

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



Optimalizace novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v České republice

MUDr. Veronika Krulišová

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor:	Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie
Předseda oborové rady:	Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.
Školící pracoviště:	Ústav biologie a lékařské genetiky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Motol
Autor:	MUDr. Veronika Krulišová
Školitel:	Prof. MUDr. Milan Macek jr., DrSc.
Konzultant:	Doc. MUDr. Felix Votava, Ph.D.
Oponenti:	

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:vhod.
kde:

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

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, specifity 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.

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Cystická fibróza (CF)	6
1.2. Postnatální diagnostika CF	6
1.3. Novorozenecký screening	7
1.3.1. Novorozenecký screening cystické fibrózy	7
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	11
3. PUBLIKACE	12
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	12
3.1.1. Abstrakt	12
3.1.2. Úvod k publikaci	13
3.1.3. Závěr.....	14
3.2. Sommerburg, O., Krulisova, V., Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., Happich, M., Kulozik, A.E., Votava, F., Balaschakova, 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	16
3.2.1. Abstrakt	16
3.2.2. Úvod k publikaci	16
3.2.3. Závěr.....	17
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	18
3.3.1. Abstrakt	18
3.3.2. Úvod k publikaci	18
3.3.3. Závěr.....	19
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. 20	20
3.4.1. Abstrakt	20
3.4.2. Úvod k publikaci	21
3.4.3. Závěr.....	21

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	22
3.5.1. Abstrakt	22
3.5.2. Úvod k publikaci	23
3.5.3. Závěr.....	23
4. SHRNU TÍ.....	24
5. POUŽITÁ LITERATURA.....	25
6. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	29
6.1. Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem dizertace	29
6.1.1. S impact factorem.....	29
6.1.2. Bez impact factoru	30
6.2. Seznam ostatních publikací.....	30

1. ÚVOD

1.1. Cystická fibróza (CF)

CF (MIM 219700) je nejčastějším nevyléčitelným 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 studiemi (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 prenatalní a preimplantační diagnostiky je populační riziko CF v České republice odhadováno na 1 : 4 500 (Votava et al., 2014).

CF ve své klasické podobě postihuje zejména dýchací systém, slinivku břišní a potní žlázy. Dalším běžným příznakem je mužská infertility. U novorozence se může CF manifestovat střevní neprůchodností, tzv. mekoniovým ileem. V některých případech může být jediným projevem onemocnění např. chronická pankreatitida, nosní polypóza nebo porucha reprodukce u mužů (tzv. CBAVD - Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens).

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. Postnatální diagnostika CF

Diagnóza CF vychází z klinického podezření. Abnormální funkci proteinu CFTR lze potvrdit potním testem (tj. koncentrace chloridových iontů v potu ≥ 60 mmol/l) 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.

1.3. Novorozenecký screening

Novorozeneckým screeningem 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: kongenitální hypotyreóza, kongenitální adrenální hyperplazie, CF, dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin (tj. fenyلكetonurie 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).

1.3.1. 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 sinobronchiálního 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 ductů vazkým hlenem. Aciny produkují IRT a obstrukce pankreatických ductů způsobí, že IRT přestoupí do krve ve vyšší koncentraci.

1.3.1.1. Základní schémata NSCF

1.3.1.1.1. 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 \geq 99. percentil (Wilcken et al., 1995), dle jiných autorů je vhodnější použít cut-off hodnotu \geq 95. – 97. percentil (Comeau et al., 2004; Wagener et al., 2012). 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 pozitivní prediktivní hodnotu (PPV) testu.

1.3.1.1.2. 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 diagnostický potní test. Podle nastavené cut-off hodnoty IRT v prvním odběru je potní test indikovaný u 1 - 5 % novorozenců - protokoly IRT/IRT tak stále vedou k vysokému počtu falešných pozitivit (Castellani et al., 2009; Ross, 2008).

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 přidavné zátěže novorozence a rodiny.

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 chloridových iontů v potu do 30 mmol/l) nebo pacienta s CF (koncentrace chloridových iontů nad 60 mmol/l), kde druhá, vzácnější mutace, není součástí použité diagnostické soupravy.

Mezi nevýhody těchto protokolů patří zejména detekce zdravých heterozygotů a probandů s nejasnou diagnózou. Tyto a další nevýhody jsou podrobněji diskutovány v kapitole 3.1.2.

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. PAP je stanovován ze stejné krevní skvrny jako iniciální IRT. PAP sám o sobě je vysoce senzitivní, ale málo specifický. 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).

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 DNA analýzou genu *CFTR*.

1.3.1.1.3. 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 nálezů 2 nebo 1 mutace následuje diagnostický 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 nálezů 2 nebo 1 mutace pak následuje potní test.

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).

Je 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.

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 specificitu současného celoplošného screeningového protokolu IRT/DNA/IRT a protokolů IRT/PAP a IRT/PAP/DNA na kohortě 106 522 novorozenců narozených v Čechách. Výstup projektu se stal podkladem pro rozhodování o volbě optimálního modelu pravidelného celoplošného NSCF v České republice.

2) Zhodnocení senzitivity a specificity 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., Balašáková, 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

3.1.1. Abstrakt

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., ≥ 1.8 if IRT 50-99.9 or ≥ 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.

3.1.2. Úvod k publikaci

Ačkoliv jsou IRT/DNA protokoly s ohledem na vysokou senzitivitu a specifickou 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.

2) Další nevýhodou je odhalení jedinců s tzv. nejasnou diagnózou CF (Comeau et al., 2007; Mayell et al., 2009; Thauvin-Robinet et al., 2013). Pojem 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 (tj. koncentrace chloridových iontů v potu do 30 mmol/l), b) nález 1 nebo žádné mutace při hraničním výsledku potního testu (tj. 30-59 mmol/l).

U probandů s nejasnou diagnózou nelze předpovědět závažnost obtíží ani prognózu. Většina těchto jedinců může být celý život asymptomatická nebo může mít jen „mírnější“ formu CF (tzv. *CFTR*-related disorders; skupina chorob související s *CFTR*).

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 (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 specifickou (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 specifickou lepší než u IRT/IRT protokolů.

Hlavním cílem našeho projektu bylo proto ověřit hypotézu o výhodnosti screeningových protokolů založených na stanovení PAP ve druhém analytickém stupni. Porovnávali jsme proveditelnost, senzitivitu a specifitu protokolu IRT/DNA/IRT, který funguje jako současný celoplošný screeningový protokol na území České republiky od roku 2009, a protokolu IRT/PAP. Design této studie nám dále umožnil posoudit senzitivitu a specifitu protokolu IRT/PAP/DNA. Závěr projektu se stal podkladem pro rozhodování o volbě nejvhodnějšího modelu pravidelného celoplošného NSCF v České republice.

3.1.3. Závěr

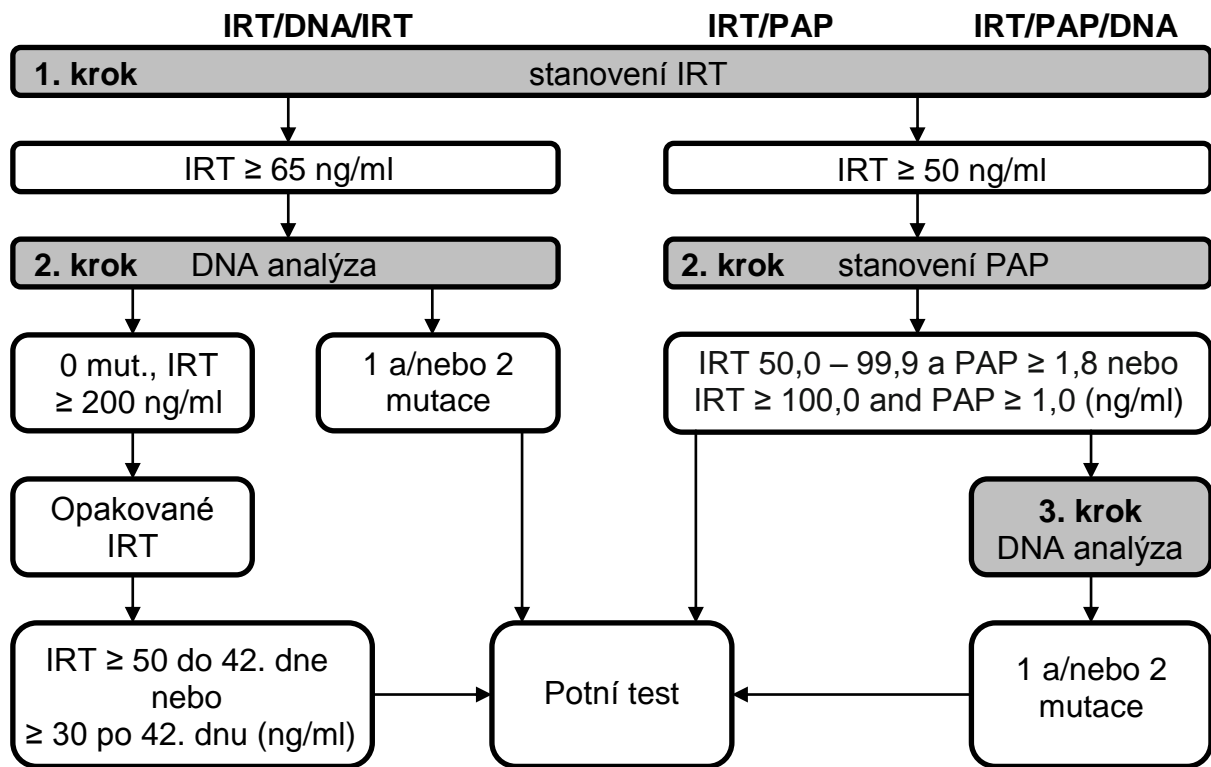
Paralelní srovnání porovnávaných modelů NSCF v naší studii ukázalo (Obr. č. 1), že screeningové schéma IRT/PAP dle originálních cut-off hodnot pro IRT a PAP (Sarles et al., 2005) má vysokou falešnou negativitu a neakceptabilně vysoký počet indikovaných potních testů, a je proto nevhodné k celoplošnému 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 (Sarles, 2011; Stopsack, 2011) 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. Nevýhodou protokolu zůstává, že stejně jako schéma IRT/DNA/IRT vede k odhalení probandů s nejasnou diagnózou. Vzhledem k nízkému počtu těchto nejasných případů 1 : 10 (2 probandi s nejasnou diagnózou připadající na 20 pacientů s klasickou formou CF), to však 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 schéma IRT/PAP/DNA s modifikovanými cut-off hodnotami pro IRT a PAP.

Obr. č. 1: Porovnávané protokoly s použitými cut-off hodnotami



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

3.2.1. Abstrakt

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.

3.2.2. Úvod k publikaci

Zatímco většina evropských zemí má v době sepisování této dizertační práce celoplošný NSCF, 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 Sársko, 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 specificity; 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 (Sarles et al., 2005)?

3.2.3. Závěr

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. Screeningové schéma IRT/PAP s dostatečně nízkými cut-off hodnotami pro PAP tak sice umožňuje dosáhnout vysoké senzitivity, ale pouze za cenu vysoké falešné pozitivivity 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., Balašáková, 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., Křesová, 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**

3.3.1. Abstrakt

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".

3.3.2. 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 efektivit 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.

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 (Sarles, 2011; Stopsack, 2011) studovali v publikaci Krulišová et al., 2012 (viz kapitola 3.1.).

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.

3.4.1. Abstrakt

Pomocí celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu ze suché kapky krve (SKK) na filtračním papírku jsou od roku 1975 vyhledáváni pacienti s fenylketonurií (PKU); 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 31. prosince 2012 bylo vyšetřeno 1 179 136 novorozenců na PKU 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 změřena 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 diagnosou. Screeningová prevalence jednotlivých nemocí byly následující CH 1:3 562; CAH 1:12 343; CF 1:7 060; PKU 1:7 234; MCADD 1:17 269; LCHADD 1:51 808; VLCADD 1:90 663; GA I 1:120 884; MSUD a IVA shodně 1:181 327. Screeninem dosud nebyl zachycen žádný novorozenec s CPTD I, II a CACTD. Efektivita screeningového programu v ČR se zvyšovala, kumulativní četnost záchytů narůstala z 1:2 701 v letech 2002-2005 přes 1:2 072

v letech 2007-2008 až na 1:1 138 po zásadním rozšíření novorozeneckého screeningu (NS) v roce 2009. Četnost falešné positivity (FPR) činila 0,540% , z toho 74% reprezentuje NS CAH.

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

3.4.2. 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.

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 efektivitě přispělo také zavedení NSCF.

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).

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**

3.5.1. Abstrakt

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.

3.5.2. 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), 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).

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.

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.

3.5.3. Závěr

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 popsaných 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.

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.

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 nevléčitelným onemocněním, kombinace časně 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. POUŽITÁ LITERATURA

- 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, 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.
- 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
- 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., 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
- 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.
- 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
- 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
- Gendiagnostikgesetz - GenDG, 2009. [online]. [accessed 2014-05-28]. Available at <http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/BJNR252900009.html>
- Houštěk, J., Vávrová, V., 1969. Výskyt a klinické formy mukoviscidózy. *Prakt. Lékař.* 49, 219–222.
- 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>.
- 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. 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., Balascakova, 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., Rüther, 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.* 18, 1241–1248. doi:10.1016/j.cub.2008.07.049
- 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., Rüther, 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.* 17, 967–975. doi:10.1038/ejhg.2008.266
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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.
- 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
- 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
- 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
- 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. 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. Inher. Metab. Dis.* 33, S263–271. doi:10.1007/s10545-010-9174-7
- 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., 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.
- 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., Biquet, 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
- 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
- Vávrová, V., Zemková, D., Skalická, V., Votava, F., 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
- Votava, F., Kožich, V., Chrastina, P., Pešková, K., Adam, T., Hlídková, E., Vinohradská, H., Dejmek, P., Krulišová, Veronika, 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.
- 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.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ

6.1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertace

6.1.1. S impact factorem

1. Sommerburg, O., **Krulisova, V.**, Hammermann, J., Lindner, M., Stahl, M., Muckenthaler, M., Kohlmüller, D., Happich, M., Kulozik, A.E., Votava, F., Balasčakova, 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), dosud necitováno
2. Khrunin, A.V., Khokhrin, D.V., Filippova, I.N., Esko, T., Nelis, M., Bebyakova, N.A., Bolotova, N.L., Klovin, 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), dosud necitováno
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), dosud necitováno
4. **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. Pediat.* 171, 1223-1229. (IF 1,907), citováno 3x

6.1.2. Bez impact factoru

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. (recenzováno)

6.2. Seznam ostatních publikací

1. 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., Melegh, 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), citováno 3x
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, prenatalní a postnatalní DNA diagnostiky cystické fibrózy v České republice. Čes-slov. Pediat. 63, 62-75. (recenzováno)