikem ireverzibilních změn v organismu, což významně prodlužuje a také zlepšuje kvalitu života.

Komentovaná verze dizertační práce se zabývá problematikou výběru vhodného screeningového programu pro cystickou fibrózu u novorozenců narozených v České republice a také stanovuje požadavky na jednotlivé analytické a molekulárně genetické stupně v porovnávaných screeningových algoritmech.

Cílem dizertační práce je navrhnout screeningové schéma detekující pacienty s cystickou fibrózou, které v podmínkách České republiky umožní dosáhnout optimálních parametrů v podobě vysoké senzitivity, specificity a přijatelné nákladové efektivity.

ABSTRACT

Newborn screening for cystic fibrosis allows diagnosing patients with cystic fibrosis during asymptomatic stage of their disease or when the symptoms had not fully developed. Due to early diagnosis, patients with cystic fibrosis have the possibility to be treated prior to the occurrence of irreversible changes in the relevant organs, which leads to significantly improved quality of life and patient survival.

Commented version of the doctoral thesis presents issues concerning the selection of a suitable newborn screening programme for cystic fibrosis in neonates born in the Czech Republic and establishes requirements for particular analytical and molecular genetics tiers in the tested screening schemes.

The aim of this thesis is to nominate newborn screening protocol for cystic fibrosis that leads to optimal parameters in terms of its high sensitivity and specificity, including acceptable costs in the conditions of the Czech Republic health care system.

Klíčová slova: Cystická fibróza, Novorozenecký screening cystické fibrózy, *CFTR* gen, Imunoreaktivní trypsinogen, Pancreatitis-associated protein, Potní test

Keywords: Cystic fibrosis, Newborn screening for cystic fibrosis, *CFTR* gene, Immunoreactive trypsinogen, Pancreatitis-associated protein, Sweat test

OBSAH

1. ÚVOD	10
1.1. Cystická fibróza (CF)	10
1.2. Klinický obraz	10
1.2.1. Klinický obraz u novorozenců, kojenců a batolat.....	10
1.2.2. Klinický obraz u větších dětí, adolescentů a dospělých.....	11
1.2.3. Klasická forma CF a skupina chorob související s CFTR (CFTR-related disorders; CFTR-RDs)	13
1.3. Postnatální diagnostika CF	14
1.3.1. Potní test.....	14
1.3.2. Molekulárně genetické vyšetření genu <i>CFTR</i>	14
1.3.3. Transepiteliální rozdíl potenciálů.....	15
1.4. Patofyziologie cystické fibrózy	16
1.4.1. <i>CFTR</i> gen, mutace genu <i>CFTR</i>	16
1.4.2. CFTR protein.....	18
1.4.3. Proteiny ENaC a ORCC	19
1.4.4. Patofyziologie - shrnutí.....	21
1.5. Léčba	22
1.6. Novorozenecký screening	24
1.6.1. Novorozenecký screening cystické fibrózy.....	25
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	33
3. PUBLIKACE	34
3.1. Krulišová, V., Balaščaková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Paděrová, J., Křenková, P., Dvořáková, L., Zemková, D., Kračmar, P., Chovancová, B., Vávrová, V., Stambergová, A., Votava, F., Macek, M., Jr, 2012. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. Eur. J. Pediat. 171, 1223-1229. IF 1,907	34
3.1.1. Úvod k publikaci.....	42
3.1.2. Výsledky a diskuze.....	45
3.1.3. Závěr.....	53
3.2. Sommerburg, O., Krulisova, V., Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., Happich, M., Kulozik, A.E., Votava, F., Balascakova, M., Skalicka, V., Stopsack, M., Gahr, M., Macek, M., Jr, Mall, M.A., Hoffmann, G.F., 2014. Comparison of different IRT-PAP	

protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. J. Cyst. Fibros. 13, 15-23. IF 2,873	54
3.2.1. Úvod k publikaci	64
3.2.2. Výsledky a diskuze.....	66
3.2.3. Závěr	67
3.3. Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balaščaková, M., Krulišová, V., Čamajová, J., Turnovec, M., Libik, M., Norambuena, P., Štambergová, A., Dvořáková, L., Skalická, V., Bartošová, J., Kučerová, T., Fila, L., Zemková, D., Vávrová, V., Koudová, M., Macek, M., Krebsová, A., Macek, M., Jr, 2013. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. J. Cyst. Fibros. 12, 532-537. IF 2,873	68
3.3.1. Úvod k publikaci	75
3.3.2. Výsledky a diskuze.....	76
3.3.3. Závěr	77
3.4. Votava, F., Kožich, V., Chrastina, P., Pešková, K., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Vinohradská, H., Dejmek, P., Krulišová, V., Holubová, A., Balaščaková, M., Piskáčková, T., Macek, M., Gaillyová, R., Valášková, I., Skalická, V., 2014. Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice. Čes-slov. Pediat. 69, 77-86.	78
3.4.1. Úvod k publikaci	89
3.4.2. Výsledky a diskuze.....	90
3.4.3. Závěr	92
3.5. Khrunin, A.V., Khokhrin, D.V., Filippova, I.N., Esko, T., Nelis, M., Bebyakova, N.A., Bolotova, N.L., Klovins, J., Nikitina-Zake, L., Rehnström, K., Ripatti, S., Schreiber, S., Franke, A., Macek, M., Krulišová, V., Lubinski, J., Metspalu, A., Limborska, S.A., 2014. A genome-wide analysis of populations from European Russia reveals a new pole of genetic diversity in northern Europe. PLoS One. 8, e58552. doi: 10.1371/journal.pone.0058552. Epub 2013 Mar 7. IF 3,73.....	93
3.5.1. Úvod k publikaci	103
3.5.2. Výsledky a diskuze.....	105
3.5.3. Závěr	105
4. SHRNUTÍ.....	107
5. PŘEHLED PUBLIKACÍ, PŘEDNÁŠEK, POSTERŮ	108
5.1. Publikace.....	108
5.2. Přednášky	111

5.3. Postery	115
5.4. Další.....	118
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	119
7. POUŽITÁ LITERATURA	121

1. ÚVOD

1.1. Cystická fibróza (CF)

CF (MIM 219700; MKN-10 E84.0) je nejčastějším nevléčitelným monogenním autozomálně recesivním onemocněním u evropských populací s prevalencí 1 : 2 500 – 1 : 6 000 (Farrell, 2008). V České republice byla prevalence CF stanovena dřívějšími epidemiologickými studii (Brunecký, 1972; Houštěk and Vávrová, 1969) a následně molekulárně genetickými metodami (Macek et al., 1997) na cca 1 : 3 000 živě narozených dětí. Současná prevalence CF vycházející z výsledků novorozeneckého screeningu za období 2009 – 2012 odpovídá 1 : 6 330 (Votava et al., 2014). Při zohlednění prenatální a preimplantační diagnostiky je populační riziko CF v České republice odhadováno na 1 : 4 500 (Votava et al., 2014).

Onemocnění je způsobeno mutacemi v genu pro cystickou fibrózu, cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 7 (7q31.2). V genu *CFTR* bylo dosud objeveno přes 1900 mutací a variant (Sosnay et al., 2013), z nichž však pouze 15 má v České republice četnost vyšší než 0,5 % (Křenková et al., 2013). Konečným produktem genu *CFTR* je stejnojmenný protein lokalizovaný na apikálních membránách buněk především v exokrinních žlázách a v sinobronchiálním systému.

1.2. Klinický obraz

1.2.1. Klinický obraz u novorozenců, kojenců a batolat

Typickým příznakem CF v novorozeneckém období je mekoniový ileus, který je přítomen asi u 10-20 % všech novorozenců s CF (De Braekeleer et al., 1998; Munck et al., 2006). Další projevy CF v tomto věku mohou být protrahovaná novorozenecká žloutenka nebo nepřibývání na váze a zpomalený růst v důsledku malnutrice. Postižení dýchacích cest může v prvním roce života probíhat pod obrazem těžké bronchiolitidy.

1.2.2. Klinický obraz u větších dětí, adolescentů a dospělých

1.2.2.1. Sinopulmonální systém

Postižení dýchacích cest je nejzávažnějším projevem onemocnění a je příčinou až 90 % úmrtí u CF. Typické jsou recidivující infekty dolních cest dýchacích nebo bronchopneumonie. Dochází postupně ke chronické kolonizaci dýchacích cest pro onemocnění typickými bakteriálními patogeny (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia complex*) a rozvíjí se chronický zánět s exacerbacemi a tvorbou diseminovaných bronchiektázií. Zánět přechází z bronchů na okolní plicní tkáň s následnou fibrotizací plicního parenchymu a tvorbou emfyzematózních bul. Destrukce plicního parenchymu s hypoxickou plicní vazokonstrikcí vede k sekundární plicní hypertenzi a v konečné fázi k rozvoji cor pulmonale.

U většiny pacientů s CF se objevuje chronická sinusitida s různě těžkým klinickým průběhem.

1.2.2.2. Gastrointestinální systém

1.2.2.2.1. Pankreas

Známky zevní insuficience pankreatu má přibližně 85 % pacientů s CF (Vávrová a kolektiv, 2006a). Abnormálně hustý pankreatický sekret vede k obstrukci pankreatických ductů se zánětem a destrukcí acinů. Sekundárně pankreas fibrotizuje a atrofuje a snižuje se tvorba pankreatických enzymů. Pokud klesne produkce enzymů pod 2 % normálních hodnot, objeví se steatorea, malnutrice s hubnutím, hypalbuminemií, anemií a příznaky hypovitaminózy vitamínů rozpustných v tucích. Diagnosticky se jako známka pankreatické insuficience vyšetřuje koncentrace elastázy I ve stolici.

Diabetes mellitus u CF (cystic fibrosis related diabetes mellitus; CFRD) se vyvine u 12–14 % pankreaticky insuficientních pacientů. S postupující věkem výskyt stoupá až na více než 25 % u CF pacientů starších 20 let (Brennan et al., 2004).

U pankreaticky suficientních CF pacientů (cca 15 % pacientů) s různým stupněm pankreatické dysfunkce mohou být přítomny recidivující pankreatitidy.

Častější než u zdravé populace je u pacientů s CF přítomen gastroezofageální reflux, gastritida a gastroduodenální vředy. Asi u 5 % pankreaticky insuficientních CF pacientů se rozvíjí distální intestinální obstrukční syndrom (DIOS, obstrukce v terminálním ileu nebo v colon ascendens).

1.2.2.2. Hepatobiliární systém

V důsledku abnormálního transportu iontů dochází ke zvýšení viskozity žluče a snížení průchodnosti žlučovýchodů. Uplatňuje se i hepatotoxicita některých žlučových kyselin a sekundární zánět. Klinicky může probíhat jako cholelitiáza nebo stenóza ductus choledochus s cholestatickým ikterem a cholangitidou.

Při postižení jater se rozvíjí fokální biliární cirhóza, později přecházející do multilobární biliární cirhózy se všemi průvodními komplikacemi. Prevalence jaterní choroby je odhadována na 2–37 % všech případů CF (Colombo et al., 2002).

1.2.2.3. Další postižení

Pacienti s CF jsou ohroženi ztrátami soli potními žlázami vedoucí k iontové dysbalanci vnitřního prostředí (hyponatremie, hypochloremie, metabolická alkalóza). Na přítomnosti zvýšené koncentrace chloridových iontů v potu je založen diagnostický potní test.

Asi 98 % dospělých mužů s diagnostikovanou CF trpí neplodností. Příčinou je kongenitální bilaterální ageneze vas deferens (congenital bilateral absence of the vas deferens; CBAVD) vedoucí k obstruktivní azoospermii.

CF může být dále provázena komplikacemi, mezi které patří autoimunitní projevy (např. revmatoidní artritida), amyloidóza (postihující např. štítnou žlázu), osteoporóza, dilatační kardiomyopatie nebo postižení CNS (např. jako důsledek avitaminózy).

1.2.3. Klasická forma CF a skupina chorob související s CFTR (CFTR-related disorders; CFTR-RDs)

Klasická forma CF je charakterizována chronickým a progresivním postižením respiračního systému, ve většině případů pankreatickou insuficiencí a pozitivním potním testem (tj. průměrné hodnoty koncentrací chloridových iontů v potu nad 60 mmol/l) (LeGrys et al., 2007). Diagnóza je potvrzena molekulárně geneticky nálezem dvou patogenní mutací v genu *CFTR* v pozici *trans*.

CFTR-RDs formy CF (Bombieri et al., 2011) (nepřesně označované jako atypické nebo mírné formy CF) jsou nejčastěji charakterizovány mírným postižením sinopulmonálního systému a pankreatickou suficiencí při hraničních hodnotách potního testu (tj. hodnoty 30 – 59 mmol/l). Klinická diagnóza těchto forem CF je obtížná, protože v diferenciálně diagnostickém přístupu je zejména v pediatrické praxi spíše než na CF pomýšleno na poruchy imunity a alergie.

V některých případech může být přítomna jen nosní polypóza, recidivující sinusitidy, nespecifické plicní postižení, chronická idiopatická pankreatitida nebo izolovaná CBAVD u mužů - jedná se o tzv. monosymptomatické formy CFTR-RDs.

Potní testy bývají u CFTR-RDs forem hraniční nebo v některých případech dokonce i v mezích negativity (tj. do 30 mmol/l). Molekulárně geneticky bývají často identifikovány alely genu *CFTR* s nejasnými klinickými důsledky.

Projevy CF je nezbytné hodnotit i z hlediska věku pacientů. Nelze vyloučit, že s postupujícím věkem přejde CFTR-RD forma do klinického obrazu klasické formy CF. Je nutno zdůraznit, že mezi klasickými formami onemocnění až po jeho monosymptomatické formy existuje klinické kontinuum. Z tohoto důvodu je nezbytná celoživotní dispenzarizace jedinců s CFTR-RD formami na specializovaném pracovišti.

1.3. Postnatální diagnostika CF

Diagnóza CF vychází z klinického podezření. Abnormální funkci proteinu CFTR lze potvrdit potním testem s následným molekulárně genetickým vyšetřením genu *CFTR*.

Výjimku z tohoto algoritmu představuje novorozenecký screening (NS) CF (NSCF), který umožňuje diagnostikovat CF ještě před rozvojem klinických příznaků. Problematice NSCF se podrobně věnuje kapitola 1.6.

1.3.1. Potní test

Potní test je považován za „zlatý standard“ diagnostiky CF (LeGrys, 2001). Princip testu spočívá ve stimulaci pocení pilokarpinovou iontoforézou na volárně ploše předloktí, sběru potu a v kvantitativním stanovení koncentrace chloridů v získaném materiálu (GIBSON and COOKE, 1959).

Za normu je považována koncentrace chloridů v potu do 30 mmol/l. Opakované koncentrace chloridů ≥ 60 mmol/l svědčí s velkou pravděpodobností pro CF (LeGrys, 2001; LeGrys et al., 2007). Hraniční hodnoty, tj. 30 – 59 mmol/l, mohou svědčit pro CFTR-RDs formy, mohou být patrné u zdravých nosičů jedné mutace genu *CFTR* nebo vzácně mohou být i důsledkem jiného onemocnění (např. hypothyreóza, hypoparathyreóza, nefrotický syndrom, mukopolysacharidoza, malnutrice atd). V případě hraničního výsledku potní test opakujeme a je-li opakovaně hraniční, je třeba použít další diagnostické nebo laboratorní metody.

1.3.2. Molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR*

U pacienta s podezřením na CF na základě klinického obrazu a výsledku potního testu je indikované molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR*.

Strategie molekulárně genetického vyšetření je závislá na technických a finančních možnostech jednotlivých laboratoří. V současné době většina laboratoří v České republice používá k diagnostice komerčně dostupné diagnostické soupravy s různým počtem vyšetřovaných alel v genu *CFTR*. Optimálně by tyto diagnostické panely měly zachycovat více než 90 % populačně specifických patogenních alel. Zahrnuty by měly být také mutace specifické pro národnostní menšiny.

Pokud jsou u probanda nalezeny 2 jednoznačně patogenní mutace (tzv. „CF-causing“ mutace) *CFTR* genu, je nutné molekulárně genetické vyšetření obou rodičů, aby byla ověřena pozici *trans* obou nalezených mutací. Patogenita jednotlivých mutací je ve většině případů odvozena z klinického stavu pacienta a je uvedena v mezinárodní databázi CFTR2 (“The Clinical and Functional Translation of CFTR, a”). Dosud byla patogenita jednotlivých alel ověřena expresními a funkčními studii pouze u cca 8 % všech popsaných alel genu *CFTR* (Sosnay et al., 2013).

Pokud diagnostické soupravy s omezeným počtem vyšetřovaných alel genu *CFTR* odhalí pouze jednu mutaci nebo neodhalí mutaci žádnou, a přitom klinické a/nebo laboratorní podezření na diagnózu CF odůvodněně přetrvává, následuje rozšířené molekulárně genetické vyšetření intragenových delecí a duplikací genu *CFTR* (pomocí metody Multiplex ligation-dependent probe amplification; MLPA) a/nebo sekvenování kódující sekvence genu *CFTR* a přilehlých intronových oblastí. V případě, že ani rozšířené molekulárně genetické vyšetření nevede k nález 2 mutací, nelze CF definitivně vyloučit. Podstatou onemocnění mohou být např. mutace nacházející se hluboko v intronech nebo v regulačních oblastech.

V blízké době lze k diagnostice CF očekávat rozšíření používání technologií založených na sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing; NGS) (Trujillano et al., 2013).

1.3.3. Transepiteliální rozdíl potenciálů

Potní test a molekulárně genetické vyšetření jsou nejdůležitějšími metodami v diagnostice CF. Výsledky těchto vyšetření však nejsou vždy jednoznačné. V tom případě lze využít další metodu, měření rozdílu transepiteliálních potenciálů v nosní sliznici nebo v rektálních biopsiích (Ahrens et al., 2002). Aktivní transport sodíku a chloridů buněčnými membránami určuje složení tekutiny na povrchu sliznic a generuje transepiteliální rozdíl potenciálů. Vzhledem k náročnosti a obtížné interpretovatelnosti se tato vyšetření provádí pouze na několika pracovištích v Evropě a mají především smysl při charakterizaci případů CFTR-RD (Sermet-Gaudelus et al., 2010).

1.4. Patofyziologie cystické fibrózy

1.4.1. *CFTR* gen, mutace genu *CFTR*

CFTR gen byl metodou pozičního klonování objeven v roce 1989. Gen je evolučně vysoce konzervovaný, nalézá se na dlouhém raménku 7. chromozomu v oblasti 7q31.2, má 27 exonů a délku cca 250 kb. Mutace v genu *CFTR* jsou ancestrální povahy, tj. jsou přenášeny z generace na generaci. Germinální *de novo* mutace jsou v genu *CFTR* velmi vzácné a mají četnost přibližně 1: 1100 rodin s CF (Girodon et al., 2008). Somatické mutace v genu *CFTR* nebyly dosud nalezeny.

Mutace genu pro *CFTR* se v populaci udržely kvůli zatím nejasné evoluční výhodě přenašečů. Zvažuje se zvýšená odolnost heterozygotů vůči infekčním enterotoxickým průjmovým onemocněním. Nicméně nízká prevalence mutací v genu *CFTR* např. u asijských populací tuto teorii příliš nepodporuje.

Z dosud známých více než 1 900 mutací a variant v genu *CFTR* ("Cystic Fibrosis Mutation Database, a") je cca 82 % alel považováno za kauzální pro rozvoj CF, 14 % představují alely bez zřejmého klinického projevu a zbývající 4 % jsou alely s nejasným klinickým dopadem (Ferec and Cutting, 2012).

Podle toho, na jaké úrovni mutace zasáhne tvorbu, intracelulární transport a funkci proteinu, jsou mutace rozděleny do pěti základních tříd (Obr. č. 1).

Mutace I. třídy blokuje syntézu nebo těžce alterují strukturu proteinu *CFTR* zařazením předčasného stop kodonu v *CFTR*-mRNA. Patří sem zejména „nonsense“ mutace (nesmyslné mutace; např. p.Gly542X) a „frameshift“ mutace (posunové mutace, které narušují čtecí rámec genu *CFTR*; např. p.Leu671X). Důsledkem je absence *CFTR* proteinu na apikální membráně epitelálních buněk.

Rovněž pro mutace II. třídy je charakteristická nepřítomnost chloridového kanálu na buněčném povrchu. Příkladem je celosvětově nejrozšířenější mutace p.Phe508del (delece 3 pb vedoucí k ztrátě fenylalaninu na pozici 508 v 10. exonu genu *CFTR*). Celosvětově představuje cca 70% (Ferec and Cutting, 2012) všech mutací v tomto genu. Ztráta jediné aminokyseliny znemožní správnou posttranslační glykosylaci vedoucí k abnormální terciární konformaci proteinu a jeho následné degradaci v endoplasmatickém retikulu.

Mutace III. třídy vedou k přítomnosti abnormálního proteinu *CFTR* na apikálním povrchu buněk. Postižena je především jeho aktivace nebo regulační

funkce. Typickým příkladem je „missense“ mutace (mutace vedoucí k záměně aminokyselin; např. p.Gly551Asp), která zabrání vazbě ATP na příslušnou doménu chloridového kanálu a tím znemožní otevření iontového kanálu CFTR proteinu.

V souhrnu tak lze říci, že třídy I - III jsou spojeny s minimální aktivitou nebo nepřítomností proteinu CFTR způsobují převážně klasickou formu CF.

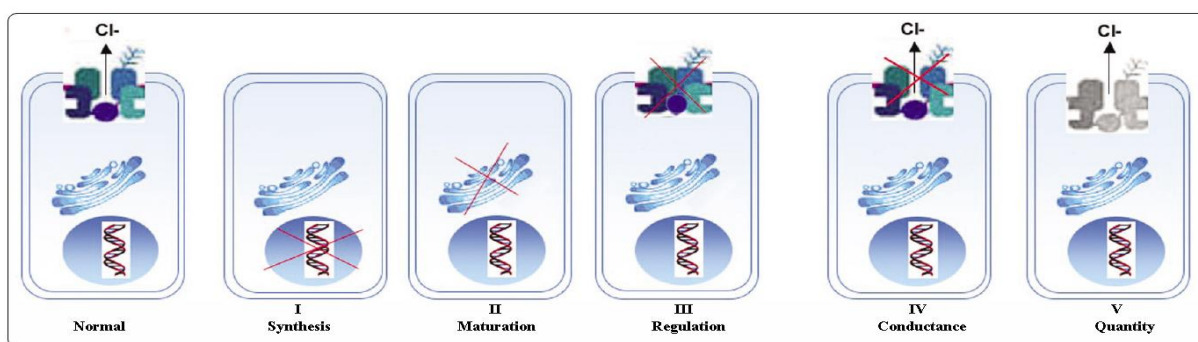
Mutace IV. třídy vedou k přítomnosti normálního množství defektního CFTR proteinu, který má zachovanou reziduální funkci chloridového kanálu. Patří sem klinicky „mírné“ mutace jako např. komplexní alela c.[350G>A;1210-12T[7]] spojená obvykle s pankreatickou suficiencí a velmi variabilním průběhem sinopulmonálního onemocnění.

Mutace V. třídy jsou charakterizované sníženým množstvím plně funkčního CFTR proteinu. Patří sem především sestřihové mutace, které vedou k neefektivnímu sestřihu mRNA genu *CFTR*, např. mutace c.3717+10kbC>T, vedoucí opět k „lehčímu“ průběhu CF (Duguépéroux and De Braekeleer, 2005).

Mutace IV. a V. třídy jsou spojeny s větší variabilitou klinického průběhu oproti mutacím z I. – III. třídy a nalzáme je signifikantně častěji u CFTR-RDs forem a monosymptomatických forem CF.

Je nutno zdůraznit, že rozdělení alterací *CFTR* genu na patogenní, mírné a benigní varianty je arbitrární povahy, protože mezi nimi neexistují z funkčního hlediska ostré hranice.

Obr. č. 1: Schématické znázornění základních tříd mutací v genu *CFTR*



Obrázek převzat z Claustres, 2005

Legenda: Normal – normální, synthesis – syntéza, maturation – vyžívání, regulation – regulace, conductance - vodivost, quantity - kvantita

1.4.2. CFTR protein

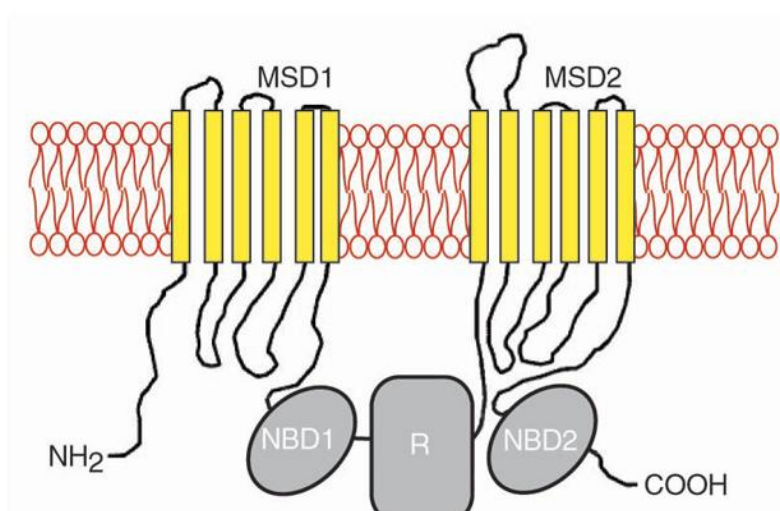
Protein CFTR se skládá z 1 480 aminokyselin a patří do skupiny tzv. „ATP-binding cassette“ transmembránových transportních proteinů. Jeho základní funkcí je transport chloridových iontů přes buněčné membrány, dále regulace sodíkového kanálu ENaC (Epithelial Sodium Channel) (Stutts et al., 1995) a chloridového kanálu ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) (Jovov et al., 1995; Schwiebert et al., 1994).

CFTR protein je tvořen 5 základními segmenty (Obr. č. 2): a) Dvěma transmembránovými segmenty MSD1 a MSD2 („Membrane Spanning Domain“); každý segment MSD1 a MSD2 je dále tvořen 6 transmembránovými doménami, b) dvěma v cytoplazmě se nacházejícími doménami označovanými NBD1 a NBD2 („Nucleotide Binding Domain“) a c) nepárovou regulační R doménou („Regulatory Domain“).

Podle mechanického modelu funkce proteinu CFTR domény MSD1 a MSD2 vytvářejí samotný chloridový kanál spojující cytoplazmatickou oblast s lumen žlázy a ukotvující protein CFTR v buněčné membráně. K otevření kanálu je nezbytná fosforylace regulační R domény proteinkinázou A. Následná vazba ATP na NBD1 a NBD2 změní jejich konformaci, čímž způsobí vertikální posun R domény, která tak umožní otevření chloridového kanálu a přesun chloridových iontů přes membránu (Harris and Argent, 1993).

Mutace nacházející se v exonech 3 – 7 postihují funkci domény MSD1, v exonech 9 – 12 porušují funkci domény NBD1, v exonu 13 postihují funkci R domény, v exonech 14 – 18 porušují funkci domény MSD2 a v exonech 19 – 22 narušují fungování domény NBD2 proteinu CFTR (Vávrová a kolektiv, 2006b).

Obr. č. 2: CFTR protein a jeho domény



Obrázek převzat z “Cystic Fibrosis Mutation Database, b”

Protein CFTR je exprimován tkáňově specifickým způsobem v epiteliálních buňkách, a to ve shodě s klinickým obrazem CF. Ve většině tkání se protein CFTR nachází na apikální membráně buněk, zatímco v potní žláze je jak v apikální tak i v bazální části sekretorických buněk.

V poslední době byla popsána i exprese CFTR proteinu mimo epitel exokrinních žláz, a to např. v kardiomyocytech, lymfocytech a endotelu cév (Kulaksiz et al., 2004; Tousson et al., 1998).

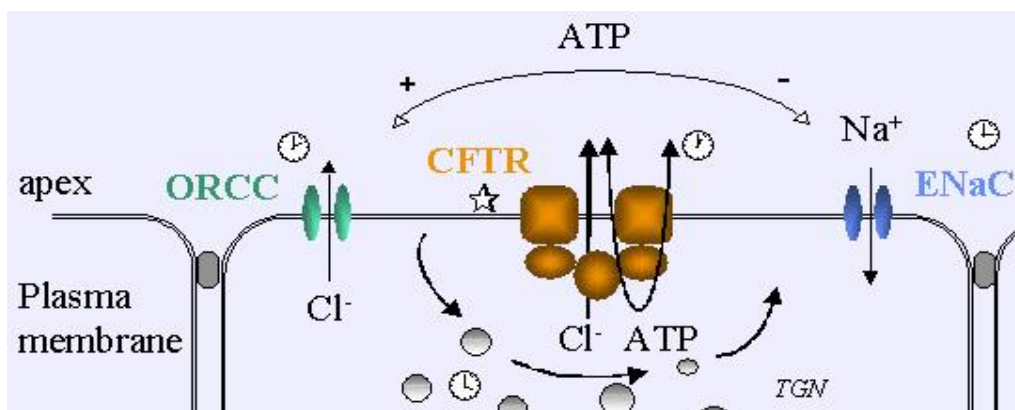
1.4.3. Proteiny ENaC a ORCC

Je všeobecně přijato, že protein ENaC se podílí na patofyziologii plicního onemocnění u CF (Gianotti et al., 2013; Ismailov et al., 1996). ENaC je transmembránový protein složený ze tří podjednotek α , β , γ . Každá z podjednotek je kódována vlastním genem (*SCNN1A*, sodium channel nonvoltage-gated 1, alpha; *SCNN1B* sodium channel nonvoltage-gated 1, beta a *SCNN1G*, sodium channel nonvoltage-gated 1, gamma) (Jasti et al., 2007). Protein CFTR ne zcela jasným mechanismem snižuje aktivitu ENaC kanálu, který je za normálních okolností v dýchacích cestách zodpovědný za absorpci sodíkových iontů do buněk.

Ztráta funkce proteinu CFTR tak v dýchacích cestách kromě snížené sekrece chloridových iontů vede ke zvýšené absorpci sodíkových iontů (Boucher, 2007; Knowles and Boucher, 2002). Konečným důsledkem je pak na základě osmotických vlivů snížené množství periciliární tekutin v lumen dýchacích cest.

Protein ORCC, který slouží jako chloridový kanál, se nachází na buněčných membránách řady epiteliálních buněk. Normálně fungující protein CFTR je schopen prostřednictvím adenosintrifosfátu (ATP) (přímo či za pomoci dalšího proteinu) aktivovat kanál ORCC a umožnit tak transport chloridových iontů (Schwiebert et al., 1999; Stutts et al., 1992). Ztráta funkce proteinu CFTR tak prostřednictvím kanálu ORCC způsobí další snížení sekrece chloridových iontů vedoucí společně s dalšími mechanismy k dehydrataci mukoidních sekretů. Schématicky je interakce jednotlivých proteinů znázorněna na obrázku č. 3.

Obr. č. 3: Protein CFTR a jeho interakce s proteiny ENaC a ORCC



Obrázek převzat a upraven dle Schwiebert et al., 1999

Legenda: apex – odpovídající apikálnímu povrchu buňky, plasma membrane – plazmatická membrána

1.4.4. Patofyziologie - shrnutí

Názory na podstatu iontové poruchy u CF prošly v posledních letech vývojem a dosud není úplná podstata iontového defektu u CF zcela jasná. V principu je CF podmíněna kombinací sekretorického a resorpčního defektu iontů přes membrány. Princip spočívá v inaktivitě chloridových a v hyperaktivitě sodíkových kanálů (Schwiebert et al., 1999).

V důsledku narušení proteinu CFTR dochází k abnormálnímu transportu chloridových a sodíkových iontů přes epitelální membrány, čímž je porušena osmotickými mechanizmy podmíněná hydratace mukoidních sekretů příslušných orgánů. Tento mechanismus vede k jejich zvýšené viskozitě, obstrukci a chronickému zánětu s progresivní destrukcí postižených cílových orgánů ireverzibilní fibrotizací.

1.5. Léčba

I přes velké pokroky v léčbě zůstává CF stále nevyléčitelným onemocněním *ad integrum*.

Standardní léčba CF se skládá ze tří základních pilířů: lékařské péče, léčebné rehabilitace a nutriční terapie. V rámci komplexní péče o pacienty s CF se na délce přežívání a kvalitě života podílí novorozenecký screening CF, který umožňuje zahájit léčbu ještě před plným rozvinutím klinického obrazu, a mutačně specifická terapie CF, která je založena na výběru vhodného léku (léčivého přípravku pro vzácná onemocnění – „orphan drug“) dle konkrétního genotypu každého pacienta. V současné době se v rámci mutačně specifické terapie CF uplatňují zejména tzv. potenciátory a korektory CFTR proteinu.

CFTR potenciátory jsou látky, které umožňují zprůchodnit poškozený chloridový kanál u pacientů s alespoň jednou mutací III. nebo IV. třídy. Podmínkou pro fungování těchto přípravků je proto přítomnost defektního CFTR proteinu na buněčném povrchu. Příkladem je přípravek VX-770, ivacaftor (KalydecoTM, Vertex Pharmaceuticals; www.vrtx.com), který představuje účinnou léčbu pro pacienty s alespoň jednou mutací p.Gly551Asp (Ramsey et al., 2011). V nedávné době bylo prokázáno, že tento přípravek je účinný u dalších 8 mutací III. třídy (H. Yu et al., 2012).

Další možností léčby jsou CFTR korektory, které na rozdíl od potenciátorů umožňují obnovit přítomnost chloridového kanálu na buněčném povrchu, tj. jsou účinné v případech, kde původně žádný chloridový kanál na buněčném povrchu v důsledku onemocnění nebyl. Příkladem je přípravek VX-809, lumacaftor (Vertex Pharmaceuticals) vhodný pro pacienty s alespoň jednou mutací p.Phe508del. Přípravek VX-809 je v současné době ve fázi klinického hodnocení (“A Phase 3 Rollover Study of Lumacaftor in Combination With Ivacaftor in Subjects 12 Years and Older With Cystic Fibrosis”). K dosažení plného terapeutického účinku u pacientů s CF s alespoň jednou mutací p.Phe508del je nutná kombinace lumacaftoru s ivacaftorem (Baroni et al., 2014), aby se protein nejen na apikální povrch buněk dostal, ale i aktivoval.

U pacientů s CF narozených v České republice do roku 1975 byl medián přežití 13,6 roků a začátkem 90. let 20. století 23,5 roků (Vávrová a kolektiv, 2006c). Díky komplexní péči lze u našich současných žijících pacientů s CF předpokládat

výrazně vyšší průměrný věk dožití. Zatímco odhady průměrné výše předpokládaného věku dožití u žijících pacientů v České republice nejsou k dispozici, britské studie odhadují průměrný věk dožití u dětí s CF narozených v roce 2009 ve Velké Británii na více než 50 let (Dodge et al., 2007; Hurley et al., 2014). Kromě délky života se významně zlepšuje především také kvalita života všech pacientů s CF (Dijk and Fitzgerald, 2012).

1.6. Novorozenecký screening

NS se rozumí aktivní a celoplošné vyhledávání chorob v jejich časném stadiu tak, aby se tyto choroby diagnostikovaly a léčily dříve, než se stačí projevit a způsobit dítěti nevratné poškození zdraví. NS je založen na analýze suché kapky krve na filtračním papírku (tzv. Guthrieho kartičce) odebírané za definovaných podmínek všem novorozencům.

V České republice se v rámci NS t. č. vyšetřuje 13 onemocnění ("Novorozenecký screening," 2013): kongenitální hypotyreóza, kongenitální adrenální hyperplazie, CF, dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin (tj. fenylketonurie a hyperfenylalaninemie, leucinóza, glutarová acidurie typ I, izovalerová acidurie) a dědičné poruchy látkové výměny mastných kyselin (deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem, deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem, deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem, deficit karnitinpalmitoyltransferázy I a II, deficit karnitinacylkarnitintranslokázy).

Hodnotícími parametry screeningových programů jsou:

1) senzitivita, $P/(P+FN)$ = poměr počtu postižených jedinců zachycených screeningovým testem (P) k celkovému počtu postižených jedinců ve screenované kohortě, tj. připočtením testem nezachycených jedinců - falešně negativních (FN);

2) specificita, $N/(N+FP)$ = poměr počtu jedinců hodnocených screeningovým testem jako negativní (N) k celkovému počtu zdravých jedinců ve screenované kohortě, tj. připočtením testem zachycených zdravých jedinců – falešně pozitivních (FP);

3) pozitivní prediktivní hodnota (PPV), $P/(P+FP)$ = poměr počtu postižených jedinců zachycených screeningovým testem (P) k celkovému počtu jedinců hodnocených testem jako pozitivní, tj. připočtením falešně pozitivních (FP). Či jinými slovy pravděpodobnost, že pozitivní výsledek NS znamená postiženého jedince.

Senzitivita a specificita testu závisí na vybrané hranici hodnoty měřeného analytu mezi negativitou a pozitivitou testu (tzv. cut-off hodnota). Oba parametry se chovají jako „spojitá nádoba“, tj. čím vyšší je senzitivita, tím nižší je specificita a obráceně. Senzitivita a specificita budou kolísat v souladu s rozhodnutím o cut-off

hodnotách a podle toho, jaké množství falešně pozitivních a negativních výsledků může být v programu tolerováno.

Dle doporučení pracovní skupiny novorozeneckého screeningu pro CF je za vysokou senzitivitu považována hodnota $> 0,95$ a pozitivní prediktivní hodnota (PPV) $> 0,3$ (Southern et al., 2013).

Dalším požadavkem je časný výsledek o pozitivitě screeningu umožňující časně odeslání na specializované pracoviště. Pojmem pozitivní screening se rozumí, že jedinec má zvýšené riziko, že daným onemocněním trpí a je proto nezbytné provést návazné diagnostické testování, které onemocnění potvrdí nebo vyloučí.

1.6.1. Novorozenecký screening cystické fibrózy

Základní principy pro provádění NSCF vycházejí z obecných principů dle Wilsona a Jungnera pro screening ostatních onemocnění (Cornel et al., 2014):

- 1) Průběh nemoci a její mechanismy jsou známé;
- 2) Onemocnění je významným socioekonomickým problémem (choroba má závažný průběh a léčba je finančně nákladná);
- 3) Je relativně častá;
- 4) Včasná diagnostika zkvalitňuje, a lze předpokládat, že i prodlužuje život pacientů (Dijk and Fitzgerald, 2012; Lai et al., 2004);
- 5) Včasná klinická diagnostika bez NS v České republice selhává (Vávrová et al., 2006);
- 6) Včasná diagnostika je prevencí úmrtí z nediodagnostikované choroby (např. v metabolickém solném rozvratu kojenců či rychlou progresí plicního postižení);
- 7) Předpokládané náklady NS jsou nižší než náklady léčby komplikací choroby z pozdní diagnostiky (Nshimyumukiza et al., 2014; Sims et al., 2007);
- 8) Včasná diagnostika redukuje stres rodiny s chronicky nemocným dítětem s nejasnou příčinou obtíží při pozdní diagnostice a tím i obecně zvyšuje důvěru ve zdravotnický systém;
- 9) Včasná diagnostika pomáhá optimalizovat genetické poradenství a umožňuje informovanou reprodukci;

10) Při celoplošném provádění NSCF lze efektivněji soustředit pacienty do klinických center, která mají s nemocí zkušenosti a kde jim je zajištěna komplexní péče. Tím lze odstranit nerovnoměrnost v kvalitě péče o pacienty.

Diagnóza CF stanovená během prvních 2 měsíců života, a z toho vyplývající časná léčba, vede k mírnějšímu postižení sino-bronchiálního systému (Farrell et al., 2001; Munck et al., 2006), lepšímu prospívání a tím i k celkově příznivější prognóze onemocnění s delším přežíváním (Dijk and Fitzgerald, 2012; Lai et al., 2004). Navíc časná diagnóza CF v rámci NSCF snižuje náklady na léčbu (Nshimyumukiza et al., 2014; Sims et al., 2007) a snižuje stres rodičů v porovnání s pozdní diagnózou (Balfour-Lynn, 2008; Baroni et al., 1997).

Na základě všeobecně uznávaného názoru o prospěšnosti NSCF byl v mnoha státech zaveden celoplošný NSCF využívající různé typy screeningových protokolů (Castellani and Massie, 2010; Castellani et al., 2009; Comeau et al., 2007; Southern et al., 2007). Ačkoliv je v současné době celosvětově popsáno více než 70 různých screeningových schémat, vždy je prvním krokem imunochemické stanovení imunoreaktivního trypsinogenu (IRT) (Crossley et al., 1981; Therrell et al., 2012) ze suché krevní skvrny odebrané novorozenci na filtrační papírek.

IRT v krvi novorozenců s CF je zvýšen, protože pankreas pacientů s CF je již prenatálně poškozen blokadou acinárních duktů vazkým hlenem. Aciny produkují IRT a obstrukce pankreatických duktů způsobí, že IRT přestoupí do krve ve vyšší koncentraci. S postupujícím věkem a atrofizací pankreatu produkce enzymu postupně klesá, a proto se pro pozdější diagnostiku nehodí.

IRT je však nespecifický marker (Ravine et al., 1993). Vyšší koncentraci IRT má i část zdravé populace, zejména zdraví nosiči jedné mutace genu *CFTR* (Castellani et al., 2005; Comeau et al., 2004), vliv má také etnický původ vyšetřovaných (Castellani and Massie, 2010; Giusti and New York State Cystic Fibrosis Newborn Screening Consortium, 2008). IRT může být také zvýšen u chromozomálních aberací, některých vrozených vývojových vad ledvin, srdce a neurální trubice nebo jako následek perinatální hypoxie (Ravine et al., 1993).

1.6.1.1. Schémata NSCF

1.6.1.1.1. IRT jako první krok

Iniciální cut-off hodnota pro IRT má zásadní význam pro senzitivitu i specifitu screeningového schématu. Požadované senzitivity lze dle některých autorů dosáhnout s cut-off hodnotou pro IRT ≥ 99 . percentil (Wilcken et al., 1995), dle jiných autorů je vhodnější použít cut-off hodnotu ≥ 95 . – 97. percentil (Comeau et al., 2004; Wagener et al., 2012). Další snižování cut-off hodnoty pro IRT má už jen malý efekt na senzitivitu, ale výrazně snižuje PPV bez ohledu na následující kroky.

Celosvětově rovněž existují rozdíly v načasování odběru iniciálního IRT. Zatímco ve většině evropských zemí se IRT odebírá 2. – 3. den postnatálně a v některých dokonce 5. – 8. den, v USA se IRT odebírá 1. – 2. den (Southern et al., 2007).

IRT je sám o sobě dostatečně senzitivním biochemickým markerem, je však spojen také s vysokou falešnou pozitivitou. Proto u novorozenců s IRT nad stanovenou cut-off hodnotu následuje druhý a v některých případech také třetí a čtvrtý krok s cílem zlepšit PPV.

1.6.1.1.2. Druhý krok

Opakované stanovení IRT, tj. IRT/IRT protokol

Koncentrace IRT v krvi u novorozenců s CF klesá pomaleji než u novorozenců, kteří CF nemají (Rock et al., 1990). Proto zvýšená hladina IRT s odstupem 2 a více týdnů zjištěná z druhého odběru může svědčit pro diagnózu CF.

K potvrzení či vyloučení diagnózy CF u probandů splňujících kritéria pro IRT/IRT schéma je nezbytné provést potní test. Podle nastavené cut-off hodnoty IRT v prvním odběru je potní test indikovaný u 1 - 5 % novorozenců.

IRT/IRT protokoly tak stále vedou k vysokému počtu falešných pozitivit (Castellani et al., 2009; Ross, 2008) - zdravá část populace novorozenců a jejich rodin je vystavena nepřiměřené zátěži a nadbytečnému stresu, což protokoly IRT/IRT významně znehodnocuje. IRT/IRT schéma však lze použít v případech, kdy příslušná

legislativa neumožňuje DNA analýzu u novorozenců nebo je v dané populaci nízká záchytnost mutací genu *CFTR* díky značné populační heterogenitě.

DNA analýza genu *CFTR*, tj. IRT/DNA protokol

U novorozenců, u kterých byla zjištěna koncentrace IRT nad stanovenou cut-off hodnotu, následuje ve druhém analytickém stupni molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR*. Vyšetření probíhá ze stejné krevní skvrny, ze které se vyšetřil IRT, tedy bez jakékoliv přídavné zátěže novorozence a rodiny.

IRT/DNA protokoly v závislosti na stanovené cut-off hodnotě pro IRT a na počtu vyšetřovaných mutací dosahují vysoké senzitivity a specificity (Farrell et al., 2008; Ross, 2008) a jsou nejrozšířenější strategií používanou v rámci NSCF (Castellani et al., 2009; Southern et al., 2007).

Většina těchto protokolů používá komerčně dostupné diagnostické soupravy vyšetřující nejčastější populačně specifické mutace genu *CFTR*. Pokud se při vyšetření prokáží dvě mutace, je diagnóza CF velmi pravděpodobná. Pro potvrzení diagnózy CF, a vyloučení některých méně obvyklých situací (např. přítomnost obou mutací v pozici *cis*, záměna vzorku), následuje diagnostický potní test. V případě nálezu 1 mutace následuje potní test k rozlišení, zda se jedná o zdravého heterozygota (koncentrace chloridů v potu do 30 mmol/l) nebo pacienta s CF (koncentrace chloridů nad 60 mmol/l), kde druhá, vzácnější mutace, není součástí použité diagnostické soupravy. U probanda s nalezenou 1 mutací v genu *CFTR* a pozitivním potním testem následuje rozšířené molekulárně genetické vyšetření (MLPA, sekvenace všech exonů genu *CFTR*) s cílem detekovat druhou kauzální mutaci.

Mezi nevýhody těchto protokolů patří zejména detekce zdravých heterozygotů a probandů s nejasnou diagnózou, což není cílem NSCF. Protokoly nejsou vhodné pro etnicky heterogenní populace, kde můžeme očekávat přítomnosti takových mutací, které nejsou součástí použitého kitu. Důsledkem je pak nižší senzitivita. V některých zemích je dále legislativně problematické zavést molekulárně genetické vyšetření do celoplošného screeningového programu. Podrobně jsou tyto nevýhody diskutovány v kapitole 3.1.1.

Stanovení Pancreatitis-Associated Proteinu (PAP), tj. IRT/PAP protokol

V roce 1999 představil prof. Jacques Sarles (Sarles et al., 1999) biochemický marker pancreatitis-associated protein. Jde o sekreční cirkulující protein, který je indukovaný akutním postižením pankreatu, je zvýšený u pacientů s CF, ale také např. u pacientů trpících akutní pankreatitidou (Iovanna et al., 1994). PAP je stanovován ze stejné krevní skvrny jako iniciální IRT. PAP sám o sobě je vysoce senzitivní, ale málo specifický, obdobně jako IRT. Pokud je použit ve druhém analytickém stupni u novorozenců se zvýšeným IRT, specificita se zvyšuje. V případě, že je koncentrace PAP zvýšená nad stanovenou cut-off hodnotu, je proband pozván k potnímu testu k potvrzení či vyloučení CF (Sarles et al., 2005).

Ačkoliv většina IRT/PAP protokolů nebyla testována na velkých populacích, dosud proběhlé studie (Sarles et al., 2014, 2005; Sommerburg et al., 2010; Vernooij-van Langen et al., 2012) prokázaly senzitivitu srovnatelnou s IRT/DNA protokoly, i když za cenu nižší PPV. Výhodou těchto protokolů jsou nižší ekonomické náklady a nepřítomnost nevýhod spojených s molekulárně genetickou analýzou genu *CFTR* (podrobně viz kapitola 3.1.1.).

Nedávná data z Austrálie prokázala, že senzitivita PAP je nižší při odběru krevní skvrny před 2. dnem života novorozence (Ranieri, 2013). Vzhledem k tomu, že odběr krve pro NS probíhá ve většině států USA již mezi 1. – 2. dnem postnatálně, nejsou IRT/PAP protokoly pro tyto státy vhodné.

1.6.1.1.3. Třetí krok

Rozšířené molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR*

Některé IRT/DNA protokoly využívají jako třetí krok rozšířené molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR*, jde o tzv. IRT/DNA/DNA protokoly. U novorozenců, u kterých je pomocí panelu s limitovaným počtem mutací v rámci DNA analýzy v 2. kroku nalezena 1 mutace v genu *CFTR*, následuje rozšířené molekulárně genetické vyšetření (obvykle sekvenování všech exonů dle Sangerova; nově je zvažováno využití NGS technologií) genu *CFTR*. Pokud se prokáže 2. mutace, následuje diagnostický potní test. Pokud se 2. mutace neprokáže, screening je hodnocen jako negativní

a odpadá tak potřeba indikovat potní test. Tento přístup sníží počet indikovaných potních testů a tímlepší PPV testu.

Mezi nevýhody patří odhalení alel s nejasným klinickým dopadem, vysoké náklady a možná falešná negativita způsobená velkými delecemi nebo duplikacemi v genu *CFTR*.

Strategie tzv. záchranné sítě - „Fail-safe“ strategie (FS)

FS byla původně navržena pro protokoly IRT/DNA k tomu, aby odhalila pacienty, kteří mají dvě vzácné mutace a ani jedna z těchto mutací genu *CFTR* není zahrnuta v použitém panelu vyšetřovaných alel.

Podle této strategie jsou děti s velmi vysokým iniciálním IRT a bez detekované mutace v rámci základního panelu mutací odesláni k opakovanému stanovení koncentrace IRT z druhého odběru nebo přímo k diagnostickému potnímu testu.

FS je vhodná součást protokolů IRT/DNA v etnicky heterogenních populacích. Nověji se FS užívá také u některých protokolů IRT/PAP (Sommerburg et al., 2014, 2010). Cílem FS je zvýšit senzitivitu testu (opět za cenu nižší specificity).

1.6.1.1.4. Další kombinace a další kroky v protokolech NSCF

Protokol IRT/IRT/DNA – novorozenci s vysokým iniciálním IRT jsou odesláni ke stanovení IRT z 2. odběru a pokud IRT přetrvává vysoké, následuje DNA analýza. Při nález 2 nebo 1 mutace následuje potní test.

Protokol IRT/PAP/DNA – u novorozenců splňujících kritéria pro IRT/PAP následuje DNA analýza. Všechna vyšetření probíhají z původní suché krevní skvrny. Při nález 2 nebo 1 mutace pak následuje potní test. Modifikací pak může být protokol IRT/PAP/DNA/DNA (Vernooij-van Langen et al., 2012), kdy u novorozenců s jednou nalezenou mutací pomocí komerčně dostupného kitu následuje rozšířené molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR*.

Je však nezbytné zdůraznit, že neexistuje ideální screeningové schéma. Žádné z uvedených screeningových schémat nemá 100% senzitivitu, takže diagnózu CF nelze na základě negativního screeningu v jednotlivém případě jednoznačně vyloučit.

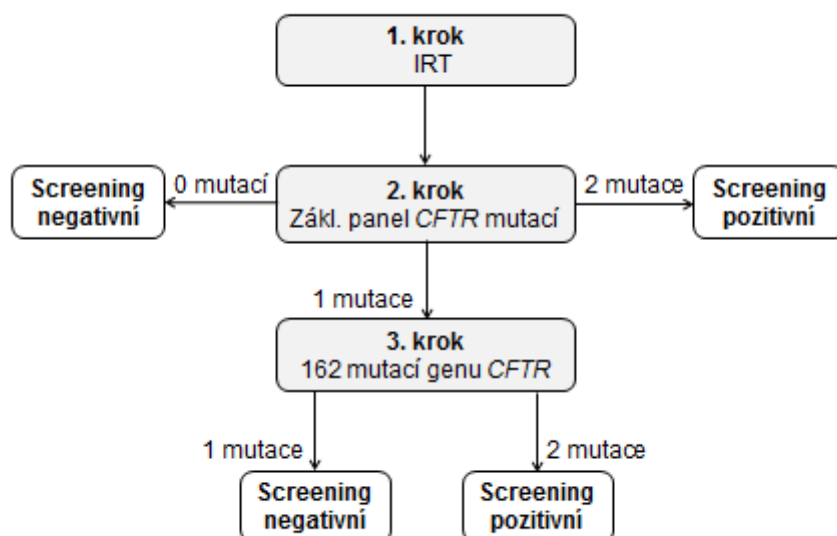
Při zavádění celoplošného screeningového programu je nutné zvážit legislativní a etické požadavky a také finanční možnosti konkrétního státu.

1.6.1.1.5. Použití metod NGS v rámci NSCF

Novinkou je zavádění technologií NGS jako součást screeningových programů. Na 36. Evropské konferenci cystické fibrózy (12. – 15. 6. 2013, Lisabon, Portugalsko) prof. Philip M. Farrell (University of Wisconsin, USA) představil protokol IRT/DNA/DNA (Obr. č. 4), kde u probandů s nalezenou 1 mutací v genu *CFTR* pomocí základního panelu nejčastějších mutací následoval 3. krok - vyšetření 162 jednoznačně patogenních mutací genu *CFTR* pomocí Illumina MiSeqDx™ Cystic Fibrosis Solution assay. Výše uvedených 162 mutací představuje 97 % všech alel vyskytujících se u pacientů s CF v USA (“The Clinical and Functional Translation of CFTR, a”). Pokud 3. krok vedl k nalezení 2. mutace, následoval potní test k potvrzení diagnózy CF. Pokud 2. mutace nalezena nebyla, screening byl hodnocen jako negativní bez nutnosti provedení potního testu. Smyslem tohoto přístupu je tak snížit falešnou pozitivitu testu. Vzácnější mutace genu *CFTR*, které nejsou zahrnuty mezi 162 vyšetřovanými, jsou pak zdrojem falešné negativity.

Vyšetření 162 mutací genu *CFTR* v 2. kroku IRT/DNA protokolu by oproti IRT/DNA/DNA mohlo jen mírně zvýšit senzitivitu, vysoké by však byly v současné době s tím spojené finanční náklady.

Obr. č. 4: Protokol IRT/DNA/DNA



NGS technologie umožňující vyšetřit všechny exony (a ev. i introny) genu *CFTR* nebyly v rámci NSCF zatím použity. Teoreticky, pokud bychom zavedli tento přístup v druhém kroku IRT/DNA schémat, dosáhli bychom maximální sensitivity, kterou druhý krok umožňuje dosáhnout (výjimkou jsou platformy, které mají problém odhalit rozsáhlé delece). Limitací pro jeho použití je zejména vysoká finanční nákladnost a detekce variant s nejasným fenotypovým dopadem. Probandi s nálezem 1 mutace by mohli mít screening uzavřený jako negativní bez potřeby podstoupit potní test. Falešnou pozitivitu by zřejmě představovali probandi s nálezem 2 alel genu *CFTR*, kde alespoň 1 z alel má nejasný fenotypový projev, a negativním výsledkem potního testu.

Krajním případem by mohlo být použití celogenomového sekvenování (Whole Genome Sequencing; WGS) u všech novorozenců jako první a jediný krok (Goldenberg and Sharp, 2012). WGS provedené u všech novorozenců by v ideálním případě nahradilo ostatní vyšetření používaná k detekci chorob v rámci screeningových programů a nahradilo by také molekulárně genetická vyšetření, která by případně jedinec v budoucnu měl podstoupit (např. vzhledem ke zdravotnímu stavu nebo rodinné anamnéze). Tento přístup by však s sebou přinášel řadu legislativních, společenských, etických, finančních, praktických a dalších otázek (Johansen Taber et al., 2014) a úskalí (např. většina kongenitálních hypothyreoz není primárně genetická, a nelze je proto diagnostikovat pomocí WGS).

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Ve své práci jsem se zabývala problematikou NSCF z hlediska:

1) Zhodnocení hypotézy o výhodnosti parametrů screeningových protokolů založených na stanovení koncentrace PAP ve druhém analytickém stupni. Hlavním cílem bylo porovnat proveditelnost, senzitivitu a specifitu současného celoplošného screeningového protokolu IRT/DNA/IRT a protokolů IRT/PAP a IRT/PAP/DNA. Výstup projektu se stal podkladem pro rozhodování o volbě optimálního modelu pravidelného celoplošného NSCF v České republice.

2) Zhodnocení senzitivity a specifity IRT/PAP protokolů v závislosti na zvolených cut-off hodnotách pro IRT a PAP. Hlavním cílem bylo ověřit, že optimálně nastavené cut-off hodnoty v rámci IRT/PAP schémat představují vhodnou alternativu pro státy nebo oblasti které z nejrůznějších důvodů nemohou začlenit molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR* jako součást screeningových schémat.

3) Charakteristiky zastoupení jednotlivých mutací v genu *CFTR* v České republice. Hlavním cílem, v souvislosti s celoplošným screeningovým programem pro CF, bylo ověřit, že populačně specifické mutace v genu *CFTR*, které jsou součástí námi používané diagnostické soupravy, nepředstavují překážku v dosažení vysoké senzitivity současného celoplošného protokolu IRT/DNA/IRT.

4) Zhodnocení efektivity screeningového programu pro CF v České republice od jeho zavedení v roce 2009 do konce roku 2012.

5) Zhodnocení vlivu zvyšujícího se počtu novorozenců od přistěhovalců z evropské části Ruské federace a Ukrajiny na území České republiky na senzitivitu protokolů IRT/DNA/IRT a IRT/PAP/DNA.

3. PUBLIKACE

Následující publikace se zabývá problematikou uvedenou v bodě 1 mezi stanovenými cíli této dizertační práce (viz kapitola 2.).

3.1. Krulišová, V., Balaščaková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Paděrová, J., Křenková, P., Dvořáková, L., Zemková, D., Kračmar, P., Chovancová, B., Vávrová, V., Stambergová, A., Votava, F., Macek, M., Jr, 2012. **Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. Eur. J. Pediat. 171, 1223-1229. IF 1,907**

Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA

Veronika Krulišová · Miroslava Balašáková ·
Veronika Skalická · Tereza Piskáčková ·
Andrea Holubová · Jana Paděrová · Petra Křenková ·
Lenka Dvořáková · Dana Zemková · Petr Kračmar ·
Blanka Chovancová · Věra Vávrová ·
Alexandra Štambergová · Felix Votava ·
Milan Macek Jr.

Received: 25 January 2012 / Accepted: 12 April 2012 / Published online: 12 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Cystic fibrosis (CF) is a life-threatening disease for which early diagnosis following newborn screening (NBS) improves the prognosis. We performed a prospective assessment of the immunoreactive trypsinogen (IRT)/DNA/IRT protocol currently in use nationwide, versus the IRT/pancreatitis-associated protein (PAP) and IRT/PAP/DNA CF NBS protocols. Dried blood spots (DBS) from 106,522 Czech newborns were examined for IRT concentrations. In the IRT/DNA/IRT protocol, DNA-testing was performed for IRT \geq 65 ng/mL. Newborns with IRT \geq 200 ng/mL and no detected cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (*CFTR*) mutations were recalled for a repeat IRT. In

the same group of newborns, for both parallel protocols, PAP was measured in DBS with IRT \geq 50 ng/mL. In PAP-positive newborns (i.e., \geq 1.8 if IRT 50–99.9 or \geq 1.0 if IRT \geq 100, all in ng/mL), DNA-testing followed as part of the IRT/PAP/DNA protocol. Newborns with at least one *CFTR* mutation in the IRT/DNA/IRT and IRT/PAP/DNA protocols; a positive PAP in IRT/PAP; or a high repeat IRT in IRT/DNA/IRT were referred for sweat testing. Conclusion: the combined results of the utilized protocols led to the detection of 21 CF patients, 19 of which were identified using the IRT/DNA/IRT protocol, 16 using IRT/PAP, and 15 using IRT/PAP/DNA. Decreased cut-offs for PAP within the IRT/PAP protocol would lead to higher sensitivity but would increase false positives. Within the IRT/PAP/DNA protocol, decreased PAP cut-offs would result in high sensitivity, an acceptable number of false positives, and would reduce the number of DNA analyses. Thus, we concluded that the IRT/PAP/DNA protocol would represent the most suitable protocol in our conditions.

Veronika Krulišová and Miroslava Balašáková contributed equally to this paper. Senior authors, Felix Votava and Milan Macek Jr., also contributed equally to this paper.

V. Krulišová · M. Balašáková · T. Piskáčková · A. Holubová ·
J. Paděrová · P. Křenková · L. Dvořáková · A. Štambergová ·
M. Macek Jr. (✉)

Department of Biology and Medical Genetics, University Hospital
Motol and the 2nd Faculty of Medicine, Charles University,
V Úvalu 84,
15006 Prague 5, Czech Republic
e-mail: milan.macek.jr@lfmotol.cuni.cz

V. Skalická · D. Zemková · V. Vávrová
Department of Pediatrics, University Hospital Motol and the 2nd
Faculty of Medicine, Charles University,
Prague, Czech Republic

P. Kračmar · B. Chovancová · F. Votava
Department of Pediatrics, University Hospital Královské
Vinohrady and the 3rd Faculty of Medicine, Charles University,
Prague, Czech Republic

Keywords Newborn screening · Cystic fibrosis (MIM 219700) · Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene · Immunoreactive trypsinogen · Pancreatitis-associated protein · Sweat test

Abbreviations

CF Cystic fibrosis
CFTR Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene
DBS Dried blood spot

DNA	Deoxyribonucleic acid
IRT	Immunoreactive trypsinogen
NBS	Newborn screening
PAP	Pancreatitis-associated protein
PSP	Population-specific percentile

Introduction

Cystic fibrosis (CF, MIM 219700) is the most frequent life-threatening autosomal recessive disease in Caucasians occurring in approximately 1 in 3,000 live births in the Czech Republic [4]. CF is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene. Diagnosis of CF during the first 2 months of life leads to more favorable prognosis [11,13,20]. Thus, CF newborns screening (NBS) has been implemented in many countries using various protocols [6,8,16]. A positive screening result indicates that a newborn is at risk for CF and diagnostic testing (e.g., sweat test) is necessary to confirm the diagnosis.

All CF NBS protocols start by determining concentrations of immunoreactive trypsinogen (IRT) [9] in dried blood spots (DBS) obtained from the newborn, which is collected on filter paper. IRT higher than the optimized population-specific percentile (PSP) achieves sufficient sensitivity by itself but is associated with a high false positive rate [16]. Therefore, additional tiers of testing have been implemented.

In newborns with increased IRT, subsequent DNA-testing for *CFTR* mutations using the same DBS (IRT/DNA protocol) yields high sensitivity and specificity and is currently the most common CF NBS strategy [12,16]. Nevertheless, DNA-testing is associated with inherent problems such as (a) detection of CF carriers [7], (b) issues of informed consent, (c) lower detection rates of commercially available mutation panels in non-European-derived populations [12], (d) detection of equivocal diagnoses of CF [8,12,24] when non CF-causing mutations are included in screening panels, and eventually (e) incidental detection of non-paternity and (f) increased costs. Some CF NBS protocols utilize fail-safe strategies to identify children (especially those of non-European origin) with *CFTR* mutations that are not included in screening panels. This strategy requires children with a very high initial IRT and no detected mutation to undergo repeated IRT measurements or directly sweat test.

In some CF NBS protocols, biochemical markers are utilized as a second tier to avoid the drawbacks of DNA-testing. An IRT repeated after 2–3 weeks (IRT/IRT protocol) improves screening specificity but still leads to a high number of false positives [12,16]. More than a decade ago, Sarles et al. [17] introduced a pancreatitis-associated protein

(PAP) in which PAP is examined from the same DBS as the initial IRT (IRT/PAP protocol). According to the recent French study [18], the IRT/PAP protocol achieves both high sensitivity and specificity.

Following the Czech pilot-phase project [2], we have adopted the IRT/DNA/IRT protocol as the current nationwide CF NBS strategy. In this study, we evaluated CF NBS by a prospective parallel comparison of the IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP [18] and IRT/PAP/DNA protocols (where in the latter protocol DNA-testing is used as a third tier).

Population and methods

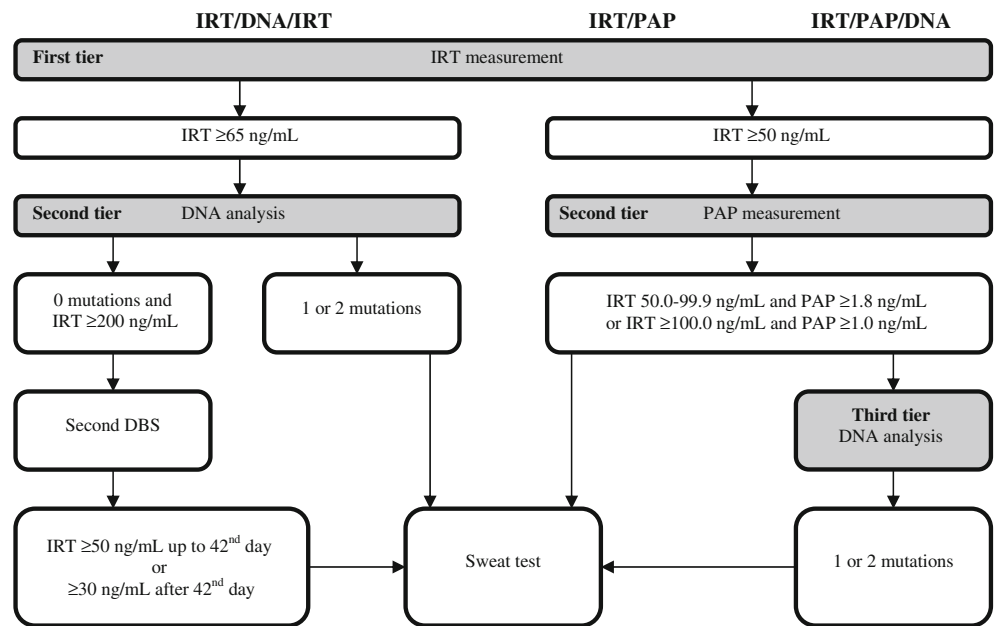
A total of 106,522 newborns from Bohemia, western region of the Czech Republic accounting for two thirds of the entire population [2], were examined. The annual birth rate in this region is about 70,000 newborns per year. Screening took place from August 2009 to January 2011. DBS on filter paper for IRT measurement were sampled by a heel prick within 72–96 h postpartum and starting in October 2009 within 48–72 h postpartum. Parental informed consent, oral or written depending on respective procedures in individual neonatal units, is mandatory for any NBS. However, the Czech Ministry of Health granted an exception not to require additional informed consent for targeted *CFTR* gene testing as part of the nationwide CF NBS program.

Parents of all newborns were informed about IRT and PAP measurements as part of the screening information process at neonatal units and had a possibility to decline the participation in the study. Informed consent was necessary but not in written form in this phase of the study. However, a signed written informed consent was obligatory for subsequent sweat test and DNA-testing in newborns with elevated PAP [18] within the IRT/PAP and IRT/PAP/DNA protocols. The study was approved by the Ethics Board of the 3rd Faculty of Medicine of Charles University, Prague, Czech Republic.

IRT/DNA/IRT protocol

IRT was assayed using AutoDELFIA® Neonatal IRT kit (PerkinElmer; Finland) by single measurement following manufacturer's instructions. The resulting fluorescence was measured using AutoDELFIA® AIS 1235 (PerkinElmer; Finland). The biochemical laboratory performing IRT tests undergoes an external quality assessment similar to that mandated by the Centers for Disease Control and Prevention, USA. In newborns with IRT ≥ 65 ng/mL (fixed cut-off; optimized for the 99.0th PSP; based on the outcomes of the pilot project; [2]), DNA-testing in an ISO15189 accredited laboratory was performed from the same DBS as the second tier (Fig. 1). Initially, DNA-testing assays included 32

Fig. 1 Parallel overview of assessed CF NBS protocols



mutations and, as of July 2010, it includes 50 mutations (CE-marked Elucigene CF-EU1[™]/Elucigene CF-EU2[™] assays; Gen-Probe, UK). These assays account for 90.8/92.8 % of all mutations in the Czech CF population, with the residual risk of still unidentified mutation being 0.34/0.28 %, respectively [2,3] (Table 1). For assay readouts on the ABI3130xl gene scanner (Applied Biosystems, USA), we used manufacturer's templates for the GeneMapper 4 software.

Newborns with an IRT ≥ 65 ng/mL (99th PSP) together with either one or two detected *CFTR* mutations were considered as having screened positive and referred for a sweat test, which was performed using the original Gibson–Cooke protocol based on pilocarpine-induced iontophoresis [14] (Fig. 1). Mean sweat chloride concentrations ≥ 60 mmol/L were considered diagnostic of CF [14]. Patients with sweat chloride concentrations between 30–60 mmol/L, who thus fell into the borderline category, were subjected to extended clinical evaluation and DNA-testing. Sweat chloride concentrations < 30 mmol/L were considered to be negative. Newborns with IRT ≥ 200 ng/mL (the 99.95th PSP; set as a fail–safe threshold in the previous pilot CF NBS project [2]) and with no detected mutations (fail–safe strategy) were also considered to have screened positive and were invited back for repeated IRT examination. Those with a repeated IRT ≥ 50 ng/mL up to the 42nd day postpartum, or ≥ 30 ng/mL after the 42nd day postpartum were referred for a sweat test.

IRT/PAP and IRT/PAP/DNA protocols

In newborns with an initial IRT ≥ 50 ng/mL (the 97.5th PSP) [18], PAP concentrations in the same DBS were assayed as

the second tier using a commercial assay (MucoPAP[®]; Dynabio, France) in accordance with the manufacturer's instructions. Sample absorbance determining PAP concentration was measured at 450 nm (reference filter 620 nm) on Microplate Reader PR3100 TSC (BioRad, USA). PAP concentrations were measured twice and their mean value was used. PAP values were not converted to the new dilution factor (in March 2011, Dynabio announced a correction of the PAP assays; the proper concentrations should have been 1.6 times higher [10]).

In the IRT/PAP protocol, newborns with an IRT ranging from 50.0 to 99.9 and PAP ≥ 1.8 or IRT ≥ 100.0 and PAP ≥ 1.0 (all ng/mL) [18] were considered to have screened positive and referred for sweat testing.

In the IRT/PAP/DNA protocol newborns meeting the same criteria with an elevated PAP [18], DNA-testing was performed on the same DBS as the third tier. In newborns in which one or two *CFTR* mutations were detected (i.e., screening positive), a sweat test followed. DNA-testing assays and sweat test techniques were identical to those used in the IRT/DNA/IRT protocol.

Results

IRT/DNA/IRT protocol

Among the 106,522 newborns screened for CF, 1,158 (1.09 %) had an IRT level ≥ 65 ng/mL and hence they were referred for DNA-testing. Among those 1,158 newborns, 19 carried two mutations and 57 a single mutation in the *CFTR* gene. Out of the 19 newborns with

Table 1 Parallel comparison of CF NBS protocols

	IRT/DNA ^a /IRT	IRT/PAP	IRT/PAP/DNA ^a
Newborns screened (<i>N</i>)	106,522	106,522	106,522
IRT positives (<i>N</i> ; %)	1,158 (1.09)	3,155 (2.96)	3,155 (2.96)
PAP positives (<i>N</i> ; %)	–	260 (0.24)	260 (0.24)
Median age (range) at the availability of DNA-testing ^a results (days)	36 (9–222 ^b)	–	36 (9–222 ^b)
1 and/or 2 CF mutations detected (<i>N</i> ; %)	76 (0.07)	–	27 (0.03)
Recalled newborns for repeated IRT examination (<i>N</i> ; %)	47 (0.04)	–	–
Positive CF NBS (<i>N</i> ; %)	123 (0.12)	260 (0.24)	27 (0.03)
Positive IRT in newborns recalled for repeated examination (<i>N</i>)	1	–	–
ST indicated (<i>N</i> ; %)	77 (0.07)	260 (0.24)	27 (0.03)
ST carried out (<i>N</i> ; % of indicated ST)	72 ^c (93.51)	204 ^c (78.46)	24 ^c (88.89)
CF carriers (<i>N</i>)	55	–	12
Prevalence of CF carriers	1 in 21	–	1 in 22
Diagnosed CF patients (<i>N</i>)	19	16	15
False positives based on performed ST (<i>N</i> ; % of all cases screened)	99 ^d (0.09)	188 (0.18)	9 (0.01)
Newborns with equivocal diagnosis [F508del/R117H-IVS-8 T(7) and ST<30 mmol/L; <i>N</i>]	2	–	0
False negatives (<i>N</i>)	2	5	6
Total of CF patients detected (<i>N</i>)	21 ^e	–	–
Median age (range) at diagnosis (days)	36 (9–57) ^e	–	–
CF prevalence	1 in 5,072 ^e	–	–
Sensitivity (TP/TP+FN)	0.9048	0.7619	0.7142
Specificity (TN/TN+FP)	0.9991	0.9982	0.9999
PPV (TP/TP+FP)	0.1610	0.0784	0.625

N number, % of all cases screened, *TP* true positives, *FN* false negatives, *TN* true negatives, *FP* false positives, *PPV* positive predictive value, *ST* sweat test

^a CF-causing mutations covered by Elucigene assays (“legacy” nomenclature) with the CF-EU1Tm accounting for: p.Arg347Pro (R347P), c.2657+5G>A (2789+5G>A), c.2988+1G>A (3120+1G>A), c.579+1G>T (711+1G>T), p.Arg334Trp (R334W), p.Ile507del (I507del), p.Phe508del (F508del), c.3718-2477C>T (3849+10kbC>T), p.Phe316LeufsX12 (1078delT), p.Trp1282X (W1282X), p.Arg560Thr (R560T), p.Arg553X (R553X), p.Gly551Asp (G551D), p.Met1101Lys (M1101K), p.Gly542X (G542X), p.Leu1258PhefsX7 (3905insT), p.Ser1251Asn (S1251N), c.1585-1G>A (1717-1G>A), p.Arg117His (R117H), p.Asn1303Lys (N1303K), p.Gly85Glu (G85E), c.1766+1G>A (1898+1G>A), p.Lys684AsnfsX38 (2184delA), p.Asp1152His (D1152H), c.54-5940_273+10250del (CFTRdele2,3), p.Pro67Leu (P67L), p.Glu60X (E60X), p.Lys1177SerfsX15 (3659delC), c.489+1G>T (621+1G>T), p.Ala455Glu (A455E), p.Arg1162X (R1162X), p.Leu671X (2143delT), c.1210-12T[n] (IVS8-T(n) variant), including additional mutations in the CF-EU2Tm: p.Gln890X (Q890X), p.Tyr515X (1677delTA), p.Val520Phe (V520F), c.3140-26A>G (3272-26A>G), p.Leu88IlefsX22 (394delTT), p.Arg1066Cys (R1066C), p.Ile105SerfsX2 (444delA), p.Tyr1092X (C>A) (Y1092X(C>A)), p.Arg117Cys (R117C), p.Ser549Asn (S549N), p.Ser549ArgT>G (S549R T>G), p.Tyr122X (Y122X), p.Arg1158X (R1158X), p.Leu206Trp (L206W), c.1680-886A>G (1811+1.6kbA>G), p.Arg347His (R347H), p.Val739TyrfsX16 (2347delG) and p.Trp846X (W846X)

^b failed DNA isolation from DBS, including repetition of DNA-testing

^c deceased patient or non-compliance with referrals (five CF carriers in IRT/DNA/IRT, 56 newborns in IRT/PAP, three CF carriers in IRT/PAP/DNA)

^d comprising newborns with repeated IRT (47 newborns)

^e aggregate data from all protocols

two mutations, 17 had a positive sweat test, confirming the diagnosis of CF. The remaining two newborns carrying the c.[1521_1523delCTT]+[350G>A;1210-12T[7]] genotype (legacy name: F508del/R117H-IVS-8 T(7)) had negative sweat test results. The R117H-T7 complex allele is usually considered a CFTR-related disorder mutation [5,24] and when found in compound heterozygosity with a CF-causing mutation, it results in variable phenotypes ranging from mild form of CF, obstructive azoospermia, or to no disease at all [5]. Therefore, it was suggested by

many CF NBS experts that this mutation should be excluded from the CF NBS screening panels [24]. However, the R117H mutation is an integral part of the Elucigene assay and thus could not have been disregarded. The two newborns carrying R117H-T7 allele, were not diagnosed with CF. They were, however, enrolled into a long-term clinical monitoring program [15].

In those newborns, having only a single detected mutation (57 newborns), two had a positive sweat test. According to the protocol, this result indicated the sequencing of the

entire *CFTR* coding region in both newborns, and led to the identification of p.Ile336Lys (I336K) and p.Glu1104Lys (E1104K) mutations. The remaining 55 newborns were carriers. From the 47 infants with an IRT ≥ 200 ng/mL and no mutation detected (fail-safe strategy), only 17 newborns were recalled for a repeat IRT. Thirty newborns did not return for repeat IRT testing, because they had been processed earlier under the parallel-running IRT/PAP protocol. Subsequently, only one of the 17 newborns had an IRT ≥ 30 ng/mL at 70 days of age. However, CF was later ruled out based on a negative sweat test.

We observed false negativity in two newborns: the first suffered from meconium ileus with a low IRT (62.2 ng/mL), and the second with the rare genotype p.[Gln552X] + [Leu1376SerfsX8] (Q552X/4259del5) was missed by the utilized commercial assay. The newborn with meconium ileus was diagnosed on clinical basis and the CF diagnosis was confirmed by positive sweat test and DNA analysis (F508del/F508del genotype). Overall, 19 CF patients and two newborns with equivocal diagnosis of CF were detected.

IRT/PAP and IRT/PAP/DNA protocols

Within the IRT/PAP protocol, out of 106,522 screened newborns, a total of 3,155 (2.96 %) had an IRT concentrations ≥ 50 ng/mL, and 260 of them (0.24 %) met the PAP positive criteria (IRT ranging from 50.0 to 99.9 and PAP ≥ 1.8 or IRT ≥ 100.0 and PAP ≥ 1.0 (all ng/mL) [18]). Sixteen CF patients were diagnosed based on using the sweat test and five CF patients proved to be false negatives (due to PAP levels below the cut-off), whereas these were detected by the IRT/DNA/IRT protocol (Tables 1 and 2).

Table 2 False negatives due to mean PAP concentrations below the cut-off

	IRT (ng/mL)	PAP (ng/mL)	<i>CFTR</i> Genotype ^a	Sweat chloride concentration (mmol/L)
Patient 1	174	0.93	F508del/ F508del	109.6
Patient 2	337	0.49	F508del/ F508del	98.7
Patient 3	203	0.42	F508del/ F508del	103.7
Patient 4	115	0.67	F508del/ I507del	93.2
Patient 5 ^b	87.8	1.43	G542X/ E1104K	74.5

^a legacy nomenclature

^b pancreatic sufficient patient (fecal Elastase-1 level was 507 μ g/g)

Of the 260 newborns referred, only 204 (78.46 %) underwent the sweat test (Table 1). This was due to previous parental knowledge of the screening outcome from the IRT/DNA/IRT scheme (16 newborns), unrelated postnatal morbidity (24 newborns), and mortality (16 newborns).

As part of the parallel IRT/PAP/DNA protocol, 204 out of 260 newborns meeting criteria for IRT/PAP protocol [18] were referred for DNA-testing. Among those, 15 patients with two mutations in *trans* were identified, and their CF diagnosis was confirmed by sweat test. In addition, 12 carriers were detected. However, a total of six CF patients were false negative: (a) five patients had PAP values below the cut-off (Table 2), and (b) one patient met PAP values but failed basic DNA-testing related to a rare CF genotype.

Discussion

The observed CF prevalence of one in 5,072 (Table 1) is substantially lower in comparison to 4-decade-old epidemiological estimates of one in 2,736 newborns [4] from the same geographical area. This trend is in accordance with other CF NBS programs [19] reflecting: (a) general acceptance of pre-implantation and/or prenatal diagnosis of CF and/or (b) an increase of non-European natality in the Czech Republic.

Due to two IRT cut-offs set for testing protocols (≥ 65 ng/mL in IRT/DNA/IRT and ≥ 50 ng/mL in IRT/PAP and IRT/PAP/DNA protocols), some newborns met the screening criteria for all protocols. Thus, the study's design did not allow for a comparison of age at the time of diagnosis in the three protocols. Nevertheless, all CF patients were diagnosed at <2 months of age (Table 1) [20].

IRT/DNA/IRT protocol

One of the two false negative CF patients could be explained by the presence of meconium ileus that is commonly associated with a low IRT [22]. However, this newborn was diagnosed clinically (and confirmed by sweat test and DNA analysis) and also detected in both parallel IRT/PAP and IRT/PAP/DNA protocols (IRT 62.2, PAP 5.39; both ng/mL). This example of a false negative patient indicates that the IRT cut-off setting is essential for achieving high sensitivity in all CF NBS protocols [1]. However, the additional lowering of these IRT cut-offs would increase the number of false positives. The second false negative CF patient (IRT 107, PAP 2.37; both ng/mL) appeared negative due to the presence of rare CF alleles [3] that are absent in the utilized DNA-testing assays. This patient was identified within the IRT/PAP protocol, but was missed by the IRT/PAP/DNA protocol.

IRT/PAP and IRT/PAP/DNA protocols

Five CF patients were false negative within the IRT/PAP protocol due to low PAP concentrations (Table 2). Six CF patients in the IRT/PAP/DNA protocol were false negative due to a low PAP (five patients, Table 2) and a rare genotype (one patient). In the absence of an external quality assessment system, PAP assays were internally calibrated using the provided standards. False negative results were verified by PAP re-examination (four times) and discussed directly with the manufacturer who did not reveal any analytical errors. The false negativity in the fifth patient could be explained by her pancreatic sufficiency (Table 2).

We consider the 260 newborns referred for sweat testing (0.24 % of the total screened) in the IRT/PAP protocol as an unacceptably high screening-related burden for families relative to the 123 newborns (76 with at least one *CFTR* mutation and 47 with repeated IRT; 0.12 % of the total screened) in the IRT/DNA/IRT protocol.

In the IRT/PAP protocol, higher sensitivity could have been achieved by lowering the cut-off for PAP, as suggested in a previous German study [21] ($\text{PAP} \geq 1.0 \text{ ng/mL}$). Even if we had utilized this PAP cut-off (for $\text{IRT} \geq 50 \text{ ng/mL}$), we would have still missed four CF patients. In addition, contrary to the German study, we did not employ the fail-safe strategy in the IRT/PAP protocol. Thus, if we had combined a fail-safe strategy ($\text{IRT} \geq 200 \text{ ng/mL}$, the 99.95th PSP) and a $\text{PAP} \geq 1.0 \text{ ng/mL}$, two CF patients would have been missed instead of five. If that had been the case, sensitivity in our study would have been comparable to that of the German study. Consequently, the number of false positives would have increased.

Although the same cut-offs for PAP with a higher cut-off for IRT ($\geq 60 \text{ ng/mL}$ instead of 50) in the IRT/PAP protocol ($\text{IRT} \geq 100$ and $\text{PAP} \geq 1.0$ or $\text{IRT} \geq 60$ and $\text{PAP} \geq 1.8$; all ng/mL) were used in a recent Dutch study [25] (with reported sensitivity of 95.0 %), we observed much lower sensitivity (76.19 %) in our IRT/PAP study. Such marked difference might be due to the fact that patients with meconium ileus were excluded in the Dutch study, which leads to an overall higher sensitivity. Another compounding factor could be the different ethnic composition of the Dutch newborn population.

Recently, there was a proposal to increase sensitivity in the IRT/PAP protocol via reduction of the PAP cut-offs. If we had recalculated our IRT/PAP raw data according to the $\text{IRT} \times \text{PAP}$ multiplication algorithm [23] (if $\text{IRT} \geq 60 \text{ ng/mL}$ then $\text{IRT} \times \text{PAP} \geq 75$), there would have been no false negative patients in our cohort. However, the number of indicated sweat tests would have increased to 0.41 %. Similarly, by using new criteria proposed by Sarles (if $\text{IRT} \geq 60$ then $\text{IRT} < 100$ and $\text{PAP} \geq 1.0$ or $\text{IRT} \geq 100$ and $\text{PAP} \geq 0.3$; all ng/mL) [oral communication: Sarles J. The use of PAP in NBS;

Results of the French study; 34th European Cystic Fibrosis Conference; 8–11 June 2011; Hamburg; Germany], all CF patients would have been detected, but referrals for sweat testing would have risen to 0.49 %.

Nevertheless, PAP tier with lower cut-offs could be used to decrease the number of DNA analyses and their associated cost within the IRT/PAP/DNA protocol to approximately one half of those resulting from DNA analyses in the IRT/DNA/IRT protocol (0.41/0.49 % versus 1.09 %).

In summary, the combined results of the utilized protocols led to the detection of 21 CF patients, 19 of which were detected by the IRT/DNA/IRT protocol, 16 by IRT/PAP, and 15 by IRT/PAP/DNA protocol. These data together with additional screening performance metrics (Table 1) proved that the current nationwide IRT/DNA/IRT protocol has higher efficacy. Decreased cut-offs for PAP within the IRT/PAP protocol would have led to a high sensitivity, but it would have increased false positives and, thus, the CF NBS-related burden.

Within the IRT/PAP/DNA protocol, decreased PAP cut-offs could yield a high sensitivity, an acceptable number of false positives, and could reduce the number and costs of DNA analyses. Based on the evidence presented, we conclude that the IRT/PAP/DNA protocol would be the most suitable CF NBS protocol in our conditions.

Acknowledgments This study was supported by a grant from the Czech Ministry of Health: IGA NS 9986-3/2008 to FV. We would like to acknowledge all collaborating primary care physicians and clinicians from neonatal units who we could not list individually. We would like to thank Mr Thomas Secrest for linguistic proofreading of the final manuscript. Finally, we would like to thank all participants of the parallel CF NBS research protocols.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Baker MW, Goose M, Hoffman G, Rock M, Levy H, Farrell PM (2011) Optimal DNA tier for the IRT/DNA algorithm determined by *CFTR* mutation results over 14 years of newborn screening. *J Cyst Fibros* 10(4):278–81
2. Balascková M, Holubová A, Skalická V, Zemková D, Kracmar P, Gonsorcikova L, Camajová J, Piskácková T, Lebl J, Drevinek P, Gregor V, Vávrová V, Votava F, Macek M Jr (2009) Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *J Cyst Fibros* 8(3):224–7
3. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM (2002) Cystic fibrosis: a worldwide analysis of *CFTR* mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 19(6):575–606
4. Brunecký Z (1972) The incidence and genetics of cystic fibrosis. *J Med Genet* 9(1):33–7
5. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T,

- Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Férec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7(3):179–96
6. Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, Mehta A, Munck A, Pollitt R, Sermet-Gaudelus I, Wilcken B, Ballmann M, Corbetta C, de Monestrol I, Farrell P, Feilcke M, Férec C, Gartner S, Gaskin K, Hammermann J, Kashirskaya N, Loeber G, Macek M Jr, Mehta G, Reiman A, Rizzotti P, Sammon A, Sands D, Smyth A, Sommerburg O, Torresani T, Travert G, Vernooij A, Elborn S (2009) European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros* 8(3):153–73
 7. Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL, Dovey M, Gerstle R, Haver K, Lapey A, O'Sullivan BP, Waltz DA, Zwerdling RG, Eaton RB (2004) Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatr* 113(6):1573–81
 8. Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW 3rd, Hoffman G, Parad RB, Wilfond BS, Rosenfeld M, Sontag MK, Massie J, Farrell PM, O'Sullivan BP, Foundation CF (2007) Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: cystic fibrosis foundation workshop report. *Pediatr* 119(2):e495–518
 9. Crossley JR, Smith PA, Edgar BW, Gluckman PD, Elliott RB (1981) Neonatal screening for cystic fibrosis, using immunoreactive trypsin assay in dried blood spots. *Clin Chim Acta* 113(2):111–21
 10. Dagorn JC (2011) International Society of Neonatal Screening [homepage on the Internet]. CF newborn screening with the Muco-PAP kits: changing the dilution factor. Available from: http://www.isnneoscreening.org/html/news_detail.htm?id=130 updated 4th March 2011
 11. Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC, Hoffman G, Laessig RH, Splaingard ML (2001) Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatr* 107(1):1–13
 12. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd, Cystic Fibrosis Foundation (2008) Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4–S14
 13. Lai HJ, Cheng Y, Cho H, Kosorok MR, Farrell PM (2004) Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 159(6):537–46
 14. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ Jr, Cystic Fibrosis Foundation (2007) Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr* 151(1):85–9
 15. Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C, Southern KW, European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group (2009) A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 8(1):71–8
 16. Ross LF (2008) Newborn screening for cystic fibrosis: a lesson in public health disparities. *J Pediatr* 153(3):308–13
 17. Sarles J, Barthelémy S, Férec C, Iovanna J, Roussey M, Farriaux JP, Toutain A, Berthelot J, Maurin N, Codet JP, Berthézène P, Dagorn JC (1999) Blood concentrations of pancreatitis-associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 80(2):F118–22
 18. Sarles J, Berthézène P, Le Louarn C, Somma C, Perini JM, Catheline M, Mirallié S, Luzet K, Roussey M, Farriaux JP, Berthelot J, Dagorn JC (2005) Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *J Pediatr* 147(3):302–5
 19. Scotet V, Assael BM, Duguépéroux I, Tamanini A, Audrézet MP, Férec C, Castellani C (2008) Time trends in birth incidence of cystic fibrosis in two European areas: data from newborn screening programs. *J Pediatr* 152(1):25–32
 20. Sims EJ, Clark A, McCormick J, Mehta G, Connett G, Mehta A (2007) Cystic fibrosis diagnosed after 2 months of age leads to worse outcomes and requires more therapy. *Pediatr* 119(1):19–28
 21. Sommerburg O, Lindner M, Muckenthaler M, Kohlmüller D, Leible S, Feneberg R, Kulozik AE, Mall MA, Hoffmann GF (2010) Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population. *J Inher Metab Dis* 33(suppl2):S263–71
 22. Sontag MK, Corey M, Hokanson JE, Marshall JA, Sommer SS, Zerbe GO, Accurso FJ (2006) Genetic and physiologic correlates of longitudinal immunoreactive trypsinogen decline in infants with cystic fibrosis identified through newborn screening. *J Pediatr* 149(5):650–67
 23. Stopsack M (2011) Improved cut off combination for IRT and PAP in newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 10(suppl1):S6
 24. Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, Génin E, Bellis G, Gautier E, Audrézet MP, Férec C, Lalau G, Georges MD, Claustres M, Bienvenu T, Gérard B, Boisseau P, Cabet-Bey F, Feldmann D, Clavel C, Bieth E, Iron A, Simon-Bouy B, Costa C, Medina R, Leclerc J, Hubert D, Nové-Josserand R, Sermet-Gaudelus I, Rault G, Flori J, Leroy S, Wizla N, Bellon G, Haloun A, Perez-Martin S, d'Acremont G, Corvol H, Clément A, Houssin E, Binquet C, Bonithon-Kopp C, Alberti-Boulmé C, Morris MA, Faivre L, Goossens M, Roussey M, Collaborating Working Group on R117H, Girodon E (2009) The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. *J Med Genet* 46(11):752–8
 25. Vernooij-van Langen AM, Loeber JG, Elvers B, Triepels RH, Gille JJ, Van der Ploeg CP, Reijntjens S, Dompeling E, Dankert-Roelse JE, on behalf of the CHOPIN Study Group (2012) Novel strategies in newborn screening for cystic fibrosis: a prospective controlled study. *Thorax* 67(4):289–295

3.1.1. Úvod k publikaci

Na základě výsledků pilotní studie (Balascaková et al., 2009) byl v České republice v roce 2009 zařazen mezi ostatní screeningová vyšetření u novorozenců také screening CF (“Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče,” 2009). Současným celoplošným screeningovým schématem pro CF je od 1. 10. 2009 v Čechách a od 1. 12. 2009 na Moravě protokol IRT/DNA, jehož součástí je FS ve formě opakovaného stanovení IRT z druhého odběru. Pro protokol je zavedeno označení IRT/DNA/IRT (Balascaková et al., 2009).

Ačkoliv jsou IRT/DNA protokoly s ohledem na vysokou senzitivitu a specificitu považovány za „zlatý standard“ screeningových schémat, DNA analýza s sebou přináší také nevýhody:

1) Detekci zdravých heterozygotů, což není cílem NS. K tomu, aby tito jedinci byli odlišeni od pacientů s CF, kde 2. mutace genu *CFTR* je mimo spektrum vyšetřovaných alel genu *CFTR*, musí podstoupit potní test. Probandi s 1 detekovanou mutací v genu *CFTR* a negativním potním testem tak představují falešnou pozitivitu testu.

V České republice, v souladu se současnou legislativou týkající se NSCF, není rodině sdělován výsledek molekulárně genetického vyšetření genu *CFTR* u probanda. Vyšetření genu *CFTR* v rámci NSCF má za cíl pouze snížit falešnou pozitivitu testu u jedinců s IRT nad stanovenou cut-off hodnotu, nemá zde význam diagnostický. Jediným výstupem vyšetření je uzavřít NSCF jako pozitivní, tj. proband je pozván k potnímu test, nebo negativní, tj. screening je ukončen.

Proband s negativním výsledkem potního testu (tj. < 30 mmol/l) se dále nevyšetřuje, rodině je pouze nabídnuta možnost genetického poradenství z důvodu zvýšené pravděpodobnosti, že proband, a minimálně jeden z rodičů, je zdravým nosičem mutace v genu *CFTR*. Až v návaznosti na genetickou konzultaci je rodině nabízeno molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR* u probanda a/nebo rodičů, které probíhá po vyplnění informovaného souhlasu dle §28 a §29 zákona č. 373/2011 Sb., o specifických zdravotních službách z DNA získané z plné krve (méně často např. z bukalního stěru).

2) Další nevýhodou je odhalení jedinců s tzv. nejasnou diagnózou CF (Comeau et al., 2007; Mayell et al., 2009; Thauvin-Robinet et al., 2013). Pojmem

nejasná diagnóza u probanda v rámci NSCF se rozumí: a) nález 2 mutací genu *CFTR*, kde alespoň jedna mutace patří mezi alely s nejasným klinickým dopadem a zároveň má proband negativní výsledek potního testu, b) nález 1 nebo žádné mutace při hraničním výsledku potního testu (30-59 mmol/l). Nově zavedla pracovní skupina novorozeneckého screeningu pro CF (The European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group, 2014) pro tuto skupinu jedinců označení CF Screen Positive Inconclusive Diagnosis (CF-SPID).

U probandů s CF-SPID nelze předpovědět závažnost obtíží ani prognózu. Většina těchto jedinců může být celý život asymptomatická nebo může mít jen „mírnější“ obtíže odpovídající *CFTR*-RDs. Cílem NSCF není diagnostikovat tuto skupinu jedinců.

3) Většina mutací v genu *CFTR* je populačně specifická, lze proto předpokládat vyšší pravděpodobnost selhání protokolu u etnicky heterogenních populací z důvodu přítomnosti mutací, které nejsou součástí použitého kitu (Bobadilla et al., 2002; Farrell et al., 2008). Důsledkem je pak vyšší falešná negativita screeningového protokolu.

4) Vysoké náklady související s cenou molekulárně genetického vyšetření genu *CFTR*.

5) V některých státech je screeningová metoda založená na DNA analýze legislativně problematická, což komplikuje logistiku novorozeneckého screeningu.

Ve snaze se „vyhnout“ DNA analýze, a tím výše popsaným nevýhodám, jsou některá schémata založena pouze na stanovení biochemických analytů. Tradičním příkladem jsou IRT/IRT protokoly, které dosahují vysoké senzitivity, mají však nižší specifitu (Castellani et al., 2009; Ross, 2008).

Perspektivní se zdají být protokoly IRT/PAP, které dosahují senzitivity srovnatelné s IRT/DNA protokoly (Sarles et al., 2014, 2005; Sommerburg et al., 2010; Vernooij-van Langen et al., 2012) se specificitou lepší než u IRT/IRT protokolů.

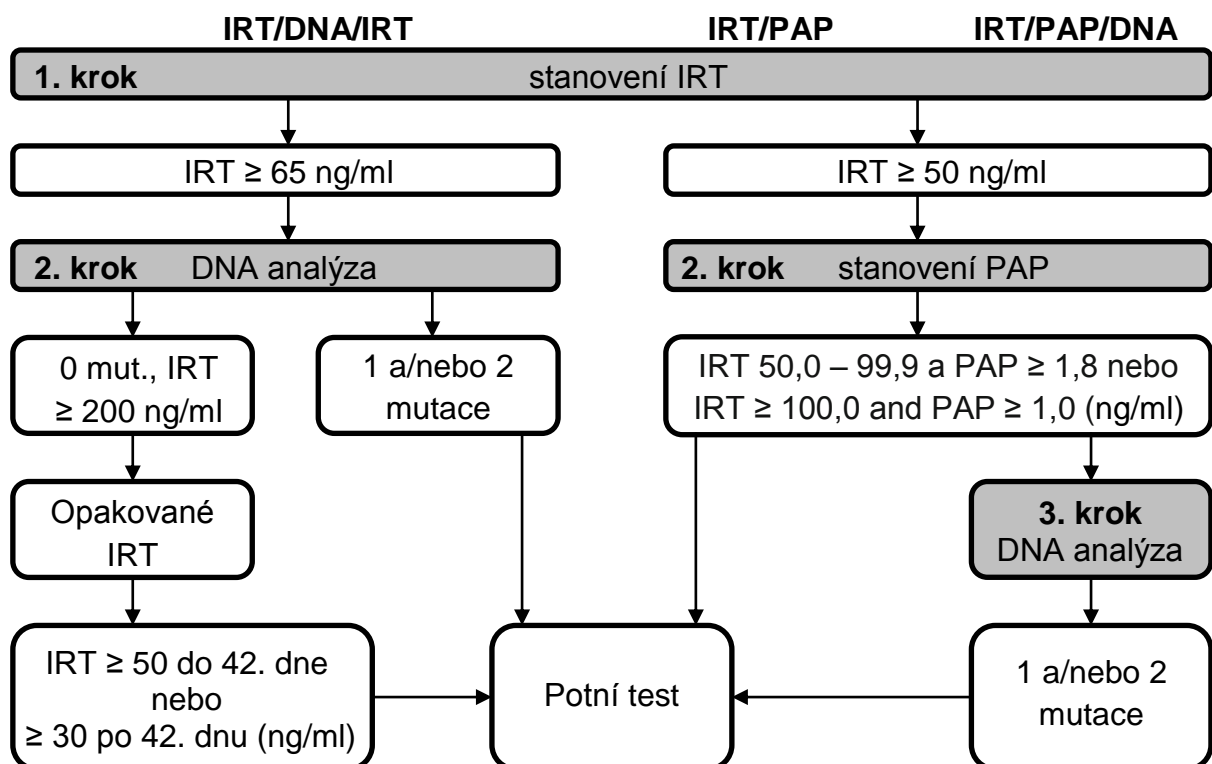
Hlavním cílem našeho projektu proto bylo ověřit hypotézu o výhodnosti screeningových protokolů založených na stanovení PAP ve druhém analytickém stupni. Porovnávali jsme proveditelnost, senzitivitu a specifitu současného celoplošného screeningového protokolu IRT/DNA/IRT a protokolu IRT/PAP na kohortě 106 522 novorozenců narozených v Čechách v době od 17. srpna 2009 do 10. ledna 2011. Design této studie nám dále umožnil posoudit senzitivitu a specifitu

protokolu IRT/PAP/DNA. Schématické znázornění porovnávaných protokolů s použitými cut-off hodnotami je na obrázku č. 5.

Závěr projektu se stal podkladem pro rozhodování o volbě nejvhodnějšího modelu pravidelného celoplošného NSCF v České republice.

Výsledky naší studie jsme publikovali jako původní článek v European Journal of Pediatrics v roce 2012.

Obr. č. 5: Porovnávané protokoly



3.1.2. Výsledky a diskuze

Z celkového počtu 21 pacientů s CF v našem souboru o 106 522 novorozencích zachytil protokol IRT/DNA/IRT 19 pacientů, protokol IRT/PAP 16 pacientů a protokol IRT/PAP/DNA 15 pacientů (Tab. č. 1 v původním článku Krulišová et al., 2012).

Při statistickém zhodnocení [odhad Cohenovo kappa a jeho 95% interval spolehlivosti (CI); pro $p < 0,001$] se schopnost porovnávaných protokolů detekovat CF v naší kohortě statisticky významně neliší. Pro důkaz statistické významnosti je rozdíl v počtu zachycených CF pacientů mezi jednotlivými protokoly velmi malý.

K dosažení statisticky významného rozdílu v počtu zachycených pacientů mezi protokoly IRT/DNA/IRT a IRT/PAP by bylo nutné testovat protokoly na mnohem větších souborech - pro výpočet 95% CI se šířkou 10/100 000 by vyžadovalo testovat protokoly na kohortě čítající alespoň 1 098 650 novorozenců¹.

Tato studie i přes omezení ve velikosti souboru umožnila porovnat základní parametry testovaných protokolů a byla přijata k publikaci v rámci mezinárodního recenzního řízení. Žádná z dosud publikovaných studií netestovala protokoly na kohortě větší než 553 167 novorozenců (Sarles et al., 2014).

3.1.2.1. Protokol IRT/DNA/IRT

Mezi porovnávanými protokoly dosáhl současný celoplošně prováděný protokol IRT/DNA/IRT nejvyšší senzitivity a také přijatelné falešné pozitivivity (Tab. č. 1 v původním článku Krulišová et al., 2012).

Pouze 2 pacienti s CF z celkového počtu 21 pacientů s CF nebyli tímto modelem zachyceni (Pacient 1 a 2; Tab. č. 1). Prvním případem byl pacient s IRT pod stanovenou cut-off hodnotu. Tento pacient byl však diagnostikován časně na základě mekoniového ileu. Nízké hodnoty IRT u novorozenců s mekoniovým ileem jsou v literatuře často popisovány (Sontag et al., 2006). IRT pod stanovenou cut-off hodnotu u novorozenců s CF ať už s mekoniovým ileem nebo bez něho je obecně nejčastější příčinou falešné negativity v rámci NSCF (Baker et al., 2011).

¹ Odhad Cohenova kappa byl proveden pomocí funkce `epi.kappa`. Odhad potřebného rozsahu byl proveden funkcí `power.prop.test` programu R ("The R Project for Statistical Computing").

Druhým případem falešné negativity byl pacient se dvěma vzácnými mutacemi v genu *CFTR*, které nejsou zahrnuty v použitém panelu vyšetřovaných mutací genu *CFTR*. FS, která měla sloužit k odhalení právě těchto případů, nebyla u našeho pacienta úspěšná, protože iniciální IRT bylo 107 ng/ml, tedy pod námi stanovený cut-off pro FS (200 ng/ml). Ani případné snížení cut-off hodnoty např. na 99,9. percentil (143 ng/ml pro naši kohortu), který byl pro FS použit v německé studii (Sommerburg et al., 2010), by nevedlo k zachycení tohoto pacienta a jen by v naší kohortě zvýšilo falešnou pozitivitu. Další případné snižování cut-off hodnoty pro FS ve snaze zachytit tohoto pacienta by vedlo k neakceptovatelně vysoké falešné pozitivitě.

Mezi vyšetřenými novorozenci se zvýšeným IRT jsme zachytili 55 zdravých nosičů jedné mutace v genu *CFTR*, což v naší kohortě představuje frekvenci 1 : 21. V běžné populaci v České republice je frekvence heterozygotů odhadována na 1 : 27 (Houštek and Vávrová, 1969) – 1 : 33 (Votava et al., 2014). Vyšší frekvence zdravých nosičů v populaci novorozenců s elevovaným IRT je v souladu s ostatními publikacemi zabývajícími se touto problematikou (Castellani et al., 2005; Comeau et al., 2004).

Je však nutno zdůraznit, že protokol neodhalí všechny zdravé heterozygoty přítomné ve vyšetřovaném souboru. Při četnosti nosičů 1 : 33 v populaci bychom očekávali mezi 106 522 novorozenci 3 228 zdravých heterozygotů. NSCF tak odhalil pouze 1,7 % zdravých heterozygotů (55/3 228).

Na informaci o znalosti nosičství mutace v genu *CFTR* u novorozence nahlíží rodiče probanda i odborná veřejnost po celém světě rozdílně. Může být chápána jako informace vítaná (Hayeems et al., 2008; Vernooij-van Langen et al., 2013), protože znalost této skutečnosti představuje primární prevenci CF u budoucích potomků probanda a dalších pokrevních příbuzných. Na druhou stranu může být v krajním případě i celoživotní psychickou zátěží (Sommerburg et al., 2010) z obavy z diskriminace ze strany rodiny, společnosti nebo zdravotního či životního pojištění.

V legislativních podmínkách České republiky není rodičům jedinců s normálním výsledkem potního testu (tj. suspektních zdravých heterozygotů) sdělován výsledek molekulárně genetického vyšetření, ale je nabídnuta možnost genetického poradenství z důvodu zvýšeného rizika nosičství mutace v genu *CFTR* v rodině. Genetické poradenství objasní rodinám problematiku dědičnosti autozomálně recesivního onemocnění, čímž dále společně s negativním výsledkem potního testu eliminuje obavu z onemocnění CF u dítěte. Existují studie, které

dokládají prospěšnost genetického poradenství v návaznosti na NSCF (Cavanagh et al., 2010; Tluczek et al., 2006). Ani z vlastní klinické zkušenosti nepovažují detekci heterozygotů za významný problém ve screeningových protokolech založených na DNA analýze genu *CFTR*.

Protokol IRT/DNA/IRT odhalil 2 pacienty s genotypem c.[1521_1523delCTT]+[350G>A;1210-12T[7]] (dle tradiční nomenklatury F508del/R117H-T7) a negativním potním testem. Alela c.350G>A (dle tradiční nomenklatury R117H) v pozici *cis* s alelou c. 1210-12T[7] (dle tradiční nomenklatury IVS8-T7) představuje komplexní alelu c.[350G>A;1210-12T[7]], která patří mezi alely s nejasným klinickým dopadem ("The Clinical and Functional Translation of CFTR, b"). Genotyp c.[1521_1523delCTT]+[350G>A;1210-12T[7]] bývá obvykle spojen s asymptomatickým průběhem (zejm. v dětském věku) nebo mírnými respiračními obtížemi (Thauvin-Robinet et al., 2013, 2009). U mužů může být jediný projev obstrukční azoospermie (J. Yu et al., 2012). Jen velmi vzácně je tento genotyp spojen s klasickým průběhem CF. Oba probandi s genotypem c.[1521_1523delCTT]+[350G>A;1210-12T[7]] tak spadají do kategorie nejasných diagnóz CF, tzv. CF-SPID. Náhodný nález těchto jedinců není cílem NSCF, vede k diagnostickým rozpakům (Parad and Comeau, 2005), znesnadňuje genetické poradenství a u rodičů vyvolává stres vzhledem k nutné dlouhodobé dispenzarizaci dítěte. Poměr odhalených pacientů s nejasnou diagnózou v naší kohortě vůči pacientům s klasickou formou CF (21 pacientů) je 1 : 10,5 což je v souladu se světovými screeningovými programy založenými na DNA analýze (Roussey et al., 2007).

3.1.2.2. Protokol IRT/PAP

Oba pacienti s CF (pacient 1 a 2; Tab. č. 1), kteří nebyli zachyceni celoplošným protokolem IRT/DNA/IRT, byli zachyceni protokolem IRT/PAP. V případě pacienta s mekoniovým ileem (pacient 1; Tab. č. 1) to však nepředstavuje reálnou výhodu.

U protokolu IRT/PAP jsme se setkali s 5 případy falešné negativity (pacienti 3 – 7; Tab. č. 1) z důvodu PAP pod stanovenou cut-off hodnotu. Takto nepřiměřeně vysokou falešnou negativitu považujeme za „diskreditující“ tento model NSCF. Důvodem pozorované falešné negativity může být: a) chyba laboratorního stanovení

PAP, která se po opakovaném měření, projednání a ověření metodiky s výrobcem diagnostické soupravy nepotvrdila, b) nevhodně zvolené cut-off hodnoty (diskutováno dále v této kapitole) a c) nízký PAP je odrazem přirozené biologické variability.

Četnost indikovaných potních testů v modelu IRT/PAP u 260 (0,24%) novorozenců považujeme za nepřiměřenou zátěž novorozenecké populace ve srovnání s počtem indikovaných potních testů u 77 (0,12 %) novorozenců v modelu IRT/DNA/IRT (Tab. č. 1 v původním článku Krulišová et al., 2012). Zvýšení počtu prováděných potních testů představuje i značnou logistickou zátěž pro zdravotní personál.

Problémem protokolu IRT/PAP byla i nižší „úspěšnost“ (78,46 %) skutečné realizace potního testu – v modelu IRT/DNA to bylo 93,51 % a v IRT/PAP/DNA 88,89 % (Tab. č. 1 v původním článku Krulišová et al., 2012). Důvodem mohla být skutečnost, že se jednalo o studii podmíněnou podepsáním informovaného souhlasu rodiči (většinou matky) novorozence. Navíc ve 40 případech byla důvodem morbidita a mortalita novorozenců.

Výhodou IRT/PAP protokolu bylo, že tento protokol neodhalil 2 probandy s nejasnou diagnózou CF, tzv. CF-SPID (genotyp c.[1521_1523delCTT]+[350G>A;1210-12T[7]], negativní potní test). Nespornou výhodou je nižší cena tohoto protokolu oproti protokolům založených na DNA analýze.

Zvýšení senzitivity námi testovaného IRT/PAP protokolu by se dalo dosáhnout použitím FS, jak popisuje německá studie (Sommerburg et al., 2010). Pokud bychom použili cut-off hodnotu pro FS 200 ng/ml (tj. stejná cut-off hodnota jako u IRT/DNA/IRT), nezachytili bychom 3 případy (pacient č. 3, 6, 7; Tab. č. 1) místo pěti. Použití nižší cut-off hodnoty pro FS, např. 143 ng/ml [99,9. Percentil; (Sommerburg et al., 2010)], by vedlo k falešné negativitě u 2 případů (pacient 6 a 7; Tab. č. 1) místo pěti. Vše by však bylo za cenu dalšího navýšení falešné pozitivivity.

Na 34. Evropské konferenci cystické fibrózy v roce 2011 prof. Jacques Sarles prezentoval výsledky francouzské studie se závěrem potřeby snížit původní cut-off hodnoty pro PAP (Sarles, 2011). Tento přístup je pochopitelně spojen s nárůstem falešné pozitivivity, v tomto případě frekvencí provádění potních testů. Při aplikaci navrhaných kritérií: IRT 60,0 – 99,9 a PAP \geq 1,0 nebo IRT \geq 100,0 a PAP \geq 0,3 (vše ng/ml) na naši kohortu bychom dosáhli 100% senzitivity za cenu 0,49 %

pozitivních záchytů (Tab. č. 2), což je vzhledem k vysoké falešné pozitivitě testu neakceptovatelné.

Pokud bychom použili model navržený Dr. Marinou Stopsack s cut-off hodnotou pro IRT ≥ 60 ng/ml, kde součin IRT x PAP ≥ 75 (Stopsack, 2011), tak bychom v naší kohortě sice dosáhli 100% senzitivity, ale frekvence pozitivních nálezů v modelu IRT/PAP by vzrostla na 0,41 % (Tab. č. 2), což je rovněž vzhledem k vysoké falešné pozitivitě neakceptovatelné.

3.1.2.3. Protokol IRT/PAP/DNA

Protokol IRT/PAP/DNA kromě 5 případů s nízkým PAP nezachytil navíc pacienta se dvěma vzácnými mutacemi (pacient 2; Tab. č. 1). Celkem se 6 případy FN tak dosáhl nejnižší senzitivity a je s těmito cut-off hodnotami pro celoplošný NSCF nevhodný. Na druhou stranu dosáhl velmi nízké falešné pozitivivity 0,01 % (Tab. č. 1 v původním článku Krulišová et al., 2012). Pro daný typ protokolu je falešná pozitivita dána počtem zdravých heterozygotů. V absolutních hodnotách jde o 12 heterozygotů s prevalencí 1 : 22 v našem souboru. Za výhodu IRT/PAP/DNA protokolu při použitých cut-off hodnotách pro IRT a PAP můžeme považovat fakt, že nebyl odhalen žádný jedinec s označením CF-SPID.

Pokud bychom pro protokol IRT/PAP/DNA použili modifikované cut-off hodnoty pro IRT a PAP dle prof. Sarlese (Sarles, 2011) a dle Dr. Stopsack (Stopsack, 2011), dosáhli bychom u obou protokolů senzitivity 95,24 % (Tab. č. 2; pouze pacient 2 se vzácnými mutacemi genu *CFTR* by nebyl zachycen, Tab. č. 1) za cenu nízké falešné pozitivivity. Nevýhodou při těchto cut-off hodnotách je zachycení obou případů s CF-SPID.

Výhodou IRT/PAP/DNA protokolu oproti IRT/DNA/IRT jsou navíc nižší finanční náklady vyplývající z nižšího počtu prováděných DNA analýz. Současný celoplošný protokol IRT/DNA/IRT je nastaven tak, aby DNA analýza byla prováděna u cca 1 % novorozenců (cut-off hodnota pro IRT je nastavena na 99. percentil), u IRT/PAP/DNA protokolu by se dle použitých cut-off hodnot DNA analýza prováděla u 0,49 % (Sarles, 2011) nebo 0,41 % novorozenců (Stopsack, 2011) (Tab. č. 2). Vyčíslení finančních nákladů pro IRT/PAP/DNA protokol při provádění DNA analýz u 0,41 % novorozenců shrnuje tabulka č. 3. Rovněž detekce nižšího počtu heterozygotů a tím nižší počet poskytnutých genetických konzultací a provedených molekulárně

genetických vyšetření u příbuzných dále nepřímo redukuje náklady na prováděný NSCF.

Tab. č. 1: Případy falešné negativy v porovnávaných protokolech

Cut-off hodnoty použité v naší studii (Krulišová et al., 2012)			
	Protokol	Příčina (IRT, PAP v ng/ml)	Genotyp (nomenklatura dle Berwouts et al., 2011)
Pacient 1	IRT/DNA/IRT	Nízké IRT IRT 62,2; PAP 5,39	p.[Phe508del]+[Phe508del]
Pacient 2	IRT/DNA/IRT, IRT/PAP/DNA	Vzácné mutace IRT 107; PAP 2,37	p.[Gln552X]+[Leu1376SerfsX8]
Pacient 3	IRT/PAP	Nízký PAP IRT 174; PAP 0,93	p.[Phe508del]+[Phe508del]
Pacient 4	IRT/PAP	Nízký PAP IRT 337; PAP 0,49	p.[Phe508del]+[Phe508del]
Pacient 5	IRT/PAP	Nízký PAP IRT 203; PAP 0,42	p.[Phe508del]+[Phe508del]
Pacient 6	IRT/PAP	Nízký PAP IRT 115; PAP 0,67	p.[Phe508del]+[Ile507del]
Pacient 7	IRT/PAP	Nízký PAP IRT 87,8; PAP 1,43	p.[Gly542X]+[Glu1104Lys]
Modifikované cut-off hodnoty pro IRT a PAP (Sarles, 2011; Stopsack, 2011)			
Pacient 2	IRT/PAP/DNA	Vzácné mutace IRT 107; PAP 2,37	p.[Gln552X]+[Leu1376SerfsX8]

Tab. č. 2: Výsledky protokolů s modifikovanými cut-off hodnotami pro IRT a PAP

Screenování novorozenci	106 522			
CF pacienti	21			
Prevalence	1 : 5 072			
Typ protokolu	IRT/PAP (Sarles, 2011) (IRT 60,0 – 99,9 a PAP ≥ 1.0 nebo IRT ≥ 100,0 a PAP ≥ 0,3; vše ng/ml)	IRT/PAP/DNA (Sarles, 2011) (IRT 60,0 – 99,9 a PAP ≥ 1.0 nebo IRT ≥ 100,0 a PAP ≥ 0,3; vše ng/ml)	IRT/PAP (Stopsack, 2011) (IRT ≥ 60 ng/ml; IRT×PAP ≥ 75)	IRT/PAP/DNA (Stopsack, 2011) (IRT ≥ 60 ng/ml; IRT×PAP ≥ 75)
IRT pozitivita	1 577 (1,48%)	1 577 (1,48%)	1 577 (1,48%)	1 577 (1,48%)
PAP pozitivita	517 (0,49 %)	517 (0,49 %) (tj. počet DNA analýz)	436 (0,41 %)	436 (0,41 %) (tj. počet DNA analýz)
Pozitivní NSCF	517 (0,49 %)	*≥41 (0,04 %)	436 (0,41 %)	*≥39 (0,04 %)
CF pacienti	21	20	21	20
Nejasná diagnóza CF (CF-SPID)	0	2	0	2
Falešná pozitivita	496 (0,47 %)	≥ 21 (0,02 %)	415 (0,39 %)	≥ 19 (0,02 %)
Negativní NSCF	106 005	*-	106 086	*-
Skutečná negativita	106 005	*-	106 086	*-
Falešná negativita	0	1	0	1
Nejasná diagnóza CF (CF-SPID)	2	0	2	0
Senzitivita	1,0000	0,9524	1,0000	0,9524
Specificita	0,9953	*-	0,9961	*-
PPV	0,0406	*-	0,0481	*-

Legenda: * Vzhledem k rozdílným cut-off hodnotám pro IRT a PAP oproti protokolům v původní studii se nemůžeme přesně vyjádřit k falešné pozitivitě, tj. počtu heterozygotů, a odvozeným parametrům. Soubor novorozenců, u kterého byla provedena DNA analýza v původní studii, není úplně totožný se souborem novorozenců, u kterého by měla být DNA analýza provedena po změně cut-off (v původní studii nebyla DNA analýza provedena u novorozenců s kritérii IRT 60,0 – 64,9 a PAP 1,0 – 1,8; vše ng/ml). Dá se předpokládat, že počet heterozygotů je vyšší řádově maximálně jen o pár jednotek, než ukazuje tabulka č. 2.

Pozn.

1) Pojmem „prevalence“ zde rozumíme počet vyšetřených novorozenců na odhalení jednoho novorozence s CF.

2) Tabulka vychází z dat získaných aplikací obměněných cut-off hodnot pro IRT a PAP na původně vyšetřenou kohortu 106 522 novorozenců - tzn. nejsou zohledněni probandí, kteří se k provedení potního testu nedostavili z nejrůznějších důvodů.

Tabulka č. 3: Srovnání finančních nákladů na IRT/DNA/IRT a IRT/PAP/DNA protokol

	Náklady na 1 vyšetření (Kč)	Náklady na 100 000 vyšetření (Kč)	
		IRT/DNA/IRT (IRT ≥ 65 ng/ml) (Krulišová et al., 2012)	IRT/PAP/DNA (IRT ≥ 60 ng/ml) IRT×PAP ≥ 75 (Stopsack, 2011)
Odběr, kartička, poštovné	5	500 000	500 000
IRT	110	11 000 000	11 000 000
PAP	360	-	540 000
DNA	11 000	11 000 000	4 850 000
Celkem	-	22 500 000	16 890 000
Odhalení 1 pacienta s CF (1 : 5 072)	-	1 150 000	860 000

3.1.3. Závěr

Paralelní srovnání porovnávaných modelů NSCF v naší studii ukázalo, že screeningové schéma IRT/PAP dle originálních cut-off hodnot pro IRT a PAP (Sarles et al., 2005) má vysokou falešnou negativitu a neakceptabilně vysoký počet indikovaných potních testů, a je proto nevhodné k celoplošnému zavedení.

K dosažení vyšší senzitivity by bylo nutné snížení cut-off hodnot pro PAP nebo zavedení FS, jak dokládají i další práce (Sarles et al., 2014; Sommerburg et al., 2014). Vyšší senzitivita je však dosažena za cenu dalšího navýšení falešné pozitivivity.

Model IRT/PAP/DNA za předpokladu upravení cut-off hodnot pro IRT a PAP nabízí dosažení vyšší senzitivity a možnost snížení počtu prováděných molekulárně genetických analýz na cca jednu polovinu vedoucí k nižší falešné pozitivitě a nižším finančním nákladům. Falešnou pozitivitu v podobě zdravých heterozygotů nepovažujeme za významný problém. Nevýhodou protokolu nicméně zůstává, že stejně jako schéma IRT/DNA/IRT vede k odhalení probandů s CF-SPID. Vzhledem k nízkému počtu těchto nejasných případů 1 : 10 (2 probandi s CF-SPID připadající na 20 pacientů s klasickou CF, Tab. č. 2), to rovněž nepovažujeme za zásadně limitující faktor.

Na základě výsledků naší studie nedoporučujeme změnu současného screeningového protokolu IRT/DNA/IRT na model IRT/PAP. Doporučujeme však změnu protokolu IRT/DNA/IRT na schema IRT/PAP/DNA s modifikovanými cut-off hodnotami pro IRT a PAP.

Následující publikace se zabývá problematikou uvedenou v bodě 2 mezi stanovenými cíli této dizertační práce (viz kapitola 2.).

3.2. Sommerburg, O., **Krulisova, V.**, Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., Happich, M., Kulozik, A.E., Votava, F., Balascakova, M., Skalicka, V., Stopsack, M., Gahr, M., Macek, M., Jr, Mall, M.A., Hoffmann, G.F., 2014. **Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations.** J. Cyst. Fibros. 13, 15-23. **IF 2,873**

Original Article

Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations

Olaf Sommerburg^{a,b,*}, Veronika Krulisova^c, Jutta Hammermann^d, Martin Lindner^e,
Mirjam Stahl^{a,b}, Martina Muckenthaler^{a,b}, Dirk Kohlmüller^e, Margit Happich^a,
Andreas E. Kulozik^a, Felix Votava^f, Miroslava Balascakova^c, Veronika Skalicka^g,
Marina Stopsack^h, Manfred Gahr^d, Milan Macek Jr.^c,
Marcus A. Mall^{a,b,i,1}, Georg F. Hoffmann^{b,e,1}

^a Division of Paediatric Pulmonology & Allergy and Cystic Fibrosis Center, Department of Paediatrics III, Children's Hospital, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 430, D-69120 Heidelberg, Germany

^b Translational Lung Research Centre Heidelberg (TLRC), Member of the German Center for Lung Research (DZL), Im Neuenheimer Feld 350, D-69120 Heidelberg, Germany

^c Department of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol and 2nd Faculty of Medicine, Charles University, V Uvalu 84, Prague 5, CZ 150 06, Czech Republic

^d Pediatric Department, University Hospital of Dresden, Fetscherstr. 74, D-01307 Dresden, Germany

^e Division of Metabolic Diseases and Newborn Screening Center, Department of Paediatrics I, Children's Hospital, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 430, D-69120 Heidelberg, Germany

^f Department of Pediatrics, University Hospital Kralovske Vinohrady and 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Srobarova 50, Prague 10, CZ 100 34, Czech Republic

^g Department of Pediatrics, University Hospital Motol and 2nd Faculty of Medicine, Charles University, V Uvalu 84, Prague 5, CZ 150 06, Czech Republic

^h Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Hospital of Dresden, Fetscherstr. 74, D-01307 Dresden, Germany

ⁱ Department of Translational Pulmonology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 350, D-69120 Heidelberg, Germany

Received 1 December 2012; received in revised form 10 June 2013; accepted 19 June 2013

Available online 25 July 2013

Abstract

Background: In recent years different IRT/PAP protocols have been evaluated, but the individual performance remains unclear. To optimize the IRT/PAP strategy we compared protocols from three regional CF newborn screening centers (Heidelberg, Dresden, and Prague).

Methods: We evaluated the effect of elevating the IRT-cut-off from 50 to 65 µg/l (~97.5th to ~99.0th percentile), the need of a failsafe protocol (FS, IRT ≥ 99.9th percentile) and the relative performance using either two IRT-dependent PAP-cut-offs or one PAP-cut-off.

Findings: Elevation of the IRT cut-off to 65 µg/l (~99.0th percentile) increased the PPV significantly (Dresden: 0.065 vs. 0.080, $p < 0.0001$, Prague: 0.052 vs. 0.074, $p < 0.0001$) without reducing sensitivity. All three IRT/PAP protocols showed a trend towards a higher sensitivity with FS than without and when using one PAP-cut-off instead of two IRT-dependent PAP-cut-offs.

Conclusions: For best performance we suggest an IRT/PAP protocol with an IRT-cut-off close to the 99.0th percentile, FS, and a single PAP-cut-off.

© 2013 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cystic fibrosis; Newborn screening; Biochemical screening; Pancreatitis associated protein; Immunoreactive trypsinogen

Abbreviations: CF, cystic fibrosis; CFNBS, cystic fibrosis newborn screening; DBS, dried blot spot; FS, failsafe strategy; IRT, immunoreactive trypsinogen; NBS, newborn screening; MI, meconium ileus; PAP, pancreatitis associated protein; PS, pancreatic sufficient; PI, pancreatic insufficient

* Corresponding author at: Division of Paediatric Pulmonology & Allergy and Cystic Fibrosis Center, Department of Pediatrics III, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 430, D-69120 Heidelberg, Germany. Tel.: +49 6221 5638790; fax: +49 6221 5633810.

E-mail address: olaf.sommerburg@med.uni-heidelberg.de (O. Sommerburg).

¹ These authors contributed equally as senior authors.

1. Introduction

Agreement on the benefits of newborn screening (NBS) for cystic fibrosis (CF) [1] led to widespread implementation of CF screening programs [2,3]. Most protocols rely on a combination of IRT quantitation and genetic analysis [4], with a *CFTR* mutation panel adapted to the respective population. Since previous studies demonstrated that IRT/DNA protocols achieve good sensitivity and specificity (e.g. [5]) this strategy is currently used in most countries. However, often discussed concerns against genetic CFNBS including detection of heterozygotes and clinically equivocal forms, legislative and ethical issues as well as ethnic diversity [6], led to the development of alternative biochemical protocols that can bypass *CFTR* mutation analysis using IRT in combination with pancreatitis associated protein (PAP) as second tier analysis [7].

During the past years, different IRT/PAP protocols were tested [7–10]. Beside the original protocol of Sarles et al. [7] with two IRT-dependent cut-offs, an alternative IRT/PAP method was evaluated at the Heidelberg CFNBS center with only one PAP cut-off based on the assumption that two IRT-dependent PAP cut-offs may have limitations in sensitivity [8]. Further, a third protocol was developed in The Netherlands, in which the original

IRT/PAP protocol [7] was combined with genetic analysis as third tier [9].

The present retrospective study addressed several questions important for further optimization of the IRT/PAP screening strategy when used as an exclusive, biochemical protocol without genetic testing, as well as a combined testing with genetic analysis as third tier. We used the results from three regional CFNBS programs carried out in ethnically differing central European populations and using varying IRT/PAP protocols (Fig. 1). The combined evaluation of these data provided the opportunity of a retrospective analysis of the different IRT/PAP protocols to draw important conclusions on how to improve the IRT/PAP method. Specifically, we addressed the questions 1) if it is possible to elevate the IRT cut-off above 50.0 $\mu\text{g/l}$ to achieve a higher specificity; 2) if an IRT/PAP protocol benefits from a failsafe strategy (FS); and 3) whether an IRT/PAP protocol with one PAP cut-off level achieves higher sensitivity than a protocol with two IRT-dependent PAP-cut-offs.

2. Methods

The CFNBS centers in Heidelberg, Dresden (Germany) and Prague (Czech Republic) conducted individual studies evaluating

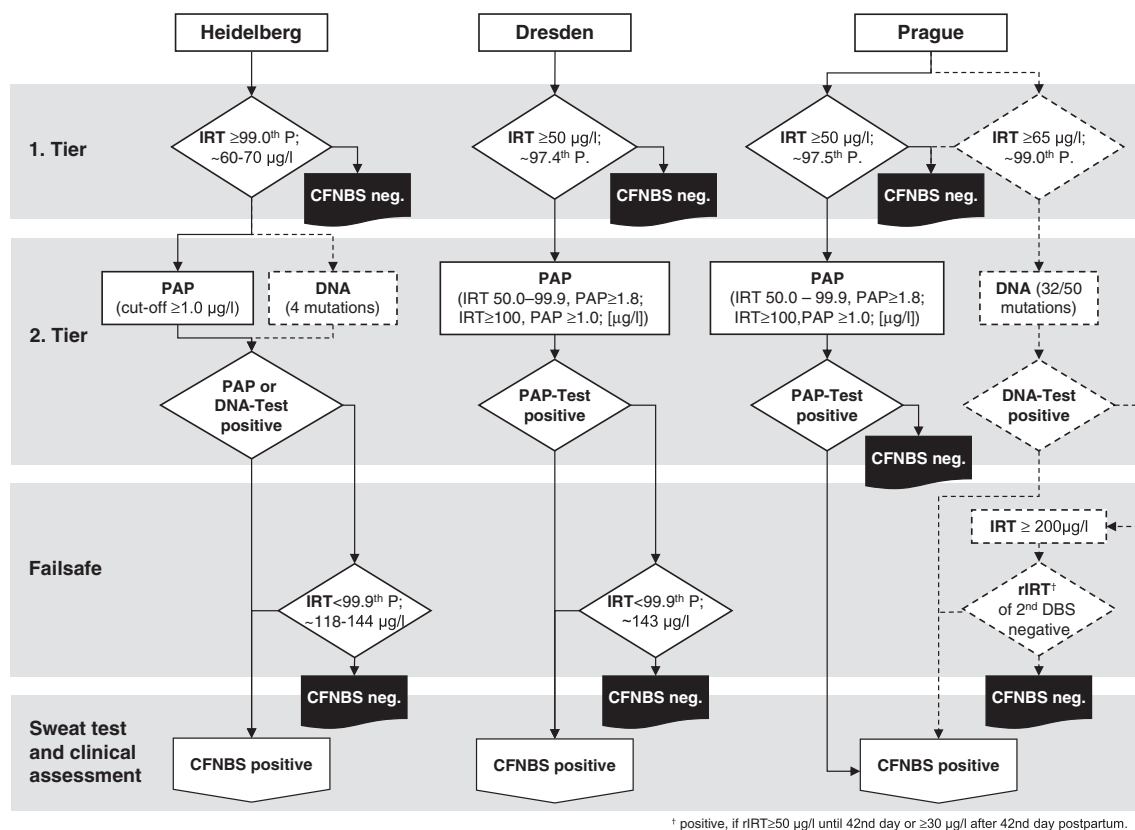


Fig. 1. Overview over the different CF newborn screening protocols originally used in the CF screening centers in Heidelberg, Dresden, and Prague. To assess the quality of the IRT/PAP protocol a DNA testing was implemented as second tier in addition to PAP analysis in Heidelberg (dotted lines). In Prague the nationwide Czech CFNBS using an IRT/DNA/IRT protocol served as quality control (dotted lines). The number of tested *CFTR* mutations is given in parenthesis for both centers (in Prague number of tested *CFTR* mutations was changed during the time of the study). In Heidelberg and Dresden the IRT/PAP protocol contained a failsafe strategy (CFNBS positive, if IRT $\geq 99.9^{\text{th}}$ percentile [IRT-cut-off $\sim 118\text{--}144 \mu\text{g/l}$ in Heidelberg and $143 \mu\text{g/l}$ in Dresden]). In Prague only the IRT/DNA protocol run in parallel contained a failsafe strategy (repeated IRT of 2nd dried blood spot, if first IRT was $\geq 200 \mu\text{g/l}$; $\sim 99.9^{\text{th}}$ percentile). Abbreviations: CFNBS — cystic fibrosis newborn screening; P — percentile; neg. — negative; DBS — dried blood spot; rIRT — repeated IRT.

locally used IRT/PAP protocols. All three regional studies were performed prospectively and were initially assessed individually [8,10,11]. For this study the data were shared among the centers.

2.1. Population

The presented data were obtained from April 2008 to August 2011 in the NBS center Heidelberg (~44,000 newborns p.a.), from February 2008 to December 2010 in the NBS center Dresden (~15,000 newborns p.a.), and from August 2009 to January 2011 in the NBS center of Prague (~70,000 newborns p.a.). All original study protocols were approved by local ethics committees and/or local authorities and informed consent was provided by the parents. More information regarding the coverage of the programs and the legislation of informed consent in the different countries is given in the online supplement.

2.2. Test protocols

The methods of the individual IRT/PAP protocols used in Heidelberg and Prague are described elsewhere [8,10]. Details of all three IRT/PAP protocols are given in Fig. 1 and in more detail in the online supplement. Only the main differences between the protocols are described here.

IRT was used as first tier in all CFNBS centers (Heidelberg: floating IRT-cut-off ≥ 99.0 th percentile, ~60–70 $\mu\text{g/l}$; Dresden and Prague: ≥ 50 $\mu\text{g/l}$, ~97.5th percentile, respectively). In Dresden and Prague positive rating of PAP as second tier was depended on two different PAP cut-offs (PAP ≥ 1.8 $\mu\text{g/l}$ if IRT 50.0–99.9 $\mu\text{g/l}$, and PAP ≥ 1.0 $\mu\text{g/l}$ if IRT ≥ 100 $\mu\text{g/l}$) [7]. In Heidelberg a protocol with one PAP cut-off (IRT ≥ 99.0 th percentile, PAP ≥ 1.0 $\mu\text{g/l}$) was used [8].

In Heidelberg and Dresden, an additional failsafe strategy (FS) was added to the IRT/PAP protocol. According to that CFNBS was also rated positive if IRT was ≥ 99.9 th percentile regardless of the second tier test results (IRT/PAP-FS).

The centers in Heidelberg and Prague compared their IRT/PAP results internally to an IRT/DNA protocol run in parallel (Table S1 and details in online supplement). In Dresden there was no independent assessment of the quality of the IRT/PAP results. However, until July 2012 there were no reports of CF patients diagnosed clinically during and after the study period missed by the IRT/PAP-FS protocol used in Dresden.

2.3. Medical evaluation

CFNBS in the original studies was considered positive, if IRT was elevated and either PAP testing reached the individual cut-offs described above (Heidelberg, Dresden, Prague), one or two *CFTR* mutations were identified (Heidelberg, Prague), or IRT concentration was ≥ 99.9 th percentile (FS for Dresden 138 $\mu\text{g/l}$, for Heidelberg floating from 118 to 144 $\mu\text{g/l}$). In case of a positive rated CFNBS, the parents of the newborn were contacted and referred to a local CF center for sweat chloride (Cl^-) testing and clinical assessment. Sweat tests in all local CF centers were performed according to the Gibson-Cooke Quantitative Pilocarpin Iontophoresis according to international

guidelines [12,13] either with the original filter pad collection method (Czech Republic) or with the Macroduct® collection method (Germany). Cl^- concentrations ≥ 60 mmol/l in two independent samples were considered diagnostic of CF, Cl^- concentrations between 30 and 60 mmol/l were considered borderline and led to an extended work up including extended genetic testing and/or functional evaluation of *CFTR*-mediated Cl^- secretion using intestinal current measurements, as previously described [14–16]. In Dresden nearly all CFNBS positive rated newborns were seen in the CF center Dresden for medical evaluation. In Heidelberg about 10% and in Prague about 21% [10] of the parents of CFNBS positive rated newborns refused sweat testing and further medical evaluation.

2.4. Retrospective analysis

To address the question whether the IRT-cut-off can be elevated to increase specificity, raw data from Dresden and Prague were reanalyzed as if the IRT-cut-off had been either 50 $\mu\text{g/l}$ (~97.5th percentile), 60 $\mu\text{g/l}$ (~98.5th percentile), or 65 $\mu\text{g/l}$ (~99.0th percentile). The obtained results were compared to the original findings. Since in Heidelberg a floating IRT-cut-off of ≥ 99.0 th percentile (60–70 $\mu\text{g/l}$) was used from the beginning of the study, no data obtained with lower IRT-cut-offs were available which could be used for a similar analysis.

For the question on the necessity of an FS protocol data from Prague were analyzed as if they would have used an FS protocol in their IRT/PAP protocol as done in Heidelberg and Dresden. The FS IRT-cut-off of the 99.9th percentile for Prague was calculated to be 143 $\mu\text{g/l}$. In turn, raw data from Heidelberg and Dresden were analyzed, as if these centers would not have used a FS protocol, and the results were compared to those of the original study. The results of the different scenarios were compared and statistically analyzed.

To answer the question whether an IRT/PAP protocol performs better with two IRT-dependent PAP cut-offs according to Sarles et al. [7], or one PAP cut-off according to Sommerburg et al. [8] raw data from Heidelberg were reanalyzed as if two IRT-dependent PAP-cut-offs were used. Raw data from Dresden and Prague were reanalyzed in two ways: First, for an optimized protocol with two IRT-dependent PAP-cut-offs (PAP ≥ 1.8 $\mu\text{g/l}$ if IRT 60.0–99.9 $\mu\text{g/l}$, and PAP ≥ 1.0 $\mu\text{g/l}$ if IRT ≥ 100 $\mu\text{g/l}$) and second, for a protocol similar to the one used in Heidelberg [8] with one PAP cut-off (IRT ≥ 60 $\mu\text{g/l}$, PAP ≥ 1.0 $\mu\text{g/l}$). Thereafter, the results of both protocols were compared for each of the three cohorts.

2.5. Statistical analysis

The data of the CFNBS cohorts were collected in a Microsoft Access 2010 database (Heidelberg), in the newborn screening program LD NGS (Dresden), or Microsoft Excel 2010 (Prague). To evaluate the performance of the different protocols statistical analysis was performed only for patients with an expected typical course of CF disease. CF patients with meconium ileus (MI) were not included into statistical analysis since they are expected to be diagnosed immediately after birth. Furthermore, newborns with

equivocal CF diagnosis were also excluded from statistical analysis since they are not the target of NBS [3,17]. Performances of the different protocols were compared using exact binomial test. *p*-values of <0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed with Microsoft Excel 2010, and the actual free “R” software package “DTComPair” [18].

3. Results

Altogether 325,917 newborns were screened for CF in the three CFNBS centers participating in this study. Fig. S1 in the online supplement provides an overview over the results of the CFNBS protocols used in the individual studies.

3.1. IRT cut-off in an IRT/PAP protocol

An increase in the IRT-cut-off from 50 µg/l (~97.5th percentile) to either 60 µg/l (~98.5th percentile) or 65 µg/l (~99.0th percentile) in the cohorts of Dresden and Prague

resulted in a substantial decrease of false-positive tested newborns leading to a significant increase of specificity as well as the positive predictive value (PPV, Table 1). The sensitivity did not change in either of the cohorts. Up to an IRT cut-off of 65 µg/l (~99.0th percentile), no CF patient would have been missed in Dresden. In the cohort of Prague, up to an IRT cut-off of 60 µg/l (~98.5th percentile), all CF patients would have been detected. When using an IRT-cut-off of 65 µg/l (~99.0th percentile) one CF patient with MI would have been missed in the Prague cohort, however, this CF patient was diagnosed clinically.

3.2. Evaluation of the necessity of a failsafe protocol in an IRT/PAP protocol

The results of the retrospective analysis of the effects of a FS protocol are summarized in Table 2. Considering only CF patients without MI, sensitivity of the original IRT/PAP protocol without FS used in Prague was 74%. After reanalyzing the data for an IRT/PAP-FS protocol, sensitivity increased to 90% (*p* = 0.999).

Table 1
Comparison of IRT/PAP-FS protocols with two IRT-dependent PAP cut-offs differing in the IRT cut-off as first tier of the protocol: 50 µg/l, 60.0 µg/l, or 65 µg/l. The data given represent the results of a retrospective analysis using raw data of the cohorts of Dresden and Prague. All CF patients with MI and all newborns with equivocal diagnosis of CF are presented in the table but were excluded from statistical calculations. Marked results are statistically significant compared to the protocol with an IRT-cut-off of 50 µg/l in the same cohort: **p* < 0.001; ***p* < 0.0001.

Cohort	Dresden		Prague				
Newborns screened	56,326		106,522				
Newborns with 2 mutations in the <i>CFTR</i> gene detected during and after the original study	10		23				
Screening protocol (IRT [µg/l], PAP [µg/l])	Originally used protocol	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 50.0–99.9 µg/l, PAP ≥ 1.8 µg/l, IRT ≥ 100 µg/l, PAP ≥ 1.0 µg/l)	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 60.0–99.9 µg/l, PAP ≥ 1.8 µg/l, IRT ≥ 100 µg/l, PAP ≥ 1.0 µg/l)	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 65.0–99.9 µg/l, PAP ≥ 1.8 µg/l, IRT ≥ 100 µg/l, PAP ≥ 1.0 µg/l)	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 50.0–99.9 µg/l, PAP ≥ 1.8 µg/l, IRT ≥ 100 µg/l, PAP ≥ 1.0 µg/l)	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 60.0–99.9 µg/l, PAP ≥ 1.8 µg/l, IRT ≥ 100 µg/l, PAP ≥ 1.0 µg/l)	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 65.0–99.9 µg/l, PAP ≥ 1.8 µg/l, IRT ≥ 100 µg/l, PAP ≥ 1.0 µg/l)
Test positive (TP)	107 (0.19%)	92 (0.16%)	87 (0.15%)	325 (0.30%)	257 (0.24%)	230 (0.22%)	
Detected CF w/o MI	7	7	7	17	17	17	
Detected CF with MI ^a	1	1	1	2	2	1	
Positive, equivocal diagnosis ^a	1	1	1	1	1	1	
False positive	100	85	80	308	240	213	
Test negative	56,219	56,234	56,239	106,197	106,265	106,292	
True negative	56,219	56,234	56,239	106,195	106,263	106,290	
False negative, CF w/o MI	0	0	0	2	2	2	
False negative, CF with MI ^a	1	1	1	0	0	1	
Negative, equivocal diagnosis ^a	0	0	0	1	1	1	
Sensitivity, % (95% CI)	1.000 (1.000–1.000)	1.000 (0.676–1.000)	1.000 (0.676–1.000)	0.895 (0.757–1.033)	0.895 (0.757–1.033)	0.895 (0.757–1.033)	
Specificity, % (95% CI)	0.9982 (0.9982–0.9992)	0.9985* (0.9985–0.9985)	0.9986** (0.9986–0.9986)	0.9971 (0.9971–0.9971)	0.9977** (0.9977–0.9978)	0.9980** (0.9979–0.9980)	
PPV, % (95% CI)	0.0654 (0.0186–0.1128)	0.0761** (0.0219–0.1302)	0.0804** (0.0233–0.1376)	0.0523 (0.0281–0.0765)	0.0661** (0.0357–0.0965)	0.0739** (0.0401–0.1077)	

^a These newborns were excluded from statistical analysis.

Table 2
 Comparison of PAP-based CF NBS protocols with or without a failsafe strategy. For this analysis a FS strategy was applied using an IRT cut-off \geq 99.9th percentile. Statistical analysis was performed only with CF patients without meconium ileus (MI). All CF patients with MI and all newborns with equivocal diagnose of CF are presented in the table but were excluded from statistical calculations. Marked results are statistically significant compared to the protocol without an FS strategy in the same cohort: **p < 0.0001.

Cohort	Heidelberg	Dresden	Prague
Newborns screened	163,069	56,326	106,522
Newborns with 2 mutations in the <i>CFTR</i> gene detected during and after the original study	34	10	23
Screening protocol	Retrospective analysis w/o FS IRT/PAP (IRT \geq 99.0 P., PAP \geq 1.0 μ g/l)	Retrospective analysis w/o FS IRT/PAP (IRT 50.0–99.9 μ g/l, PAP \geq 1.8 μ g/l/IRT \geq 100 μ g/l, PAP \geq 1.0 μ g/l)	Originally used protocol w/o FS IRT/PAP (IRT 50.0–99.9 μ g/l, PAP \geq 1.8 μ g/l/IRT \geq 100 μ g/l, PAP \geq 1.0 μ g/l)
<i>Test positive</i>	245 (0.15%)	99 (0.18%)	260 (0.24%)
Detected CF w/o MI	21	6	14
Detected CF with MI ^a	7	1	2
Positive, equivocal diagnosis ^a	0	1	1
False positive	224	93	246
<i>Test negative</i>	162,824	56,227	106,262
True negative	162,820	56,226	106,257
False negative, CF w/o MI	4 ^b	1	5
False negative, CF with MI ^a	0	1	0
Negative, equivocal diagnosis ^a	2	0	1
<i>Sensitivity, % (95% CI)</i>	0.840 (0.696–0.984)	0.857 (0.598–1.116)	0.737 (0.539–0.935)
<i>Specificity (95% CI)</i>	0.9986 (0.9986–0.9987)	0.9983 (0.9983–0.9984)	0.9977 (0.9976–0.9977)
<i>PPV</i>	0.0857 (0.0507–0.1207)	0.0801 (0.0487–0.1116)	0.0538 (0.0264–0.0812)

^a These newborns were excluded from statistical analysis.

^b One of these patients was not diagnosed because of low initial IRT (36 μ g/l).

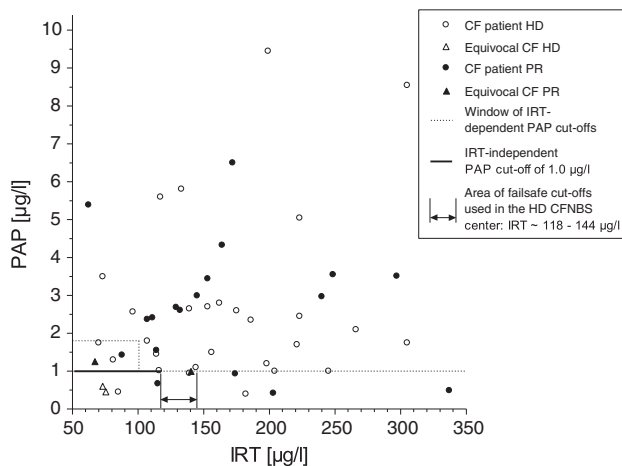


Fig. 2. Newborns with CF-related mutations in the *CFTR* gene detected in the cohorts from Heidelberg and Prague by the IRT/PAP and IRT/DNA protocols used. Summary of the performance of an IRT/PAP protocol with one PAP cut-off of 1.0 µg/l and an IRT/PAP protocol with two IRT-dependent cut-offs (IRT 50.0–99.9 µg/l, PAP ≥ 1.8 µg/l; IRT ≥ 100 µg/l, PAP ≥ 1.0 µg/l). Abbreviations: HD — Heidelberg, PR — Prague.

Of note, 3 of the 5 CF patients initially not detected by the original IRT/PAP protocol [10] would have been identified, if a FS had been applied. The retrospective analysis performed with raw data from Heidelberg and Dresden confirmed that sensitivity calculated for detected CF patients drops from 92% to 84% ($p = 0.999$) and from 100% to 86% ($p = 0.999$), respectively, if an IRT/PAP protocol without FS is used. None of these results reached statistical significance; however, there was a general trend towards a higher sensitivity, when a FS protocol was used. Apart from that using a FS protocol led to a slightly lower specificity. These changes were statistically significant ($p < 0.0001$) for the cohorts of Heidelberg and Prague, respectively.

3.3. Performance of IRT/PAP protocols using either two IRT-dependent PAP-cut-offs or one PAP cut-off

IRT and PAP values of all newborns with two *CFTR* mutations diagnosed in Heidelberg and Prague with respect to the PAP cut-off levels of the individual IRT/PAP protocols are shown in Fig. 2. If an IRT/PAP-FS protocol with two IRT-dependent PAP cut-offs had been used in the centers of Heidelberg and Prague eight newborns with two *CFTR* mutations had not been detected. Three out of these had normal sweat tests (HD-10, HD-13, PR-19) and were considered as newborns with equivocal CF diagnosis. Two out of the remaining five had MI (HD-15, HD-18) and were diagnosed clinically after birth. The remaining three newborns missed had CF (HD-29, PR-16, PR-21). In contrast, if an IRT/PAP-FS protocol with one PAP cut-off [8] had been applied only four newborns with two *CFTR* mutations had not been found. Two out of these had a normal sweat chloride (HD-15, HD-18), but the remaining two (HD-29, PR-16) had CF. To follow individual newborns, we refer to the Tables S2, S3, and S4 in the online supplement providing an overview over all newborns

with two *CFTR* mutations diagnosed in the three CFNBS centers.

Table 3 shows the results of the retrospective analysis of both an optimized IRT/PAP-FS protocol with two IRT-dependent PAP cut-offs and of the IRT/PAP-FS protocol with one PAP cut-off. In the cohorts of Heidelberg and Dresden, no differences in sensitivity is seen using either of the protocols. However, in the cohort of Prague, one CF patient was missed with the IRT/PAP-FS protocol with two IRT-dependent PAP-cut-offs, but was found with the protocol with one PAP-cut-off. This led to a trend towards higher sensitivity in favor of the latter protocol (90% vs. 95%), but this change was statistically not significant ($p = 0.999$). In all three cohorts, the number of false positives was higher when using one PAP cut-off resulting in a significant decrease of specificity and of positive predictive value (Table 3).

4. Discussion

By evaluating three different IRT/PAP protocols, this study addressed several important questions relevant for further improvement of a PAP based CFNBS.

First, we asked whether the IRT cut-off concentration for a PAP based CFNBS protocol can be elevated. While the original IRT/PAP method suggested an IRT cut-off of 50 µg/l (~97.5th percentile) [7], the protocol run in Heidelberg relied on an IRT cut-off ≥ 99.0th percentile (floating from 60 to 70 µg/l) similar to that often used in IRT/DNA protocols [8]. The reason for using the low cut-off of 50 µg/l (~97.5th percentile) in the original IRT/PAP protocol [7] was the fear of an inadequate sensitivity when IRT and PAP are used simultaneously as combined parameters. However, in all PAP based protocols applied nowadays, IRT and PAP are measured sequentially. Thus, considering IRT as first tier test, the situation is similar to an IRT/DNA protocol. Along these lines, the IRT cut-off was already increased to 60 µg/l (~98.5th percentile) when the IRT/PAP-FS/DNA protocol was implemented in The Netherlands [9]. Our results based on recalculations of the data obtained in Dresden and Prague show that an IRT cut-off of 65 µg/l (~99.0th percentile) can be used without reducing sensitivity. In turn, increasing the IRT cut-off in IRT/PAP protocols reduces significantly the number of PAP measurements and the rate of false positives. This results in a significant increase in specificity and in the PPV as shown for both the cohorts from Dresden and Prague (Table 1).

Second, we addressed the question whether the use of a FS is required as it is known for IRT/DNA based protocols [19,20]. One possibility for a FS is to request a second dry blood spot after day 21 for a repeated IRT measurement [3]. However, recalling newborns with unclear CFNBS results for a second heel prick is not feasible everywhere and therefore a number of IRT/PAP protocols, e.g. in Germany or in The Netherlands, were combined with a FS executed when $IRT \geq 99.9$ th percentile regardless of the second tier test result [8,9]. From the three IRT/PAP protocols compared in this paper, only the one run in Prague was without FS [10] and it could be shown that three of the five newborns missed in the original study by IRT/PAP would have been detected with FS (Table 2). Similar results were obtained when

Table 3

Retrospective analysis using the raw data of the cohorts of Heidelberg, Dresden, and Prague: Comparison of an optimized IRT/PAP-FS protocol with two IRT-dependent PAP cut-offs (PAP $\geq 1.8 \mu\text{g/l}$, if IRT 60.0–99.9 $\mu\text{g/l}$ and PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$, if IRT $\geq 100 \mu\text{g/l}$) with an IRT/PAP-FS protocol with one PAP cut-off (IRT ≥ 99.0 percentile for Heidelberg/IRT $\geq 60 \mu\text{g/l}$ for Dresden and Prague, PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$). All CF patients with MI and all newborns with equivocal diagnose of CF are presented in the table but were excluded from statistical calculations. Marked results are statistically significant compared to the respective protocol with two IRT-dependent PAP-cut-offs in the same cohort: **p < 0.0001.

Cohort	Heidelberg		Dresden		Prague	
Newborns screened	163,069		56,326		106,522	
Newborns with 2 mutations in the <i>CFTR</i> gene	34		10		23	
Prevalence of newborns with 2 mutations in the <i>CFTR</i> gene	1:4796 (3432–6701)		1:5633 (3060–10,369)		1:4631 (3087–6950)	
Screening protocol	Retrospective analysis IRT/PAP-FS ^a protocol (IRT 60.0–99.9 $\mu\text{g/l}$, PAP $\geq 1.8 \mu\text{g/l}$ /IRT $\geq 100 \mu\text{g/l}$, PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$)	Originally used protocol Heidelberg protocol of IRT/PAP-FS (IRT ≥ 99.0 P., PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$)	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 60.0–99.9 $\mu\text{g/l}$, PAP $\geq 1.8 \mu\text{g/l}$ /IRT $\geq 100 \mu\text{g/l}$, PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$)	Retrospective analysis Heidelberg protocol of IRT/PAP-FS (IRT ≥ 99.0 P., PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$)	Retrospective analysis IRT/PAP-FS protocol (IRT 60.0–99.9 $\mu\text{g/l}$, PAP $\geq 1.8 \mu\text{g/l}$ /IRT $\geq 100 \mu\text{g/l}$, PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$)	Retrospective analysis Heidelberg protocol of IRT/PAP-FS (IRT ≥ 99.0 P., PAP $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$)
Test positive (TP)	174 (0.11%)	287 (0.18%)	92 (0.16%)	122 (0.22%)	257 (0.24%)	390 (0.37%)
Detected CF w/o MI	23	23	7	7	17	18
Detected CF with MI ^b	5	7	1	1	2	1
Positive, equivocal diagnosis ^b	0	0	1	1	1	2
False positive	151	214	85	115	240	372
Test negative	162,895	162,782	56,234	56,204	106,265	106,132
True negative	162,893	162,780	56,234	56,204	106,263	106,131
False negative, CF w/o MI	2 ^c	2 ^c	0	0	2	1
False negative, CF with MI ^b	2	0	1	1	0	1
Negative, equivocal diagnosis ^b	2	2	0	0	1	0
Sensitivity, % (95% CI)	0.920 (0.814–1.026)	0.920 (0.814–1.026)	1.000 (0.676–1.000)	1.000 (1.000–1.000)	0.895 (0.757–1.033)	0.947 (0.847–1.048)
Specificity, % (95% CI)	0.9991 (0.9991–0.9991)	0.9984** (0.9984–0.9984)	0.9985 (0.9985–0.9985)	0.9980** (0.9980–0.9980)	0.9977 (0.9977–0.9978)	0.9965** (0.9965–0.9965)
PPV, % (95% CI)	0.1322 (0.0819–0.1825)	0.0801** (0.0487–0.1116)	0.0761 (0.0219–0.1302)	0.0573** (0.0161–0.0986)	0.0661 (0.0357–0.0965)	0.0437** (0.0233–0.0640)

^a The IRT/PAP-FS protocol with two IRT-dependent PAP cut-offs for the cohort of Heidelberg could be simulated only with the data available. In the original study in Heidelberg the IRT cut-off was set to ≥ 99.0 th IRT percentile (~ 60 – $70 \mu\text{g/l}$). This leads here to a smaller number of IRT positives compared to the other cohorts.

^b These patients were not included into statistical calculations.

^c One of these patients was not diagnosed because of an initially low IRT (36 $\mu\text{g/l}$).

the data of the cohorts of Heidelberg and Dresden were reanalyzed (Table 2). Due to the limited number of newborns in the individual substudies, the changes in sensitivity did not reach statistical significance. However, the trend towards an increased sensitivity when using FS could be seen in all three cohorts. Our results indicate that the use of a FS, e.g. rating of all newborns with negative PAP but an IRT ≥ 99.9 th percentile as a positive test result, may improve sensitivity.

Third, we determined the effect of different PAP cut-off levels on the performance of PAP based CFNBS. To our knowledge, all

currently used IRT/PAP protocols (e.g. [7,9]), except in Heidelberg [8], rely on two IRT-dependent PAP cut-offs. The reason to use two PAP cut-offs was based on the assumption that in the IRT range of 50.0 to 99.9 $\mu\text{g/l}$, lower PAP values may reflect mild CF phenotypes, which should not be detected. When the IRT/PAP strategy was implemented in Heidelberg, it was decided to use only a single PAP cut-off level of $\geq 1.0 \mu\text{g/l}$, because there is no evidence so far that PAP concentration generally correlates with CF disease severity. This notion is also supported by our present data showing higher PAP levels in some patients with PS

mutations (i.e. R117H;7T) and low PAP concentrations in some patients with PI mutations (i.e. F508del). Fig. 2 shows all newborns with IRT ≥ 50 $\mu\text{g/l}$ and two CF related mutations detected in the cohorts of Heidelberg and Prague. Comparing the different IRT/PAP protocols, four newborns with two mutations in the *CFTR* gene (HD-15, HD-18, PR-19, and PR-21 in Tables S2 and S4 in the online material) would have been missed by the IRT/PAP protocol with two IRT dependent PAP cut-offs, but would have been detected by the protocol with one PAP cut-off. Only one out of these four newborns missed carried one “mild” mutation in the *CFTR* gene and had a normal sweat chloride (PR-19). The other three newborns were diagnosed with CF. Two out of these three CF patients suffered from MI (HD-15, HD-18) and would have been diagnosed clinically. However, the third CF patient (PR-21) would have been missed by all IRT/PAP protocols relying on two IRT-dependent PAP cut-offs (e.g. [7,9,10]). It can be argued whether we have to consider three missed patients with CF or only one since two out of these three presented with MI. The fact that newborns carrying two CF causing mutations were not detected due to the IRT/PAP-FS protocol with two PAP cut-offs, raises the question whether this protocol is reliable enough for CFNBS. The comparison of the results of the different IRT/PAP-FS protocols (Table 3) suggests the use of only one PAP cut-off which showed a trend towards a higher sensitivity in the cohort of Prague, but led also to a higher false positive rate and to a lower specificity. Nevertheless, our results support a protocol with only one PAP cut-off until a well-powered study is available clearing this issue. During the introduction of an IRT/PAP protocol for CFNBS, the disadvantage of a higher false positive rate of a protocol with one PAP-cut-off will be offset by its expected higher sensitivity. Furthermore, combining this protocol with genetic testing as third tier will keep the higher sensitivity, but eliminate the disadvantage of the higher false positive rate.

Our study has several limitations which need to be considered in the interpretation of the results. First, two newborns without MI carrying CF causing mutations (HD-29, PR-16 in Tables S2 and S4 in the online material) were missed by both of the IRT/PAP protocols since PAP values of these newborns were lower than 1.0 $\mu\text{g/l}$. One of these two CF patients (HD-29) was born preterm in the 30th week of gestation and a second Guthrie card was not tested later for CF as usually done for other diseases included in NBS. Of note, Vernooij-van Langen et al. demonstrated that PAP values of preterm infants are variable [21]. This suggests that false negative PAP results might be explained by low PAP values in preterm infants, and that retesting of those close to the calculated birth date may be warranted when using an IRT/PAP protocol. Alternatively, the low PAP in this patient (HD-29) might be explained by expression of R347P mutation which is partially associated with exocrine pancreatic sufficiency and might therefore result in a lower PAP value after birth. Up to now there is no explanation why the second CF patient (PR-16) could not be detected by either of the PAP based CFNBS protocols. During the original study carried out in Prague all false negative results were verified by PAP re-examination and discussed directly with the manufacturer of the PAP kit. In this process no analytical or handling error was revealed. Another false negative tested CF patient (HD-01) not given in Fig. 2 was missed because of an IRT

value far below the cut-off (36 $\mu\text{g/l}$). Nonetheless, this patient would have been missed by any other IRT based screening strategy and should, therefore, not be considered as false negative result specific for PAP based CFNBS protocols. Nevertheless, it might happen that more individual patients are missed due to mobility of families, although Germany and the Czech Republic have reliable CF networks reporting CF patients tested false-negative by CFNBS to the NBS center.

Second, none of the study cohorts was large enough and was followed long enough to calculate sensitivity reliably. Furthermore, exclusion of CF patients with MI and of newborns with equivocal CF diagnosis from statistical analyses puts the focus on the relevant patients for a NBS study, but weakens determination of protocol sensitivity even further. This is the main reason why sensitivities reported here are lower than in other IRT/PAP studies [7–10]. Of note, if positive rated newborns who presented with MI after birth and were diagnosed with CF had been included in the statistical analysis, the sensitivity e.g. in the Heidelberg cohort would have increased from 92% up to 95%.

Third, in Heidelberg about 10% and in Prague about 21% [10] of the parents whose newborns were tested positive in the CFNBS refused confirmation of the test result by sweat testing and/or further clinical evaluation despite of respective efficient tracking procedures. This is an important fact since this could have influenced the initial results of these two cohorts and has to be taken into consideration when interpreting the results of this retrospective study.

Finally, differences between the calculated sensitivities of the studied protocols were too small to reach statistical significance for the given sizes of our cohorts. A power calculation predicted that a difference of 8 newborns would have been necessary to reach statistical significance between the calculated sensitivities of the different protocols compared in our retrospective study. Therefore, we expect that $\geq 800,000$ newborns have to be screened to demonstrate significant differences in sensitivities between screening protocols by comparative statistical analysis. However, we think these limitations do not impair the relevance or the findings reported in this study.

In summary, our results support that an IRT/PAP protocol is a good choice, if genetic analysis has to be avoided or if detection of carriers and newborns with equivocal diagnosis of CF should be limited. To optimize the specificity of an IRT/PAP protocol an IRT cut-off close to the 99.0th percentile (~ 65 $\mu\text{g/l}$) can be applied. Usage of a FS in an IRT/PAP protocol may improve sensitivity and usage of only one PAP cut-off may further increase the sensitivity, but lower the specificity when IRT/PAP is used as exclusive biochemical strategy.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2013.06.003>.

Acknowledgment

We gratefully thank all parents of newborns who participated in the study, all colleagues in participating obstetric and/or pediatric hospitals, Stephanie Hirtz (Heidelberg) for technical

assistance, Nadine Mutz (Heidelberg) for support in data management, and Gisela Haege (Heidelberg) for help in statistical analysis of the data. This study was sponsored by grants from the Dietmar-Hopp-Stiftung Walldorf GmbH (to O.S.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG MA 2081/4-1 to M.A.M.), the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF 82DZL00401), the Czech Ministry of Health for conceptual development of research organization (n. 00064203), the European Regional Development Fund Prague (CZ.2.16/3.1.00/24022OPPK to M.M.), and from Charles University Prague (PRVOUK UK2.LF to M.M. and PRVOUK P31 to F.V.).

References

- [1] Farrell PM, Lai HJ, Li Z, Kosorok MR, Laxova A, Green CG, et al. Evidence on improved outcomes with early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening: enough is enough! *J Pediatr* 2005;147:S30–6.
- [2] Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell III PW, Hoffman G, Parad RB, et al. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics* 2007;119:e495–518.
- [3] Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros* 2009;8:153–73.
- [4] Wilcken B, Wiley V. Newborn screening methods for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:272–7.
- [5] Munck A, Dhondt JL, Sahler C, Roussey M. Implementation of the French nationwide cystic fibrosis newborn screening program. *J Pediatr* 2008;153:228–33.
- [6] Ross LF. Newborn screening for cystic fibrosis: a lesson in public health disparities. *J Pediatr* 2008;153:308–13.
- [7] Sarles J, Berthezene P, Le Louarn C, Somma C, Perini JM, Catheline M, et al. Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *J Pediatr* 2005;147:302–5.
- [8] Sommerburg O, Lindner M, Muckenthaler M, Kohlmüller D, Leible S, Feneberg R, et al. Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:S263–71.
- [9] Vernooij-van Langen AM, Loeber JG, Elvers B, Triepels RH, Gille JJ, Van der Ploeg CP, et al. Novel strategies in newborn screening for cystic fibrosis: a prospective controlled study. *Thorax* 2012;67:289–95.
- [10] Krulišová V, Balašáková M, Skalická V, Piskáčková T, Holubová A, Paděrová J, et al. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur J Pediatr* 2012;171:1223–9.
- [11] Hammermann J, Mense L, Stopsack M. Newborn screening for cystic fibrosis with an IRT-PAP protocol. *J Cyst Fibros* 2012;11:S47 [Abstract].
- [12] Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545–9.
- [13] Green A, Kirk J. Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem* 2007;44:25–34.
- [14] Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, et al. *CFTR* Cl⁻ channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2004;127:1085–95.
- [15] Mall M, Kreda SM, Mengos A, Jensen TJ, Hirtz S, Seydewitz HH, et al. The $\Delta F508$ mutation results in loss of *CFTR* function and mature protein in native human colon. *Gastroenterology* 2004;126:32–41.
- [16] Hentschel J, Riesener G, Nelle H, Stuhmann M, Schöner A, Sommerburg O, et al. Homozygous *CFTR* mutation M348K in a boy with respiratory symptoms and failure to thrive. Disease-causing mutation or benign alteration? *Eur J Pediatr* 2012;171:1039–46.
- [17] Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, et al. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2009;8:71–8.
- [18] Stock C, Hielscher T. DTCComPair: comparison of binary diagnostic tests in a paired study design. R package version 1.00; 2013 [Internet Communication].
- [19] Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL, Dovey M, Gerstle R, Haver K, et al. Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics* 2004;113:1573–81.
- [20] Sontag MK, Wright D, Beebe J, Accurso FJ, Sagel SD. A new cystic fibrosis newborn screening algorithm: IRT/IRT1 upward arrow/DNA. *J Pediatr* 2009;155:618–22.
- [21] Vernooij-van Langen AM, Loeber JG, Elvers B, Triepels RH, Roefs J, Gille JJ, et al. The influence of sex, gestational age, birth weight, blood transfusion, and timing of the heel prick on the pancreatitis-associated protein concentration in newborn screening for cystic fibrosis. *J Inherit Metab Dis* 2013;36:147–54.

3.2.1. Úvod k publikaci

Zatímco většina evropských zemí má v době sepisování této dizertační práce celoplošný NSCF (Obr. č. 6), Německo je v tomto ohledu výjimkou. Současné legislativní a etické požadavky ("Deutschen Ethikrat," 2013, "Gendiagnostikgesetz - GenDG," 2009), jako důsledek eugeniky vycházející z ideologie nacistického Německa, neumožňují zavádět molekulárně genetické vyšetření pro autozomálně recesivní onemocnění jakožto součást celoplošného screeningového programu. Důvodem je zejména náhodné odhalení zdravých heterozygotů, což v krajním případě může pro rodinu probanda představovat celoživotní psychické trauma (Sommerburg et al., 2010).

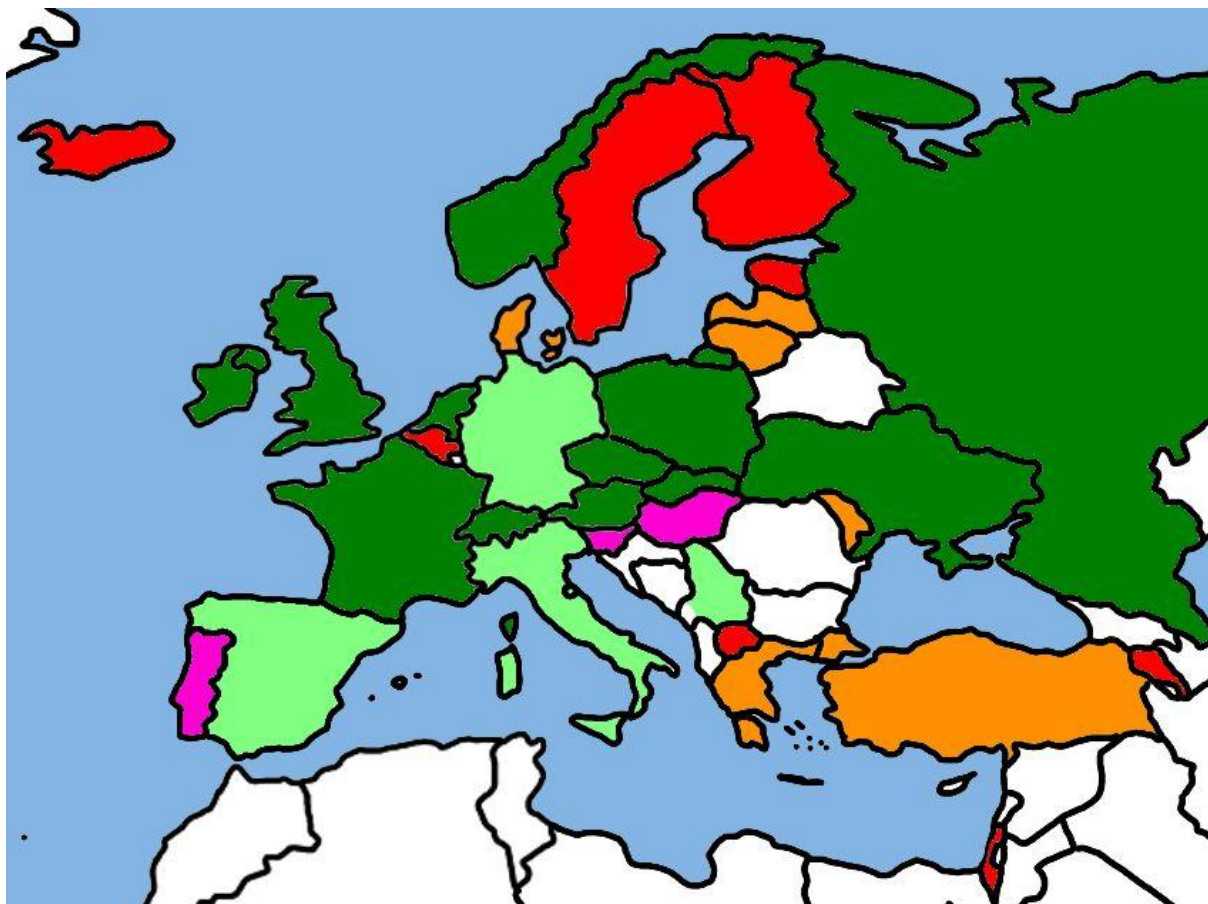
Vzhledem k výše uvedenému legislativnímu omezení tak Německo nemůže pro celoplošný NSCF použít protokol IRT/DNA a je odkázáno na protokoly založené pouze na biochemických analytech. Perspektivním modelem je protokol IRT/PAP.

Tato studie se zabývá problematikou optimalizace strategie IRT/PAP. K retrospektivnímu zhodnocení byly použity výsledky tří regionálních evropských programů, ve kterých byla použita rozdílná schémata IRT/PAP. Studie byla provedena na celkovém souboru 325 917 novorozenců z následujících screeningových center v Německu a České republice: a) Heidelberg - novorozenci z Bádensko-Württemberska, Porýní-Falce a Sárska, b) Drážďany - novorozenci z východního Saska a c) Praha – novorozenci narození v Čechách.

Studie vychází z původních cut-off hodnot navržených pro IRT/PAP protokol prof. Sarlesem (Sarles et al., 2005), tj. IRT 50,0 – 99,9 a PAP $\geq 1,8$ nebo IRT $\geq 100,0$ a PAP $\geq 1,0$ (vše ng/ml). V rámci optimalizace IRT/PAP protokolu si klademe tyto otázky: 1) je možné zvýšit cut-off pro IRT na 60 - 65 ng/ml se zachováním stejné senzitivity a dosažením vyšší specifity; 2) je vhodné zavádět FS pro IRT/PAP protokoly; 3) dosáhne protokol s jedinou cut-off hodnotou pro PAP vyšší senzitivity než dvě IRT-dependentní cut-off hodnoty pro PAP dle profesora Sarlese?

Díky rozsáhlejší mezinárodní kohortě tak byly dosaženy vhodnější podmínky k objektivnímu statistickému zhodnocení senzitivity a specifity protokolů IRT/PAP lišících se v nastavení cut-off hodnot pro jednotlivé analyty. Výsledky studie byly publikovány jako původní článek v Journal of Cystic Fibrosis v roce 2014.

Obr. č. 6: Evropské státy ve vztahu k zavádění NSCF



Autor obrázku: Dr. Kevin Southern (University of Liverpool, United Kingdom; osobní komunikace)

Legenda: Tmavě zelená – celoplošný screeningový program, světle zelená – regionální program, červená – dosud bez NSCF, oranžová – dosud bez NSCF, zavedení NSCF je odsouhlaseno, není však známa doba jeho zahájení, růžová – dosud bez NSCF, zavedení celoplošného NSCF je odsouhlaseno a plánováno od roku 2015

3.2.2. Výsledky a diskuze

Na základě retrospektivní studie bylo za nejvhodnější schéma, primárně s ohledem na dosaženou senzitivitu, považováno schéma IRT/PAP s cut-off hodnotou pro IRT odpovídající 99. percentilu, jedinou cut-off hodnotou pro PAP a s použitím FS odpovídající 99,9. percentilu. Tento typ protokolu může být vhodnou volbou v případě, že DNA analýza nelze použít jako součástí screeningového programu.

Pokud bychom výše zmíněné cut-off hodnoty (tj. v absolutních hodnotách IRT 65, PAP 1,0 a IRT pro FS 143; vše ng/ml) aplikovali na kohortu 106 522 českých novorozenců, dosáhli bychom senzitivity 0,9048 (tzn. zachytili bychom 19 případů s klasickou formou CF z 21 pacientů ve sledované kohortě)².

Senzitivity 0,9048 je však dosaženo za cenu vyšší falešné pozitivivity. Frekvenci indikovaných potních testů při těchto cut-off hodnotách u 390 (0,37%) novorozenců (Tab. č. 3 v původním článku Sommerburg et al., 2014) považujeme z hlediska vysoké falešné pozitivivity za nepřiměřenou zátěž novorozenecké populace. Stejně senzitivity, tj. 0,9048, dosáhl v české studii testovaný celoplošný protokol IRT/DNA/IRT při nutnosti indikovat potní test pouze u 77 (0,12 %) novorozenců (Krulišová et al., 2012). Je však nutno zdůraznit, že v našich podmínkách nemáme legislativní problémy s uplatněním molekulárně genetického vyšetření mutací v genu *CFTR* do celoplošného screeningového programu.

Navržené schéma IRT/PAP s cut-off hodnotou pro IRT odpovídající 99. percentilu a s jedinou cut-off hodnotou pro PAP může být opět použito ve formě protokolu IRT/PAP/DNA, kde jako třetí krok následuje DNA analýza genu *CFTR*³.

² Tab. č. 3 v původním článku Sommerburg et al., 2014 uvádí senzitivitu 0,9474; tj. zachycených 18 pacientů s klasickou formou CF z 19 pacientů. Důvodem tohoto rozporu je rozdílný přístup k pacientům s klinicky diagnostikovaným mekoniovým ileem - tyto pacienti byli v německo-české studii ze statistického zpracování vyřazeni.

³ Touto problematikou se zabývá připravovaná publikace: Sommerburg O, Krulisova V, Lindner M, Muckenthaler M, Kohlmüller M, Happich M, Stahl M, Kulozik AE, Votava F, Macek M Jr., Mall MA, Hoffmann GF. The combination of an IRT/PAP protocol using one PAP cut-off with *CFTR* mutation analysis in a new IRT/PAP/DNA protocol provides high sensitivity and specificity and avoids carrier detection in cystic fibrosis newborn screening in two different cohorts of Central European populations.

3.2.3. Závěr

Screeningové schéma IRT/PAP s dostatečně nízkými cut-off hodnotami pro PAP sice umožňuje dosáhnout vysoké senzitivity, ale pouze za cenu vysoké falešné pozitivity v podobě vysokého počtu indikovaných potních testů u jedinců bez CF.

Výsledky studie také ilustrují rozdílné požadavky kladené na screeningové protokoly - zatímco pro Českou republiku je vysoká falešná pozitivita zásadně limitující pro zavedení IRT/PAP schématu do celoplošně prováděného screeningového programu, pro Německo by z důvodu legislativních omezení mohla být parametrem akceptovatelným.

Následující publikace se zabývá problematikou uvedenou v bodě 3 mezi stanovenými cíli této dizertační práce (viz kapitola 2.).

3.3. Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balaščaková, M., **Krulišová, V.**, Čamajová, J., Turnovec, M., Libík, M., Norambuena, P., Štambergová, A., Dvořáková, L., Skalická, V., Bartošová, J., Kučerová, T., Fila, L., Zemková, D., Vávrová, V., Koudová, M., Macek, M., Krebsová, A., Macek, M., Jr, 2013. **Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations.** J. Cyst. Fibros. 12, 532-537. **IF 2,873**

Short Communication

Distribution of *CFTR* mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/*de novo* alleles and relevance for related/derived populations ☆

Petra Křenková ^a, Tereza Piskáčková ^a, Andrea Holubová ^a, Miroslava Balašáková ^a,
Veronika Krulišová ^a, Jana Čamajová ^{a,b}, Marek Turnovec ^a, Malgorzata Libik ^a,
Patricia Norambuena ^a, Alexandra Štambergová ^a, Lenka Dvořáková ^a, Veronika Skalická ^c,
Jana Bartošová ^c, Tereza Kučerová ^c, Libor Fila ^d, Dana Zemková ^c, Věra Vávrová ^c,
Monika Koudová ^{a,e}, Milan Macek, Sr. ^a, Alice Krebsová ^{a,f}, Milan Macek Jr. ^{a,*}

^a Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine of Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

^b Regional Authority of Public Health, Banská Bystrica, Slovak Republic

^c Department of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine of Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

^d Department of Pneumology, 2nd Faculty of Medicine of Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

^e GHC Genetics Ltd., Prague, Czech Republic

^f Department of Cardiology, Humboldt University, Virchow Klinikum Charité, Berlin, Germany

Received 15 October 2012; received in revised form 30 November 2012; accepted 2 December 2012

Available online 29 December 2012

Abstract

Background: This two decade long study presents a comprehensive overview of the *CFTR* mutation distribution in a representative cohort of 600 Czech CF patients derived from all regions of the Czech Republic.

Methods: We examined the most common CF-causing mutations using the Elucigene CF-EU2v1™ assay, followed by MLPA, mutation scanning and/or sequencing of the entire *CFTR* coding region and splice site junctions.

Results: We identified 99.5% of all mutations (1194/1200 *CFTR* alleles) in the Czech CF population. Altogether 91 different *CFTR* mutations, of which 20 were novel, were detected. One case of *de novo* mutation and a novel polymorphism was revealed.

Conclusion: The commercial assay achieved 90.7%, the MLPA added 1.0% and sequencing increased the detection rate by 7.8%. These comprehensive data provide a basis for the improvement of CF DNA diagnostics and/or newborn screening in our country. In addition, they are relevant to related Central European populations with lower mutation detection rates, as well as to the sizeable North American “Bohemian diaspora”.

© 2012 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cystic fibrosis; Czech Republic; *De novo CFTR* mutation; Central Europe; Newborn screening

Abbreviations: AT, Austrian/Austria; CE, Central Europe; CF, Cystic Fibrosis; CZ, Czech Republic/Czech; *CFTR*, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene; DE, German/Germany; HU, Hungarian/Hungary; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; NBS, newborn screening; PL, Polish/Poland; SK, Slovak/Slovakia; UK, United Kingdom; USA, United States of America.

☆ Presented as a poster at the 33rd European Cystic Fibrosis Conference, Valencia, Spain, June 2010. Petra Křenková, Tereza Piskáčková, Miroslava Balašáková, Andrea Holubová, Jana Čamajová, Miroslava Hančárová, Lenka Dvořáková, Veronika Skalická, Alexandra Štambergová, Věra Vávrová, Milan Macek Jr. Spectrum of *CFTR* Mutations in the Czech Republic. *Journal of Cystic Fibrosis* 2010; 9(S1):S2.

* Corresponding author at: Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine of Charles University Prague and University Hospital Motol, V Úvalu 84; Prague 5, CZ 15006, Czech Republic. Tel.: +420 224433501; fax: +420 224433520.

E-mail address: milan.macek.jr@lfmotol.cuni.cz (M. Macek).

1569-1993/\$ -see front matter © 2012 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.12.002>

1. Introduction

The incidence of cystic fibrosis (CF) in the Czech Republic (CZ) was estimated using epidemiological approaches more than half a century ago (1 in 2700 live births), while recent outcomes of a nationwide CF newborn screening (NBS) revealed a two-fold lower incidence (1 in 4023 live births) [1]. Given the current annual birth rate of 108,673 [2], approximately 30 CF patients would be expected to be born each year.

The CZ population has German (Bavarian; DE), Northern Austrian (AT), Polish (PL), Slovak (SK) or Hungarian (HU) influences (arranged by the degree of their historical impact) and is a representative of the population composition of Central Europe (CE) [3,4]. Romani intermarriage and non-European immigration have remained marginal [2]. Therefore, generally speaking, the CZ population is stable and homogeneous [5].

Over the past two decades, the Prague CF Centre has performed DNA diagnostic testing for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene in a group of almost 3000 CZ families. This facility serves as the national reference center, both for clinical and laboratory diagnosis of CF [6], within an official network of regional CF centers [7]. The Prague center also coordinates CF newborn screening for the western part of the country [1].

The aim of this study is to present results from a substantially larger and representative group of CZ CF patients, compared to

the previous report published within a collaborative study [8]. In addition, data on intra-*CFTR* rearrangements, copy number and/or novel mutations are included. Significantly updated data provide a basis for improvement of CF DNA diagnosis and/or CF NBS in the CZ and related populations. Finally, the information is important for the selection of patients for mutation-specific therapies [9].

2. Methods

Diagnosis of CF was established in 600 unrelated CZ CF patients by using a combination of clinical and laboratory diagnostic criteria [10]. Their geographic origin is presented in Fig. 1. During this long-term population study, DNA diagnostic techniques have gradually evolved (data available upon request). Initially, we examined the most common CF causing mutations using “in house” methods, later followed by commercial assays (e.g. Elucigene CF-EU2v1™, Gen-Probe Life Sciences, UK). Patients with one or both unidentified mutations were then examined for intragenic rearrangements using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA, MRC-Holland, Netherlands). Subsequently, negative cases were subjected to mutation scanning [11] and/or sequencing of the entire *CFTR* coding region and splice site junctions (Applied Biosystems, USA). Any detected *CFTR* mutations were verified in the index case’s parents.



Fig. 1. Origin of 600 Czech CF patients. Legend: Origin of patients is based on the postal codes of their domicile. Number of patients in the regions: Capital Prague (Praha) Region — 99; Central Bohemia Region (i.e. regiona surrounding Prague) — 88; Ústí nad Labem Region — 52; Pilsen (Plzeň) Region — 48; Liberec Region — 41; South-Bohemian (České Budějovice) Region — 40; Hradec Králové Region — 37; Zlín Region — 32; Pardubice Region — 31; Moravian-Silesian (Ostrava) Region — 29; Vysočina (Jihlava) Region — 29; Karlovy Vary Region — 26; Olomouc Region — 25; South Moravian (Brno) Region — 23.

Table 1
Spectrum of *CFTR* mutations detected in Czech CF patients.

	Mutations/HGVS nomenclature/	Mutations/traditional nomenclature, legacy name/	Legacy exon/intron	No. of alleles	%
1.	c.1521_1523delCTT	F508del [#]	Ex10	809	67.42
2.	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3/21kb/ [#]	In1–In3	69	5.75
3.	c.1652G>A	G551D [#]	Ex11	35	2.92
4.	c.3909C>G	N1303K [#]	Ex21	29	2.42
5.	c.1624G>T	G542X [#]	Ex11	24	2.00
6.	c.3718-2477C>T	3849+10kbC>T [#]	In19	20	1.67
7.	c.1766+1G>A	1898+1G>A [#]	In12	17	1.42
8.	c.1040G>C	R347P [#]	Ex7	11	0.92
9.	c.2012delT	2143delT [#]	Ex13	11	0.92
10.	c.3140-26A>G	3272-26A>G [#]	In17a	8	0.67
11.	c.1007T>A	I336K [#]	Ex7	7	0.58
12.	c.3846G>A	W1282X [#]	Ex20	7	0.58
13.	c.1657C>T	R553X [#]	Ex11	6	0.50
14.	c.2657+5G>A	2789+5G>A [#]	In14b	6	0.50
15.	c.2834C>T	S945L [#]	Ex15	6	0.50
16.	c.442delA	574delA [#]	Ex4	5	0.42
17.	c.489+1G>T	621+1G>T [#]	In4	5	0.42
18.	c.2052_2053insA	2184insA [#]	Ex13	5	0.42
19.	c.3009_3017delAGCTATAGC	3141delI9^{&}	Ex17a	5	0.42
20.	c.366T>A	Y122X [#]	Ex4	4	0.33
21.	c.[874G>A]+[2126G>A]	E292K/R709Q	Ex7/Ex13	4	0.33
22.	c.1585-1G>A	1717-1G>A [#]	In10	4	0.33
23.	c.3454 G>C	D1152H [#]	Ex18	4	0.33
24.	c.3484C>T	R1162X [#]	Ex19	4	0.33
25.	c.4242+1G>T	4374+1G>T	In23	4	0.33
26.	c.1000C>T	R334W [#]	Ex7	3	0.25
27.	c.1767-?_2619+?del	CFTRdele13,14a	Ex13–Ex14a	3	0.25
28.	c.3468+2_3468+3insT	3600+2insT	In18	3	0.25
29.	c.3469-?_3717+?dup	CFTRdup19	Ex19	3	0.25
30.	c.3964-78_4242+577del	CFTRdele22,23 [#]	Ex22–Ex23	3	0.25
31.	c.53+1G>T	185+1G>T	In1	2	0.17
32.	c.54-1161_164+1603del2875	CFTRdele2	Ex2	2	0.17
33.	c.169T>G	W57G	Ex3	2	0.17
34.	c.254G>A	G85E [#]	Ex3	2	0.17
35.	c.274G>T	E92X [#]	Ex4	2	0.17
36.	c.328G>C	D110H [#]	Ex4	2	0.17
37.	c.579+3A>G	711+3A>G [#]	In5	2	0.17
38.	c.3528delC	3659delC [#]	Ex19	2	0.17
39.	c.4127_4131delITGGAT	4259delI5	Ex22	2	0.17
40.	c.1-?_1584+?del	CFTRdele1,10	Ex1–Ex10	1	0.08
41.	c.115C>T	Q39X [#]	Ex1	1	0.08
42.	c.79G>C	G27R	Ex2	1	0.08
43.	c.[125C>T]+[223C>T]	S42F/R75X [#]	Ex2/Ex3	1	0.08
44.	c.164+1G>A	296+1G>A	In2	1	0.08
45.	c.274G>A	E92K [#]	Ex4	1	0.08
46.	c.349C>T	R117C [#]	Ex4	1	0.08
47.	c.509G>A	R170H	Ex5	1	0.08
48.	c.533G>A	G178E	Ex5	1	0.08
49.	c.579+1G>T	711+1G>T [#]	In5	1	0.08
50.	c.902A>G	Y301C	Ex7	1	0.08
51.	c.1040G>A	R347H [#]	Ex7	1	0.08
52.	c.1114C>T	Q372X	Ex7	1	0.08
53.	c.1117-1G>A	1249-1G>A	In7	1	0.08
54.	c.1209+1G>A	1341+1G>A [#]	In8	1	0.08
55.	c.1519_1521delATC	I507del [#]	Ex10	1	0.08
56.	c.1654C>T	Q552X [#]	Ex11	1	0.08
57.	c.1673T>C	L558S [#]	Ex11	1	0.08
58.	c.1679+1G>C	1811+1G>C	In11	1	0.08
59.	c.1687T>C	Y563H	Ex12	1	0.08
60.	c.1753G>T	E585X [#]	Ex12	1	0.08
61.	c.1766+1G>C	1898+1G>C	In12	1	0.08
62.	c.2044delA	2176delA	Ex13	1	0.08
63.	c.2051_2052delAAinsG	2183delAA>G [#]	Ex13	1	0.08
64.	c.2052delA	2184delA [#]	Ex13	1	0.08

Table 1 (continued)

	Mutations/HGVS nomenclature/	Mutations/traditional nomenclature, legacy name/	Legacy exon/intron	No. of alleles	%
65.	c.2290C>T	R764X [#]	Ex13	1	0.08
66.	c.2490+1G>A	2622+1G>A [#]	In13	1	0.08
67.	c.2538G>A	W846X* [#]	Ex14a	1	0.08
68.	c.2551C>T	R851X [#]	Ex14a	1	0.08
69.	c.2589_2599delAATTTGGTGCT	2721del11	Ex14a	1	0.08
70.	c.2705delG	2837delG	Ex15	1	0.08
71.	c.2789delG	2921delG	Ex15	1	0.08
72.	c.2803_2813delCTACCACTGGT	2935del11	Ex15	1	0.08
73.	c.2856G>C	M952I	Ex15	1	0.08
74.	c.2991G>C	L997F [#]	Ex17a	1	0.08
75.	c.3106delA	3238delA	Ex17a	1	0.08
76.	c.3136G>T	E1046X	Ex17a	1	0.08
77.	c.3139G>C	G1047R	Ex17a	1	0.08
78.	c.3196C>T	R1066C* [#]	Ex17b	1	0.08
79.	c.3196C>G	R1066G	Ex17b	1	0.08
80.	c.3302T>G	M1101R	Ex17b	1	0.08
81.	c.3310G>A	E1104K	Ex17b	1	0.08
82.	c.3353C>T	S1118F	Ex17b	1	0.08
83.	c.3472C>T	R1158X* [#]	Ex19	1	0.08
84.	c.3587C>G	S1196X [#]	Ex19	1	0.08
85.	c.3708delT	3840delT	Ex19	1	0.08
86.	c.3937C>T	Q1313X [#]	Ex21	1	0.08
87.	c.3971T>C	L1324P	Ex22	1	0.08
88.	c.4003C>T	L1335F	Ex22	1	0.08
89.	c.4004T>C	L1335P	Ex22	1	0.08
90.	c.4097T>A	I1366N	Ex22	1	0.08
91.	c.4426C>T	Q1476X	Ex24	1	0.08
92.	Unknown			6	0.50
	Total			1200	100.00

Legend: Within the traditional nomenclature column: “*” mutations included in the Elucigene CF-EU2v1™ assay; “[#]” genotype–phenotype correlations of detected mutations are described in the CFTR2 database [21] with e.g. D1152H, L997F having “varying consequences”; “?” — Genomic position of breakpoints has not been identified, thus far. Novel mutations are formatted in bold and “&” the novel mutation 3141del9 was independently detected in five unrelated CZ families.

3. Results

Altogether we found 91 different *CFTR* mutations (Table 1), with only seven being present at a frequency >1%: F508del (67.42%), CFTRdele2,3(21kb) (5.75%), G551D (2.92%), N1303K (2.42%), G542X (2.0%), 3849+10kbC>T (1.67%) and 1898+1G>A (1.42%) (using the legacy/traditional nomenclature). More than half of all mutations (n=52) occurred within a single family. In addition, 20 novel mutations (Table 1) and a novel variant (S1456N) were discovered.

A *de novo* novel mutation 3840delT was detected on “fingerprinting-proven” paternal *CFTR* allele in an adolescent male patient who bears a second novel mutation in compound heterozygosity — 3840delT/2921delG. He was diagnosed clinically at 3 years of age (sweat test: 80 mmol/l), and suffers from chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization and pancreatic insufficiency.

In addition, we observed the previously described V754M mutation in *trans* to N1303K in an unaffected mother (sweat test: 40 mmol/l). Her first CF child bears a R709Q-E292K/N1303K in *trans*, while sequencing of exon 7, 13 and 21 during prenatal diagnosis of her second child, who is unaffected, revealed the R709Q-E292K/V754M genotype.

The S1455X mutation was observed in compound heterozygosity with the F508del in a male patient who was clinically diagnosed at age 7 years, in which “repeated bronchitis” led to sweat testing (mean concentration 70 mmol/l). Interestingly, the patient’s asymptomatic father bears mutation S1455X in *trans* to a novel variant S1456N and the patient’s apparently healthy brother has the maternal-F508del/S1456N genotype.

In aggregate, we identified 99.50% of all mutations (1194/1200 *CFTR* alleles) in the CZ CF population (Table 1).

4. Discussion

This study presents a comprehensive overview of the *CFTR* mutation distribution in a representative cohort of CZ CF patients originating from all CZ regions (Fig. 1). Integration of CF clinical expertise with DNA diagnostics at the Prague National Reference Center, together with consistent application of consensus CF clinical and laboratory diagnostic criteria, led to the identification of more than 99% of all *CFTR* mutations (Table 1).

There are over 10 million inhabitants in the country, which according to population genetic analyses, is a representative of the CE ethnic composition [3], with significant overlaps with

Table 2
Distribution of selected *CFTR* mutations in Central European populations.

Mutations/HGVSNomenclature/	Mutations/traditional nomenclature, legacy name/	Czech Republic 2012 (this study) (N=1200)	Slovakia 2010 (N=856)	Eastern Hungary 2011 (N=80)	Germany Bavaria 2002 (N=250)	Austria Tyrol 1997 (N=126)	Austria North– East, North– North 2002 (N=118)	Poland (N=1726)
c.1521_1523delCTT	F508del	67.42	66.80	70.00	74.00	74.60	70.30	57.0
c.54-5940_273+10250del21 kb	CFTRdele2,3/21kb	5.75	2.26	5.00	1.2*	2.6 [#]	NA	1.80
c.1652G>A	G551D	2.91	<0.50	0.00	6.40	1.60	2.50	0.50
c.3909C>G	N1303K	2.42	2.03	5.00	2.40	0.00	NA	1.80
c.1624G>T	G542X	2.00	4.06	3.75	3.20	2.40	5.10	2.60
c.3718-2477C>T	3849+10kbC>T	1.67	4.28	0.00	NA	0.00	3.40	2.70
c.1766+1G>A	1898+1G>A	1.42	<0.50	0.00	NA	0.00	NA	NA
c.1040G>C	R347P	0.92	1.10	1.25	0.80	1.60	2.50	NA
c.2012delT	2143delT	0.92	1.10	0.00	NA	0.00	NA	NA
c.3140-26A>G	3272-26A>G	0.67	<0.50	0.00	NA	0.00	NA	NA
c.3846G>A	W1282X	0.58	<0.50	0.00	NA	0.00	NA	0.70
c.1007T>A	I336K	0.58	0.00	0.00	NA	0.00	NA	NA
c.1657C>T	R553X	0.50	0.90	0.00	1.20	0.00	NA	1.90
c.2657+5G>A	2789+5G>A	0.50	0.00	0.00	NA	2.40	NA	NA
c.2834C>T	S945L	0.50	0.00	0.00	NA	0.00	NA	NA
c.2052_2053insA	2184insA	0.42	1.58	5.00	NA	0.00	NA	NA

Legend: data for Slovakia [12], Eastern Hungary [14], Germany–Bavaria [13], Austria–Tyrol [18], Austria North East and North West [13], Poland and * [8], and [#] [16]. NA: not analyzed/data not available. N: number of analyzed CF alleles.

the SK, HU, AT and DE populations [3,4], and to a lesser degree, with its PL and DE Saxony neighbors [5]. Therefore, our data are pertinent to the related populations with lower mutation detection rates (Table 2) [8,12,13], with the exception of Eastern HU [14]. The CZ mutation distribution is also relevant to the North American “Bohemian diaspora” (residing mainly in Canada and the U.S. Midwest) consisting of over 1.2 million immigrants with descendants from historical CZ territories [15].

In the CE population, the frequency of the F508del mutation does not “rigorously” follow the expected “North-to-South” gradient, which could be due to the higher population heterogeneity in PL (Table 2). The “Slavic” mutation CFTRdele2,3/21kb/ [16] is relatively common in CE (Table 2). However, the G551D mutation is more common within the “core Hallstatt culture territory” [17] that comprises the current CZ, DE, AT and AT–Tyrol [18, Table 2]. Therefore, a “Celtic” origin of G551D is likely and is supported by its common origin and extrapolated “age” [19]. Similarly, we presume that the “Mediterranean” mutation G542X [8] is, according to historical patterns of CE colonization [17], the most prevalent in the Danube basin, i.e. in SK, HU, AT and DE.

In the CZ population the commercial assay Elucigene CF-EU2v1TM achieved mutation detection rates of 90.7%, MLPA added 1.0%, with the CFTRdele2,3/21 kb/mutation (5.75%) being independently confirmed by this assay. Mutation scanning and/or sequencing detected an extra 94 CF alleles, adding an additional 7.8%.

We have not included the male with the S1455X/F508del in our cohort, since he only suffers from “isolated elevated sweat chloride concentrations” [20] and does not meet the diagnostic criteria for CF [10]. Similarly, all cases with the R117H-IVS8 T(7) in *cis*, which did not meet the diagnostic criteria were also excluded from this study. Although the V754M mutation “is still under evaluation” in the CFTR2 database [21], we concluded that

its pathogenic potential is limited. All “equivocal” cases have been enrolled into a long-term clinical monitoring program at our center [6,22].

The previously reported pathological L1-mediated retro-transpositional event [23] was detected in one patient who was compound heterozygous for the E92K/M952I mutations. It is likely that the pathogenetic impact of the “CFTR-related disorder associated” mutation M952I [22] was augmented by the Alu1-related molecular alternation of the *CFTR*, leading to a “classical” presentation of CF in this case.

The observed *de novo* novel mutation occurred on the paternal *CFTR* allele (father’s age at conception was 25 years) at a rate of 1 in 1200 *CFTR* alleles examined, i.e. as previously reported [24].

In addition, previously unknown complex allele [25] comprising R709Q-E292K in *cis* in four unrelated families was discovered, with the R709Q being reported in AT [26].

In summary, we present a thorough overview of the *CFTR* mutation distribution in the CZ population, which demonstrates that integrated clinical and laboratory expertise [22] can yield very high mutation detection rates.

The Elucigene CF-EU2v1TM assay was shown to achieve sufficient mutation detection rates for multi-tier CF NBS (i.e. more than 85%), although the I336K and S945L, with frequency over 0.5% (Table 1), should also be included in the Czech national screening panel [1]. The CZ mutation distribution is relevant to related populations which have reported rather limited mutation spectra (e.g. Northern AT) and to the sizeable North American immigrant population derived from this part of CE.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest that could influence the content or processing of this manuscript.

Acknowledgment

Supported by CZ.2.16/3.1.00/24022OPPK, “Conceptual development project of research organization #00064203” (University Hospital Motol, Prague) from the Czech Ministry of Health, PRVOUK UK 2. LF and the European Commission projects (Eurogentest; FP7-HEALTH-F4-2010-261469) to MM Jr. We would like to acknowledge all collaborating clinicians whom we could not list individually and current and previous colleagues Nikola Bílá, Miroslava Hančárová, Magdalena Hérová, Milada Matějčíková, Jana Paděrová and Inna Soldátová from our department. We would like to thank our partners and long-time foreign collaborators Drs. Marie-Pierre Audrézet, Jian-Min Chen, Claude Férec and Bernard Mercier (Laboratoire de Génétique Moléculaire et d’Histocompatibilité, Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital Morvan, Brest, France) and Timothy W. Hefferon (National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) for their invaluable assistance. We would also like to acknowledge the support of Dr. Garry R. Cutting (MsKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, U.S.A.) who supported this study in the early to mid nineties. Finally, we would like to thank the Czech CF Association (www.cfklub.cz) for their continuous support.

References

- [1] Balašáková M, Holubová A, Skalická V, et al. Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *J Cyst Fibrosis* 2009;8(3):224–7.
- [2] Czech Statistical Office. <http://www.czso.cz/eng/redakce.nsf/i/home>.
- [3] Lao O, Lu TT, Nothnagel M, et al. Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Curr Biology* 2008;18(16):1241–8.
- [4] Heath SC, Gut IG, Brennan, et al. Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies. *Eur J Hum Genet* Dec 2008;16(12):1413–29.
- [5] Zástěra J, Roewer L, Willuweit S, Sekerka P, Benešová L, Minárik M. Assembly of a large Y-STR haplotype database for the Czech population and investigation of its substructure. *Forensic Sci Int Genet* Apr 2010;4(3):e75–8.
- [6] Mayell SJ, Munck A, Craig JV, et al. European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibrosis* 2009;8(1):71–8.
- [7] Official bulletin of the Czech Ministry of Health no. 4. http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c4/2012_6288_2510_11.html; May 28, 2012. [establishing national network of *de iure* CF centers].
- [8] Bobadilla JL, Macek Jr M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* Jun 2002;19(6):575–606.
- [9] Amaral MD. Targeting CFTR: how to treat cystic fibrosis by CFTR-repairing therapies. *Curr Drug Targets* 2011;12(5):683–93.
- [10] De Boeck K, Derichs N, Fajac I, et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibrosis* 2011;Suppl. 2:S53–66.
- [11] Křenková P, Norambuena P, Štambergová A, Macek Jr M. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the CFTR gene. *Folia Biol (Praha)* 2009;55(6):238–42.
- [12] Šoltýsová A, Ficek A, Baldovič M, et al. Molecular diagnosis of cystic fibrosis in Slovakia: current status and outlook into the future (“Molekulárna diagnostika cystickej fibrózy na Slovensku: jej stav a perspektívne smerovanie”). *CF Plus Motýlik* 2010;5:40–1 [ISSN 1337–7183].
- [13] The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)/A/ECFSGenoa, Italy; 19 June 2002 [www.cfww.org/docs/who/2002/who_hgn_cf_wg_04.02.pdf].
- [14] Ivady G, Madar L, Nagy B, et al. Distribution of CFTR mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* May 2011;10(3):217–20.
- [15] United States Census Bureau 2010 — factfinder2.census.gov.
- [16] Dörk T, Macek Jr M, Mekus F, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* Mar 2000;106(3):259–68.
- [17] Cunliffe Barry. *The ancient Celts*. Penguin Books; 2001 [ISBN-13: 978–0140254228].
- [18] Stuhmann M, Dörk T, Frühwirth M, et al. Detection of 100% of the CFTR mutations in 63 CF families from Tyrol. *Clin Genet* Oct 1997;52(4):240–6.
- [19] Cashman SM, Patino A, Martinez A, et al. Identical intragenic microsatellite haplotype found in cystic fibrosis chromosomes bearing mutation G551D in Irish, English, Scottish, Breton and Czech patients. *Hum Hered* Jan-Feb 1995;45(1):6–12.
- [20] Salvatore D, Tomaiuolo R, Vanacore B, Elce A, Castaldo G, Salvatore F. Isolated elevated sweat chloride concentrations in the presence of the rare mutation S1455X: an extremely mild form of CFTR dysfunction. *Am J Med Genet A* Mar 1 2005;133A(2):207–8.
- [21] Clinical and Functional Translation of CFTR database (CFTR2). www.cfr2.org.
- [22] Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* May 2008;7(3):179–96.
- [23] Chen JM, Masson E, Macek Jr M, et al. Detection of two Alu insertions in the CFTR gene. *J Cyst Fibros* Jan 2008;7(1):37–43 [Epub 2007 May 24].
- [24] Girodon E, des Georges M, Medina R, et al. Occurrence of CFTR de novo mutations is not so rare. *J Cyst Fibros* Jun 2008;7(Suppl. 2):S6.
- [25] El-Seedy A, Girodon E, Norez C, et al. CFTR mutation combinations producing frequent complex alleles with different clinical and functional outcomes. *Hum Mutat* Jun 7 2012, <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22129> [Epub ahead of print].
- [26] Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). www.genet.sickkids.on.ca.

3.3.1. Úvod k publikaci

Senzitivita screeningových schémat pro CF založených na DNA analýze je dána nejen cut-off hodnotami pro biochemické markery, ale také možnostmi molekulárně genetického vyšetření detekovat různě široké spektrum kauzálních mutací v genu *CFTR*. Předpokladem efektivity schémat IRT/DNA je znalost distribuce mutací genu *CFTR* u pacientů s CF v daném regionu a populaci.

Doposud neexistuje jednoznačné doporučení, kolik mutací se má v rámci DNA analýzy u screeningových schémat vyšetřovat. Dle konsensu je doporučováno, aby byly zahrnuty nejčastější populačně specifické mutace a dále alely přítomné u příslušných etnických minorit (Castellani et al., 2009). V praxi jsou v rámci NSCF vyšetřovány mutace představující 85 – 90 % všech alel vyskytujících se u pacientů s CF v dané populaci.

Tato práce se zabývá problematikou zastoupení jednotlivých alel *CFTR* genu u pacientů s CF v České republice. Mezi pacienty byli zahrnuti také pacienti diagnostikovaní na základě NSCF. Výsledky práce nám umožnily zhodnotit, zda panel mutací, který je v současné době používán v rámci celoplošného screeningového programu IRT/DNA/IRT, nepředstavuje překážku v dosažení vysoké senzitivity NSCF. Výsledky práce byly publikovány v Journal of Cystic Fibrosis v roce 2013.

3.3.2. Výsledky a diskuze

U 600 pacientů s diagnostikovanou klasickou formou CF na základě klinických a laboratorních diagnostických kritérií bylo identifikováno 99,50 % mutací v genu *CFTR* (1194/1200 alel). U vyšetřených pacientů bylo nalezeno 91 různých mutací, z nichž pouze 15 mělo četnost vyšší než 0,5 %. Četnost jednotlivých mutací je uvedena ve publikaci Křenková et al., 2013 v Tab. č. 1.

Pro DNA analýzu v druhém kroku celoplošného NSCF je v České republice od července 2010 používán komerčně dostupný panel obsahující 50 mutací genu *CFTR* (Elucigene CF-EU2TM od firmy Gen-Probe), přehled vyšetřovaných mutací je uveden v tabulce č. 4. Dle procentuálního zastoupení jednotlivých *CFTR* alel u pacientů s CF v České republice vycházející z výsledků této práce dosahuje panel s 50 mutacemi záchytnosti 90,7 %.

Lze předpokládat, že další navyšování počtu vyšetřovaných mutací v rámci NSCF nezvýší významně senzitivitu [na senzitivitu protokolů využívajících DNA analýzu má vliv spíše iniciální cut-off hodnota pro IRT než počet vyšetřovaných mutací (Baker et al., 2011)], ale zvýší především falešnou pozitivitu reprezentovanou detekcí vyššího počtu zdravých heterozygotů.

Tabulka č. 4: Přehled vyšetřovaných mutací v rámci celoplošného NSCF

Panel 50 <i>CFTR</i> mutací (Elucigene CF-EU2 TM od firmy Gen-Probe)
p.Phe508del, p.Ser18ArgfsX16, p.Ile507del, c.2657+5G>A, p.Glu60X, p.Gln890X, p.Pro67Leu, p.Tyr515X, c.2988+1G>A, p.Gly85Glu, p.Val520Phe, c. 3140-26A>G, p.Leu88IlefsX22, c.1585-1G>A, p.Arg1066Cys, p.Ile105SerfsX2, p.Gly542X, p.Tyr1092X, p.Arg117Cys, p.Ser549Asn, p.Met1101Lys, p.Arg117His, p.Ser549Arg, p.Asp1152His, p.Tyr122X, p.Gly551Asp, p.Arg1158X, c.489+1G>T, p.Arg553X, p.Arg1162X, c.579+1G>T, p.Arg560Thr, p.Lys1177SerfsX15, p.Leu206Trp, c.1679+1.6kbA>G, c.3717+10kbC>T, p.Phe316LeufsX12, c.1766+1G>A, p.Ser1251Asn, p.Arg334Trp, p.Leu671X, p.Leu1258PhefsX7, p.Arg347Pro, p.Lys684AsnfsX38, p.Trp1282X, p.Arg347His, p.Val739TyrfsX16, p.Asn1303Lys, p.Ala455Glu, p.Trp846X, varianty 1210-12T[5/7/9]

3.3.3. Závěr

Na základě výsledků této práce jsme potvrdili, že detekční schopnost komerčně dostupné diagnostické soupravy používané pro druhý krok protokolu IRT/DNA/IRT splňuje požadavky kladené na DNA analýzu v rámci screeningových programů, tj. dosahuje záchytnosti vyšší než 85 %. V kombinaci s vhodně zvolenými cut-off hodnotami pro biochemické markery tak nepředstavuje překážku v dosažení vysoké senzitivity současného screeningového schématu IRT/DNA/IRT ani schématu IRT/PAP/DNA, které jsme s modifikovanými cut-off hodnotami pro IRT a PAP studovali v kapitole 3.1.2.3.

Následující publikace se zabývá problematikou uvedenou v bodě 4 mezi stanovenými cíli této dizertační práce (viz kapitola 2.).

3.4. Votava, F., Kožich, V., Chrastina, P., Pešková, K., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Vinohradská, H., Dejmek, P., **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščaková, M., Piskáčková, T., Macek, M., Gaillyová, R., Valášková, I., Skalická, V., 2014. **Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice.** Čes-slov. Pediat. 69, 77-86.

Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice

Votava F.¹, Kožich V.², Chrastina P.², Pešková K.², Adam T.³, Friedecký D.³, Hlídková E.³, Vinohradská H.⁴, Dějmek P.¹, Krulišová V.⁵, Holubová A.⁵, Balaščíková M.⁵, Piskáčková T.⁵, Macek M.⁵, Gaillyová R.⁶, Valášková I.⁶, Skalická V.⁷

¹Klinika dětí a dorostu, UK 3. lékařská fakulta a FN Královské Vinohrady, Praha
přednosta doc. MUDr. F. Votava, Ph.D.

²Ústav dědičných metabolických poruch, UK 1. lékařská fakulta a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha
přednosta prof. MUDr. V. Kožich, CSc.

³Laboratoř dědičných metabolických poruch OKBI, UP Lékařská fakulta a FN Olomouc
vedoucí doc. RNDr. T. Adam, Ph.D.

⁴Oddělení klinické biochemie, pracoviště Dětská nemocnice, MU Lékařská fakulta a FN, Brno
primář doc. MUDr. M. Dastych, CSc.

⁵Ústav biologie a lékařské genetiky, UK 2. lékařská fakulta a FN Motol, Praha
přednosta prof. MUDr. M. Macek, DrSc.

⁶Oddělení lékařské genetiky, MU Lékařská fakulta a FN, Brno
primářka MUDr. R. Gaillyová, Ph.D.

⁷Pediatrická klinika, UK 2. lékařská fakulta a FN Motol, Praha
přednosta prof. MUDr. J. Lebl, CSc.

Čes-slov Pediat 2014; 69 (2): 77–86

SOUHRN

Pomocí celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu ze suché kapky krve (SKK) na filtračním papírku jsou od roku 1975 vyhledáváni pacienti s fenylketonurií/hyperfenylalaninemií (PKU/HPA); od roku 1985 s vrozenou hypotyreózou (CH); od roku 2006 s kongenitální adrenální hyperplazií (CAH) a od X/2009 pacienti s cystickou fibrózou (CF) a 9 dalšími dědičnými poruchami metabolismu – leucinózou (MSUD), glutarovou acidurií typu I (GA I), izovalerovou acidurií (IVA), deficitem dehydrogenázy acyl-CoA se středně dlouhým, 3-hydroxyacyl-CoA s dlouhým a acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem (MCADD, LCHADD a VLCADD), deficitem karnitinpalmitoyltransferázy I a II (CPTD I a II) a deficitem karnitinacylkarnitintranslokázy (CACTD).

Metodika: V období od 1. ledna 2002 až do 31. prosince 2012 bylo vyšetřeno 1 179 136 novorozenců na PKU/HPA a CH; koncentrace fenylalaninu byla měřena různými metodami a od X/2009 jednotně tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS); koncentrace tyreotropinu byla zjišťována pomocí fluoroimunoeseje (FIA). U 752 922 novorozenců byla změněna koncentrace 17-hydroxyprogesteronu pomocí FIA. U 367 114 dětí byl změřen imunoreaktivní trypsin (IRT) pomocí FIA a u 1,05 % novorozenců s nejvyšším IRT bylo vyšetřeno v prvotních SKK 32 a později 50 nejčastějších mutací v genu *CFTR* s cílem minimalizovat falešnou pozitivitu. U 362 653 novorozenců byly analyzovány metabolity pro záchyt dalších 9 dědičných metabolických poruch pomocí MS/MS.

Výsledky: Celkem bylo novorozeneckým screeninem zachyceno 646 pacientů s následně potvrzenou diagnózou. Screeningové prevalence jednotlivých nemocí byly následující CH 1:3562; CAH 1:12 343; CF 1:7060; PKU/HPA 1:7234; MCADD 1:17 269; LCHADD 1:51 808; VLCADD 1:90 663; GA I 1:120 884; MSUD a IVA shodně

1:181 327. Screeningem dosud nebyl zachycen žádný novorozenec s CPTD I, II a CACTD. Efektivita screeningového programu v ČR se zvyšovala, kumulativní četnost záchytů narůstala z 1:2701 v letech 2002–2005 přes 1:2072 v letech 2007–2008 až na 1:1138 po zásadním rozšíření novorozeneckého screeningu (NS) v roce 2009. Četnost falešné pozitivivity (FPR) činila 0,540 % , z toho 74 % reprezentuje NS CAH.

Závěr: NS je účinný nástroj sekundární prevence vzácných onemocnění s účinnou léčbou. Pro optimalizaci programu se zavádějí druhostupňová vyšetření u malého množství vzorků s cílem snížit falešnou pozitivitu a hledají se možnosti rozšíření spektra screenovaných chorob.

KLÍČOVÁ SLOVA

novorozenecký screening, suchá kapka krve, prevalence, vzácná onemocnění, kongenitální hypotyreóza, kongenitální adrenální hyperplazie, cystická fibróza, fenylketonurie, dědičné metabolické poruchy

SUMMARY

The results of expanded newborn screening in the Czech Republic

The nationwide newborn screening (NBS) using dried blood spots (DBS) was started in 1975 for phenylketonuria/hyperphenylalaninemia (PKU/HPA); in 1985 for congenital hypothyroidism (CH); in 2006 for congenital adrenal hyperplasia (CAH) and in X/2009 screening for cystic fibrosis (CF) and 9 inherited metabolic diseases – maple syrup urine disease (MSUD), glutaric aciduria type I (GA I), isovaleric aciduria (IVA), medium chain acyl-CoA, long chain 3-hydroxyacyl-CoA and very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD, LCHADD and VLCADD), carnitine palmitoyltransferase I and II deficiency (CPTD I and II) and carnitine-acylcarnitine translocase deficiency (CACTD) was mandated.

Methods: From 1st January 2002 through 31st December 2012 a total of 1 179,136 newborns were screened for PKU/HPA and CH; phenylalanine was measured by different methods, since X/2009 solely by tandem mass spectrometry (MS/MS); the levels of thyrotropin were measured by fluoroimmunoassay (FIA). The levels of 17-hydroxyprogesterone concentrations were determined in 752,922 newborns by FIA. The level of immunoreactive trypsinogen (IRT) was measured in 367,114 newborns by FIA and the *CFTR* gene (at first 32, later 50 most common mutations) was analysed in original DBS in 1.05% of newborns with the highest IRT levels to minimize false positive results. The spectrum of metabolites for 9 expanded inborn errors of metabolism was analysed in 362,653 newborns by MS/MS.

Results: NS detected in total 646 patients with subsequently confirmed diagnosis. Screening prevalence were as follows PKU/HPA 1:7,234; CH 1:3,562; CAH 1:12,343; CF 1:7,060; MCADD 1:17,269; LCHADD 1:51,808; VLCADD 1:90,663; GA I 1:120,884; MSUD and IVA both 1:181,327. No case of CPTD I and CPTDII/CACTD was detected. Efficacy of NBS increased with the expansion of diseases in the programme: detection rate rose from 1:2,701 in 2002–2005 over 1:2,072 in 2007–2008 to 1:1,138 after last expansion of NBS in 2009. False positive rate (FPR) was 0.540%, of which 74% represent results of CAH screening.

Conclusion: NBS is an effective approach for presymptomatic detection of serious rare diseases. Further optimization is a subject of current research including the introduction of additional analytical tests (second tiers) to reduce FPR and by further expanding of screened disorders.

KEY WORDS

newborn screening, dried blood spot, prevalence, rare diseases, congenital hypothyroidism, congenital adrenal hyperplasia, cystic fibrosis, phenylketonuria, inherited metabolic disorders

V.

ÚVOD

Pod pojem novorozenecký screening (NS) lze v širším smyslu zahrnout jakékoliv preventivní vyšetření novorozence, v užším smyslu se tímto pojmem myslí systematické

vyhledávání léčebně ovlivnitelných chorob v jejich preklinickém stadiu. Laboratorní novorozenecký screening je založen na odběru kapilární krve na filtrační papírek (tzv. suché kapky krve, SKK) podle přesně dohodnutých pravidel všem novorozencům na definovaném

Tab. 1. Přehled novorozeneckých screeningových programů v 36 evropských státech.

Onemocnění	Počet evropských států provádějících novorozenecký screening (včetně pilotních studií)
PKU/HPA	32 neprovádí Černá Hora, Finsko, FYROM a Malta
CH	36
CAH	14 provádí Belgie, Bosna-Hercegovina, Bulharsko, ČR, Dánsko, Francie, Holandsko, Lucembursko, Německo, Rakousko, Slovensko, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko
MCADD	13 provádí Belgie, ČR, Dánsko, Holandsko, Island, Lucembursko, Německo, Maďarsko, Portugalsko, Rakousko, Španělsko, Švýcarsko a Velká Británie
CF	10 provádí ČR, Francie, Holandsko, Itálie (ne všechny regiony), Německo, Polsko, Rakousko, Slovensko, Španělsko a Velká Británie
GAL	10 provádí Belgie, Holandsko, Irsko, Německo, Maďarsko, Rakousko, Řecko, Španělsko, Švédsko a Švýcarsko
BD	10 provádí Belgie, Holandsko, Dánsko, Německo, Maďarsko, Rakousko, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko a Turecko
hemoglobinopatie	5 provádí Francie, Holandsko, Malta, Španělsko a Velká Británie
rozšířené DMP	11 provádí Belgie, ČR, Dánsko, Holandsko, Irsko, Island, Německo, Maďarsko, Portugalsko, Rakousko a Španělsko

Vysvětlivky: PKU/HPA = fenylketonurie nebo hyperfenylalaninemie; CH = kongenitální hypotyreóza; MCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; CAH = kongenitální adrenální hyperplazie, resp. deficit 21-hydroxylázy; CF = cystická fibróza; GAL = galaktosémie; BD = deficit biotinidázy; rozšířené DMP = další dědičné metabolické poruchy (kromě PKU a MCADD), spektra a počty vyšetřovaných rozšířených DMP se v jednotlivých státech liší.

Upraveno podle [2], 28 členských států Evropské unie + Bosna a Hercegovina, Černá Hora, FYROM (bývalá jugoslávská republika Makedonie), Island, Norsko, Srbsko, Švýcarsko vč. Lichtenštejnska, Turecko). V Albánii není NS prováděn. Nedostupné údaje: Bělorusko, Kosovo, Moldavsko, Rusko a Ukrajina.

území (většinou celostátně). SKK se následně vyšetřují v centrálních laboratořích. Tento typ NS je předmětem předkládaného sdělení.

Zakladatelem NS je profesor Robert Guthrie z univerzity v Buffalu ve státě New York, USA. V roce 1963 vyvinul a následně i zavedl do praxe jednoduchou, levnou a spolehlivou semikvantitativní metodu měření koncentrace fenylalaninu (založenou na principu inhibice růstu bakterií) pro NS fenylketonurie [1]. Od té doby se spektrum vyhledávaných chorob stále rozšiřuje. Tabulka 1 uvádí poslední známá data z let 2010/2011 o NS prováděných v Evropě [2]. V jednotlivých státech USA je počet screenovaných chorob v současné době mnohem vyšší, ve většině států mezi 40–50 s maximem 54 nemocí v Minnesotě [3]. Odborné zastřešení NS poskytuje mezinárodní společnost ISNS, International Society for Neonatal Screening, <http://www.isns-neoscreening.org/>, která

organizuje pravidelné celosvětové a regionální (kontinentální) kongresy. Např. 6. evropský kongres této organizace se konal v roce 2009 v Praze a bylo mu věnováno samostatné číslo Česko-slovenské pediatrie [4].

Od počátku 70. let minulého století se datují pilotní studie NS fenylketonurie (PKU) v naší republice [5, 6], který se v roce 1975 stal naším prvním, pravidelně prováděným celostátním screeningovým programem. Jako druhý v pořadí byl v roce 1985 zaveden NS kongenitální hypotyreózy (CH) [7]. Dalším rozšířením bylo přidání kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) v roce 2006 [8]. K poslednímu významnému rozšíření NS v ČR došlo v říjnu 2009, kdy do spektra vyhledávaných onemocnění byla přidána cystická fibróza (CF) [9] a 9 dalších dědičných metabolických poruch [10, 11, 12]. Tabulka 2 shrnuje v současnosti vyhledávaná onemocnění v ČR a hlavní

Tab. 2. Onemocnění vyhledávaná novorozeneckým screeningem v ČR.

Onemocnění	Od	Analyt	Smysl = efekt včasného záchytu
PKU/HPA	1975	Phe, Phe/Tyr	Speciální dieta s nízkým obsahem fenylalaninu zabrání nevratnému poškození CNS
CH	1985	TSH	Substituce hormonů štítné žlázy zabrání nevratnému poškození CNS.
CAH	2006	17OHP	Substituce glukó- a mineralokortikoidy zabrání život ohrožující solné krizi a u lehčích forem zabrání předčasné pubertě a ztrátě dospělé výšky
CF	říjen 2009	IRT, CFTR	Komplexní léčba zahájena do 2 měsíců věku zlepší průběh a prognózu
MCADD		Profil acyl-karnitinů	Režimová a dietní opatření s cílem prevence hypoglykemií zabrání život ohrožujícímu selhání energetického metabolismu a poškození CNS
LCHADD			
VLCADD			
CPTD I			
CPTD II			
CACTD			
MSUD		Val/Leu/Ileu	Speciální dieta s nízkým obsahem větvených aminokyselin sníží riziko život ohrožujícího metabolického rozvratu a poškození CNS
GA I		Glutaryl- karnitin	Speciální dieta s nízkým obsahem lysinu sníží riziko život ohrožujícího metabolického rozvratu a poškození CNS
IVA	Izovaleryl-karnitin	Speciální dieta s nízkým obsahem leucinu a substituce glycinem sníží riziko život ohrožujícího metabolického rozvratu a poškození CNS	

Vysvětlivky: PKU/HPA = fenylketonurie nebo hyperfenylalaninémie; CH = kongenitální hypotyreóza; CAH = kongenitální adrenální hyperplazie, resp. deficit 21-hydroxylázy; CF = cystická fibróza; MCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; LCHADD = deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem; VLCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem; CPTD I a II = deficit karnitinpalmitoyltransferázy I a II; CACTD = deficit karnitinacylkarnitintranslokázy; MSUD = leucinóza (nemoc javorového sirupu); GA I = glutarová acidurie typ I; IVA = izovalerová acidurie; Phe = fenylalanin, Tyr = tyrosin; TSH = tyreotropin; 17OHP = 17-hydroxyprogesteron; IRT = imunoreaktivní trypsinogen; CFTR = gen pro cystickou fibrózu; Val = valin; Leu = leucin; Ileu = isoleucin

důvod, proč je potřebná jejich včasná detekce. Všechna onemocnění vyhledávaná pomocí NS splňují definici vzácných onemocnění („rare disease“, RD, prevalence <1:2000), proto se NS stává modelovým nástrojem diagnostiky a léčby RD a zásadním způsobem může pomoci naplňovat směrnice Evropské unie a usnesení vlády ČR pro RD [13, 14].

Systém NS nespočívá pouze v laboratorní analýze, ale musí zajišťovat i bezchybnou logistiku preanalytické části (informovaný souhlas rodičů; způsob, podmínky, časování a event. opakování odběrů suché kapky krve), navazující analytické části (jaké analyty, jakým způsobem a kde jsou měřeny, nastavení hranice mezi negativitou a pozitivitou – „cut-off“) a konečně postanalytické části (postupy screeningových laboratoří při pozitivním či nejasném nález, návaznost na klinická pra-

coviště ověřující podezření na nemoc podle obecně přijatých definic a konečně i zabezpečení dlouhodobé léčby a sledování pacientů). Celý program se periodicky hodnotí, průběžně se zpracovávají data ze screeningů a nastavují či upravují se pravidla. Sběr dat a hodnocení programu zajišťuje Koordinační centrum pro novorozenecký screening ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze (KCNS) ustanovené Ministerstvem zdravotnictví ČR, které sdružuje všechny laboratoře provádějící NS a zástupce MZ ČR. Způsob provádění NS v ČR je podrobně definován „Metodickým návodem k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningů a následné péče“, který se v několikaletých intervalech aktualizuje podle dosaženého stupně medicínského poznání, rozvoje NS a celospolečenských podmínek. Metodický návod se publikuje

ve Věstníku Ministerstva zdravotnictví ČR. Poslední aktualizace byla zveřejněna v srpnu 2009 [15]. Přesné znění Metodického návodu a řadu dalších informací, sdělení a odpovědí KCNS pro odbornou i laickou veřejnost lze nalézt na webových stránkách <http://www.novorozeneckyscreening.cz>.

Smyslem tohoto sdělení je vyhodnotit výsledky NS v ČR ve vztahu k jeho postupnému rozšiřování.

SOUBOR, METODIKA

Sledované období 11 let mezi 1. 1. 2002 až 31. 12. 2012 zahrnuje všechny fáze postupného rozšiřování NS, tak, aby bylo možno porovnat kumulativní četnost zachycených pacientů (tzv. „detection rate“) v jednotlivých fázích rozšiřování. Celkem bylo vyšetřeno 1 179 136 novorozenců na hyperfenylalaninemii (PKU/HPA) a CH; koncentrace fenylalaninu byla měřena původní „Guthrieho“ bakteriálně inhibiční metodou, později enzymoimunoesejí (Quantase[®], firmy Biorad) či chromatograficky; od X/2009 se vyšetřuje jednotně tandemovou hmotnostní spektrometrií (kity MassChrom[®] Reagent firmy Chromsystems; MS/MS přístroje API 2000[™], API 3200[™] a API 4000[™] firmy AB Sciex); koncentrace tyreotropinu byla stanovena pomocí fluoroimunoeseje (FIA; Delfia[®] a AutoDelfia[®] firmy Perkin-Elmer). U 752 922 novorozenců byla změřena koncentrace 17-hydroxyprogesteronu v SKK pomocí FIA. U 367 114 dětí byl změřen imunoreaktivní trypsin (IRT) pomocí FIA a u 3859 (1,05 %) z nich s nejvyšším IRT byla provedena analýza CFTR genu (bylo vyšetřováno 32, později 50 nejčastějších mutací pomocí esejí Elucigene CF-EU1[™]/Elucigene CF-EU2[™] firmy Gen-Probe) v originálních SKK, ve kterých byla zjištěna vysoká koncentrace IRT. Analýza CFTR genu ve druhém stupni NS CF má jediný cíl a výstup – minimalizaci falešně pozitivních výsledků. U 362 653 novorozenců byly analyzovány metabolity pro záchyt dalších

9 dědičných metabolických poruch pomocí výše uvedené MS/MS techniky.

V případě zjištění hodnoty analytu pod „cut-off“ hodnotou byl výsledek NS považován za negativní a proband nebyl dále vyšetřován. Při pozitivní hodnotě analytu byl proband předán ke confirmaci diagnózy, léčbě a dalšímu sledování příslušnému klinickému pracovišti. Při nejasném výsledku v tzv. „šedé zóně“, kdy hodnota analytu byla mezi „cut-off“ a jasnou pozitivitou, byl odběr SKK na filtračním papíře opakován. Počet opakovaných odběrů SKK s konečným negativním výsledkem v opakovaném odběru, tj. s poklesem hodnoty analytu pod „cut-off“ se vyjadřuje v procentech jako četnost falešné positivity („false positivity rate“ – FPR). Zdrojem dat o počtu detekovaných i nedetekovaných pacientů byla hlášení klinických pracovišť screeningovým laboratořím. Diagnóza byla opřena o diagnostický standard platný v dané době. Uvedení konkrétních hodnot analytů pro „cut-off“ a pozitivitu, confirmaci diagnóz podle domluvených definic a i uvedení léčby a follow-up přesahuje rozsah a smysl tohoto sdělení, zájemce odkazujeme na sekci „Pro odbornou veřejnost“ webových stránek <http://www.novorozeneckyscreening.cz>.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky NS v ČR v průběhu postupného rozšiřování spektra vyhledávaných onemocnění ve sledovaném období ukazuje tabulka 3.

Zlepšující se schopnost celého systému NS v ČR detekovat pacienty s vrozeným či dědičným vzácným onemocněním dokládá kumulativní četnost záchytů, která narůstala z 1:2701 v letech 2002–2005 přes 1:2072 v letech 2007–2008 po rozšíření o CAH až na 1:1138 po posledním rozšíření NS v roce 2009 o CF a dalších 9 DMP. Efektivita screeningového programu se tak mezi lety 2005 a 2012 zvýšila více než 2,5krát a dosahuje parametrů srovnatelných s jinými evropskými zeměmi.

Tab. 3. Výsledky novorozeneckého screeningu v ČR v období 1. 1. 2002 – 31. 12. 2012.

Onemocnění	Sledované období od - do 31. 12. 2012	Vyšetřených novorozenců (n)	Konfirmované diagnózy (n)	Screeningová prevalence	Kumulativní četnost záchytů	Známa falešná negativita (n)	FPR <2500 g (%)	FPR ≥2500 g (%)	FPR celková (%)
PKU/HPA	1. 1. 2002 -	1179 136	163	1:7234	1:2701	-	0,203	0,008	0,026
CH			331	1:3562		-	-	-	0,016
CAH	1. 2. 2006 -	752 922	61	1:12 343	1:2072	2	2,746	0,207	0,400
CF	1. 10. 2009 -	362 653	52	1:7060	1:1138	6	-	-	0,024
MCADD			21	1:17 269		-	0,008	0,001	0,002
LCHADD			7	1:51 808		-	0	0,001	0,001
VLCADD			4	1:90 663		-	0,035	0,014	0,015
CPTD I			0	-		-	0,102	0,001	0,009
CPTD II			0	-		-	0	0	0
CACTD			0	-		-	-	-	-
MSUD			2	1:181 327		1	0,187	0,007	0,022
GA I			3	1:120 884		-	0,011	0,004	0,005
IVA			2	1:181 327		-	0,129	0,010	0,020

Vysvětlivky: PKU/HPA = fenylketonurie nebo hyperfenylalaninemie; CH = kongenitální hypotyreóza; CAH = kongenitální adrenální hyperplazie resp. deficit 21-hydroxylázy; CF = cystická fibróza; MCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; LCHADD = deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem; VLCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem; CPTD I a II = deficit karnitinpalmitoyltransferázy I a II; CACTD = deficit karnitinacylkarnitintranslokázy; MSUD = leucinóza (nemoc javorového sirupu); GA I = glutarová acidurie typ I; IVA = izovalerová acidurie; FPR = „false positivity rate“, četnost opakovaní odběru screeningu s konečným negativním výsledkem pro předchozí nejasný nále v prvním pravidelném odběru mezi 48. a 72. hodinou života, počítáno v období 1. 1. 2010 – 31. 12. 2012

Odvrácenou stranou dosažené vysoké detekční schopnosti systému s větším počtem vyhledávaných nemocí je však nárůst počtu opakování odběru SKK na filtrační papírek pro nejasný první výsledek. U většiny novorozenců se při opakovaném odběru zjistí fyziologické koncentrace analytů a původní abnormální nále se tak stává falešně pozitivním. Kumulativní hodnota FPR v období mezi 1. 1. 2010 až 31. 12. 2012 dosáhla 0,540 % pro všechny vyšetřené novorozence bez rozdílu porodní hmotnosti. Ve skupině novorozenců s porodní hmotností 2500 g a více činila 0,253 % a u novorozenců s nízkou porodní hmotností 3,421 %. Falešná pozitivita přináší jistou zátěž pro zdravou část populace a podle některých studií může zvyšovat stres u rodičů (viz článek Franková a kol. v tomto čísle, s. 000-000). FPR vzrůstá s klesající

porodní hmotností (resp. zralostí). Je pravdou, že ve skupině nezralých novorozenců je zátěž a stigmatizace opakovaným odběrem SKK významně menší, protože se většinou jedná o děti na intenzivní péči, které jsou vyšetřovány i z jiných důvodů, ale snižování FPR je pro systém NS výzvou a cílem. Z tabulky 3 je zřejmé, že na falešné pozitivitě se z největší části (74 %) podílí NS CAH. Ostatní screenovaná onemocnění mají FPR významně nižší (např. všech 10 DMP jen okolo 0,1 %). Efektivní cestou ke snižování FPR je zavádění druhostupňových analytických metod, které se provádějí přímo v těch originálních SKK, ve kterých byl zjištěn zvýšený primární analyt. V případě CAH byl zkoušen průkaz alespoň jedné funkční kopie genu CYP21A2 pro 21-hydroxylázu. Tento přístup se nejeví použitelný pro běžnou praxi z důvodu velké

Tab. 4. Onemocnění doporučená k vyhledávání pomocí novorozeneckého screeningu v USA, podle [22].

Skupina onemocnění	Základní (30 onemocnění)	Doplňková (25 onemocnění)
Organické acidurie/acidemie	IVA; GA I; HMGD; MCD; MUT; Cb1 A,B; 3MCC; PROP; BKT	Cb1 C,D; 2M3HBA; IBG; 2MBG; 3MGA; MAL
Poruchy oxidace mastných kyselin	MCADD; VLCADD; LCHADD; TFP; CUD	M/SCHADD; SCADD; MCKATD; GA II; CPTD I; CPTD II; CACTD; DE REDUCT
Poruchy metabolismu aminokyselin	PKU; MSUD; HCY; TYR I; ASA; CIT	HPA; TYR II; BIOPT (BS); TYR III; ARG; BIOPT (REG); MET; CIT II
Hemoglobinopatie	SCA; Hb S/Th; Hb S/C	Varietní Hb včetně HbE
Jiná onemocnění	CH; BD; CAH; GAL; HEAR; CF; SCID	GALE; GALK

Vysvětlivky: IVA = izovalerová acidurie; GA I = glutarová acidurie I. typu; HMG = deficit lyázy 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; MCD = mnohočetný deficit karboxyláz; MUT = deficit metylmalonyl-CoA mutázy; Cb1 A ,B = metylmalonová acidémie forma Cb1a a B; 3MCC = deficit karboxylázy 3-methylcrotonyl-CoA; PROP = propionová acidurie; BKT = deficit β-ketothiolázy; MCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; VLCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem; LCHADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem; TFP = deficit trifunkčního mitochondriálního proteinu; CUD = defekt vychytávání karnitinu; PKU = fenylketonurie; MSUD = leucinóza (nemoc javorového sirupu); HCY = homocystinurie; TYR I = tyrosinémie I. typu; ASA = argininsukcinátová acidurie; CIT = citrulinémie I. typu; SCA = srpkovitá anemie; Hb S/Th = S-β thalasémie; Hb S/C = kombinovaná hemoglobinopatie S a C; CH = kongenitální hypotyreóza; BD = deficit biotinidázy; CAH = kongenitální adrenální hyperplazie resp. deficit 21-hydroxylázy; GAL = galaktosémie; HEAR = poruchy sluchu; CF = cystická fibróza; SCID = syndrom těžké kombinované imunodeficiency (přidan do panelu až v roce 2010); Cb1 C, D = metylmalonová acidémie forma Cb1 C a D; 2M3HBA = 2-metyl-3-hydroxybutyrátová acidurie; IBG = deficit dehydrogenázy izobutyryl-CoA; 2MBG = deficit dehydrogenázy 2-metylbutyryl-CoA; 3MGA = 3-metylglutakonová acidurie; MAL = malonová acidemie; M/SCHADD = deficit dehydrogenázy hydroxyacyl-CoA mastných kyselin se středně dlouhým a krátkým řetězcem; SCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s krátkým řetězcem; MCKATD = deficit thiolázy 3-ketoacyl-CoA mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; GA II = glutarová acidurie II. typu; CPTD I = deficit karnitin palmitoyltransferázy I; CPTD II = deficit karnitin palmitoyltransferázy II; CACTD = deficit karnitin-acylkarnitintranslokázy; DE REDUCT = deficit reduktázy dienoyl-CoA; HPA = non PKU hyperfenylalaninémie; TYR II = tyrosinémie II. typu; BIOPT (BS) = defekt syntézy biopterinu; TYR III = tyrosinémie III. typu; ARG = argininémie; BIOPT (REG) = defekt regenerace biopterinu; MET = hypermethioninémie; CIT II = citrulinémie II. typu; GALE = deficit epimerázy galaktózy; GALK = deficit galaktokinázy

Tab. 5. Onemocnění doporučená k vyhledávání pomocí novorozeneckého screeningu v Evropě, podle [23].

Základní skupina (metodika screeningu není složitá a zdravotní efekt je prokázán)	Kandidátní skupina (19 onemocnění, u kterých NS zatím představuje více výzev a nejasností ve vztahu ke kritériím dle Wilsona a Jungnera)
7 onemocnění s relativně vysokou prevalencí	3 onemocnění s nižší prevalencí
PKU/HPA, CH, CAH, CF, MCADD, Hb S/Th, Hb S/C	MSUD, GA I, GAL
	BD, CPTD II, CACTD, GA II, HMGD, HCSD, HCY, IVA, BKT, LCHADD, LSD, 3MCC, TYR I TYR II a III, VLCADD, deficit vitamínu B12, SCID, CMV

Vysvětlivky: PKU = fenylketonurie resp. hyperfenylalaninémie; CH = kongenitální hypotyreóza; CAH = kongenitální adrenální hyperplazie resp. deficit 21-hydroxylázy; CF = cystická fibróza; MCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; Hb S/Th = S-β thalasémie; Hb S/C = kombinovaná hemoglobinopatie S a C; MSUD = leucinóza (nemoc javorového sirupu); GA I = glutarová acidurie I. typu; GAL = galaktosémie; BD = deficit biotinidázy; CPTD II = deficit karnitin palmitoyltransferázy II; CACTD = deficit karnitin-acylkarnitintranslokázy; GA II = glutarová acidurie II. typu; HMGD = deficit lyázy 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; HCSD = deficit syntézy holokarboxylázy; HCY = homocystinurie; IVA = izovalerová acidurie; BKT = deficit β-ketothiolázy; LCHADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem; LSD = lyzozomální střeďadavé choroby (několik jednotek, např. Pompe, Krabbe, Fabry); 3MCC = deficit karboxylázy 3-methylcrotonyl-CoA; TYR I = tyrosinémie I. typu; TYR II a III = tyrosinémie II. a III. typu; VLCADD = deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem; SCID = syndrom těžké kombinované imunodeficiency; CMV = vrozená infekce virem CMV

pracnosti a finančních nákladů [16]. Slibné je profilování steroidů pomocí kapalinové chromatografie s následnou analýzou pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS), pilotní studie probíhají ve světě [17] i v ČR, zavedení této metody jako druhostupňové metody by mohlo podle pilotní studie v ČR snížit FPR pro CAH o cca 80–90 %.

V každém screeningovém programu existují také případy falešné negativity (FN), kdy pacienti (většinou s mírnějšími formami nemoci) nejsou screeningem zachyceni. Při NS CAH byly v průběhu sledovaného období zaznamenány dva případy, které unikly detekci NS. V jednom případě se jednalo o probanda s klinickým podezřením na CAH a léčeného korti-

koidy již před odběrem SKK, tento případ tedy není faktickou FN, ale ve druhém případě se jednalo o skutečnou „biologickou“ FN u dívky s genotypem svědčícím pro solnou poruchu. Kauza byla podrobně analyzována a publikována [8]. Skutečná novorozenecká prevalence CAH po započítání FN činila 1:11 951. Detekci NS unikl i jeden pacient s MSUD, protože při konfirmačním vyšetření standardními technikami nebyly zjištěny zvýšené koncentrace diagnosticky významného analytu – allosoleucinu, reálná novorozenecká prevalence pak vzroste na 1:120 884. Během NS CF bylo ve sledovaném období zaznamenáno 6 dětí, které unikly záchytu. Ve 3 případech se jednalo o pacienty, kteří se v novorozeneckém věku demonstrovali mekoniovým ileem (MI). Nejednalo se tedy o faktický únik diagnózy a nižší koncentrace IRT v případě MI jsou známé [18]. V dalším jednom případě se jednalo o skutečnou „biologickou“ FN s IRT pod „cut-off“ a u dvou novorozenců se jednalo o „analytickou“ FN, protože probandi měli dvě vzácné mutace, které nejsou ve spektru vyšetřovaných. Skutečná prevalence CF v naší kohortě novorozenců po započítání FN činila 1:6330. Populační riziko CF po započítání preimplantační a prenatalní diagnostiky je však vyšší – cca 1:4500. NS CF lze významně zefektivnit pomocí dalšího analytického mezistupně – měření proteinu asociovaného s pankreatitidou [19].

Ze sledovaného období nemáme informaci o FN PKU/HPA. Screeningová prevalence PKU/HPA v období 1. 1. 2010 – 31. 12. 2012 byla vyšší (1:5867) než za celé sledované období (1:7234). Důvodem může být jednak fluktuace v důsledku relativně malého počtu vyšetřených novorozenců, ale také snížení hranice „cut-off“ pro fenylalanin z 240 na 120 $\mu\text{mol/l}$ a zvýšenému záchytu lehčích forem HPA.

Sekundární non-PKU hyperfenylalaninémie způsobené poruchami metabolismu pterinů nejsou zahrnuty – v celém sledovaném období byl detekován 1 pacient s deficitem tetrahydrobiopterinu.

S technologickým pokrokem se rozšiřují analytické možnosti detekce stále většího počtu onemocnění ze SKK. Rozhodování, která onemocnění zahrnout do novorozeneckého screeningového programu, se stává stále složitější. V historických počátcích NS Wilson a Jungner stanovili rozhodovací kritéria o zařazování onemocnění do NS [20, 21]. Tato kritéria nebyla zpochybněna, ale jsou relativizována, např. hranice prevalence nebo ekonomická hranice (v ČR jsou náklady zdravotní pojišťovny na současný NS u jednoho novorozence 750 Kč). V diskusích se objevují i nová kritéria, jako např. ušetření jedince diagnostickému martyriu u vzácných chorob nebo informovaná reprodukce s možností prenatalního vyšetření či preimplantační diagnostiky u neléčitelných chorob.

S rozšiřováním NS se rozšiřují problémy nejen odborné, ale i etické, ekonomické a politické. Autoritativní stanovisko zaujala Americká společnost lékařské genetiky (ACMG), která po rozsáhlé studii a diskusi publikovala [22] seznam 55 chorob vhodných pro NS, které rozdělila na skupinu základní a na skupinu doplňkovou. Seznam, v USA chápán jako závazný, je uveden v tabulce 4 a postupně se v jednotlivých státech zavádí. Evropská síť odborníků v novorozeneckém screeningu (EUNENBS, European Network of Experts on Newborn Screening) provedla v letech 2010/2011 dotazníkovou studii a vydala [23] podobný seznam 26 onemocnění, které považuje za vhodné k zařazení do spektra NS v evropských státech. Seznam rozdělila na skupinu základní (potřebnou) s vysokou prevalencí, základní s nízkou prevalencí a skupinu kandidátní – viz tabulku 5.

Evropský panel je v současnosti vnímán méně závazně než americký a má charakter spíše „doporučení ke zvážení“. V ČR v současné době probíhá pilotní studie k rozšíření spektra dědičných metabolických poruch pomocí MS/MS a metodicky se připravuje studie NS těžké kombinované imunodeficiencie (SCID) [24].

ZÁVĚR

Rozšíření novorozeneckého screeningového programu v ČR zásadním způsobem zvýšilo efektivitu presymptomatického vyhledávání pacientů, neboť téměř dvaapůlkrát zvýšilo zachyt novorozenců s některou z vyhledávaných nemocí. Úroveň novorozeneckého screeningu v ČR odpovídá nyní standardu vyspělých států Evropské unie. NS v ČR je účinným nástrojem zkvalitnění péče o pacienty se vzácnými onemocněními a je vzorovým příkladem zlepšení přístupu zdravotnického systému k těmto pacientům. Další optimalizace systému NS jsou potřebné a jsou předmětem výzkumu – v současné době jsou vyvíjené druhostupňové metody s cílem snížit falešnou pozitivitu a hledají se možnosti k rozšíření spektra screenovaných chorob.

Práce vznikla za podpory: PRVOUK P31 pro FV¹ a P24 pro VK²; IGA MZ ČR NT/12213-3 a MZ ČR RVO-VFN64165/2012 pro VK²; MZOFNM2005, CZ.2.16/3.1.00/24022 a 00064203 pro MM⁵.

LITERATURA

- Guthrie R, Susi A.** A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338–343.
- Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, et al.** Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1 – From blood spot to screening result. *J Inher Metab Dis* 2012; 35 (4): 603–611.
- Webové stránky NNSGRC (National Newborn Screening and Genetics Resource Center), <http://genes-r-us.uthscsa.edu/sites/genes-r-us/files/>.
- Abstracts of the 6th European Regional Meeting in Neonatal Screening. *Čes-slov Pediat* 2009; 4: 159–220.
- Hyánek J, Hoza J, Vinsová N, et al.** Výsledky hromadného screeningu vrozených metabolických poruch u novorozenců. *Čs Gynek* 1972; 4: 208–209.
- Bleňová B, Pažoutová M, Bloudková D, et al.** Zhodnocení screeningu fenylketonurie za šest let trvání laboratoře. *Čes-slov Pediat* 1976; 7: 399–400.
- Hníková O, Kračmar P, Zelenka Z, et al.** Screening of congenital hypothyroidism in newborns in Bohemia and Moravia. *Endocrinologia Experimentalis* 1989; 2: 117–123.
- Votava F, Novotna D, Kracmar P, et al.** Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. *Eur J Pediatr* 2012; 171 (6): 935–940.
- Balascakova M, Holubova A, Skalicka V, et al.** Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *J Cyst Fibros* 2009; 8 (3): 224–227.
- Chrastina P, Šťastná S, Myšková H, et al.** Tandemová hmotnostní spektrometrie – budoucnost novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch. *Čes-slov Pediat* 2003; 7: 464–467.
- Chrastina P, Kostalova E, Paulova H, et al.** Experience with screening by tandem mass spectrometry in the Czech Republic. The 5th European ISNS Congress in Newborn Screening, June 10–12th 2007, Reykjavík, Island, Abstracts book, p.41.
- Chrastina P, Bártil J, Horník P, et al.** LCHAD deficiency – the most frequent fatty acid oxidation disorder in newborn screening in the Czech Republic. *Čes-slov Pediat* 2009; 4: 175–176.
- Doporučení Rady Evropské unie o akci v oblasti vzácných onemocnění ze dne 8.6.2009. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2009:151:0007:0010:CS:PDF>.
- Usnesení vlády ČR č. 466 ze dne 14. 6. 2010 o Národní strategii pro vzácná onemocnění na léta 2010–2020. <http://www.vlada.cz/>.
- Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče. *Věstník Ministerstva zdravotnictví ČR* 2009; 6: 7–14.
- Malikova J, Votava F, Vrzalova Z, et al.** Genetic analysis of the *CYP21A2* gene in neonatal dried blood spots from children with transiently elevated 17-hydroxyprogesterone. *Clin Endocrinol* 2012; 77 (2): 187–194.
- Dhillon K, Ho T, Rich P, et al.** An automated method on

PŮVODNÍ PRÁCE

analysis of blood steroids using liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to population screening for congenital adrenal hyperplasia in newborns. *Clin Chim Acta* 2011; 412 (23-24): 2076-2084.

18. Calvin J, Hogg SL, McShane D, et al. Thirty-years of screening for cystic fibrosis in East Anglia. *Arch Dis Child* 2012; 97 (12): 1043-1047.

19. Krulisova V, Balascakova M, Skalicka V, et al. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur J Pediatr* 2012; 1 (8): 1223-1229.

20. Wilson JMG, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. World Health Organisation. *Public Health Papers* 1968; 34: 11.

21. Votava F, Strnadová KA. Novorozenecký screening v České republice a v Evropě. *Čes-slov Pediatr* 2008; 63 (2): 96-105.

22. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system – executive summary. *Pediatrics* 2006; 117 (5 Pt 2): S296-S307.

23. Burgard P, Rupp K, Linder M, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 2 – From screening laboratory results to treatment, follow-up and quality assurance. *J Inher Metab Dis* 2012; 35 (4): 613-625.

24. Svaton M, Sediva A, Mejstrikova E, et al. Differential diagnostics of immunodeficiency using antigen receptor excision circles in neonatal screening cards and in postnatal peripheral blood. The 8th European Regional Meeting of International Society of Neonatal Screening, Hungary, Budapest. *Orvosi Hetilap* 2012; 42.

Došlo: 8. 1. 2014

Přijato: 14. 2. 2014

doc. MUDr. Felix Votava, Ph.D.

Klinika dětí a dorostu UK 3. lékařské fakulty
a FN Královské Vinohrady

Šrobárova 50

100 34 Praha 10

e-mail: votava@fnkv.cz

3.4.1. Úvod k publikaci

NS je účinný nástroj včasné diagnostiky závažných vzácných onemocnění s účinnou léčbou nebo sekundární prevencí. V době sepisování této dizertační práce je v České republice u všech novorozenců za definovaných podmínek rutinně vyšetřováno celkem 13 onemocnění. CF je součástí tohoto screeningového programu od roku 2009.

Cílem práce bylo zhodnotit efektivitu screeningového programu v České republice. Výsledky této práce byly publikovány jako původní článek v Česko-slovenské Pediatrii v roce 2014.

3.4.2. Výsledky a diskuze

V rámci NSCF bylo od jeho zavedení v roce 2009 do konce roku 2012 vyšetřeno celkem 367 114 novorozenců. Protokol IRT/DNA/IRT ve sledovaném období odhalil celkem 52 pacientů s klasickou formou CF vedoucí ke screeningové prevalenci CF 1 : 7 060 (52/367 114). Po započtení 6 známých případů falešné negativity byla skutečná prevalence CF v naší kohortě 1 : 6 330 (58/367 114).

Prevalence pozorovaná na výsledcích NSCF je výrazně nižší než prevalence cca 1 : 3 000 vycházející z dřívějších epidemiologických studií (Brunecký, 1972; Houštěk and Vávrová, 1969). Důvodem tohoto rozdílu může být existence dalších pacientů s CF, kteří nebyli screeningovým programem zachyceni. Dosud víme o 6 případech falešné negativity. K přesnému zhodnocení další případné falešné negativity je však nutný delší časový odstup od sledovaného období.

Velký vliv na prevalenci má plánované rodičovství párů s potvrzeným 25% rizikem CF u potomků. Tyto páry mohou podstoupit prenatální diagnostiku s možností ukončení gravidity v případě průkazu 2 patogenních mutací *CFTR* genu u plodu, mohou se rozhodnout podstoupit preimplantační diagnostiku nebo se vzdát možnosti mít (další) společné dítě. Alternativou pro páry s 25% rizikem CF u plodu je dále adopce či dárcovství gamet. Na CF u plodu párů s negativní rodinnou anamnézou CF může upozornit také zvýšená echogenita střevních kliček při ultrazvukovém vyšetření plodu ve 20. týdnu gravidity a/nebo velmi nízké koncentrace gama-glutamyl transferázy v plodové vodě (jde o náhodný nález v případech, kdy je amniocentéza indikována z jiného důvodu).

V období, které by ovlivnilo prevalenci CF u novorozenců v našem souboru, bylo na území České republiky uměle ukončeno 15 těhotenství z důvodu prenatální diagnózy CF u plodu (Gregor, 2014). Pokud by nedošlo k ukončení těchto těhotenství, prevalence CF by se zvýšila na 1 : 5 029 (73/367 129). Problematictější pro zhodnocení populačního rizika pro CF je zohlednění vlivu preimplantační diagnostiky, která je páry s 25 % rizikem CF u plodu čím dál více vyhledávána. Dosud však neexistují spolehlivá data v příslušných národních registrech, která by nám umožnila zhodnotit vliv preimplantační diagnostiky na prevalenci CF. Metody asistované reprodukce jsou převážně poskytovány nestátními zdravotnickými zařízeními, která nemají povinnost publikovat počet a typ provedených preimplantačních vyšetření (Macek, 2014).

Dále plánované rodičovství vedoucí k možnému rozhodnutí nemít (další) společné dítě či rozhodnutí o dárcovství gamet nebo adopci se mohou podílet na výsledné nižší prevalenci CF. Lze proto předpokládat, že populační riziko CF v České republice je vyšší než 1 : 5 029.

Významný je i počet Vietnamců [60 289 Vietnamců v roce 2010 ("Počet cizinců - Popis aktuálního vývoje," 2013)] žijících v České republice. Zvyšující se počet novorozenců a dětí vietnamské národnosti narozených v České republice může přispívat k celkově nižší prevalenci CF. Důvodem je obecně nízká prevalence CF u asijských populací odpovídající cca 1 : 35 000 (Rohlf's et al., 2011).

Prevalence zjištěná na základě NSCF se vztahuje výhradně ke klasickým formám CF - probandi s CF-SPID byli ze statistických analýz vyřazeni. Lze však předpokládat, že někteří probandi s CF-SPID postupem času dospějí ke klinickým obtížím odpovídajícím klasické formě CF. Tito pacienti mohli být v minulosti do prevalence započítáni, protože byly sledovány klinicky diagnostikované formy onemocnění ve všech věkových skupinách (Brunecký, 1972).

Můžeme také spekulovat, zda např. vyšší prevalence 1 : 2700 (Houštěk and Vávrová, 1969) stanovená ve Středních Čechách v 60. letech na základě sekčních nálezů nemohla být nadhodnocena v důsledku nesprávně stanovené diagnózy při všeobecné nedostupnosti potního testu. Rovněž regionální charakter této studie mohl vést k falešně vyšší prevalenci CF v bývalém Československu.

V některých oblastech mohla k vyšší prevalenci CF v minulosti také přispívat vyšší míra konsanguinity v obecné populaci, která obecně vede ke zvýšení výskytu autozomálně recesivních onemocnění v populaci.

Trend k nižší prevalenci zjištěné na základě výsledků NSCF v porovnání s dříve citovanými údaji je popisován také u ostatních evropských screeningových programů (Dodge et al., 1997; Massie et al., 2010; Scotet et al., 2012; Slieker et al., 2005). Důvody tohoto jevu jsou obdobné s výše diskutovanými příčinami, přesto bude nezbytné je dále analyzovat v rámci dlouhodobějšího časového horizontu.

Nejvhodnější způsob, který by nám umožnil vyjádřit se přesněji k populačnímu riziku klasické formy CF v České republice, je systematický celoplošný prekoncepční screening odhalující zdravé nosiče genu *CFTR* v populaci (Castellani and Massie, 2014), který však v České republice není prováděný.

3.4.3. Závěr

Efektivita screeningového programu se mezi lety 2005 - 2012 zvýšila v České republice více než 2,5 násobně a dosahuje parametrů srovnatelných s jinými evropskými zeměmi. Ke zlepšení této efektivity přispělo také zavedení NSCF.

Výhledově lze ještě očekávat zařazení dalších onemocnění do screeningového programu a nahrazení stávajícího protokolu IRT/DNA/IRT protokolem IRT/PAP/DNA, čímž se screeningový program v České republice bude dále zefektivňovat.

Následující publikace se zabývá problematikou uvedenou v bodě 5 mezi stanovenými cíli této dizertační práce (viz kapitola 2.).

3.5. Khrunin, A.V., Khokhrin, D.V., Filippova, I.N., Esko, T., Nelis, M., Bebyakova, N.A., Bolotova, N.L., Klovins, J., Nikitina-Zake, L., Rehnström, K., Ripatti, S., Schreiber, S., Franke, A., Macek, M., **Krulišová, V.**, Lubinski, J., Metspalu, A., Limborska, S.A., 2014. **A genome-wide analysis of populations from European Russia reveals a new pole of genetic diversity in northern Europe.** PLoS One. 8, e58552. doi: 10.1371/journal.pone.0058552. Epub 2013 Mar 7. **IF 3,73**

A Genome-Wide Analysis of Populations from European Russia Reveals a New Pole of Genetic Diversity in Northern Europe

Andrey V. Khrunin^{1*}, Denis V. Khokhrin¹, Irina N. Filippova¹, Tõnu Esko^{2,3,4}, Mari Nelis^{2,4,5}, Natalia A. Bebyakova⁶, Natalia L. Bolotova⁷, Janis Klovins⁸, Liene Nikitina-Zake⁸, Karola Rehnström^{9,10}, Samuli Ripatti^{9,10}, Stefan Schreiber¹¹, Andre Franke¹², Milan Macek¹³, Veronika Krulišová¹³, Jan Lubinski¹⁴, Andres Metspalu^{2,3,4}, Svetlana A. Limborska¹

1 Department of Molecular Bases of Human Genetics, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, **2** Estonian Genome Center, University of Tartu, Tartu, Estonia, **3** Department of Biotechnology, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Tartu, Estonia, **4** Estonian Biocentre, Tartu, Estonia, **5** Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland, **6** Department of Medical Biology and Genetics, Northern State Medical University, Archangelsk, Russia, **7** Department of Ecology and Zoology, Vologda State Pedagogical University, Vologda, Russia, **8** Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga, Latvia, **9** Institute for Molecular Medicine Finland, University of Helsinki, Helsinki, Finland, **10** Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, United Kingdom, **11** Department of Internal Medicine I, Popgen Biobank, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany, **12** Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts University, Kiel, Germany, **13** Department of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol and Second School of Medicine, Charles University Prague, Prague, Czech Republic, **14** Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

Abstract

Several studies examined the fine-scale structure of human genetic variation in Europe. However, the European sets analyzed represent mainly northern, western, central, and southern Europe. Here, we report an analysis of approximately 166,000 single nucleotide polymorphisms in populations from eastern (northeastern) Europe: four Russian populations from European Russia, and three populations from the northernmost Finno-Ugric ethnicities (Veps and two contrast groups of Komi people). These were compared with several reference European samples, including Finns, Estonians, Latvians, Poles, Czechs, Germans, and Italians. The results obtained demonstrated genetic heterogeneity of populations living in the region studied. Russians from the central part of European Russia (Tver, Murom, and Kursk) exhibited similarities with populations from central–eastern Europe, and were distant from Russian sample from the northern Russia (Mezen district, Archangelsk region). Komi samples, especially Izhemski Komi, were significantly different from all other populations studied. These can be considered as a second pole of genetic diversity in northern Europe (in addition to the pole, occupied by Finns), as they had a distinct ancestry component. Russians from Mezen and the Finnic-speaking Veps were positioned between the two poles, but differed from each other in the proportions of Komi and Finnic ancestries. In general, our data provides a more complete genetic map of Europe accounting for the diversity in its most eastern (northeastern) populations.

Citation: Khrunin AV, Khokhrin DV, Filippova IN, Esko T, Nelis M, et al. (2013) A Genome-Wide Analysis of Populations from European Russia Reveals a New Pole of Genetic Diversity in Northern Europe. PLoS ONE 8(3): e58552. doi:10.1371/journal.pone.0058552

Editor: Taras K. Oleksyk, University of Puerto Rico at Mayaguez, United States of America

Received: June 22, 2012; **Accepted:** February 6, 2013; **Published:** March 7, 2013

Copyright: © 2013 Khrunin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from the Programs 'Molecular and Cell Biology' and 'Fundamental Science for Medicine' of the Russian Academy of Sciences; the Federal Support of Leading Scientific Schools (grant 4294.2012.4); Russian Basic Research Foundation and The Ministry of education and science of Russian Federation (project 8805). EGCCUT received financing by (ENGAGE, OPENGENE), targeted financing from Estonian Government SF0180142508, Estonian Research Roadmap through Estonian Ministry of Education and Research (3.2.0304.11-0312), Center of Excellence in Genomics (EXCEGEN) and Development Fund of University of Tartu (SP1GVARENG). MM was supported by CZ.2.16/3.1.00/24022, Institutional support for UH Motol (0064203) and by NT/13770-4 from the Czech Ministry of Health. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: khrunin@img.ras.ru

Introduction

Identifying and understanding patterns of genetic variation within and between populations has long been the major focus of studies in human population genetics. Over the last decade, our ability to investigate population structure has been significantly enhanced by the advances in high-throughput genotyping technologies, as these allow simultaneous genotyping of hundreds of thousands of polymorphic markers. Compared with the previous methodology used in human population genetics, they enabled a new level of accuracy and power without the constraint

of having to use only a few loci as a proxy for the entire genome [1,2].

To date, there is a number of studies in which the fine-scale structure of human genetic variation have been examined at a global, continental, geographic region, single country, or even a subpopulation level [3–11]. European ancestry is the best studied of these aspects, for which the strongest genetic differentiation has been found between the north and south of the continent. The identified European population substructure correlated well with geography [4–6,12]. Although these studies included many population samples, they mainly represented northern, western, central, and southern Europe, while populations from Eastern

Europe, particularly from the European part of Russia, were less represented. The region is inhabited by ethnic Russians as well as different indigenous Finno-Ugric groups. In this study, we report an analysis of 165872 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in four Russian populations from European Russia, as well as in populations from two of the northernmost Finno-Ugric ethnic groups: Veps and Komi.

Russians are the largest ethnic group among the European populations: more than 80 million individuals live in an area that covers more than a third of continental Europe [13]. A recent study of genetic diversity in Europe performed by Nelis et al. [5] resulted in a genetic map of the continent that had a triangular structure and showed that Russians were forming one of its vertexes, together with Polish and Baltic samples. However, the Russian population included in that study originated from a single region of the European part of Russia (Tver), even though, in the context of existing genetic data (i.e., Y-chromosome and several autosomal polymorphisms) [14–16], European Russians could be subdivided into at least two groups: central–southern and northern Russians.

In order to study genetic structure of the European Russians in greater detail, we combined genome-wide SNP data from the Tver sample mentioned above with the genotypes of three new Russian samples from southern (Kursk), eastern (Murom), and northern (Mezen) regions of European Russia (Figure 1). Taking into account the well-documented impact of Finno-Ugric communities on the ethnogenesis of Russians [17], the genotypes of Veps and Komi were also included in our analysis. An additional reason of involving of Veps and Komi was the scarcity of the data on fine-scale genetic structure of Finno-Ugrians, which were mainly presented by Finns, Saami, Estonians and Hungarians [2,5,11]. The Finnic-speaking Veps (also called Vepsians or Ves in ancient times) are one of the oldest people of northern Europe that are still found in the northwest Russia (Figure 1). Veps were first mentioned in historical chronicles in the middle of the 6th century [18]. It has been proposed that Veps tribes inhabited the territories between Lakes Onega, Ladoga, and Beloe as early as the first half of the first millennium [18]. In contrast to the scarce Veps, the Komi (Komi-Zyryan) people, belonging to the different linguistic branch of the Finno-Ugric family, the Permian branch, is more numerous [13,19]. They occupy the northeastern-most location of Europe and consist of several ethnographic groups, formed during the 8th–19th centuries [19]. We included samples from two of the geographically and socioeconomically distant Komi groups: the Izhemski Komi and Priluzski Komi [20]. Finally, to place genetic variation into the geographical context of the continental Europe, we also included genotypic data from several reference populations (Figure 1). The obtained results demonstrated similarity between Russian populations from the central part of European Russia as well as their proximity to the populations from central–eastern Europe. They were also showed that genetic peculiarity of Russians from northern Russia was resulted from their admixture with Finno-Ugric populations among them a special impact should be attributed to Komi people. It was manifested by a distinct ancestry component differed Komi from all other European populations studied.

Materials and Methods

Samples

The used research protocols and forms of informed consent have been approved by the Ethic Commission of the Medico-Genetic Scientific Centre of the Russian Academy of Medical Sciences (an approval was signed by the Head of the Ethic

Commission, Prof. L.F. Kurilo). Written informed consent for participation was obtained from all subjects included in the study.

Blood samples were collected in EDTA-coated vacutainers after recording genealogical information and obtaining informed consent from each individual. Inclusion in the study required that all individuals belong to the native ethnic group of the region studied (i.e., they belonged to at least the third generation living in a particular geographic region), were healthy and unrelated. DNA was isolated from peripheral leukocytes according to standard techniques using proteinase K treatment and phenol–chloroform extraction [21]. Among the 615 individuals genotyped, 384 were Russians from Archangelsk (Mezen district, $n=96$), Vladimir (Murom district, $n=96$), Kursk (Kursk and Oktyabrsky districts, $n=96$), and Tver (Andreapol district, $n=96$) regions; 81 were Veps from the Babaevo district of Vologodsky region and 150 were Komi from the Izhemski (Izhemski Komi, $n=79$) and Priluzski (Priluzski Komi, $n=71$) districts of the Komi Republic.

DNA samples were genotyped using different versions of Illumina BeadChips: Human370CNV-Duo (Tver and Murom), Human660W-Quad (Kursk), and HumanOmniExpress (Mezen, Veps, and Komi), according to the manufacturer's protocol (Illumina Inc., USA). All samples were subjected to the same quality control procedures using SNP and Variation Suite v.7.4.0 software package (Golden Helix, Bozeman, MT, USA). Only SNPs from the 22 autosomal chromosomes with minor allele frequency $>1\%$, at Hardy–Weinberg equilibrium $P>0.00001$, and with genotyping success rate $>95\%$ were accepted. Cryptic relatedness was tested with the same software and from the detected relative pairs ($PI >0.2$), only one was chosen for the subsequent analyses at random. These steps resulted in the retention of 165,872 autosomal SNPs in 603 individuals. To investigate population genetic structure, we also included genotypes of several populations described by Nelis et al. [5]: Finns (samples from Helsinki ($n=100$) and Kuusamo ($n=84$), Estonians ($n=100$), Latvians ($n=95$), Poles ($n=48$), Czechs ($n=94$), and Germans ($n=100$). In addition, we used free genotype data from the HapMap 3 project (Italians from Tuscany ($n=88$) and Han Chinese from Beijing ($n=78$) [22], and as well as from the human genome diversity panel (HGDP, Russians ($n=25$) [23]. After filtering and removing all non-overlapping SNPs, a subset of 128,844 autosomal SNPs included genotypes available for all populations (except Chinese). Because background linkage disequilibrium (LD) can induce biases in principal component (PCA) [24] and structure analyses [25], both marker sets –165,872 and 128,844 SNPs – were further thinned by excluding SNPs with strong LD (pairwise genotypic correlation $r^2>0.2$) using a window of 200 SNPs (sliding the window by 25 SNPs at a time), which yielded 59,318 and 52,808 SNPs, respectively.

Statistical Analysis

In order to explore the genetic structure of the populations from European Russia, several forms of analyses were performed. We started with principal component analysis (PCA), a widely used method for identifying and visualizing patterns of population structure [26]. It was carried out using the Genotypic Principal Components Analysis module of SNP and Variation Suite v.7.4.0. To obtain non-overestimated eigenvectors [27], we first ran the software using an outlier removal procedure, in which individuals with values that were greater than six standard deviations from the mean along any of the top 10 eigenvectors (principal components) were identified and removed.

Genetic differentiation among the populations was quantified by estimating pairwise Wright's fixation indices (F_{ST}) using the SMARTPCA program in the EIGENSOFT software package



Figure 1. Geographic locations of the populations analyzed. Key: Komi_Izh – Izhemski Komi, Komi_Pr – Priluzski Komi, Rus_Tv – Russians from Tver, Rus_Ku – Russians from Kursk, Rus_Mu – Russians from Murom, Rus_Me – Russians from Mezen, Finns_He – Finns from Helsinki, Finns_Ku – Finns from Kuusamo, Rus_HGDP – Russians from the Human Genome Diversity Panel.
doi:10.1371/journal.pone.0058552.g001

(v.4.2). Allele frequency differences in pairs of populations were evaluated using trend tests. The resulting P values were subjected to Bonferroni correction and the significance threshold was set at $P=0.05$ (Bonferroni-adjusted P was equal 3×10^{-7}).

Next, the population structure was examined using the ADMIXTURE software package (v.1.22), which, in contrast to

PCA, implements a model-based clustering algorithm for estimating individual ancestry proportions [25]. This approach assumes that the genome of each subject originates from K unknown ancestral populations and estimates the proportions of the genome derived from each of these populations. To identify putative ancestral clusters within the samples, we ran the software assuming

2–12 subpopulations on separate runs, using default parameters. Each run was repeated at least three times to assess the stability of the clustering patterns. To validate the results, a cross-validation procedure was used [28].

Finally, to assess the potential effect of population demographics on the population structure, the runs of homozygosity (ROH) and the extent of pairwise linkage disequilibrium (LD) were examined in the populations studied. ROH in the individuals were identified using SNP and Variation Suite v.7.4.0. ROH was defined as a sequence of at least 25 consecutive homozygous SNPs spanning at least 1500 kb, with a maximum gap of 100 kb between adjacent SNPs and a minimum density of 1 SNP per 50 kb [29]. Taking into account the limited number of SNPs tested, we also used another definition of ROH, in which the limitations on the maximum distance between SNPs and the minimum density of SNPs were excluded [30,31]. For comparative purposes the results obtained were summarized by the calculation of means for the number of ROH and the cumulative length of ROH per individual for each population. The extent of pairwise linkage disequilibrium (LD) was calculated as the genotype correlation (r^2) between marker pairs located less than 100 kb apart using the PLINK v. 1.07.29 software [32]. A custom Perl script was applied to categorize the r^2 values according to intermarker distances (0–5 kb, 5–10 kb, etc.) and a mean r^2 was calculated for each category.

Results

To probe population structure, we first analyzed our data sets using a model-free ancestry PCA. In Figure 2 we plotted the first two principal components (PC) that had the highest eigenvalues (Figure S1). The plot demonstrated the presence of significant differences between Russian populations from the central part of the Russian Plain (i.e., populations from the Kursk, Murom, and Tver regions), which formed a single cluster on the PC plot, and the Russian population from the northern Archangelsk region (Mezen Russians). Mezen Russians exhibited closer relationships with the population of Veps. The samples of Izhemski and Priluzski Komi were located distantly, not only from Veps and Russians, but also from each other.

The lack of separation between populations from the Kursk, Murom, and Tver regions in the PC plot was consistent with the results of the assessment of population differentiation via the calculation of pairwise F_{ST} statistics, in which F_{ST} values were not greater than 0.001 (Table 1). The pairwise F_{ST} value between these populations and Mezen Russians was 0.006. The same F_{ST} value characterized the genetic relationships between Mezen Russians and Veps. This finding correlated with the population substructure observed in a plot of PC3 versus PC4, in which Mezen Russians and Veps were clearly separated from each other along PC4 (Figure S2). The highest pairwise F_{ST} estimates were obtained from comparisons that included Komi samples.

None of the SNPs analyzed showed significant ($P < 3 \times 10^{-7}$) differences in allele frequencies between populations from the Kursk, Murom, and Tver regions, but 144 to 172 SNPs in each of these populations differed from those of Russians from the Mezen region. The highest number of SNPs with large differences in allele frequencies was found between Izhemski Komi and populations from the Kursk, Murom, and Tver regions (Table 1).

To understand the place of Russians, Komi, and Veps on the genetic canvas of Europe, we combined their genotypes with the genotypic data of several European populations (Finns, Estonians, Latvians, Poles, Czechs and Germans, as well as Italians, who are the most distant from our populations [5]). The results of PCA

performed on this extended number of samples are shown in Figure 3, and may be described as having an “airplane”-like structure with the two wings represented by the Finnish (upper left), and Komi (lower left) samples. A comparison of the resulting genetic map, with the results presented by Nelis et al. [5], shows that the populations from one of the vertices of the latter are now located at the intersection formed by the two genetic “wings”. Russians from Murom, Kursk, and Tver were also placed at this intersection. However, Russians from Mezen were located outside this intersection. This population, together with the Finnic-speaking Veps, was located in the space between the Finnish and Komi “wings” on the chart. Taking into account the genetic differences found for Mezen Russians among the other Russian populations studied here, a Russian-only sample from the HGDP set was also included in the analysis. The HGDP Russians were also from the Archangelsk region (Kargopol district), but their location is geographically closer to samples of populations from central regions of European Russia (Figure 1). This is reflected in their intermediate position on the PC plot (Figure 3) and lower pairwise F_{ST} values (0.004 against Mezen and 0.002 against the Russians from Kursk, Murom, and Tver regions) (Table S1, Figure S3).

To further explore the population structure, a model-based structure-like analysis using the ADMIXTURE software was performed [25]. This analysis considers the genome of each individual as having originated from several hypothetical ancestral populations, the number of which (K) could be specified. In addition to populations already used in PCA, a Chinese sample was included to check for the potential presence of East Asian admixture. We ran ADMIXTURE at $K = 2$ to 12. At $K = 2$, only the population groups corresponding to Europe and Asia were separated (Figure 4). Subtle variations detected in this analysis were possibly due to the differences in the proportion of East Asian ancestry, which was present in all European populations included in this study, but had a higher average contribution in Komi samples. Subcontinental patterns appeared at $K = 3$: one ancestry component was the most abundant in Izhemski Komi and Finns from Kuusamo (red) and a different component (blue) was at the maximum in the Italian population (Figure 4). At $K = 4$, the red component has diverged into two parts and distinguished Finns (purple) from Komi (red). These results match closely with the population structure revealed by the PCA, where they corresponded to the genetic “wings” described in Figure 3. Mezen Russians and Veps exhibited the highest proportions of both red and purple ancestry components, differing only in their ratios, which were the opposite of each other (henceforth, we will refer to these crucial components as Komi and Finnic). Russians from the HGDP are found at the intermediate position between Mezen and other Russians, with lower proportions of Komi and Finnic components and a higher proportion of the blue component, most common in Italians, compared with the Mezen Russians. At $K = 5$, a new component is found (yellow), with a high proportion in most of the populations, with the exception of Izhemski Komi, Finns, and Italians. The proportions of Komi and Finnic ancestries were significantly reduced for many central and eastern European populations, but remained high in Veps and Mezen Russians. $K = 5$ was the observation threshold for subcontinental patterns of genetic variation. At higher K values ($K = 6$ to 8), we observed the subsequent separations of the populations of Priluzski Komi, Veps, and Mezen Russians (Figure S4). The situation in which a new ancestry component introduced for the next K value differentiated only a single population was considered as being less informative for the hierarchical comparisons of populations [33,34]. Therefore, although the lowest cross-validation errors were observed at

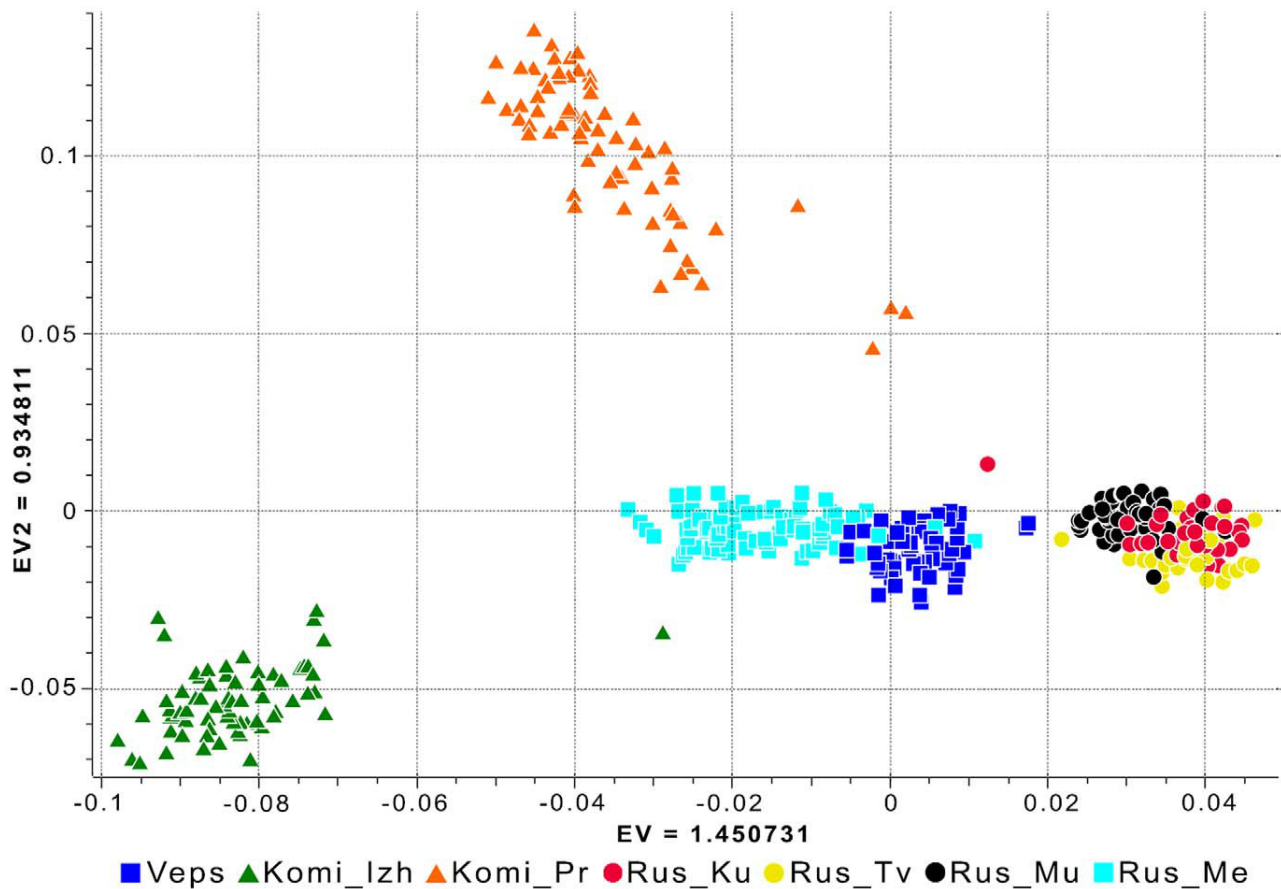


Figure 2. Principal component analysis of the autosomal genotypic data of individuals from European Russia. The first two PCs are shown. Each individual is represented by a sign and the color label corresponding to their self-identified population origin. Population designations are the same as in Figure 1.
doi:10.1371/journal.pone.0058552.g002

K = 7 (Figure S5), our further discussion will focus on the results of clustering at K = 5.

To explore the potential effect of population demographics on the population structures identified, ROH were compared across populations. ROH may indicate prolonged isolation and a reduced population size [29,35]. Here, we analyzed ROH longer than 1,500 kb as being the most informative [29]. Using the thresholds for SNP density along a ROH tract (≥ 1 SNP per

50 kb, with a gap size ≤ 100 kb), the total number of ROH in 16 populations (the Chinese sample was not included) was 1,298, with a mean population number of ROH (nROH) of 0.20–2.68 per individual. The population average of the cumulative ROH length (cROH) per individual ranged from 0.43 to 6.31 Mb (Table 2). The use of the alternative definition of ROH, which allows the screening of ROH across various SNPs, resulted in an increase in both the number and length of ROH, which ranged between 6.77

Table 1. F_{ST} values and the number of SNPs with significant differences in allele frequencies between the populations from Russia*.

	Rus_Tv	Rus_Ku	Rus_Mu	Rus_Me	Veps	Komi_Pr	Komi_Izh
Rus_Tv	–	0	0	172	64	262	683
Rus_Ku	0.000	–	0	144	40	212	620
Rus_Mu	0.001	0.001	–	144	41	195	548
Rus_Me	0.006	0.006	0.006	–	113	224	313
Veps	0.006	0.007	0.006	0.006	–	215	388
Komi_Pr	0.011	0.010	0.010	0.009	0.012	–	334
Komi_Izh	0.014	0.014	0.013	0.011	0.014	0.014	–

*Pairwise F_{ST} values are indicated below the diagonal and the number of SNPs is indicated above it. The abbreviations of populations are the same as in Figure 1.
doi:10.1371/journal.pone.0058552.t001

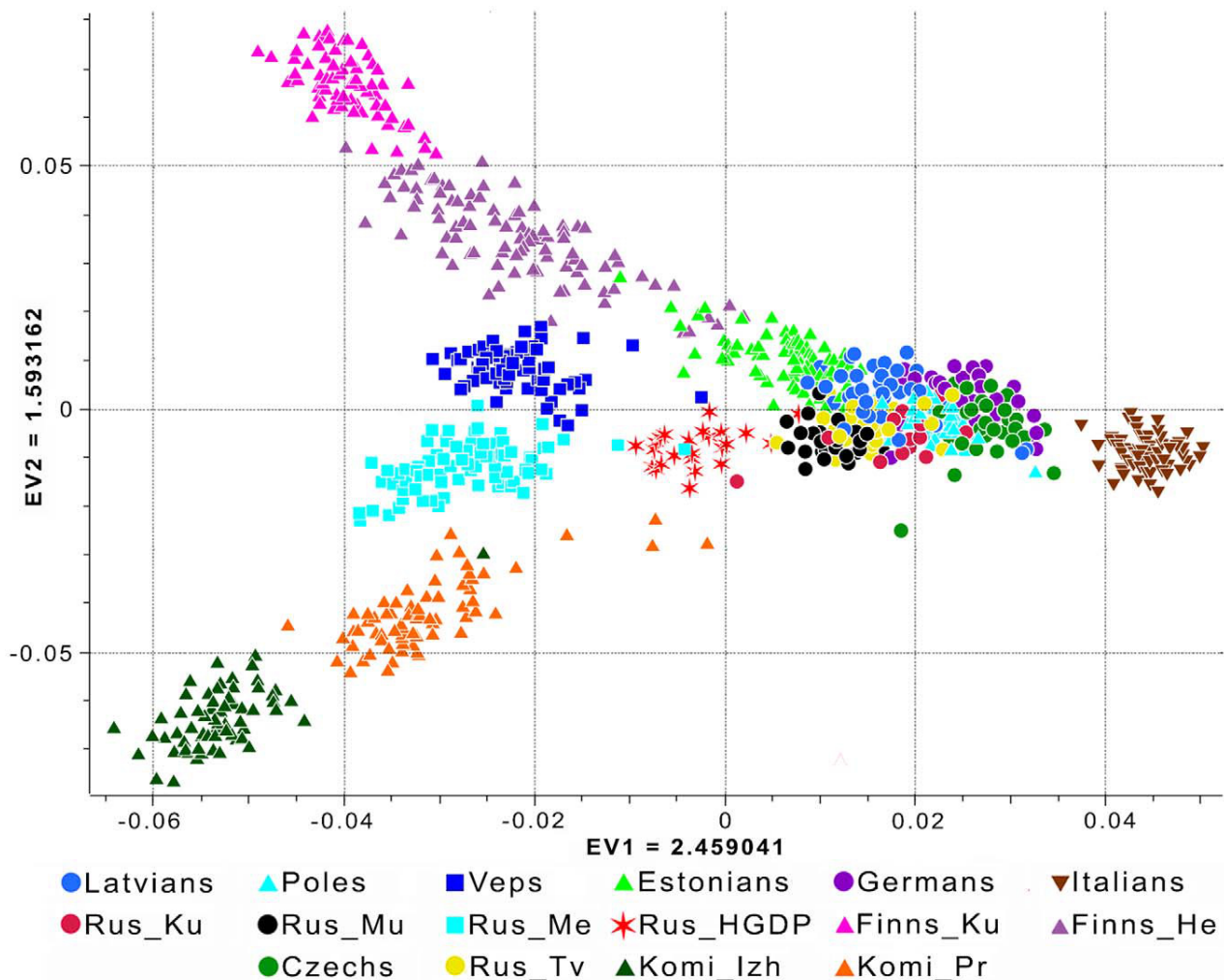


Figure 3. Principal component analysis of the combined autosomal genotypic data of individuals from Russia and seven European countries (Finland, Estonia, Latvia, Poland, Czech Republic, Germany [5] and Italia [22]). The first two PCs are shown. The color legend for the predefined population labels is indicated within the plot. Population designations are the same as in Figure 1. doi:10.1371/journal.pone.0058552.g003

and 17.21 Mb for nROH and 19.62 and 71.83 Mb for cROH. Regardless of the variations in the analysis, the highest nROH and cROH values were found in Izhemski Komi and in the Finnish sample from Kuusamo. Intermediate estimates were observed in Priluzski Komi, Veps, Finns from Helsinki, and Mezen Russians. Other populations had lower nROH and cROH values. An analysis of LD decay across genomes showed that Izhemski Komi and Finns from Kuusamo also exhibited elevated LD (Figure S6). Concomitantly, Priluzski Komi, Veps, Mezen Russians, and Finns from Helsinki exhibited only slightly elevated LD and were more comparable to the level observed in other European samples, including the remaining Russian samples.

Discussion

In this study, we used genome-wide SNP data to analyze the population genetic structure of Russians, Veps, and Komi. The samples under investigation covered territories in the northeastern Europe, not been included in previous analyses.

The results obtained revealed no substantial genetic stratification within Russians from central-southern regions of European

Russia (i.e., samples from the Kursk, Murom, and Tver regions). These three populations were clustered in close proximity to other populations from central-eastern Europe. In contrast, a sample from the northern Archangelsk region of Russia, Mezen Russians, was clearly distant from those of Kursk, Murom, and Tver. These data are in good agreement with earlier data obtained for polymorphisms of the Y-chromosome [14,15,36,37] and several autosomal loci [16,38,39]. It has been proposed that the genetic specificity of northern Russians is because of admixture with Finno-Ugric populations. The results of our ADMIXTURE analysis suggest that, although they descended historically from the Novgorod Russians, Mezen Russians admixed significantly with both Finnic-speaking and Komi populations (Komi belongs to the different linguistic branch of the Finno-Ugric family, the Permian branch). The estimated proportion of Komi ancestry in Mezen Russians was higher than the Finnic proportion. This might be explained by either a more extensive or a later admixture with Komi people. The existing anthropological data favor the latter explanation, proposing a two-staged inclusion of Finno-Ugric elements during the ethnogenesis of Northern Russians, in which Komi elements were included last [40]. Both the Komi and

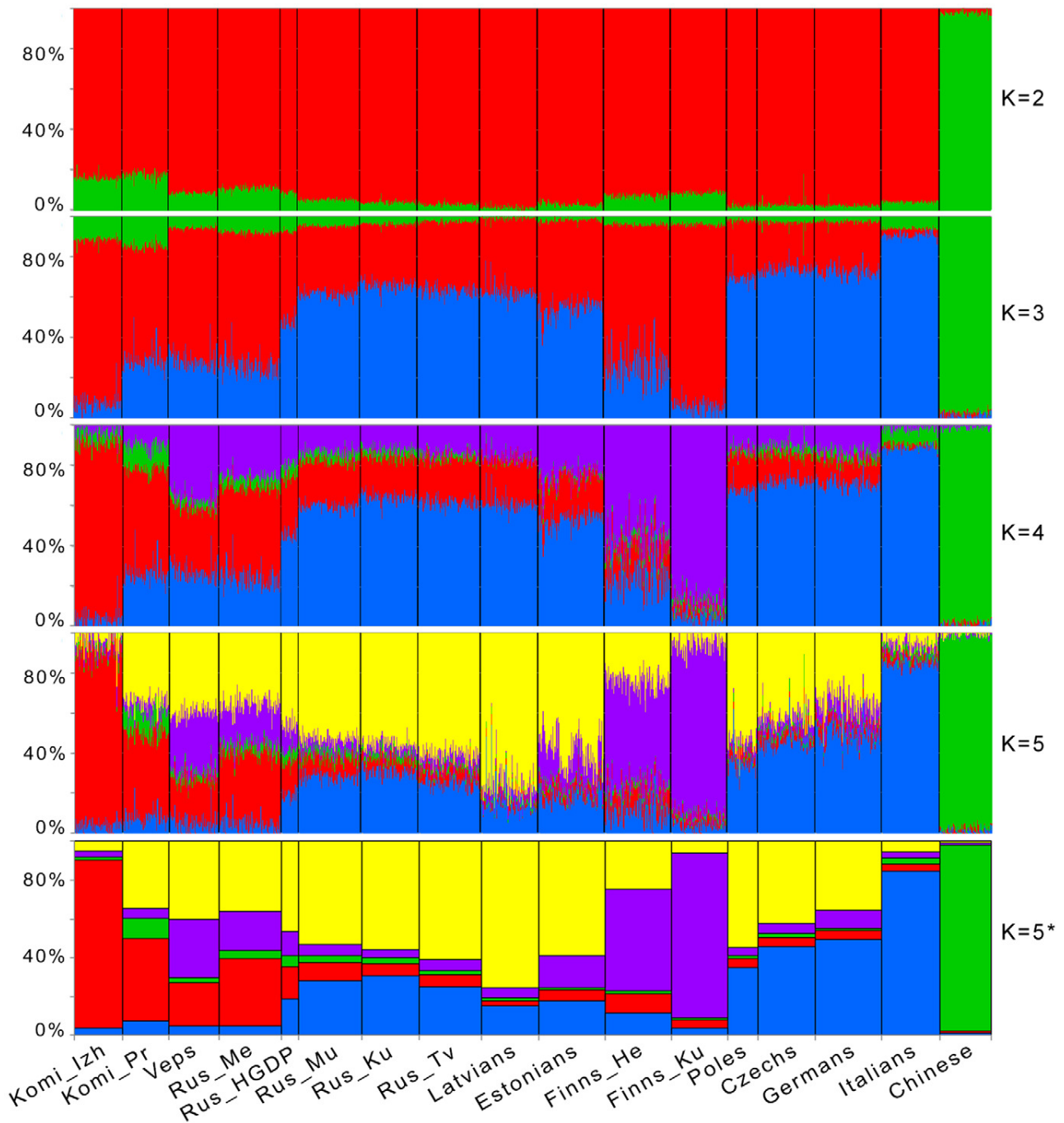


Figure 4. ADMIXTURE clustering of individuals from the populations studied. Results obtained at $K=2$ to 5 are shown. Each individual is represented by a vertical line composed of colored segments, in which each segment represents the proportion of an individual's ancestry derived from one of the K ancestral populations. Individuals are grouped by population (labeled on the bottom of the graph). In addition to populations used in principal component analysis, a Chinese sample (Han Chinese from Beijing [22]) was included. The results at $K=5$ are also accompanied by average ancestral proportions by population (*). Population designations are the same as in Figure 1. doi:10.1371/journal.pone.0058552.g004

Finnic ancestry components occurred at lower proportions in other Russians, as well as in the populations of Poles, Czechs, Germans, and Italians, which are geographically distant from Finns and Komi. The proportions of Komi and Finnic components were also low in Latvians, but not in Estonians, among whom the proportion of Finnic ancestry was relatively high.

The Veps were another population that exhibited an increased percentage of both Komi and Finnic ancestries. The high level of Finnic ancestry is evidently characteristic of this population, as they belong to the same linguistic community, the Finnic-speaking community, as Finns do. The higher level of Komi ancestry in this population compared with that of Finns and Estonians could be

Table 2. Summary of ROH statistics of 16 European populations.

Population	nROH	cROH	nROH*	cROH*
Italians	0.19	0.4	6.27	19.64
Germans	0.2	0.43	6.77	19.62
Rus_Ku	0.28	0.65	7.88	24.4
Czechs	0.35	0.64	7.23	19.79
Rus_Mu	0.39	0.98	7.97	27.41
Rus_HGDP	0.44	0.83	8.92	25.15
Rus_Tv	0.49	1.12	9.34	28.05
Poles	0.51	1.11	8.51	27.43
Latvians	0.58	1.08	10.62	29.56
Estonians	0.61	1.45	9.95	33.26
Finns_He	1.13	2.32	12.85	41.47
Rus_Me	1.63	3.81	13.02	51.42
Veps	1.72	3.87	14.77	54.29
Komi_Ob	1.77	3.94	13.13	52.17
Finns_Ku	2.24	4.95	16.58	58.76
Komi_Izh	2.68	6.31	17.21	71.83

*ROH calculated without the thresholds for SNP density and length of the gaps along a ROH tract. The abbreviations of populations are the same as in Figure 1. doi:10.1371/journal.pone.0058552.t002

from admixture of Veps (Ves) with Komi (ancient Permians) in the 11th–14th centuries, when Komi lived westward of their current territory and were the neighbors of Veps [41].

As for the Komi themselves, it has been proposed [42] that their ethnogenesis was influenced by Finnic (e.g., Veps or “Chud”) and Russian people. The evaluation of the impact of Finnic people in the context of Finnic ancestry revealed that the corresponding component was not represented at a high proportion in the Komi samples studied. The impact of Russians on the ethnogenesis of Komi seems to be indicated by the yellow component. It was abundant in Priluzski Komi (Figure 4), which is in good agreement with the population history of this region – the basin of the Luza river, where Russian people resided as far back as the 13th–14th centuries [41]. In contrast to the Priluzski Komi, Komi component was overrepresented in the ancestry of the Izhemski Komi, accounting for more than 80% of the total ancestry (86% at $K=5$). Historical records show that the first mention of the current center of Izhemski Komi, the Izhma village, occurred at the end of the 16th century and that Izhma was founded mainly by a group of Vimski Komi. Later, some Russian and Nenets families joined them [41,43]. Nenets were not studied here. Although the ADMIXTURE components depend on the samples included, a minimal influence of the genetics of Nenets on the results of clustering can be proposed. Here, we can refer to both the existing data on the absence of (or very limited) genetic relationships between the Nenets and the populations listed (including Komi) [15,44,45], and the results of our analyses, which indicate the genetic isolation of the Izhemski Komi. Evidence of the latter stemmed both from pairwise F_{ST} values, which were the same between Izhemski Komi and both Priluzski Komi, who shared the same ethnic territory, and the geographically distant Finns from Helsinki, and from their higher parameters of ROH estimated.

Both nROH and cROH have been shown to be higher in northern Europeans compared to their southern counterparts, which is consistent with the smaller effective population size and

lower population density in northern Europe [35]. In our study, all northern samples (Mezen Russians, Veps, and both Komi samples) were also characterized by higher nROH and cROH compared to Russians from the central part of the Russian Plain and most of the European populations tested. However, the Izhemski Komi had the highest nROH and cROH, comparable to the values calculated in the sample from Kuusamo, the known Finnish isolate [46]. Similar to the Finns from Kuusamo, the Izhemski Komi exhibited elevated LD. Taking into account the history of the Komi people, the recorded genetic distinction of the Izhemski Komi can be due to the increased stability of their community life reinforced by the advanced type of traditional economy, including reindeer breeding [47]. Reindeer breeding was adopted by this group from the Nenets and currently differentiates the Izhemski Komi from the other Komi groups.

In summary, we reported results of the first genome-wide autosomal SNP-based study of the population structure of European Russia, in which samples of Russians, Veps, and Komi were analyzed. The data obtained strongly supports the results of earlier genetic studies, based either on Y-chromosome polymorphisms or on a limited number of autosomal markers, and suggested a genetic distinction of the northern Russian populations. Here, we were able to show clearly that this distinction was attributed to admixture with Finno-Ugric populations. The second important finding of our work was the context of that admixture. Our data on Komi population structure led us to consider this group as the second pole of genetic diversity in northern Europe (in addition to the pole occupied by Finns). Although we understand that the picture of the genetic structure of populations from European Russia obtained is still sparse, we propose that populations (ethnic groups) located between those two poles will have different proportions of Komi and Finnic ancestries (e.g., Veps and Mezen Russians).

Supporting Information

Figure S1 Scree plots for eigenvalues of components 1 to 25 from the principal component analysis: (A) individuals from Russia, (B) individuals from Russia and selected samples from seven European countries.

(TIF)

Figure S2 Principal component analysis of the autosomal genotypic data of individuals from European Russia. PC3 and PC4 are shown. Population designations are the same as in Figure 1.

(TIF)

Figure S3 Multidimensional scaling analysis (two dimensions) of pairwise F_{ST} among 16 European populations. The F_{ST} matrix from Table S1 was used as an input for the analysis.

(TIF)

Figure S4 Results of ADMIXTURE clustering at $K=6$ to 8. The number of populations and their order are the same as at Figure 4.

(TIF)

Figure S5 Cross-validation plot for 16 populations from the ADMIXTURE analysis. The plot displays the cross-validation error versus K . The results of eight runs with different random seeds are presented.

(TIF)

Figure S6 The decay of LD across the genomes of the populations from Russia and the European reference

samples. The samples of Poles and Russians from the HGDP were not included because of their smaller sample size. The Italian sample was also excluded (its merging with other samples resulted in a significant decrease in the number of SNPs). (TIF)

Table S1 F_{ST} statistics calculated in pairs of all European populations analyzed. (DOC)

Acknowledgments

We thank the volunteers from Russia who provided their blood samples. We acknowledge the personnel of the Estonian Genome Center of the

University of Tartu (EGCUT), especially Mr. Viljo Soo. We also acknowledge the Genome Database of Latvian population, Latvian Biomedical Research and Study Centre for providing data and DNA samples. Data analysis was carried out in part in the High Performance Computing Center of University of Tartu.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AVK SAL. Performed the experiments: AVK DVK TE MN. Analyzed the data: AVK DVK INF TE. Contributed reagents/materials/analysis tools: TE MN NAB NLB JK LNZ KR SR SS AF MM VK JL AM SAL. Wrote the paper: AVK SAL.

References

- Seldin MF, Shigeta R, Villoslada P, Selmi C, Tuomilehto J, et al. (2006) Gregersen PK. European population substructure: clustering of northern and southern populations. *PLoS Genet* 2: e143.
- Salmela E, Lappalainen T, Fransson I, Andersen PM, Dahlman-Wright K, et al. (2008) Genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms uncovers population structure in Northern Europe. *PLoS One* 3: e3519.
- Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, et al. (2008) Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation. *Science* 319: 1100–4.
- Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko AR, et al. (2008) Genes mirror geography within Europe. *Nature* 456: 98–101.
- Nelis M, Esko T, Mägi R, Zimprich F, Zimprich A, et al. (2009) Genetic Structure of Europeans: A View from the North–East. *PLoS One* 4: e5472.
- Tian C, Plenge RM, Ransom M, Lee A, Villoslada P, et al. (2008) Analysis and application of European genetic substructure using 300 K SNP information. *PLoS Genet* 4: e4.
- Price AL, Helgason A, Palsson S, Stefansson H, St Clair D, et al. (2009) *PLoS Genet* 5: e1000505.
- Humphreys K, Grankvist A, Leu M, Hall P, Liu J, et al. (2011) The Genetic Structure of the Swedish Population. *PLoS One* 6: e22547.
- O'Dushlaine CT, Morris D, Moskvina V, Kirov G, Consortium IS, et al. (2010) Population structure and genome-wide patterns of variation in Ireland and Britain. *Eur J Hum Genet* 18: 1248–54.
- Pistis G, Piras I, Pirastu N, Persico I, Sassu A, et al. (2009) High Differentiation among Eight Villages in a Secluded Area of Sardinia Revealed by Genome-Wide High Density SNPs Analysis. *PLoS One* 4: e4654.
- Huyghe JR, Franssen E, Hannula S, Van Laer L, Van Eyken E, et al. (2011) A genome-wide analysis of population structure in the Finnish Saami with implications for genetic association studies. *Eur J Hum Genet* 19: 347–52.
- Lao O, Lu TT, Nothnagel M, Junge O, Freitag-Wolf S, et al. (2008) Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Curr Biol* 18: 1241–1248.
- Russian Census. Available: http://www.gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/perepis_itogi1612.htm. Accessed 2012 Dec 21.
- Khrunin AV, Bebiakova NA, Ivanov VP, Solodilova MA, Limborskaia SA (2005) Polymorphism of Y-chromosomal microsatellites in Russian populations from the northern and southern Russia as exemplified by the populations of Kursk and Arkhangel'sk Oblast. *Genetika* 41: 1125–31.
- Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, et al. (2008) Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. *Am J Hum Genet* 82: 236–250.
- Flegontova OV, Khrunin AV, Lylova OI, Tarskaia LA, Spitsyn VA, et al. (2009) Haplotype frequencies at the DRD2 locus in populations of the East European Plain. *BMC Genet* 10: 62.
- Alexeeva TI (Editor) (2002) Eastern Slavs. Anthropology and ethnic history. Moscow: Nauchny mir. 342 p.
- Pimenov VV (1965) *Veps: A study of ethnic history and genesis of culture.* Moscow-Leningrad: Nauka. 264 p.
- Savel'eva EA (Editor) (2001) Atlas of the Komi Republic. Moscow: Dizain. Moscow: Inter'er Kartografiya. 552 p.
- Khrunin A, Verbenko D, Nikitina K, Limborska S (2007) Regional differences in the genetic variability of Finno-Ugric speaking Komi populations. *Am J Hum Biol* 19: 741–50.
- Milligan BG (1998) Total DNA isolation. In: Hoelzel AR, editor. *Molecular Genetic Analysis of Populations.* Oxford: Oxford University Press. pp. 29–60.
- The HapMap 3 genotype data (R2 B356 FWD). Available for users of SNP and Variation Suite software package (Golden Helix, Bozeman, MT, USA). Accessed 2012 April 5.
- The HGDP-CEPH diversity panel. Available: <http://www.cephb.fr/en/hgdp/>. Accessed 2012 April 10.
- Patterson N, Price AL, Reich D (2006) Population Structure and Eigenanalysis. *PLoS Genet* 2: e190.
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* 19: 1655–64.
- Biswas S, Scheinfeldt LB, Akey JM (2009) Genome-wide insights into the patterns and determinants of fine-scale population structure in humans. *Am J Hum Genet* 84: 641–50.
- Luca D, Ringquist S, Klei L, Lee AB, Gieger C, et al. (2008) On the use of general control samples for genome-wide association studies: genetic matching highlights causal variants. *Am J Hum Genet* 82: 453–63.
- Alexander DH, Lange K (2011) Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics* 12: 246.
- McQuillan R, Leutenegger AL, Abdel-Rahman R, Franklin CS, Pericic M, et al. (2008) Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet* 83: 359–372.
- Spain SL, Cazier JB, CORGI Consortium, Houlston R, Carvajal-Carmona L, et al. (2009) Colorectal cancer risk is not associated with increased levels of homozygosity in a population from the United Kingdom. *Cancer Res* 69: 7422–9.
- Howrigan DP, Simonson MA, Keller MC (2011) Detecting autozygosity through runs of homozygosity: a comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC Genomics* 12: 460.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K et al. (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Human Genet* 81: 559–75.
- Behar DM, Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Rosset S, et al. (2010) The genome-wide structure of the Jewish people. *Nature* 466: 238–242.
- Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, et al. (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463: 757–62.
- Nothnagel M, Lu TT, Kayser M, Krawczak M (2010) Genomic and geographic distribution of SNP defined runs of homozygosity in Europeans. *Hum Mol Genet* 19: 2927–35.
- Malyarchuk B, Derenko M, Grzybowski T, Lunkina A, Czarny J, et al. (2004) Differentiation of Mitochondrial DNA and Y chromosomes in Russian Populations. *Hum Biol* 76: 877–900.
- Mirabal S, Regueiro M, Cadenas AM, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA, et al. (2009) Y-chromosome distribution within the geo-linguistic landscape of northwestern Russia. *Eur J Hum Genet* 17: 1260–73.
- Khrunin AV, Khokhrin DV, Limborskaia SA (2008) Glutathione-S-transferase gene polymorphism in Russian populations of European Russia *Genetika* 47, 1565–8.
- Verbenko DA, Slominsky PA, Spitsyn VA, Bebyakova NA, Khusnutdinova EK, et al. (2006) Polymorphisms at locus DIS80 and other hypervariable regions in the analysis of Eastern European ethnic group relationships. *Ann Hum Biol* 33: 570–84.
- Alexeev VP (1969) The origin of nations of Eastern Europe. Moscow: Nauka. 324 p.
- Zherebtsov LN (1982) Historical and cultural relationships of Komi with their neighbors. Moscow: Nauka. 224 p.
- Savel'eva EA (Editor) (1997) *Archaeology of Komi Republic.* Moscow: DIK. 758 p.
- Zherebtsov IL (1996) The population of Komi territory in the second half of XVI century to the beginning of XVIII century. Yekaterinburg: UrO RAN. 258 p.
- Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A (1996) The history and geography of human genes. Princeton: Princeton University Press. 414 p.
- Karafet TM, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Zegura SL, et al. (2002) High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life. *Hum Biol* 74: 761–89.
- Varilo T, Laan M, Hovatta I, Wiebe V, Terwilliger JD, et al. (2000) Linkage disequilibrium in isolated populations: Finland and a young sub-population of Kausamo. *Eur J Hum Genet* 8: 604–12.
- Konakov ND, Kotov OV (1991) Ethnoareal Komi group: the formation and current ethnic and cultural status. Moscow: Nauka. 232 p.

3.5.1. Úvod k publikaci

Ačkoliv obyvatelé české, moravské a slezské oblasti představují z populačně genetického hlediska relativně homogenní populaci (Lao et al., 2008; Lu et al., 2009) (Obr. č. 7), v důsledku imigrace přibývá v České republice také národnostních menšin. Jednou z těchto menšin je stále se zvětšující komunita z oblastí bývalého Sovětského svazu (např. Ruská federace, Ukrajina). Český statistický úřad udává údaj 31 807 legálně žijících Rusů a 134 281 Ukrajinců na území České republiky v roce 2010 ("Počet cizinců - Popis aktuálního vývoje," 2013).

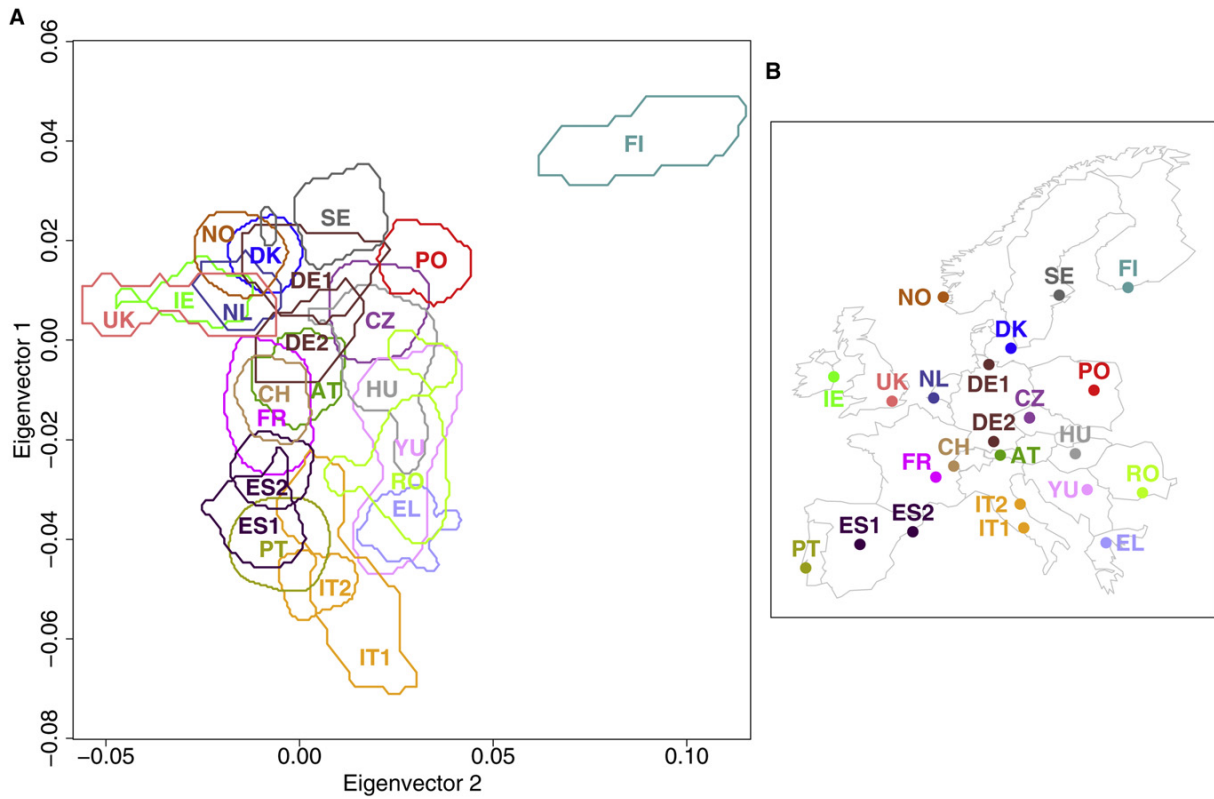
Zastoupení jednotlivých mutací v genu *CFTR* v ruské populaci není spolehlivě zmapováno. Počet detekovaných alel genu *CFTR* u pacientů s CF ruského původu odpovídá dle dostupných zdrojů maximálně 75 % (Bobadilla et al., 2002; Kashirskaya and Kapranov) z celkového počtu mutací u klinicky diagnostikovaných pacientů s CF. Velká populační heterogenita, nedostatečná znalost všech populačně specifických alel genu *CFTR* a jejich frekvence jsou jen dvěma z řady důvodů, proč má Rusko pro celoplošný screeningový program zavedeno schéma IRT/IRT (Kashirskaya, 2014). Data z Ukrajiny nejsou spolehlivě doložena s výjimkou jejích západních regionů (Makukh et al., 2010).

S přibývajícím počtem novorozenců od přistěhovalců z výše uvedených oblastí narozených na území České republiky tak vyvstala otázka, zda spektrum vyšetřovaných mutací v genu *CFTR* v rámci současného protokolu IRT/DNA/IRT (a také v rámci plánovaného zavedení protokolu IRT/PAP/DNA) nepředstavuje zvýšené riziko selhání screeningového programu pro CF z důvodu nedostatečné záchytnosti komerční diagnostické soupravy Elucigene CF-EU2[™] assays, která je v současné době pro DNA analýzu v rámci NSCF v České republice používána. Výčet 50 mutací, které jsou zahrnuty v diagnostické soupravě Elucigene CF-EU2[™], shrnuje tabulka č. 4 v kapitole 3.3.2.

Z tohoto důvodu jsme se zúčastnili projektu, jehož cílem bylo na základě analýzy téměř 166 000 jednonukleotidových polymorfismů (Single nucleotide polymorphisms; SNPs) zjistit z hlediska dalších diskuzí k novorozeneckému screeningu genetickou příbuznost/odlišnost vybraných reprezentativních ruských a evropských kohort.

Výsledky této mezinárodní kolaborativní studie byly publikovány jako původní článek v PLOSE ONE v roce 2013.

Obrázek č. 7: Genetická příbuznost vyplývající z porovnání SNPs u 2457 jedinců z 23 evropských subpopulací



Obrázek převzat z Lao et al., 2008

.5.2. Výsledky a diskuze

Výsledky této studie prokázaly, že Rusové pocházející ze střední části evropské Ruské federace (konkrétně obyvatelé Tverské, Kurské a Vladimírské oblasti) jsou z populačně genetického hlediska podobní populacím ze střední a východní Evropy, ale jsou odlišní od obyvatel ze severního Ruska (obyvatelé Archangelské oblasti). Zcela odlišní od populací ze střední a východní Evropy a Rusů pocházejících ze střední části evropské ruské federace a ze severního Ruska jsou obyvatelé Republiky Komi.

Na základě těchto populačně genetických analýz provedených porovnáním 165 872 SNPs mezi reprezentativním vzorkem obyvatel z České republiky a ze střední části evropské části Ruské federace můžeme předpokládat, že některé z alel u ruských pacientů s CF, vyskytující se nad rámec dosud popsanych mutací u ruských pacientů s CF, jsou shodné s alelami detekovanými u českých pacientů s CF. Tento „extrapolovaný“ populačně genetický předpoklad však neplatí pro imigranty ze severních oblastí Ruska a Republiky Komi.

3.5.3. Závěr

Po dobu fungování protokolu IRT/DNA/IRT v České republice můžeme očekávat, že novorozenci s CF ruského (a ukrajinského) původu mohou být zachyceni buď přímo díky molekulárně genetickému vyšetření genu *CFTR* v rámci 2. kroku protokolu IRT/DNA/IRT nebo pomocí FS. Po zavedení protokolu IRT/PAP/DNA, jehož součástí není FS, bychom se mohli setkávat s vyšší falešnou negativitou reprezentovanou zejména ruskými novorozenci pocházejícími ze severních a severovýchodních oblastí Ruska.

Je ke zvážení, zda do našeho screeningového programu pro CF nezařadit také mutaci p.Gln685ThrfsX4, která není součástí námi používaného komerčně dostupného panelu mutací Elucigene CF-EU2Tm, ale vyskytuje se ve zvýšené míře na západní Ukrajině, v oblasti Podkarpatské Rusi a v Rusku (Kashirskaya and Kapranov; Makukh et al., 2010). Novorozenci s CF nesoucí minimálně jednu mutaci p.Gln685ThrfsX4 genu *CFTR* by tak mohli být příkladem falešné negativy v rámci screeningového programu v České republice.

Ačkoliv je snaha, aby screeningové programy pro CF vzaly v potaz populační heterogenitu screenované populace, neexistuje protokol založený na DNA analýze, který by v tomto ohledu zajistil 100% senzitivitu.

4. SHRnutí

Ačkoliv je CF závažným a stále nevyléčitelným onemocněním, kombinace časné diagnostiky s nejmodernější léčbou cílenou na konkrétní genotyp genu *CFTR* přináší pacientům s CF naději na delší přežívání a kvalitnější život.

Jediný způsob umožňující včasnou diagnostiku CF je pomocí celoplošného screeningového programu. Současný protokol IRT/DNA/IRT je vysoce efektivní a účinný nástroj k odhalení pacientů s CF v době, kdy ještě nejsou plně nebo dokonce vůbec přítomny klinické příznaky onemocnění. A i když tento protokol dosahuje dobré senzitivity i specifity, lze dále zefektivnit zavedením dalšího analytického mezistupně – proteinu asociovaného s pankreatitidou v podobě schématu IRT/PAP/DNA.

Protokol IRT/PAP/DNA za předpokladu vhodně zvolených cut-off hodnot pro IRT a PAP a dostatečně širokého spektra vyšetřovaných mutací genu *CFTR* nabízí dosažení vyšší senzitivity a možnost snížení počtu prováděných molekulárně genetických analýz na cca jednu polovinu vedoucí k vyšší specifitě a nižším finančním nákladům.

Na základě výsledků této práce lze očekávat zavedení screeningového schématu IRT/PAP/DNA do klinické praxe v nejbližších letech.

5. PŘEHLED PUBLIKACÍ, PŘEDNÁŠEK, POSTERŮ

5.1. Publikace

Původní články s IF:

1. Sommerburg, O., **Krulisova, V.**, Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., Happich, M., Kulozik, A.E., Votava, F., Balascakova, M., Skalicka, V., Stopsack, M., Gahr, M., Macek, M., Jr, Mall, M.A., Hoffmann, G.F., 2014. Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *J. Cyst. Fibros.* 13, 15-23. IF 2,873
2. Esko, T., Mezzavilla, M., Nelis, M., Borel, C., Debniak, T., Jakkula, E., Julia, A., Karachanak, S., Khrunin, A., Kisfali, P., **Krulisova, V.**, Aušrelė Kučinskienė, Z., Rehnström, K., Traglia, M., Nikitina-Zake, L., Zimprich, F., Antonarakis, S.E., Estivill, X., Glavač, D., Gut, I., Klovins, J., Krawczak, M., Kučinskas, V., Lathrop, M., Macek, M., Marsal, S., Meitinger, T., Meleghe, B., Limborska, S., Lubinski, J., Paolotie, A., Schreiber, S., Toncheva, D., Toniolo, D., Wichmann, H.E., Zimprich, A., Metspalu, M., Gasparini, P., Metspalu, A., D'Adamo, P., 2013. Genetic characterization of northeastern Italian population isolates in the context of broader European genetic diversity. *Eur. J. Hum. Genet.* 21, 659-665. IF 4,319
3. Khrunin, A.V., Khokhrin, D.V., Filippova, I.N., Esko, T., Nelis, M., Bebyakova, N.A., Bolotova, N.L., Klovins, J., Nikitina-Zake, L., Rehnström, K., Ripatti, S., Schreiber, S., Franke, A., Macek, M., **Krulišová, V.**, Lubinski, J., Metspalu, A., Limborska, S.A., 2014. A genome-wide analysis of populations from European Russia reveals a new pole of genetic diversity in northern Europe. *PLoS One.* 8, e58552. doi: 10.1371/journal.pone.0058552. Epub 2013 Mar 7. IF 3,73

4. Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balaščáková, M., **Krulišová, V.**, Čamajová, J., Turnovec, M., Libík, M., Norambuena, P., Štambergová, A., Dvořáková, L., Skalická, V., Bartošová, J., Kučerová, T., Fila, L., Zemková, D., Vávrová, V., Koudová, M., Macek, M., Krebsová, A., Macek, M., Jr, 2013. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J. Cyst. Fibros.* 12, 532-537. IF 2,873

5. **Krulišová, V.**, Balaščáková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Paděrová, J., Křenková, P., Dvořáková, L., Zemková, D., Kračmar, P., Chovancová, B., Vávrová, V., Štambergová, A., Votava, F., Macek, M., Jr, 2012. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur. J. Pediat.* 171, 1223-1229. IF 1,907

Původní články bez IF:

1. Votava, F., Kožich, V., Chrastina, P., Pešková, K., Adam, T., Hlídková, E., Vinohradská, H., Dejmek, P., **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščíková, M., Piskáčková, T., Macek, M., Gaillyová, R., Valášková, I., Skalická, V., 2014. Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice Čes-slov. Pediat. 69, 77–86.
2. Balaščíková, M., Piskáčková, T., Holubová, A., Raušová, E., **Kazárová, V.**, Krebsová, A., Koudová, M., Štambergová, A., Čamajová, J., Norambuena, P., Křenková, P., Votava, F., Skalická, V., Vávrová, V., Macek, M. st., Macek, M. ml, 2008. Současné metodické postupy a přehled preimplantační, prenatální a postnatální DNA diagnostiky cystické fibrózy v České republice. Čes-slov. Pediat. 63, 62-75.

5.2. Přednášky

Abstrakta v časopisech s IF

1. **Krulisova, V.**, Balascakova, M., Skalicka, V., Piskackova, T., Holubova, A., Stambergova, A., Dvorakova, L., Krenkova, P., Zemkova, D., Kracmar, P., Vavrova, V., Macek, M. Jr, Votava, F., 2011. The comparison of parallel IRT/DNA/IRT and IRT/PAP/DNA+ST cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic. 34th European Cystic Fibrosis Conference, Germany, Hamburg, 8. - 11. 6. 2011. Abstract in: J. Cyst. Fibros. 10, S5. IF 2.239
2. Votava, F., **Krulisova, V.**, Balascakova, M., Dvorakova, L., Skalicka, V., Piskackova, T., Holubova, A., Stambergova, A., Krenkova, P., Zemkova, D., Kracmar, P., Chovancova, B., Vavrova, V., Macek, M. Jr, 2011. The comparison of parallel IRT/DNA/IRT and IRT/PAP/DNA+ST cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic. The 7th ISNS European Neonatal Screening Regional Meeting. Switzerland, Geneva, 28. - 30. 8. 2011. Abstract in: J. Inherit. Metabol. Dis. 34, S36. IF 3.808
3. Votava, F., Kracmar, P., Chrastina, P., Vinohradska, H., Friedecky, D., Adam, T., Stastna, S., Peskova, K., Kožich, V., Dejmek, P., **Krulisova, V.**, Holubova, A., Balascakova, M., Piskackova, T., Macek, M. Jr, Gaillyova, R., Truellova, I., Svagera, Z., 2011. Newborn screening program in the Czech Republic. The 7th ISNS European Neonatal Screening Regional Meeting. Switzerland, Geneva, 28. - 30. 8. 2011. Abstract in: J. Inherit. Metabol. Dis. 34, S43. IF 3.808

Abstrakta v časopisech bez IF a ve sbornících

1. Votava, F., Kožich, V., Chrastina, P., Pešková, K., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Vinohradská, H., Dejmek, P., **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščáková, M., Piskáčková, T., Macek, M. Jr, Gaillyová, R., Valášková, I., Skalická, V., 2014. Vývoj novorozeneckého screeningu v České republice po roce 2000. Beskydské pediatrické dny 4. - 5. 4. 2014, Ostravice, hotel Sepetná; Abstract in: Sborník, 5.
2. **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščáková, M., Piskáčková, T., Skalická, V., Dřevínek, P., Votava, F., Macek, M. Jr, 2013. Výsledky novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v České republice. 9. Slovenská konferencia cystickej fibrózy s medzinárodnou účasťou. Slovensko, Košice, 15. – 16. 11. 2013. Abstract in: Book of abstracts, 9.
3. **Krulisova, V.**, 2013. Lessons from the Czech Republic Newborn Screening Programme. 36th European Cystic Fibrosis Conference, Neonatal Screening Working Group Meeting. Portugal, Lisbon 12. – 15. 6. 2013. Vyžádaná přednáška.
4. **Krulišová, V.**, Balaščáková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Vávrová, V., Macek, M. jr, Votava, F., 2012. Novorozenecký screening cystické fibrózy: Protokoly založené na stanovení Pancreatitis-associated proteinu. První ročník výjezdního zasedání Registru pacientů s cystickou fibrózou. Martinice, 19. – 20. 10. 2012. Abstract in: Sborník abstrakt, 7.
5. Votava, F., Chrastina, P., Kožich, V., Pešková, K., Šťastná, S., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Vinohradská, H., Kračmar, P., Dejmek, P., **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščáková, M., Piskáčková, T., Macek, M. Jr, Gaillyová, R., Truellová, I., Švagera, Z., 2011. Hodnocení novorozeneckého screeningu v České republice. 9. Slovenský pediatrický kongres s medzinárodnou účasťou. Slovensko, Banská Bystrica, 22. – 24. 11. 2011. Abstract in: Čes-slov. Pediat. 66(suppl 1), 36-37.

6. Votava, F., Chrastina, P., Kožich, V., Pešková, K., Šťastná, S., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Vinohradská, H., Kračmar, P., Dejmek, P., **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščaková, M., Piskáčková, T., Macek, M. Jr, Gaillyová, R., Truellová, I., Švagera, Z., 2011. Novinky v novorozeneckém screeningu. XIII. Hradecké pediatrické dny. Hradec Králové, 11. – 12. 11. 2011. Abstract in: Sborník abstrakt, ISBN 978-80-87009-88-8, 16-17.
7. Votava, F., Chrastina, P., Kožich, V., Pešková, K., Šťastná, S., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Vinohradská, H., Kračmar, P., Dejmek, P., **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščaková, M., Piskáčková, T., Macek, M. Jr, Gaillyová, R., Truellová, I., Švagera, Z., 2011. Výsledky novorozeneckého screeningu v České republice. X. celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie s mezinárodní účastí. Plzeň, 25. – 27. 9. 2011. Abstract in: Sborník abstrakt, 184–185.
8. **Krulišová, V.**, Balaščaková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Štambergová, A., Dvořáková, L., Křenková, P., Zemková, D., Kračmar, P., Vávrová, V., Macek, M. jr, Votava, F., 2011. Novorozenecký screening cystické fibrózy v Čechách – srovnání protokolů IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 44. Výroční cytogenetická konference. Třeboň, 7. - 9. 9. 2011. Abstract in: Sborník abstrakt, 58.
9. Skalická, V., **Krulisova, V.**, Balascakova, M., Piskackova, T., Holubova, A., Křenková, P., Nagyová, G., Gaillyová, R., Holčíková, A., Macek, M. Jr, Votava, F., 2011. První výsledky novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v České republice. 10. celostátní konference dětské pneumologie. Abstract in: Čes-slov. Pediat. 66, 267-268.

10. Skalicka, V., **Krulisova, V.**, Balascakova, M., Piskackova, T., Holubova, A., Křenková, P., Nagyová, G., Gaillyová, R., Holčíková, A., Macek, M. Jr, Votava, F., 2011. Novorozenecký screening cystické fibrózy v České republice: souhrn prvních výsledků. 18. kongres české a slovenské pneumologické a ftiseologické společnosti. 22. - 25. 6. 2011, Plzeň. Abstract in: Supplement Studia Pneumologica et Phtiseologica, ISBN 978-80-52118-04/7:str. 89.
11. Votava, F., Kračmar, P., Dejmek, P., Chrastina, P., Kožich, V., Pešková, K., Šťastná, S., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Vinohradská, H., **Krulišová, V.**, Holubová, A., Balaščíková, M., Piskáčková, T., Macek, M. Jr, Gaillyová, R., Truellová, I., Švagera, Z., 2011. Newborn screening in Czechia: Overview of the last 9 years, with emphasis on congenital adrenal hyperplasia (dedicated to anniversary of Prof. Olga Hníková). 17th Workshop of Middle-European Society of Paediatric Endocrinology (MESPE). Český Krumlov 18. – 20. 11. 2011. Abstract in: Čes-slov. Pediat. 66, 347.

5.3. Postery

Abstrakta v časopisech s IF

1. **Krulišová, V.**, Holubová, A., Piskáčková, T., Balaščaková, M., Skalická, V., Gaillyová, R., Valášková, I., Vinohradská, H., Votava, F., Macek, M., 2014. Cystic fibrosis (CF) prevalence derived from CF newborn screening (CFNBS) in the Czech Republic: Comparison of previous epidemiological and current CFNBS-based disease prevalence data. 37th European Cystic Fibrosis Conference. Sweden, Gothenburg, 11. - 14. 6. 2014. Abstract in: J. Cyst. Fibros. 13, S51. IF 2.873
2. Holubová, A., **Krulišová, V.**, Skalická, V., Votava, F., Dejmek, P., Balaščaková, M., Piskáčková, T., Bartošová, J., Kinclová, E., Macek, M. Jr. 2014. Cystic fibrosis newborn screening (CF NBS): 4 year experience of the Prague Centre with the IRT/DNA/IRT protocol. 37th European Cystic Fibrosis Conference. Sweden, Gothenburg, 11. - 14. 6. 2014. Abstract in: J. Cyst. Fibros. 13, S49. IF 2.873
3. Holubová, A., **Krulišová, V.**, Piskáčková, T., Balaščaková, M., Skalická, V., Votava, F., Macek, M. Jr, 2013. Uptake of genetic counseling and analysis of DNA testing outcomes following newborn screening for cystic fibrosis: Experience of the Prague centre. 36th European Cystic Fibrosis Conference. Portugal, Lisbon, 12. - 15. 6. 2013. Abstract in: J. Cyst. Fibros. 12, S56. IF 3.190
4. **Krulišová, V.**, Holubová, A., Skalická, V., Balaščaková, M., Piskáčková, T., Bartošová, J., Vávrová, V., Fila, L., Dejmek, P., Votava, F., Macek, M. Jr., 2012. Diagnostic and counselling dilemmas in newborn screening for cystic fibrosis related to the detection of atypical mutations. 35th European Cystic Fibrosis Conference. Ireland, Dublin, 6. - 9. 6. 2012. Abstract in: J. Cyst. Fibros. 11, S62. IF 2.840

5. **Krulisova, V.**, Balascakova, M., Skalicka, V., Piskackova, T., Holubova, A., Stambergova, A., Dvorakova, L., Krenkova, P., Zemkova, D., Kracmar, P., Vavrova, V., Macek, M. Jr, Votava, F., 2011. The comparison of parallel IRT/DNA/IRT and IRT/PAP/DNA+ST cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic. 34th European Cystic Fibrosis Conference. Germany, Hamburg, 8. - 11. 6. 2011. Abstract in: J. Cyst. Fibros. 10, S5. IF 2.239

6. Balascakova, M., Skalicka, V., Dvorakova, L., Piskacková, T., **Krulisova, V.**, Zemkova, D., Kracmar, P., Vavrova, V., Votava, F., Macek, M. Jr, 2010. Parallel Assessment of the IRT/PAP/DNA versus IRT/DNA newborn screening protocols in the Czech Republic: preliminary results. The 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference. USA, Baltimore, 21. - 23. 10. 2010, Abstract in: Pediatr. Pulmonol., supp33, 397-398. IF 1.918

Abstrakta v časopisech bez IF a ve sbornících

1. **Krulišová, V.**, Balaščaková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Štambergová, A., Macek, M. Jr, Votava, F., 2013. Novorozenecký screening cystické fibrózy: Protokoly založené na stanovení pankreatitis-associated proteinu. Vědecká konference. Praha, 24. – 25. 4. 2013. Abstract in: Sborník, 91.
 2. Votava, F., Chrastina, P., Kozich, V., Peskova, K., Stastna, S., Adam, T., Friedecky, D., Hlidkova, E., Vinohradska, H., Dejmek, P., **Krulisova, V.**, Holubova, A., Balascakova, M., Piskackova, T., Macek, M. Jr, Gaillyova, R., Truellova, I., 2012. Expansion of neonatal screening in the Czech Republic. Poster. The 8th European Regional Meeting of International Society of Neonatal Screening. Hungary, Budapest, 4. – 6. 11. 2012. Abstract in: Orvosi Hetilap, 30-31.
 3. **Krulišová, V.**, Balaščaková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Paděrová, J., Křenková, P., Dvořáková, L., Zemková, D., Kračmar, P., Chovancová, B., Vávrová, V., Štambergová, A., Votava, F., Macek, M. Jr, 2012. Optimalizace novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v ČR: Souběžné posouzení protokolů IRT/DNA/IRT, IRT/PAP a IRT/PAP/DNA. X. český pediatrický kongres. Liberec, 3. – 6. 10. 2012. Abstract in: Čes-slov. Pediat. 67, 354-355.
- Česká pediatrická společnost ČLS JEP ocenila tento poster prvním místem v hodnocení o nejlepší poster zveřejněný v průběhu X. českého pediatrického kongresu 3. – 6. 10. 2012 v Liberci.**
4. **Krulišová, V.**, Balaščaková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Štambergová, A., Dvořáková, L., Křenková, P., Zemková, D., Kračmar, P., Vávrová, V., Macek, M. Jr, Votava, F., 2011. Novorozenecký screening cystické fibrózy v Čechách – Srovnání protokolů IRT/DNA/IRT a IRT/PAP/PT+DNA. Vědecká konference. Praha, 13. – 14. 4. 2011. Abstract in: Sborník, 87.

5.4. Další

Výuková činnost: Lektor IPVZ, výuka mediků v rámci předmětu Klinická genetika (4. ročník 2. LF UK)

Organizátor Mezilaboratorní kontroly kvality molekulárně genetické diagnostiky cystické fibrózy v České republice v letech 2012 a 2013.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
CBAVD	Congenital bilateral absence of the vas deferens; kongenitální bilaterální absence vas deferens
CF	Cystická fibróza
CF-SPID	CF screen positive inconclusive diagnosis; nejasná diagnóza u novorozenců s pozitivním screeningem CF
CFRD	CF-related diabetes; na CF vázaný diabetes mellitus
<i>CFTR</i>	Cystic fibrosis transmembrane regulator gene; transmembránový regulátor vodivosti
CFTR-RDs	CFTR-related disorders; skupina chorob související s <i>CFTR</i>
CI	Confidence interval, interval spolehlivosti
DIOS	Distální intestinální obstrukční syndrom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina; v našem případě označení pro DNA analýzu – molekulárně genetické vyšetření genu <i>CFTR</i>
ENaC	Epithelial sodium channel
FN	Falešná negativita/falešně negativní
FP	Falešná pozitivita/falešně pozitivní
FS	Fail-safe strategy; „záchranná síť“
IRT	Imunoreaktivní trypsinogen
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MSD1, MSD2	Membrane spanning domain 1, Membrane spanning domain 2
NBD1, NBD2	Nucleotide binding domain 1, Nucleotide binding domain 2
NGS	New generation sequencing, sekvenování nové generace
NS	Novorozenecký screening
NSCF	Novorozenecký screening cystické fibrózy
ORCC	Outwardly rectifying chloride channel
P	Počet; v našem případě počet postižených jedinců zachycených screeningovým testem
PAP	Pancreatitis-associated protein; protein asociovaný s pankreatitidou
PPV	Pozitivní prediktivní hodnota

R	Regulatory domain, regulační doména
SNP	Single nucleotide polymorphism; jednonukleotidový polymorfismus
WGS	Whole genome sequencing; celogenomové sekvenování

7. POUŽITÁ LITERATURA

- A Phase 3 Rollover Study of Lumacaftor in Combination With Ivacaftor in Subjects 12 Years and Older With Cystic Fibrosis. [online]. [accessed 2014-06-10]. Available at <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01931839>
- Ahrens, R.C., Standaert, T.A., Launspach, J., Han, S.-H., Teresi, M.E., Aitken, M.L., Kelley, T.J., Hilliard, K.A., Milgram, L.J.H., Konstan, M.W., Weatherly, M.R., McCarty, N.A., 2002. Use of nasal potential difference and sweat chloride as outcome measures in multicenter clinical trials in subjects with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 33, 142–150.
- Baker, M.W., Goose, M., Hoffman, G., Rock, M., Levy, H., Farrell, P.M., 2011. Optimal DNA tier for the IRT/DNA algorithm determined by CFTR mutation results over 14 years of newborn screening. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 10, 278–281. doi:10.1016/j.jcf.2011.02.001
- Balascaková, M., Holubová, A., Skalická, V., Zemková, D., Kracmar, P., Gonsorcikova, L., Camajová, J., Piskácková, T., Lebl, J., Drevínek, P., Gregor, V., Vávrová, V., Votava, F., Macek, M., Jr, 2009. Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 8, 224–227. doi:10.1016/j.jcf.2009.01.002
- Balfour-Lynn, I.M., 2008. Newborn screening for cystic fibrosis: evidence for benefit. *Arch. Dis. Child.* 93, 7–10. doi:10.1136/adc.2007.115832
- Baroni, D., Zegarra-Moran, O., Svensson, A., Moran, O., 2014. Direct interaction of a CFTR potentiator and a CFTR corrector with phospholipid bilayers. *Eur. Biophys. J. EBJ.* doi:10.1007/s00249-014-0956-y
- Baroni, M.A., Anderson, Y.E., Mischler, E., 1997. Cystic fibrosis newborn screening: impact of early screening results on parenting stress. *Pediatr. Nurs.* 23, 143–151.
- Berwouts, S., Morris, M.A., Girodon, E., Schwarz, M., Stuhmann, M., Dequeker, E., 2011. Mutation nomenclature in practice: findings and recommendations from the cystic fibrosis external quality assessment scheme. *Hum. Mutat.* 32, 1197–1203. doi:10.1002/humu.21569

- Bobadilla, J.L., Macek, M., Jr, Fine, J.P., Farrell, P.M., 2002. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.* 19, 575–606. doi:10.1002/humu.10041
- Bombieri, C., Claustres, M., De Boeck, K., Derichs, N., Dodge, J., Girodon, E., Sermet, I., Schwarz, M., Tzetis, M., Wilschanski, M., Bareil, C., Bilton, D., Castellani, C., Cuppens, H., Cutting, G.R., Drevínek, P., Farrell, P., Elborn, J.S., Jarvi, K., Kerem, B., Kerem, E., Knowles, M., Macek, M., Jr, Munck, A., Radojkovic, D., Seia, M., Sheppard, D.N., Southern, K.W., Stuhmann, M., Tullis, E., Zielenski, J., Pignatti, P.F., Ferec, C., 2011. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 10 Suppl 2, S86–102. doi:10.1016/S1569-1993(11)60014-3
- Boucher, R.C., 2007. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol. Med.* 13, 231–240. doi:10.1016/j.molmed.2007.05.001
- Brennan, A.L., Geddes, D.M., Gyi, K.M., Baker, E.H., 2004. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 3, 209–222. doi:10.1016/j.jcf.2004.08.001
- Brunecký, Z., 1972. The incidence and genetics of cystic fibrosis. *J. Med. Genet.* 9, 33–37.
- Castellani, C., Massie, J., 2010. Emerging issues in cystic fibrosis newborn screening. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 16, 584–590. doi:10.1097/MCP.0b013e32833e9e27
- Castellani, C., Massie, J., 2014. Newborn screening and carrier screening for cystic fibrosis: alternative or complementary? *Eur. Respir. J.* 43, 20–23. doi:10.1183/09031936.00125613
- Castellani, C., Picci, L., Scarpa, M., Dehecchi, M.C., Zanolla, L., Assael, B.M., Zacchello, F., 2005. Cystic fibrosis carriers have higher neonatal immunoreactive trypsinogen values than non-carriers. *Am. J. Med. Genet. A.* 135, 142–144. doi:10.1002/ajmg.a.30470

- Castellani, C., Southern, K.W., Brownlee, K., Dankert Roelse, J., Duff, A., Farrell, M., Mehta, A., Munck, A., Pollitt, R., Sermet-Gaudelus, I., Wilcken, B., Ballmann, M., Corbetta, C., de Monestrol, I., Farrell, P., Feilcke, M., Férec, C., Gartner, S., Gaskin, K., Hammermann, J., Kashirskaya, N., Loeber, G., Macek, M., Jr, Mehta, G., Reiman, A., Rizzotti, P., Sammon, A., Sands, D., Smyth, A., Sommerburg, O., Torresani, T., Travert, G., Vernooij, A., Elborn, S., 2009. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 8, 153–173. doi:10.1016/j.jcf.2009.01.004
- Cavanagh, L., Compton, C.J., Tluczek, A., Brown, R.L., Farrell, P.M., 2010. Long-term evaluation of genetic counseling following false-positive newborn screen for cystic fibrosis. *J. Genet. Couns.* 19, 199–210. doi:10.1007/s10897-009-9274-4
- Claustres, M., 2005. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod. Biomed. Online* 10, 14–41.
- Colombo, C., Battezzati, P.M., Crosignani, A., Morabito, A., Costantini, D., Padoan, R., Giunta, A., 2002. Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology* 36, 1374–1382. doi:10.1053/jhep.2002.37136
- Comeau, A.M., Accurso, F.J., White, T.B., Campbell, P.W., 3rd, Hoffman, G., Parad, R.B., Wilfond, B.S., Rosenfeld, M., Sontag, M.K., Massie, J., Farrell, P.M., O'Sullivan, B.P., Cystic Fibrosis Foundation, 2007. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics* 119, e495–518. doi:10.1542/peds.2006-1993
- Comeau, A.M., Parad, R.B., Dorkin, H.L., Dovey, M., Gerstle, R., Haver, K., Lapey, A., O'Sullivan, B.P., Waltz, D.A., Zwerdling, R.G., Eaton, R.B., 2004. Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics* 113, 1573–1581.
- Cornel, M.C., Rigter, T., Weinreich, S.S., Burgard, P., Hoffmann, G.F., Lindner, M., Gerard Loeber, J., Rupp, K., Taruscio, D., Vittozzi, L., 2014. A framework to start the debate on neonatal screening policies in the EU: an Expert Opinion Document. *Eur. J. Hum. Genet.* 22, 12–17. doi:10.1038/ejhg.2013.90

- Crossley, J.R., Smith, P.A., Edgar, B.W., Gluckman, P.D., Elliott, R.B., 1981. Neonatal screening for cystic fibrosis, using immunoreactive trypsin assay in dried blood spots. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 113, 111–121.
- Cystic Fibrosis Mutation Database, a. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>
- Cystic Fibrosis Mutation Database, b. [online]. [accessed 2014-05-25]. Available at <http://www.genet.sickkids.on.ca/CftrDomainPage.html>
- De Braekeleer, M., Allard, C., Leblanc, J.P., Aubin, G., Simard, F., 1998. Is meconium ileus genetically determined or associated with a more severe evolution of cystic fibrosis? *J. Med. Genet.* 35, 262–263.
- Deutschen Ethikrat, 2013. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at <http://www.ethikrat.org/files/press-release-2013-03.pdf>
- Dijk, F.N., Fitzgerald, D.A., 2012. The impact of newborn screening and earlier intervention on the clinical course of cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 13, 220–225. doi:10.1016/j.prrv.2012.05.003
- Dodge, J.A., Lewis, P.A., Stanton, M., Wilsher, J., 2007. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur. Respir. J.* 29, 522–526. doi:10.1183/09031936.00099506
- Dodge, J.A., Morison, S., Lewis, P.A., Coles, E.C., Geddes, D., Russell, G., Littlewood, J.M., Scott, M.T., 1997. Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee. *Arch. Dis. Child.* 77, 493–496.
- Duguépéroux, I., De Braekeleer, M., 2005. The CFTR 3849+10kbC->T and 2789+5G->A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur. Respir. J.* 25, 468–473. doi:10.1183/09031936.05.10100004
- Farrell, P.M., 2008. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 7, 450–453. doi:10.1016/j.jcf.2008.03.007

- Farrell, P.M., Kosorok, M.R., Rock, M.J., Laxova, A., Zeng, L., Lai, H.C., Hoffman, G., Laessig, R.H., Splaingard, M.L., 2001. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics* 107, 1–13.
- Farrell, P.M., Rosenstein, B.J., White, T.B., Accurso, F.J., Castellani, C., Cutting, G.R., Durie, P.R., Legrys, V.A., Massie, J., Parad, R.B., Rock, M.J., Campbell, P.W., 3rd, Cystic Fibrosis Foundation, 2008. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J. Pediatr.* 153, S4–S14. doi:10.1016/j.jpeds.2008.05.005
- Ferec, C., Cutting, G.R., 2012. Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a009480. doi:10.1101/cshperspect.a009480
- Gendiagnostikgesetz - GenDG, 2009. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at <http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/BJNR252900009.html>
- Gianotti, A., Melani, R., Caci, E., Sondo, E., Ravazzolo, R., Galletta, L.J.V., Zegarra-Moran, O., 2013. Epithelial sodium channel silencing as a strategy to correct the airway surface fluid deficit in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 445–452. doi:10.1165/rcmb.2012-0408OC
- GIBSON, L.E., COOKE, R.E., 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23, 545–549.
- Girodon, E., Des Georges, M., Medina, R., Grenet, D., Ferec, C., Claustres, M., Audrézet, M.P. 2008. Occurrence of CFTR de novo mutations is not so rare. *J. Cyst. Fibros.* 7, Suppl2, S6.
- Giusti, R., New York State Cystic Fibrosis Newborn Screening Consortium, 2008. Elevated IRT levels in African-American infants: implications for newborn screening in an ethnically diverse population. *Pediatr. Pulmonol.* 43, 638–641. doi:10.1002/ppul.20824
- Goldenberg, A.J., Sharp, R.R., 2012. The ethical hazards and programmatic challenges of genomic newborn screening. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 307, 461–462. doi:10.1001/jama.2012.68

- Gregor, V., 2014. Oddělení lékařské genetiky, Thomayerova nemocnice, Praha, primář MUDr. Vladimír Gregor. Osobní komunikace na základě dat z registru www.vrozene-vady.cz
- Harris, A., Argent, B.E., 1993. The cystic fibrosis gene and its product CFTR. *Semin. Cell Biol.* 4, 37–44.
- Hayeems, R.Z., Bytautas, J.P., Miller, F.A., 2008. A systematic review of the effects of disclosing carrier results generated through newborn screening. *J. Genet. Couns.* 17, 538–549. doi:10.1007/s10897-008-9180-1
- Houšťek, J., Vávrová, V., 1969. Výskyt a klinické formy mukoviscidózy. *Prakt. Lékař.* 49, 219–222.
- Hurley, M.N., McKeever, T.M., Prayle, A.P., Fogarty, A.W., Smyth, A.R., 2014. Rate of improvement of CF life expectancy exceeds that of general population-Observational death registration study. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* doi:10.1016/j.jcf.2013.12.002
- Iovanna, J.L., Keim, V., Nordback, I., Montalto, G., Camarena, J., Letoublon, C., Lévy, P., Berthézène, P., Dagorn, J.C., 1994. Serum levels of pancreatitis-associated protein as indicators of the course of acute pancreatitis. Multicentric Study Group on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 106, 728–734.
- Ismailov, I.I., Awayda, M.S., Jovov, B., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Dedman, J.R., Kaetzel, M., Benos, D.J., 1996. Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 271, 4725–4732.
- Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E.B., Gouaux, E., 2007. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449, 316–323. doi:10.1038/nature06163
- Johansen Taber, K.A., Dickinson, B.D., Wilson, M., 2014. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Intern. Med.* 174, 275–280. doi:10.1001/jamainternmed.2013.12048
- Jovov, B., Ismailov, I.I., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Sorscher, E.J., Dedman, J.R., Kaetzel, M.A., Benos, D.J., 1995. Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J. Biol. Chem.* 270, 29194–29200.

- Kashirskaya, N.Y., 2014. CF Newborn Screening in the Russian Federation. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at https://www.ecfs.eu/files/webfm/webfiles/File/Working%20Groups/Neonatal%20WG/NSWG_newsletter06Jan14.pdf.
- Kashirskaya, N.Y., Kapranov, N.I. MANAGEMENT OF CYSTIC FIBROSIS IN RUSSIA. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at <http://www.cf-rf.ru/content/en/home.html>.
- Knowles, M.R., Boucher, R.C., 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* 109, 571–577. doi:10.1172/JCI15217
- Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balaščaková, M., Krulišová, V., Čamajová, J., Turnovec, M., Libik, M., Norambuena, P., Štambergová, A., Dvořáková, L., Skalická, V., Bartošová, J., Kučerová, T., Fila, L., Zemková, D., Vávrová, V., Koudová, M., Macek, M., Krebsová, A., Macek, M., Jr, 2013. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 12, 532–537. doi:10.1016/j.jcf.2012.12.002
- Krulišová, V., Balaščaková, M., Skalická, V., Piskáčková, T., Holubová, A., Paděrová, J., Křenková, P., Dvořáková, L., Zemková, D., Kračmar, P., Chovancová, B., Vávrová, V., Štambergová, A., Votava, F., Macek, M., Jr, 2012. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur. J. Pediatr.* 171, 1223–1229. doi:10.1007/s00431-012-1747-z
- Lai, H.J., Cheng, Y., Cho, H., Kosorok, M.R., Farrell, P.M., 2004. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Epidemiol.* 159, 537–546.
- Lao, O., Lu, T.T., Nothnagel, M., Junge, O., Freitag-Wolf, S., Caliebe, A., Balaschakova, M., Bertranpetit, J., Bindoff, L.A., Comas, D., Holmlund, G., Kouvatsi, A., Macek, M., Mollet, I., Parson, W., Palo, J., Ploski, R., Sajantila, A., Tagliabracci, A., Gether, U., Werge, T., Rivadeneira, F., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Gieger, C., Wichmann, H.-E., Rütger, A., Schreiber, S., Becker, C., Nürnberg, P., Nelson, M.R., Krawczak, M., Kayser, M., 2008. Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Curr. Biol.* CB 18, 1241–1248. doi:10.1016/j.cub.2008.07.049

- LeGrys, V.A., 2001. Assessment of sweat-testing practices for the diagnosis of cystic fibrosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125, 1420–1424. doi:10.1043/0003-9985(2001)125<1420:AOSTPF>2.0.CO;2
- LeGrys, V.A., Yankaskas, J.R., Quittell, L.M., Marshall, B.C., Mogayzel, P.J., Jr, Cystic Fibrosis Foundation, 2007. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J. Pediatr.* 151, 85–89. doi:10.1016/j.jpeds.2007.03.002
- Lu, T.T., Lao, O., Nothnagel, M., Junge, O., Freitag-Wolf, S., Caliebe, A., Balascakova, M., Bertranpetit, J., Bindoff, L.A., Comas, D., Holmlund, G., Kouvatsi, A., Macek, M., Mollet, I., Nielsen, F., Parson, W., Palo, J., Ploski, R., Sajantila, A., Tagliabracci, A., Gether, U., Werge, T., Rivadeneira, F., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Gieger, C., Wichmann, H.-E., Ruether, A., Schreiber, S., Becker, C., Nürnberg, P., Nelson, M.R., Kayser, M., Krawczak, M., 2009. An evaluation of the genetic-matched pair study design using genome-wide SNP data from the European population. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17, 967–975. doi:10.1038/ejhg.2008.266
- Macek, M., 2014. Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha, přednosta prof. MUDr. Milan Macek jr., DrSc. Osobní komunikace.
- Macek, M., Jr, Macek, M., Sr, Krebsová, A., Nash, E., Hamosh, A., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Schmidtke, J., Maestri, N.E., Sperling, K., Krawczak, M., Cutting, G.R., 1997. Possible association of the allele status of the CS.7/HhaI polymorphism 5' of the CFTR gene with postnatal female survival. *Hum. Genet.* 99, 565–572.
- Makukh, H., Krenková, P., Tyrkus, M., Bober, L., Hancárová, M., Hnateyko, O., Macek, M., 2010. A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: genotype-phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 9, 371–375. doi:10.1016/j.jcf.2010.06.001
- Massie, J., Curnow, L., Gaffney, L., Carlin, J., Francis, I., 2010. Declining prevalence of cystic fibrosis since the introduction of newborn screening. *Arch. Dis. Child.* 95, 531–533. doi:10.1136/adc.2009.172916

Mayell, S.J., Munck, A., Craig, J.V., Sermet, I., Brownlee, K.G., Schwarz, M.J., Castellani, C., Southern, K.W., European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group, 2009. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 8, 71–78. doi:10.1016/j.jcf.2008.09.005

Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče, 2009. *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky*, 6, 7–14.

Munck, A., Gérardin, M., Alberti, C., Ajzenman, C., Lebourgeois, M., Aigrain, Y., Navarro, J., 2006. Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *J. Pediatr. Surg.* 41, 1556–1560. doi:10.1016/j.jpedsurg.2006.05.014

Novorozenecký screening, 2013. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at <http://www.novorozeneckyscreening.cz/ov-co-je-novorozenecky-screening>

Nshimyumukiza, L., Bois, A., Daigneault, P., Lands, L., Laberge, A.-M., Fournier, D., Duplantie, J., Giguère, Y., Gekas, J., Gagné, C., Rousseau, F., Reinharz, D., 2014. Cost effectiveness of newborn screening for cystic fibrosis: a simulation study. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 13, 267–274. doi:10.1016/j.jcf.2013.10.012

Parad, R.B., Comeau, A.M., 2005. Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J. Pediatr.* 147, S78–82. doi:10.1016/j.jpeds.2005.08.017

Počet cizinců - Popis aktuálního vývoje, 2013. [online]. [accessed 2014-05-29]. Available at http://www.czso.cz/csu/cizinci.nsf/o/ciz_pocet_cizincu-popis_aktualniho_vyvoje

Ramsey, B.W., Davies, J., McElvaney, N.G., Tullis, E., Bell, S.C., Dřevínek, P., Griese, M., McKone, E.F., Wainwright, C.E., Konstan, M.W., Moss, R., Ratjen, F., Sermet-Gaudelus, I., Rowe, S.M., Dong, Q., Rodriguez, S., Yen, K., Ordoñez, C., Elborn, J.S., VX08-770-102 Study Group, 2011. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* 365, 1663–1672. doi:10.1056/NEJMoa1105185

Ranieri, E., 2013. Newborn screening in Australia, investigating alternative strategies such as PAP. Oral presentation. 36th European Cystic Fibrosis Conference. Portugal, Lisbon, 12. - 15. 6. 2013.

- Ravine, D., Francis, R.I., Danks, D.M., 1993. Non-specific elevation of immunoreactive trypsinogen in sick infants. *Eur. J. Pediatr.* 152, 348–349.
- Rock, M.J., Mischler, E.H., Farrell, P.M., Wei, L.J., Bruns, W.T., Hassemer, D.J., Laessig, R.H., 1990. Newborn screening for cystic fibrosis is complicated by age-related decline in immunoreactive trypsinogen levels. *Pediatrics* 85, 1001–1007.
- Rohlf, E.M., Zhou, Z., Heim, R.A., Nagan, N., Rosenblum, L.S., Flynn, K., Scholl, T., Akmaev, V.R., Sirko-Osadsa, D.A., Allitto, B.A., Sugarman, E.A., 2011. Cystic fibrosis carrier testing in an ethnically diverse US population. *Clin. Chem.* 57, 841–848. doi:10.1373/clinchem.2010.159285
- Ross, L.F., 2008. Newborn screening for cystic fibrosis: a lesson in public health disparities. *J. Pediatr.* 153, 308–313. doi:10.1016/j.jpeds.2008.04.061
- Roussey, M., Le Bihannic, A., Scotet, V., Audrezet, M.P., Blayau, M., Dagorne, M., David, V., Deneuille, E., Giniès, J.L., Laurans, M., Moisan-Petit, V., Rault, G., Vigneron, P., Férec, C., 2007. Neonatal screening of cystic fibrosis: diagnostic problems with CFTR mild mutations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 613. doi:10.1007/s10545-007-0633-8
- Sarles, J., 2011. The use of Pancreatitis associated protein (PAP) in NBS; results of the French study. Oral presentation. 34th European Cystic Fibrosis Conference. Germany, Hamburg, 8. - 11. 6. 2011.
- Sarles, J., Barthelémy, S., Férec, C., Iovanna, J., Roussey, M., Farriaux, J.P., Toutain, A., Berthelot, J., Maurin, N., Codet, J.P., Berthézène, P., Dagorn, J.C., 1999. Blood concentrations of pancreatitis associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 80, F118–122.
- Sarles, J., Berthézène, P., Le Louarn, C., Somma, C., Perini, J.-M., Catheline, M., Mirallié, S., Luzet, K., Roussey, M., Farriaux, J.-P., Berthelot, J., Dagorn, J.-C., 2005. Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *J. Pediatr.* 147, 302–305. doi:10.1016/j.jpeds.2005.05.017
- Sarles, J., Giorgi, R., Berthézène, P., Munck, A., Cheillan, D., Dagorn, J.-C., Roussey, M., 2014. Neonatal screening for cystic fibrosis: Comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* doi:10.1016/j.jcf.2014.01.004

- Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., Guggino, W.B., 1999. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* 79, S145–166.
- Schwiebert, E.M., Flotte, T., Cutting, G.R., Guggino, W.B., 1994. Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. *Am. J. Physiol.* 266, C1464–1477.
- Scotet, V., Duguépéroux, I., Saliou, P., Rault, G., Roussey, M., Audrézet, M.-P., Férec, C., 2012. Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 14. doi:10.1186/1750-1172-7-14
- Sermet-Gaudelus, I., Girodon, E., Roussel, D., Deneuille, E., Bui, S., Huet, F., Guillot, M., Aboutaam, R., Renouil, M., Munck, A., des Georges, M., Iron, A., Thauvin-Robinet, C., Fajac, I., Lenoir, G., Roussey, M., Edelman, A., 2010. Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax* 65, 539–544. doi:10.1136/thx.2009.123422
- Sims, E.J., Clark, A., McCormick, J., Mehta, G., Connett, G., Mehta, A., United Kingdom Cystic Fibrosis Database Steering Committee, 2007. Cystic fibrosis diagnosed after 2 months of age leads to worse outcomes and requires more therapy. *Pediatrics* 119, 19–28. doi:10.1542/peds.2006-1498
- Slieker, M.G., Uiterwaal, C.S.P.M., Sinaasappel, M., Heijerman, H.G.M., van der Laag, J., van der Ent, C.K., 2005. Birth prevalence and survival in cystic fibrosis: a national cohort study in the Netherlands. *Chest* 128, 2309–2315. doi:10.1378/chest.128.4.2309
- Sommerburg, O., Krulisova, V., Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., Happich, M., Kulozik, A.E., Votava, F., Balasckova, M., Skalicka, V., Stopsack, M., Gahr, M., Macek, M., Jr, Mall, M.A., Hoffmann, G.F., 2014. Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 13, 15–23. doi:10.1016/j.jcf.2013.06.003

- Sommerburg, O., Lindner, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., Leible, S., Feneberg, R., Kulozik, A.E., Mall, M.A., Hoffmann, G.F., 2010. Initial evaluation of a biochemical cystic fibrosis newborn screening by sequential analysis of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein (IRT/PAP) as a strategy that does not involve DNA testing in a Northern European population. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, S263–271. doi:10.1007/s10545-010-9174-7
- Sontag, M.K., Corey, M., Hokanson, J.E., Marshall, J.A., Sommer, S.S., Zerbe, G.O., Accurso, F.J., 2006. Genetic and physiologic correlates of longitudinal immunoreactive trypsinogen decline in infants with cystic fibrosis identified through newborn screening. *J. Pediatr.* 149, 650–657. doi:10.1016/j.jpeds.2006.07.026
- Sosnay, P.R., Siklosi, K.R., Van Goor, F., Kaniecki, K., Yu, H., Sharma, N., Ramalho, A.S., Amaral, M.D., Dorfman, R., Zielenski, J., Masica, D.L., Karchin, R., Millen, L., Thomas, P.J., Patrinos, G.P., Corey, M., Lewis, M.H., Rommens, J.M., Castellani, C., Penland, C.M., Cutting, G.R., 2013. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat. Genet.* 45, 1160–1167. doi:10.1038/ng.2745
- Southern, K.W., Munck, A., Kashirskaya, N., The ECFS Neonatal Screening Working Group, 2013. [online]. Newborn Screening and Access to Specialist Care from Early Life. [accessed 2014-05-28]. Available at https://www.ecfs.eu/files/webfm/webfiles/File/Working%20Groups/Neonatal%20SWG/NSWG_newsletter_Aug2013.pdf
- Southern, K.W., Munck, A., Pollitt, R., Travert, G., Zanolla, L., Dankert-Roelse, J., Castellani, C., ECFS CF Neonatal Screening Working Group, 2007. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 6, 57–65. doi:10.1016/j.jcf.2006.05.008
- Stopsack, M., 2011. Improved cut off combination for IRT and PAP in newborn screening for cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 10, Suppl1, S6.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., Boucher, R.C., 1995. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269, 847–850.
- Stutts, M.J., Chinet, T.C., Mason, S.J., Fullton, J.M., Clarke, L.L., Boucher, R.C., 1992. Regulation of Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1621–1625.

Thauvin-Robinet, C., Munck, A., Huet, F., de Becdelièvre, A., Jimenez, C., Lalau, G., Gautier, E., Rollet, J., Flori, J., Nové-Josserand, R., Soufir, J.-C., Haloun, A., Hubert, D., Houssin, E., Bellis, G., Rault, G., David, A., Janny, L., Chiron, R., Rives, N., Hairion, D., Collignon, P., Valeri, A., Karsenty, G., Rossi, A., Audrézet, M.-P., Férec, C., Leclerc, J., Georges, M. des, Claustres, M., Bienvenu, T., Gérard, B., Boisseau, P., Cabet-Bey, F., Cheillan, D., Feldmann, D., Clavel, C., Bieth, E., Iron, A., Simon-Bouy, B., Izard, V., Steffann, J., Viville, S., Costa, C., Drouineaud, V., Fauque, P., Binquet, C., Bonithon-Kopp, C., Morris, M.A., Faivre, L., Goossens, M., Roussey, M., Girodon, E., collaborating working group on p.Arg117His, 2013. CFTR p.Arg117His associated with CBAVD and other CFTR-related disorders. *J. Med. Genet.* 50, 220–227. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101427

Thauvin-Robinet, C., Munck, A., Huet, F., Génin, E., Bellis, G., Gautier, E., Audrézet, M.-P., Férec, C., Lalau, G., Georges, M.D., Claustres, M., Bienvenu, T., Gérard, B., Boisseau, P., Cabet-Bey, F., Feldmann, D., Clavel, C., Bieth, E., Iron, A., Simon-Bouy, B., Costa, C., Medina, R., Leclerc, J., Hubert, D., Nové-Josserand, R., Sermet-Gaudelus, I., Rault, G., Flori, J., Leroy, S., Wizla, N., Bellon, G., Haloun, A., Perez-Martin, S., d' Acremont, G., Corvol, H., Clément, A., Houssin, E., Binquet, C., Bonithon-Kopp, C., Alberti-Boulmé, C., Morris, M.A., Faivre, L., Goossens, M., Roussey, M., Collaborating Working Group on R117H, Girodon, E., 2009. The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. *J. Med. Genet.* 46, 752–758. doi:10.1136/jmg.2009.067215

The Clinical and Functional Translation of CFTR, a. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at <http://www.cftr2.org>

The Clinical and Functional Translation of CFTR, b. [online]. [accessed 2014-05-28] Available at http://www.cftr2.org/mutation.php?view=scientific&mutation_id=6

The European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group, 2014. Report for the Board. [online]. [Accessed 2014-05-27]. Available at <https://www.ecfs.eu/files/webfm/webfiles/File/Working%20Groups/Neonatal%20SWG/NSWGReportMay2014.pdf>

The R Project for Statistical Computing. [online]. [accessed 2014-04-28]. Available at <http://www.r-project.org/>

Therrell, B.L., Jr, Hannon, W.H., Hoffman, G., Ojodu, J., Farrell, P.M., 2012. Immunoreactive Trypsinogen (IRT) as a Biomarker for Cystic Fibrosis: challenges in newborn dried blood spot screening. *Mol. Genet. Metab.* 106, 1–6. doi:10.1016/j.ymgme.2012.02.013

- Tluczek, A., Kosciak, R.L., Modaff, P., Pfeil, D., Rock, M.J., Farrell, P.M., Lifchez, C., Freeman, M.E., Gershan, W., Zaleski, C., Sullivan, B., 2006. Newborn screening for cystic fibrosis: parents' preferences regarding counseling at the time of infants' sweat test. *J. Genet. Couns.* 15, 277–291. doi:10.1007/s10897-006-9031-x
- Trujillano, D., Ramos, M.D., González, J., Tornador, C., Sotillo, F., Escaramis, G., Ossowski, S., Armengol, L., Casals, T., Estivill, X., 2013. Next generation diagnostics of cystic fibrosis and CFTR-related disorders by targeted multiplex high-coverage resequencing of CFTR. *J. Med. Genet.* 50, 455–462. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101602
- Vávrová, V., a kolektiv, 2006a. *Cystická fibróza*. Grada, ISBN 80-247-0531-1, Praha, 301.
- Vávrová, V., a kolektiv, 2006b. *Cystická fibróza*. Grada, ISBN 80-247-0531-1, Praha, 35.
- Vávrová, V., a kolektiv, 2006c. *Cystická fibróza*. Grada, ISBN 80-247-0531-1, Praha, 479.
- Vávrová, Zemková, Skalická, Votava, 2006. Problémy v diagnostice cystické fibrózy – potřeba novorozeneckého screeningu. *Čes-slov. Pediat.* 12, 703–709.
- Vernooij-van Langen, A.M.M., Loeber, J.G., Elvers, B., Triepels, R.H., Gille, J.J.P., Van der Ploeg, C.P.B., Reijntjens, S., Dompeling, E., Dankert-Roelse, J.E., CHOPIN Study Group, 2012. Novel strategies in newborn screening for cystic fibrosis: a prospective controlled study. *Thorax* 67, 289–295. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200730
- Vernooij-van Langen, A.M.M., Reijntjens, S., van der Pal, S.M., Loeber, J.G., Dompeling, E., Dankert-Roelse, J.E., 2013. To know or not to know, disclosure of a newborn carrier screening test result for cystic fibrosis. *Eur. J. Med. Genet.* 56, 192–196. doi:10.1016/j.ejmg.2013.01.006
- Votava, F., Kožich, V., Chrástina, P., Pešková, K., Adam, T., Hlídková, E., Vinohradská, H., Dejmek, P., Krulišová, Veronika, V., Holubová, A., Balašáková, M., Piskáčková, T., Macek, M., Gaillyová, R., Valášková, I., Skalická, V., 2014. Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice. *Čes-slov. Pediat.* 69, 77–86.

- Wagener, J.S., Zemanick, E.T., Sontag, M.K., 2012. Newborn screening for cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 24, 329–335. doi:10.1097/MOP.0b013e328353489a
- Wilcken, B., Wiley, V., Sherry, G., Bayliss, U., 1995. Neonatal screening for cystic fibrosis: a comparison of two strategies for case detection in 1.2 million babies. *J. Pediatr.* 127, 965–970.
- Yu, H., Burton, B., Huang, C.-J., Worley, J., Cao, D., Johnson, J.P., Jr, Urrutia, A., Joubran, J., Seepersaud, S., Sussky, K., Hoffman, B.J., Van Goor, F., 2012. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 11, 237–245. doi:10.1016/j.jcf.2011.12.005
- Yu, J., Chen, Z., Ni, Y., Li, Z., 2012. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 25–35. doi:10.1093/humrep/der377