

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Skríninky cystické fibrózy

(literární rešerše)

Luboš Kapusta

Školitel: RNDr. Emanuel Žďárský, CSc.

České Budějovice, 2009

Kapusta L., 2009: Skríničky cystické fibrózy [Cystic fibrosis screenings. Bc. Thesis]. 25 pp., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Byla provedena literární rešerše na téma skrínink cystické fibrózy (CF), zaměřená na dva základní typy populačního skríninku cystické fibrózy.

Annotation:

Literature research on the issues concerning cystic fibrosis (CF) screening, focusing on the two basic population screening methods.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím literatury uvedené v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Luboš Kapusta

V Českých Budějovicích, dne 28.4.2009

Poděkování:

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli RNDr. Emanuelu Žďárskému, CSc., za jeho rady, připomínky a pomoc při tvorbě této práce. Velký dík patří mým rodičům za podporu při studiu a v neposlední řadě děkuji své přítelkyni za psychickou podporu při psaní.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. KLINICKÉ PROJEVY CYSTICKÉ FIBRÓZY (CF).....	3
3. SOUČASNÁ LÉČBA CF.....	5
4. <i>CFTR</i>	6
5. MUTACE <i>CFTR</i>	7
6. DIAGNOSTIKA CF.....	9
6.1 Novorozenecký potní test.....	9
6.2 DNA test <i>CFTR</i> genu.....	9
7. PREVENCE.....	11
7.1 Historie skríninků CF.....	11
7.2 Současné reálné skríninkové alternativy.....	12
7.3 Novorozenecký skrínink (NS).....	13
7.4 Přenašečský skrínink (PS).....	13
7.5 Postskríninkový tok informací.....	15
7.6 Genetické poradenství.....	15
7.7 Kontrola kvality.....	15
8. INCIDENCE CF V ČR.....	16
9. EPIDEMIOLOGIE CF.....	17
10. ZÁVĚR A DOTAZNÍKOVÁ AKCE.....	18
11. PŘÍLOHA – VYHODNOCENÍ DOTAZNÍKOVÉ AKCE.....	19
12. SEZNAM LITERATURY.....	20

1. ÚVOD

Cystická fibróza (CF), někdy také nazývaná mukoviscidóza, je jednou z nejčastějších smrtelných autozomálně recesivních genetických chorob u dětí v bělošské populaci. Příčinou tohoto onemocnění jsou mutace v genu *CFTR* (z angličtiny: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), kódující integrální membránový C_{fr} protein (Nussbaum et al., 2004). Jeho hlavní funkcí je umožnění přestupu chloridových iontů přes buněčnou membránu v obou směrech (Welsh and Fick, 1987). I když je nemoc způsobena mutací jen jedinného genu, její klinické projevy postihují řadu orgánů. CF je v současnosti charakterizována jako poškození cAMP-řízeného Cl⁻ kanálu, C_{fr}, který je exprimován v mnoha epitelových buňkách nacházejících se v potních kanálcích, dýchacích cestách, slinivce, střevech, žlučových cestách a chámovodech. Tato choroba může vyvolávat zvýšenou koncentraci chloridů v potu, poruchy plic, způsobené bakteriálními záněty a bronchoektázií, selhávání slinivky, ucpávání střev, biliární cirhózu a kongenitální bilaterální absenci vas deferens (Davis, 2006). Nemoc zatím nelze léčit, současná medicína umí pouze zmírnit její klinické symptomy a/nebo zpomalit její průběh.

Prvního pacienta s CF popsal už v devatenáctém století královehradecký rodák, patolog Karel Rokytanský, jeden ze zakladatelů proslulé vídeňské lékařské školy. Roku 1936 publikoval Guido Falconi článek, ve kterém popsal spojitost mezi cystickou fibrózou slinivky a celiakií. Tento názor zpochybnila v roce 1938 Dorothy Hansine Andersen, na základě porovnání pitevnických studií histologických preparátů a dalších klinických nálezů pacientů s CF slinivky a celiakií. Záhy byla prokázána autozomálně recesivní povaha CF (Andersen et al., 1946 ; Lowe et al., 1949; Roberts, 1960). Zásadním objevem bylo zjištění, že pacienti s CF mají abnormální hodnoty Na⁺ a Cl⁻ iontů v potu (Di Sant'Agnese et al., 1953). Na základě tohoto zjištění byla v roce 1969 Gibsonem a Cookem vyvinuta poměrně rychlá metoda k měření koncentrace Na⁺ a Cl⁻ iontů v potu nemocných CF, takzvaná pilokarpinová iontoforéza. Pomocí pozičního klonování s použitím genetického vazebného mapování byl lokalizován a zmapován gen *CFTR* (Rommens et al., 1989; Riordan et al., 1989). Současně byla objevena nejčastější mutace (ΔF_{508})- delece 3 bp v pozici 508 , jež byla prokázána u 70% všech chromosomů

nemocných CF (Kerem et al., 1989). Nedávné pokroky ve výzkumu CF a *CFTR* umožnily lepší porozumění klinickým projevům nemoci i způsobům, jakým mutace ovlivňují strukturu a funkci proteinu Cfr. Tyto poznatky usnadnily nejen výzkum a vývoj nových potencionálních látek pro léčbu CF, ale také umožnily přesnější a účinnější strategie detekce nemocných i přenašečů v populaci.

2. KLINICKÉ PROJEVY CF

Mutace v *CFTR* genu znemožňují správnou funkci chloridového Cftr kanálu, který reguluje přenos elektrolytů mezi buňkami epitelu sliznic některých orgánů a vnějším prostředím. Ačkoliv je hlavním problémem porucha v transportu Cl⁻, způsobuje CF komplexní multisystémové onemocnění. Nemoc postihuje dýchací cesty, exokrinní slinivku, střeva, hepatobiliární systém, mužský pohlavní trakt (chánovody) a potní žlázy. Závažnost obtíží nemocných CF závisí nejen na typu *CFTR* mutace (Zielenski, 2000; Kerem and Kerem, 1996), ale i na genetických modifikátorech CF (Collaco and Cutting, 2008; Vanscoy et al., 2007) a na životních podmínkách jedince (Goss et al., 2004).

V plicích CF pacientů se tvoří hustý hlen (asi 10x hustší než u zdravých lidí), který dráždí k neustálému kašli, ucpává dýchací cesty a zapříčiňuje časté bakteriální infekce dýchacího ústrojí (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandorea apista*, netuberkulozní mykobakterie, aj.). Plicní orgány i dýchací cesty na tyto infekce reagují morfologickými změnami, tvorbou nosních polypů apod. Destrukce plicní tkáně je nejčastější příčinou předčasné smrti CF pacientů. Nemocní CF se dožívají průměrně 37 let (<http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2007-Patient-Registry-Report.pdf>). Hustý hlen se u CF pacientů tvoří také ve slinivce, kde je ovlivněna správná produkce a uvolňování trávicích šťáv. Morfologické změny slinivky následkem zánětů a zablokování odtoku trávicích šťáv vedou ke snížení produkce inzulínu a zároveň k rezistenci vůči němu (Yung et al., 1999). Tento typ diabetu je nazýván CFRD (cystic fibrosis related diabetes). Ve střevech se nedostatek trávicích enzymů projeví nedostatečným rozkladem živin a tudíž k poruchám jejich vstřebávání, což vede k podvýživě, špatnému růstu a nedostatku vitamínů (především A, D, E a K). Až 1/7 CF novorozenců má „ucpaná“ střeva (mekoniiový ileus), k jehož odstranění je třeba chirurgický zákrok. Jaterní problémy u CF pacientů pramení ze vznikající neprůchodnosti žlučových cest. Kromě znemožnění správného trávení je ucpávání odtoku žluči pro játra devastující a může vést až k cirhóze (Moyer and Banistrel, 2009). CF ovlivňuje i funkci pohlavních orgánů. Téměř všichni muži s CF jsou neplodní- mají nepohyblivé spermie, u některých nejsou vyvinuty chánovody a semenné vajíčky. Naopak ženy mají normální

anatomii, avšak také sníženou plodnost a pokud dosáhnou těhotenství, mají větší zdravotní komplikace a úmrtnost, než zdravé ženy (Philipson, 1998).

3. SOUČASNÁ LÉČBA CF

CF patří mezi nevyléčitelné choroby, současná medicína umí jenom zmírnit její projevy několika souběžně používanými strategiemi. Bronchiální pročišťování je metoda mechanického uvolňování dýchacích cest od hlenu. Provádí se nacvičenými údery do zad nemocného zkušenou osobou (nemocný v předklonu vykašlává hleny) 2-3x denně po dobu 20-30 minut, existují i mechanické pomůcky. DNAzy degradují DNA uvolněnou z buněk imunitního systému (hromadně zanikajících v plicích při likvidaci prachu a infekcí) a okolní tkáň, která jako vysokomolekulární látka ještě více zvyšuje vazkost hlenu. Také inhalace hypertonického roztoku NaCl, který přitáhne více vody do dýchacích cest usnadňuje vykašlávání hlenu. Podáváním některých látek (albuterol) aerosolovými inhalátory může být dosaženo rozšíření dýchacích cest a tím zlepšení průchodu vzduchu. Aplikace antibiotik proti bakteriím způsobujícím záněty dýchacích cest, zejména plic, se provádí buď inhalačně (ve formě aerosolů), orálně (ve formě kapslí, či roztoků), nebo intravenózně. Důležitou složkou CF terapie je orální podávání pankreatických enzymů, vitamínů a dalších doplňků stravy, jež zlepšují nutriční statut pacientů. K tlumení bolesti se používá například ibuprofen.

Transplantace plic není univerzálním léčebným postupem, protože vyžaduje velmi dobrý zdravotní stav postiženého, kvalitního dárce plic (ten bývá obvykle dospělý a tudíž nastává problém s velikostí plic donora a hrudní dutiny CF nemocného, což jsou obvykle mladí lidé a děti) a je také často provázena postoperačními infekčními komplikacemi (<http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2007-Patient-Registry-Report.pdf>).

5. MUTACE *CFTR*

První popsanou mutací v genu *CFTR* byla delece fenylalaninu v pozici 508 (F508del) (Riordan et al., 1989), která je nejrozšířenější *CFTR* mutací. V současné době většina popsaných *CFTR* mutací je etnicky a místně specifických, nebo privátních a jejich prevalence ve světě je minimální (http://www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_TOC.pdf). K dnešnímu dni je v mezinárodním registru CF mutací vedeno 1604 položek (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app). V České republice jich je popsáno zatím 70 (viz Tab.1) a je pravděpodobné, že se spektrum bude dále rozrůstat. Druhou nejčastější příčinou CF v ČR je rozsáhlá delece *CFTR*dele2.3/21kb/, nazývaná také „slovanská“ mutace (Dörk et al., 2000). Ne všechny mutace způsobují závažné zdravotní problémy již od narození, jak je tomu u F508del (Kerem and Kerem, 1996). Některá porušení genu *CFTR* se mohou projevit až v dospělosti, nebo se nemusí projevit vůbec. Jsou známy mutace, způsobující lehčí formy CF, jako například mutace R117H (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993). Rozhodování o tom, které mutace jsou těžké a které lehké lze přibližně učinit i na teoretické rovině. Záleží na jejím typu, povaze a hlavně kterou část Cfr proteinu tato mutace postihuje. Některé studie vedou k závěru, že mutace nejsou v genu *CFTR* rozmístěny rovnoměrně, ale soustřeďují se do míst, která kódují důležité součásti Cfr proteinu, domény MSD a NBD, což odráží jejich důležitost pro správnou funkci proteinu (Murray et al., 1999). Obecně lze mutace *CFTR* rozdělit do pěti skupin. Do první skupiny spadají mutace, které blokují vznik úplného proteinu, nebo znemožňují jeho produkci (předčasné stop kodóny, nestabilní mRNA, nebo předčasná degradace proteinu). Druhou skupinou jsou mutace, způsobující, chybnou dodávku proteinu na místo určení (chyby v konformaci, nebo glykosylaci). Mutace třetí třídy se vyskytují většinou v NBD oblasti a omezují funkci Cfr Cl⁻ kanálu. Mutace čtvrté třídy jsou relativně vzácné, postihují zejména oblast MSD a způsobují vadnou propustnost Cfr. Poslední, pátou skupinu tvoří mutace ovlivňující hladinu normálního *CFTR* mRNA transkriptu a proteinu Cfr, potřebného pro normální funkci. V současné době probíhá řada výzkumů a studií, zabývajících se nápravou mutací v genu *CFTR*. Některé potenciální terapeutické látky

jsou už v posledním stádiu klinických testů, některé teprve ve fázi vývoje. Jestli se osvědčí i v praxi, ukáže čas.

Tab.1: Četnost mutací u pacientů vyšetřených v pražském CF centru ve FN v Motole během posledních deseti let. Převzato z Balašáková et al., 2008

Mutace	N	Mutace	N
F508del	743	1525-1G>A	1
CFTRdel2.321kb/	59	S1196X	1
G551D	32	E585X	1
N1303K	29	G178E	1
G542X	19	185+1G>A	1
3849+10kbC>T	15	1249-1G>A	1
1898+1G>A	12	H1368N	1
R347P	11	3944delGT	1
3272-26A>G	10	R1056C	1
2143delT	9	3238delA	1
W1282X	8	296+1G>A	1
2789+5G>A	8	G27R	1
R553X	6	2622+1G>A	1
4374+1G>T	5	dele2/MS1-5811_IVS2+2186delB108ins182pb	1
1717-1G>A	4	R75X	1
S945L	4	S1118F	1
Y122X	4	M952I	1
I336K	4	G372X	1
621+1G>T	3	R1158X	1
2184insA	3	S42F	1
W57G	3	2184delA	1
3141delG	3	711+1G>T	1
R1162X	2	I607del	1
R117H	2	L1324P	1
G85E	2	2637delG	1
E92X	2	L1335P	1
574delA	2	2721delI1	1
IVS21-78-IVS23+577del1532pb	2	1811+1G>C	1
D1152H	2	delece 2. exonu	1
1898+1G>C	1	3434T>G	1
R334W	1	R851X	1
2183delAA>G	1	3640delT	1
3658delC	1	L1335F	1
3600+2insT	1	711+3A>G	1
711+5G>A	1	F508del/delece v oblasti 58 kb před genem CFTR v jeho promotorové oblasti, včetně exonů 1-10	1

N- počet nalezených mutací

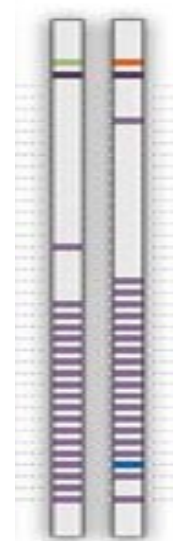
6. DIAGNOSTIKA CF

6.1 Novorozenecký potní test.

Provádí se pomocí speciálního přístroje, který elektroosmotickým tlakem vnese pod kůži novorozence chemikálii pilokarpin. Ta podporuje vylučování potu. Po této proceduře je místo pečlivě očištěno a přiložen sběrný kotouček nasávající produkovaný pot. Nasbíraný pot je ve speciálním přístroji podroben analýze koncentrace chloridů.

6.2 DNA test *CFTR* genu.

Využívá výhody DNA stanovení – jejího absolutního charakteru (mutace je/není přítomna). DNA testovaného je nejdříve podrobena PCR amplifikaci 36 sekvencí a pak je tento amplifikát nanesen na testovací strip, kde za přesných teplotních a iontových podmínek hybridizuje k na stripu fixované próbě (Obr.2). Jistou komplikací DNA testu je, že spektrum mutací *CFTR* genu je regionálně závislé, tj. například u českých a slovenských pacientů je jiné. To je největší nevýhoda většiny komerčních souprav, protože ty jsou vždy statické (mají pevně daný seznam mutací, které umí detekovat – k ostatním jsou slepé). Například nejpoužívanější komerční test sice detekuje 36 nejčastějších mutací, ale 11 z tohoto testu se zatím mezi českými CF pacienti nenalezlo a naopak 41 mutací z našeho území vůbec nevidí. Naštěstí těchto „neviditelných“ 41 mutací tvoří jen asi 6% (teoretický záchyt testu je tedy asi 94%). Výstupem takovýchto testů je závěrečné konstatování, které mutace ze sledovaných jsou přítomny a které nikoliv. Proběhlá nebo neproběhlá hybridizace je pak vizualizovaná jako tmavý proužek – z jeho pozice lze odhadnout druh mutace. V dolní části testovacího stripu jsou kontrolní proužky normální sekvence, mutačně specifické jsou v horní části. Modernější diagnostickou variantou je kompletní sken všech mutací. Dnes již existují genetické technologie schopné registrovat jakoukoliv, i neznámou, mutaci. Mohou tedy přehlédnout sekvence všech exonů i přilehlých intronů. Velikost exonů genu *CFTR* je dostatečně krátká, avšak kvůli větší citlivosti metody je třeba některé exony rozdělit na menší úseky a analyzovat zvlášť (Montgomery et al., 2007).



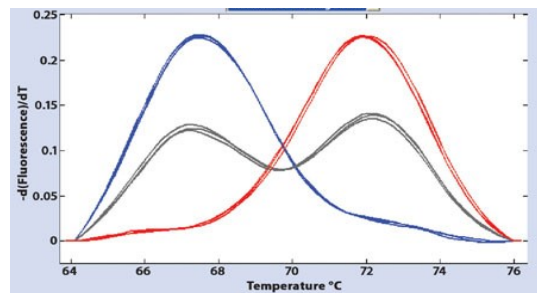
Obr.2: Diagnostický strip 36plexové detekce mutací.

Důležité je to, že některé skenovací technologie postoupily do klinické fáze a jsou podporovány specializovanými přístroji a soupravami (viz Obr.3).

Výsledku je dosaženo opět PCR amplifikací relevantních DNA za přítomnosti interkalačních fluoroforů. PCR produkty jsou posléze analyzovány na přístroji LightScanner®, který automaticky vyhodnocuje mutační statut (<http://www.idahotech.com/LightScanner/index.html>).

Poslední variantou je OLA systém, který kromě PCR využívá selektivní ligaci, závislou na přesné komplementaritě ligovaných DNA sekvencí. Finální vyhodnocení se provádí na sekvenátoru. Panel obsahuje 32 mutací (<https://www.celera.com/celera/cf>). Jak bylo prokázáno, tento systém je rychlou a spolehlivou alternativou skríninku CF homozygotů, heterozygotů i přenašečů (Eggerding et al., 1995).

Kromě diagnostických postupů existují ještě další vyšetření jako například rentgenový obraz hrudního koše, plicní funkční test, kultivace spůta a také měření koncentrace imunoreaktivního trypsinogenu (IRT test). Ten je základním skríninkovým testem novorozeneckého skríninku a bude zmíněn v příslušné kapitole.



Obr.3: Ukázka vyhledání *CFTR* mutačního statusu metodou vysokorozlišovací analýzy: Denaturační křivky pro homozygota bez mutací v exonu 10 (červené křivky), heterozygota pro F508del mutaci (černé křivky) a u DNA CF pacienta – homozygota pro F508del mutace.

7. PREVENCE

Genetický skrínink lze charakterizovat jako soustavné prohledávání populace s cílem vyhledání individuí s genotypem, ohrožujícím je samé, nebo jejich potomky. Primát mezi genetickými skríninky patří skríninku novorozeneckých fenylketonuriků (MacCready, 1963), u nás spuštěný v 70. let minulého století (Blehová et al. 1971). Později se přistoupilo ke skríninku aneuploidii z amniové tekutiny u žen starších 35ti let (Nadler, 1970). Oba skríninky jsou ve světě i v ČR praktikovány dodnes.

Velká úspěch zmíněných prevencí znamenal lavinovité šíření různých skríninkových projektů, a proto se Světová zdravotnická organizace (WHO) rozhodla vnést jistá pravidla do této aktivity a vyhlásila některá doporučení a kritéria, která by měla být splněna před zahájením skríninku. Skrínovaná nemoc by měla:

- (1) být dobře definovaná a probádaná
- (2) mít jasný a dostupný postup preventivní detekce
- (3) být v skrínované populaci častá
- (4) způsobovat vážné zdravotní potíže a snižovat délku života
- (5) být skríninkem zachycena alespoň s 90% efektivností
- (6) být skrínována tak, aby byla dostupná všem

7.1 Historie skríninků CF

Prvním, neúspěšným, pokusem o skrínink cystické fibrózy bylo měření obsahu albuminu ve smolce (první novorozenecké stolici)(Ryley et al., 1975). Mnohem úspěšnějším pro praxi se ukázal nález rozdílných hladin imunoreaktivního trypsinogenu (IRT) v krvi mezi zdravými a CF nemocnými. Převedení tohoto jevu do praxe se stalo základem novorozeneckého skríninku (NS) z krevních skvrn (Dominici et al., 1980). Tento dodnes praktikovaný skríninkový pokus se koncipoval intuitivně – s vírou, že včas odhalenému nemocnému se dostane adekvátní péče a tím se zlepší vyhlídky na kvalitnější a/nebo i delší život. Snaha o nalezení příslušného genu byla u CF korunována v roce 1989 popisem kompletní sekvence *CFTR* genu (Kerem et al., 1989). Poté rychle následovalo stanovením místně platného *CFTR* mutačního seznamu a tím se otevřela cesta k molekulárně genetickému skríninku, identifikací přenašečů některé z mutací – tzv.

přenašečskému skríninku (PS). Technicky je to možné buď tzv. „pasivní“ formou - prohledáváním genotypů příbuzných již diagnostikovaných pacientů (tento typ skríninku je ale zjevně neúčinný a tudíž neekonomický, protože není schopen výrazně snížit incidenci nemoci (Shickle and Harvey, 1993), anebo „aktivně“ – nabídkou stanovení genotypu prekoncepčně nebo alespoň prenatalně. Se stále se zlepšující technikou ultrazvukového vyšetření těhotných – přesnějším rozlišení detailů – je do jisté míry možné jako CF skríninkové vyšetření považovat vyhodnocení tzv. echogenity dutiny břišní (Hogge et al., 1993).

7.2 Současné reálné skríninkové alternativy.

K dnešnímu dni se pro ČR jeví jako reálné dva druhy skríninků NS a PS. Jsou-li dvě alternativy, pak v souladu s trendem moderní medicíny, je bezpodmínečně poskytnout pacientům maximální rozhodovací právo který ze skríninků je pro každého jednotlivého zájemce nejoptimálnější a současně to znamená nutnost klást velký důraz na to, aby se pacient mohl rozhodnout svobodně (Farrell et al., 2008). Bezmála třicet let zkušeností umožnilo identifikovat uzlové body obou skríninků při jejich realizaci a úspěšnosti (Sahai et al., 2009):

- (1) předskrínovací šíření informací
- (2) vlastní skríninkový a diagnostický testovací algoritmus
- (3) postskrínovací způsob předání a interpretaci výsledků
- (4) genetické poradenství
- (5) kontrola kvality
- (6) finanční analýza skríninku i následných medicínských intervencí
- (7) přínos dalšímu vědeckému zkoumání

Pokud je vložena svoboda rozhodování na občany, je povinností pro medicínské specialisty, aby všichni zájemci o skrínink, ještě před definitivním rozhodnutím ho podstoupit, byli dostatečně informováni. Dále je nutné, aby se potřebné informace dostaly i ke zprostředkovatelům zdravotní péče, tj. zdravotnickým odborníkům, kteří se sice neúčastní laboratorního skríninkového a diagnostického úkonu, ale informace občanům poskytují

(u NS jsou to především pediatři, u PS pak gynekologové a praktičtí lékaři)(Castellani et al., 2009).

7.3 Novorozenecký skrínink (NS).

Tento způsob skríninku byl jako pomoc pediatrům vynalezen na Novém Zélandu (Crossley et al., 1979) a uveden do praxe v Novém Jižním Walesu (Austrálie) v roce 1981 (Wilcken et al., 1983). Dnes je využíván v jihovýchodní Asii, Austrálii a Novém Zélandu, ale také ostrůvkovitě po celém světě. Jeho vlastní přínos už narozeným CF pacientům je nesporný, dnes již i jednoznačně potvrzený mnoha studiemi a projevuje se zlepšením řady ukazatelů. Pacienti mají lepší nutriční statut a růstové parametry (Farrell et al., 2001; Sims et al., 2005), kognitivní vlastnosti (Koscik et al., 2005), méně hospitalizací (Siret et al., 2003) a snížil se počet úmrtí CF novorozenců v časném dětství (Melle et al., 2001; Lai et al., 2004).

Pokud se NS udrží a nebude nahrazen PS, ukáže se během příštího desetiletí, zda se jeho efekt projeví i v délce života CF nemocných (první NS skrínovaní překročí 30. rok svého života tj. kritického období, přičemž průměrná očekávaná doba života CF nemocných je asi 33 let) (Massie et al., 2007).

Někteří autoři poukazují i na jisté problematické stránky NS, především chybnou demotivaci rodičů i pediatrů z negativního výsledku NS (Massie et al., 2000), nebo dokonce dřívější útok infekcí jako důsledek dřívějších hospitalizací (Farrell et al., 2003). Konečně, následkem omezené citlivosti IRT testu, je asi 1% rodičů vystaveno po určitou dobu falešně pozitivním výsledkům a tento nepříznivý průvodní jev NS nelze podceňovat (Comeau et al., 2004).

7.4 Přenašečský skrínink (PS)

V Austrálii a Novém Zélandu, zemích, kde byl poprvé aplikován NS, bylo zjištěno, že vedle přínosu pro nemocné CF (zatím nelze vyhodnotit, zda jim včasné zjištění nemoci prodlouží život), je zjištění skutečnosti, že se rodiče- přenašeči nemoci rozhodují ve velkém procentu (82%) pro prenatální diagnostiku u dalších těhotenství a to i v případech, že jejich první dítě s CF nemá zatím těžký průběh nemoci tj. jejich rozhodnutí plyne z faktu, že pokud by byli postaveni před rozhodovací okamžik a byl jim dostupný

skřínink prenatalní nebo prekoncepční, rozhodnou se pro něj (Massie et al., 2007). Co je ještě důležitější, u všech pěti těhotenství, u nichž byl takto zjištěn postižený plod, bylo rozhodnutí rodičů ukončit takovéto těhotenství (Sawyer, 2006). Z toho plyne důležitý poznatek. Kdyby tyto páry věděly o svém statutu přenašečství i u prvního těhotenství, rozhodly by se patrně stejně a nemocný novorozenec, který byl odhalen až NS, by se nenarodil a místo něj by se narodilo zdravé dítě. Velmi úspěšný byl prenatalní PS ve Skotsku. Tam průkopník tohoto typu skříninku D. J. H. Brock už v roce 1991 ukázal, že jednoduchá prenatalní strategie vede už po prvním roce ke snížení počtu narozených CF dětí na polovinu (Brock et al., 1998). V USA bylo už v roce 1997 vydáno podpůrné prohlášení k PS všemi nejdůležitějšími subjekty (National Institute of Health, American College of Obstetricians and Gynecologists, American College of Medical Genetics), i když je zdůrazněno, že nejde o restriktivní požadavky (Kaufman et al., 2008). Hlavním odrazem úspěšnosti skříninku je jeho akceptovatelnost, tj. kolik oslovených se jej dobrovolně zúčastní (Lakeman et al., 2009). Test *CFTR* mutací je spolehlivý a relativně levný. Velmi výhodná je situace v ČR, kde lze 83% mutací diagnostikovat panelem 6 mutací. Například v Austrálii, kde mají velkou zkušenost s NS, je panel 12 mutací hodnocen jako dostatečný, navíc je zde příznivý fakt, že u testu CF přenašečů stačí jediný test pro každého jedince na celý život, tedy nikoliv jako u testu na aneuploidie (Downův syndrom), kdy je každé těhotenství třeba kontrolovat znovu (Massie et al., 2007). Plané se také ukázaly námitky, že budou nalezení přenašeči ohroženi úzkostí z nálezů po celý život (Livingstone et al., 1994). Někteří čeští genetici užívají v tomto ohledu ještě dnes vágní termín, že jim hrozí iatrogenizace (Balaščaková et al., 2009), i když bylo ukázáno, že tomu tak není (Lafayette et al., 1999; Clausen et al., 1996). Ekonomický přínos PS je značný. To kontrastuje s nejasnostmi kolem ekonomické návratnosti NS, zvláště pokud není kvalita provedení dobrá a efekt zachytu nemocných je jen 39% a ještě k tomu 98,6% falešně pozitivních výsledků (Balaščaková et al., 2009). Tato nelichotivá data pramení patrně nejen z nezkušenosti s IRT skříninkem, ale i z povahy IRT testu, který je relativní a pracuje s prahovou hodnotou. Naproti tomu PS pracuje výhradně s DNA a jeho výsledky jsou absolutní (mutace je přítomna/nepřítomna) a chyby mohou vzniknout už jen lidským faktorem.

7.5 Postskrininkový tok informací

Neméně důležitým momentem je i okamžik sdělování skríninkových výsledků. Protože za PS následuje ještě několik kontrolních bodů, které mohou na CF nemocného v případě falešné negativity upozornit (ultrazvukové vyšetření, DNA test z mateřské krve případně amniové tekutiny v případech, kdy je amniocentéza z věkových nebo jiných důvodů stejně prováděna, konečně i novorozenecký test, to vše pro sice negativně skrínované, ale s jedním přenašečem mezi rodiči), je tento problém méně aktuální než u NS. Záchyt NS totiž závisí na technické zkušenosti a bude-li takový, jak je uváděno v pilotní studii (Balašáková et al., 2009), tedy jen 50%, vyvstává u falešně negativních případů reálné nebezpečí, že rodiče přicházející CF symptomy podcení. Proto je v tomto případě nutné alespoň základní genetické poradenství a musí být nalezen kompromis mezi ohromným počtem skrínovaných a formou i náplní poradenství.

7.6 Genetické poradenství

Genetické poradenství je potřebné pro jednotlivé přenašeče, rodičovské páry s nejméně jedním přenašečem a také pro všechny rodiče s pozitivním výsledkem NS, nejlépe ihned po provedení diagnostického testu (potní test nebo *CFTR* sken)(Langfelder-Schwind, 2003). Důležité je profesionální vysvětlení, že přenašečství není „vina“ a zajištění narození zdravého dítěte i přenašečskému páru je možné a to i v častém případě, kdy není otec dosažitelný (Grody et al., 2001). Součástí porady by měl být i rozbor nebezpečnosti mutace, tam, kde je dostatek podkladových informací, jako například u mutace R117H apod. (Curnow, 2003).

7.7 Kontrola kvality

Zvláště vysokokapacitní skríninky, bezpodmínečně vyžadují podrobnou dokumentaci své činnosti a kontrolu kvality práce. Po stránce organizační je to například dodržování norem ČSN EN ISO/IEC 17025/2005 a 15189/2007. I když nejsou NS a PS navzájem kompatibilní, pokud poběží vedle sebe (jako je tomu ve většině států), pak je nezbytné, aby obě skupiny spolu spolupracovaly a vyměňovaly si informace.

8. INCIDENCE CF V ČR

Ač je u nás CF jedno z nejčastějších recesivně dědičných onemocnění dodnes neznáme její incidenci. Ve studiích Macka Sr. z let 1970-1998 jsou uváděny hodnoty 1:2500 – 1:2750. V poslední v ČR publikované práci téže skupiny (Macek Jr. a Macek Sr.) jsou uváděny tři incidence 1:2500, 1:3900 a 1:6700 (Balaščaková, 2009), v mezinárodní práci o těchto výsledcích neonatálního skríninku uvádí tentýž autor (Macek Jr.) incidenci dokonce 1:9100 (Castellani et al., 2009). Proto je bezpečnější zprůměrovat tento údaj z německých dat - asi 1:3000 novorozenců (Stern et al., 2008). To by znamenalo výskyt přenašečů (zdravých heterozygotů) na hladině asi 1:27, tj. u 3,7% populace. Anebo jinými slovy, že v ČR je v současné době asi 390 000 přenašečů, z toho asi 4000 z nich je každoročně vystaveno vysokému riziku narození dítěte (asi 1%, což je více, než je u 35leté matky riziko narození dítěte s Downovým syndromem). V současné době je v pražském CF centru asi 90 pacientů (www.cfklub.cz).

9. EPIDEMIOLOGIE CF

Protektivní interakce mutovaného Cfr proteinu s baktériemi je podkladem hypotéz o selekční výhodě heterozygotů *CFTR* mutovaného genu. Není totiž jasné, jak by jinak mohlo dojít k takové incidenci přenašečů (v ČR je přenašečem každý 27. občan, tj. 3,6% populace) bez pomoci selekční výhody. Hypotéza o vyšší rezistenci k cholera toxinu jako selekční výhodou CF heterozygotů při infekcích *Vibrio cholerae* nebyla prokázána (Hogenauer et al., 2000). Další teorií je zvýšená rezistence vůči bakterii *Salmonella typhi*, u které bylo zjištěno, že používá Cfr protein jako receptor pro vstup do epiteliálních buněk (Pier et al. 1998). Ani tato teorie ovšem dostatečně nevysvětluje dnešní vysokou incidenci CF alel v evropské populaci. Jako nejpravděpodobnější se jeví teorie, podpořena nejen molekulárními, ale i historickými, demografickými a epidemiologickými daty, kde je selekční výhodou CF přenašečů, díky snížené expresi arylsulfatázy B, vyšší rezistence vůči infekcím *Mycobacterium tuberculosis* (Poolman et al. 2007). K přesnějšímu odhadu selekčního děje by měla přispět znalost stáří nejčastější evropské mutace F508del. Ač se tomuto tématu věnovalo několik nezávislých prací, výsledný rozptyl odhadů stáří v rozmezí 17000 – 52000 let mnoho světla do problematiky nepřinesl (Morral et al., 1994; Kaplan et al., 1994). Zatím nejstarší nález mutace F508del v západní Evropě je z doby zhruba před 3000 lety (Fichou et al., 2007).

10. ZÁVĚR A DOTAZNÍKOVÁ AKCE

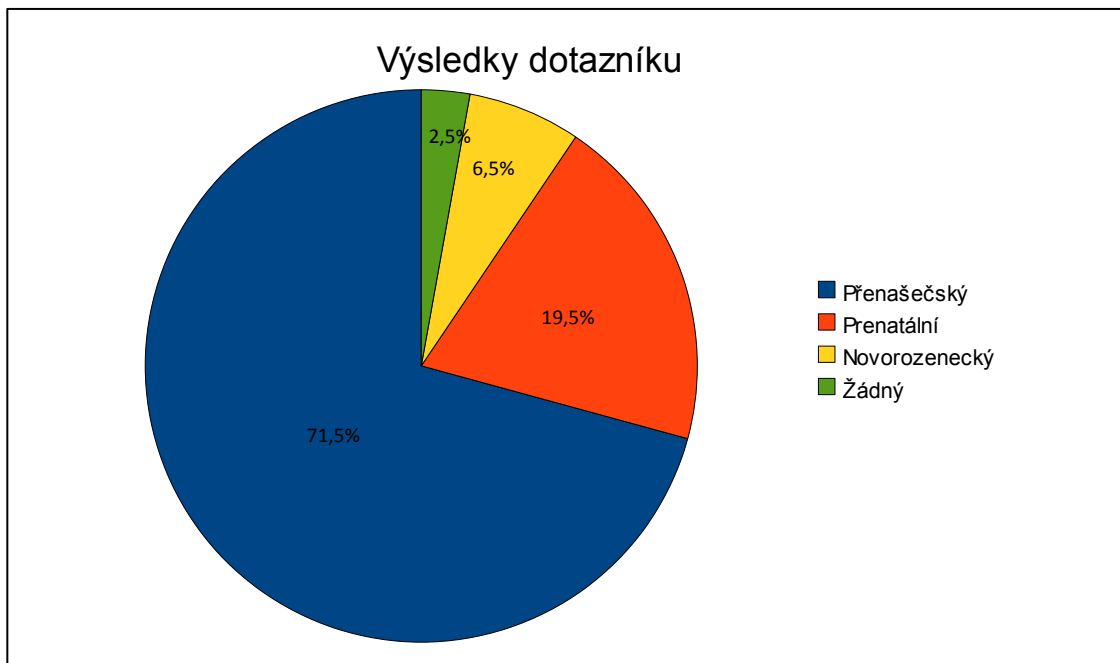
Oba případy skríninků, NS i PS, nabízejí poměrně velké vědecké užítkování jak včasného záchytu nemocných (hledání neoptimálnějších cest k využití informační výhody včasného záchytu), ale především u PS determinací velkých skupin přenašečů, včetně jejich genetické determinace (zjištění jejich genotypu). To by mohlo v konečném důsledku vést k efektivnějšímu záchytu heterozygotů a zjednodušení PS strategie. Také by se zavedením PS strategie mohla během delšího časového horizontu snížit jak frekvence nemocných, tak i přenašečů. Pokud by byl nalezen univerzálnější diagnostický test odlišující zdravé heterozygoty (nikoliv jen majoritní, ale všech Cfr protein produkci destruuujících), pak by takovýto test získal výhodu oproti dnešním, přísně mutačně determinovaným testům a tím by se otevřely dveře v nasazení PS i v zemích, kde není mutační portfolio tak výhodné jako je v ČR nebo Dánsku (www.genet.sickkids.on.ca/cfr/app).

Jako součást této práce jsme se rozhodli formou internetového dotazníku zjistit a vyhodnotit skríninkové preference mezi obyvateli České Republiky:

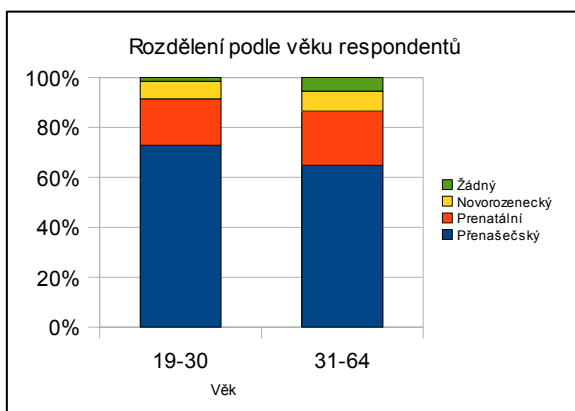
Výsledek dotazníkové akce je až překvapivě jednoznačný, ze 106 respondentů (27 mužů a 79 žen), ve věku 19- 64 let, byla drtivá většina (75 odpovědí- 71,5 %) - ve prospěch přenašečského skríninku. Na první pohled je zarážející jednoznačné odvržení skríninku novorozeneckého, v jehož prospěch hlasovalo jen 6,5% respondentů. Ten je i přes 30 let provozování stále jen v intuitivní etapě (přínosy jsou stále jen odhadovány), zatímco přenašečský je může jasně a zřetelně definovat a nejen to, dokonce garantovat. Jasným signálem respondentů pro zavedení plošného skríninku přenašečů CF u nás je fakt, že pouhých 2,5% z nich si myslí, že žádný skrínink CF u nás není třeba.

11. PŘÍLOHA - VYHODNOCENÍ DOTAZNÍKOVÉ AKCE

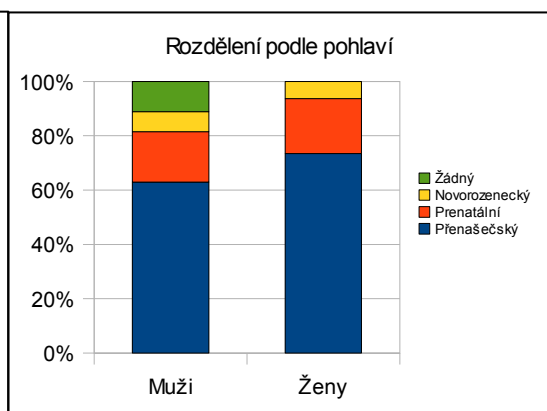
Graf 1: Preference jednotlivých druhů skříninku mezi respondenty



Graf 2: Preference jednotlivých druhů skříninku podle věku



Graf 3: Preference jednotlivých druhů skříninku podle pohlaví



12. SEZNAM LITERATURY

- Andersen, D.H. 1938.** Cystic Fibrosis of the Pancreas and Its Relation to Celiac Disease: A Clinical and Pathological Study *Am. J. Dis. Child.* 56:344–399.
- Andersen, D.H., Hodges, R.G. 1946.** Celiac Syndrome V. Genetics of Cystic Fibrosis of the Pancreas with a Consideration Etiology. *Am. J. Dis. Child.* 72:62.
- Balašáková, M., Holubová, A., Skalická, V., Zemková, D., Kračmar, P., Gonsorčíkova, L., Čamajová, J., Piskáčková, T., Lebl, J., Dřevínek, 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.* [online]
- Balašáková, M., Piskáčková, T., Holubová, A., Raušová, E., Kazárová, V., Krebsová, A., Koudová, M., Štambergová, A., Čamajová, J., Norambuena, M., Křenková, P., Votava, F., 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.
- Balková, K., Gbelská, Y. 2007.** ABC transporter proteins in multidrug resistance of microorganisms. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 56:129-139.
- Blehova, B., Zidlicky, A., Krizova, O. 1971.** Results of experimental screening for phenylketonuria, using Guthrie's method at the Children's Clinical Center in Prague. *Čes.-slov. Pediat.* 26:569.
- Brock, D.J., Gilfillan, A., Holloway, S. 1998.** The incidence of cystic fibrosis in Scotland calculated from heterozygote frequencies. *Clin. Genet.* 53:47-49.
- 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 Mone-strol, I., Farrell, P., Feilcke, M., Férec, C., Gartner, S., Gaskin, K., Hammermann, J., Kashir-skaya, 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.* [Online].
- Celera.** The Cystic Fibrosis Genotyping Assay. [online]. 26.4.2009. (<https://www.celera.com/celera/cf>).
- Clausen, H., Brandt, N.J., Schwartz, M., Skovby, F. 1996.** Psychological and social impact of carrier screening for cystic fibrosis among pregnant woman--a pilot study. *Clin. Genet.* 49:200-5.
- Collaco, J.M., Cutting, G.R. 2008.** Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 14:559-66.

- 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.
- Crossley, J.R., Elliott, R.B., Smith, P.A. 1979.** Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*. 1:472-4.
- Curnow, L., Savarirayan, R., Massie, J. 2003.** Genetic counselling after carrier detection by newborn screening when one parent carries DeltaF508 and the other R117H. *J. Arch. Dis. Child*. 88:886-888.
- Cystic Fibrosis Foundation.** Patient Registry Report. [online] 26.4.2009. Last update: 27.1.2009. (<http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2007-Patient-Registry-Report.pdf>)
- Cystic Fibrosis Mutation Database.** [online] 26.4.2009. Last update: 2.4.2007. (<http://www.genet-sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>).
- Davis, P.B. 2006.** Centennial Review: Cystic Fibrosis Since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 173:475-482.
- Di Sant'Agnes, P., Darling, R.C., Perera, G.A., Shea, E. 1953.** Abnormal Electrolyte Composition of Sweat in Cystic Fibrosis of the Pancreas: Clinical Significance and Relationship to the Disease. *Pediatrics*. 12:549-563.
- Dominici, R., Monaco, F., Morano, S., Antonozzi, I. 1980.** Immunoreactive trypsin on dried-blood spots as a possible neonatal test for cystic fibrosis. (I. Evaluation of the method and preliminary field trial). *Ric. Clin. Lab*. 10:511-9.
- Dörk, T., Macek, M. Jr., Mekus, F., Tümmler, B., Tzountzouris, J., Casals, T., Krebsová, A., Koudová, M., Sakmaryová, I., Macek, M. Sr., Vávrová, V., Zemková, D., Ginter, E., Petrova, N.V., Ivaschenko, T., Baranov, V., Witt, M., Pogorzelski, A., Bal, J., Zékanowsky, C., Wagner, K., Stuhmann, M., Bauer, I., Seydewitz, H.H., Neumann, T., Jakubiczka, S. 2000.** 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*. 106:259-268.
- Eggerding, F.A., Iovannisci, D.M., Brinson, E., Grossman, P., Winn-Deen, E.S. 1995.** Fluorescence-based oligonucleotide ligation assay for analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Hum. Mutat*. 5:153-165.
- Fanconi, G., Uehlinger, E., Knauer, C. 1936.** Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wien. Med. Wschr*. 86:753-756.
- 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. *Pediatrics*. 107:1-13.

- Farrell, P.M., Li, Z., Kosorok, M.R., Laxova, A., Green, C.G., Collins, J., Lai, H.C., Rock, M.J., Splaingard, M.L. 2003.** Bronchopulmonary disease in children with cystic fibrosis after early or delayed diagnosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 168:1100-1108.
- 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. 2008.** Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J. Pediatr.* 153:4-14.
- Fichou, Y., Géninc, E., Le Maréchalabd, C., Audrézetab, M.-P., Scoteta, V., Féreca, C. 2008.** Estimating the age of CFTR mutations predominantly found in Brittany (Western France). *J. Cyst. Fibros.* 7:168-173.
- Gibson, L.E., Cooke, R.E. 1959.** Test for the Concentration of Electrolytes in Cystic Fibrosis of the Pancreas Utilizing Pilocarpine by Iontophoresis. *Pediatrics.* 24:545-549.
- Goss, C.H., Newsom, S.A., Schilderout, J.S., Sheppard, L., Kaufman, J.D. 2004.** Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 169:816–821.
- Grody, W.W., Cutting, G.R., Klinger, K.W., Richards, C.S., Watson, M.S., Desnick, R.J. (Subcommittee on Cystic Fibrosis Screening, Accreditation of Genetic Services Committee, ACMG). 2001.** Laboratory Standards and Guidelines for Population-based Cystic Fibrosis Carrier Screening. *Genet. Med.* 3:149-154.
- Higgins, C. F. 1992.** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:67-113.
- Hogge, W.A., Hogge, J.S., Boehm, C.D., Sanders, R.C. 1993.** Increased echogenicity in the fetal abdomen: use of DNA analysis to establish a diagnosis of cystic fibrosis. *J. Ultrasound Med.* 12:451-454.
- Högenauer, Ch., Santa Ana, C.A., Porter, J.L., Millard, M., Gelfand, A., Rosenblatt, R.L., Prestidge, C.B., Fordtran, J.S. 2000.** Active Intestinal Chloride Secretion in Human Carriers of Cystic Fibrosis Mutations: An Evaluation of the Hypothesis That Heterozygotes Have Subnormal Active Intestinal Chloride Secretion. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1422–1427.
- Idaho Technology Inc.** Mutation Discovery. LightScanner® System. [online]. 26.4.2009. (<http://www.idahotech.com/LightScanner/index.html>).
- Kaplan, N.L., Lewis, P.O., Weir, B.S. 1994.** Age of the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation. *Nat. Genet.* 8:216-217.
- Kaufman, D.J., Katsanis, S.H., Javitt, G.H., Murphy, J.A., Scott, J.A., Hudson, K.L. 2008.** Carrier screening for cystic fibrosis in US genetic testing laboratories: a survey of laboratory directors. *Clin. Genet.* 74:367-73.
- Kerem, B., Rommens, M.J., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.-C. 1989.** Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science.* 245:1073-1080.

- Kerem, E., Kerem, B. 1996.** Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 22:387-395.
- Koscik, R.L., Lai, H.J., Laxova, A., Zaremba, K.M., Kosorok, M.R., Douglas, J.A., Rock, M.J., Splaingard, M.L., Farrell, P.M. 2005.** Preventing early, prolonged vitamin E deficiency: an opportunity for better cognitive outcomes via early diagnosis through neonatal screening. *J. Pediatr.* 147:51-56.
- Lafayette, D., Abuelo, D., Passero, M.A., Tantravahi, U. 1999.** Attitudes toward cystic fibrosis carrier and prenatal testing and utilization of carrier testing among relatives of individuals with cystic fibrosis. *J. Genet. Couns.* 8:17-36.
- 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.
- Langfelder-Schwind, E., Kloza, E., Sugarman, E., Pettersen, B., Brown, T., Jensen, K., Marcusand, S., Redman, J. 2005.** Cystic Fibrosis Prenatal Screening in Genetic Counseling Practice: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J. Genet. Couns.* 14:1-15
- Lakeman, P., Plass, A.M., Henneman, L., Bezemer, P.D., Cornel, M.C., Ten Kate, L.P. 2009.** Pre-conceptional ancestry-based carrier couple screening for cystic fibrosis and haemoglobinopathies: what determines the intention to participate or not and actual participation? *Eur. J. Hum. Genet.* [online]
- Livingstone, J., Axton, R.A., Gilfillan, A., Mennie, M., Compton, M., Liston, W.A., Calder, A.A., Gordon, A.J., Brock, D.J. 1994.** Antenatal screening for cystic fibrosis: a trial of the couple model. *B.M.J.* 308:1459-1462.
- Lowe, C.U., May, C.D., Reed, S.C. 1949.** Fibrosis of the pancreas in infants and children: a statistical study of clinical and hereditary features. *Am. J. Dis. Child.* 78:349-374.
- Luckie, D.B., Wilterding, J.H., Krha, M., Krouse, M.E. 2003.** CFTR and MDR: ABC Transporters with Homologous Structure but Divergent Function. *Curr. Genom.* 4:109-121.
- Massie, J., Forbes, R., Dusart, D., Bankier, A., Delatycki, M.B. 2007.** Community-wide screening for cystic fibrosis carriers could replace newborn screening for the diagnosis of cystic fibrosis. *J. Paediatr. Child. Health.* 43:721-723.
- Massie, R.J., Olsen, M., Glazner, J., Robertson, C.F., Francis, I. 2000.** Newborn screening for cystic fibrosis in Victoria: 10 years' experience (1989-1998). *Med. J. Aust.* 172:584-7.
- MacCready, R. 1963.** Phenylketonuria screening program. *N. Engl. J. Med.* 269:52-56.
- Merelle, M.E., Schouten, J.P., Gerritsen, J., Dankert-Roelse, J.E. 2001.** Influence of neonatal screening and centralized treatment on long-term clinical outcome and survival of CF patients. *Eur. Respir. J.* 18:306-315.

- Montgomery, J., Wittwer, C.T., Kent, J.O., Zhou, L. 2007.** Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin. Chem.* 53:1891-1898.
- Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Giménez, J., Reis, A., Varon-Mateva, R., Macek, M. Jr., Kalaydjieva, L., Angelicheva, D., Dancheva, R., Romeo, G., Russo, M.P., Garnerone, S., Restagno, G., Ferrari, M., Magnani, C., Claustres, M., Desgeorges, M., Schwartz, M., Schwarz, M., Dallapiccol, B., Novelli, G., Ferec, C., de Arce, M., Nemeti, M., Kere, J., Anvret, M., Dahl, N., Kadasi, L. 1994.** The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat. Genet.* 7:169-175.
- Moyer, K., Balistreri, W. 2009.** Hepatobiliary disease in patients with cystic fibrosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25:272-278.
- Murray, J., Cuckle, H., Taylor, G., Littlewood, J., Hewison, J. 1999.** Screening for cystic fibrosis. *Health Technol. Assess.* 3:1-104.
- Nadler, H.L. 1970.** Newer procedures in the preconceptional, prenatal and early postnatal diagnosis of birth defects. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 6:26-33.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F. 2004.** *Klinická genetika.* 6. vyd., Triton, Praha, str. 218-221.
- Phillipson, G. 1998.** Cystic fibrosis and reproduction. *Reprod. Fertil. Dev.* 10:113-119
- Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S.S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M.J., Colledge, W.H. 1998.** Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature.* 393: 79–82.
- Poolman, E.M., Galvani, A.P. 2007.** Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *J. R. Soc. Interface.* 4:91–98.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L.-C. 1989.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245:1066-1073.
- Roberts, G.B.S. 1960.** Familial incidence of fibrocystic disease of the pancreas. *Ann. Hum. Genet.* 24:127-13.
- Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J.R., Tsui, L.-C., Collins, F.S. 1989.** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 245:1059-1065.
- Ryley, H.C., Neale, L.M., Brogan, T.D., Bray, P.T. 1975.** Screening for cystic fibrosis by analysis of meconium for albumin and proteaseinhibitors. *Clin. Chim. Acta.* 64:117-125.
- Sahai, I., Marsden, D. 2009.** Newborn Screening. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 46:55-82.

- Sawyer, S.M., Cerritelli, B., Carter, L.S., Cooke, M., Glazner, J.A., Massie, J. 2006.** Changing their minds with time: a comparison of hypothetical and actual reproductive behaviors in parents of children with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 118:649-656.
- Shickle, D., Harvey, I. 1993.** 'Inside-out', back-to-front: a model for clinical population genetic screening. *J. Med. Genet.* 30:580-582.
- Sims, E.J., McCormick, J., Mehta, G., Mehta, A. 2005.** Neonatal screening for cystic fibrosis is beneficial even in the context of modern treatment. *J. Pediatr.* 147:42-46.
- Siret, D., Bretaudeau, G., Branger, B., Dabadie, A., Dagonne, M., David, V., de Braekeleer, M., Moisan-Petit, V., Picherot, G., Rault, G., Storni, V., Roussey, M. 2003.** Comparing the clinical evolution of cystic fibrosis screened neonatally to that of cystic fibrosis diagnosed from clinical symptoms: a 10-year retrospective study in a French region (Brittany). *Pediatr. Pulmonol.* 35:342-349.
- Stern, M., Wiedemann, B., Wenzlaff, P. 2008.** From registry to quality management: the German Cystic Fibrosis Quality Assessment Project. *Eur. Respir. J.* 31:29-35.
- The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. 1993.** Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 329:1308-1313.
- The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis.** Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS. Genoa, Italy, 19 June 2002. (http://www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_TOC.pdf). [online]
- Tindall, E.A., Petersen, D.C., Woodbridge, P., Schipany, K., Hayes, V.M. 2009.** Assessing High-Resolution Melt Curve Analysis for Accurate Detection of Gene Variants in Complex DNA Fragments. *Hum. Mut.* 30:1-8.
- Vanscoy, L.L., Blackman, S.M., Collaco, J.M., Bowers, A., Lai, T., Naughton, K., Algire, M., McWilliams, R., Beck, S., Hoover-Fong, J., Hamosh, A., Cutler, D., Cutting, G.R. 2007.** Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*; 175:1036-1043.
- Welsh, M.J., Fick, R.B. 1987.** Cystic Fibrosis. *J. Clin. Invest.* 80:1523-1526.
- Wilcken, B., Towns, S.J., Mellis, C.M. 1983.** Diagnostic delay in cystic fibrosis: lessons from newborn screening. *Arch. Dis. Child.* 58:863-866.
- Yung, B., Kemp, M., Hooper, J., Hodson, M.E. 1999.** Diagnosis of cystic fibrosis related diabetes: a selective approach in performing the oral glucose tolerance test based on a combination of clinical and biochemical criteria. *Thorax* 54:40-43
- Zeitlin, P.L. 1999.** Novel pharmacologic therapies for cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 103:447-452.
- Zielinski, J. 2000.** Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration.* 67:117-133.