

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta**

**v Hradci Králové**

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Katedra biologických a lékařských věd



**Pavel Votýpka**

**MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ VYŠETŘENÍ *CFTR* GENU V RÁMCI  
NOVOROZENECKÉHO SCREENINGU V ČESKÉ REPUBLICE**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Klusoňová, PhD.

Hradec Králové, 2013

Škola:	Univerzita Karlova v Praze
Fakulta:	Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra:	Katedra biologických a lékařských věd
Studijní program:	Zdravotnická bioanalytika
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Jméno a příjmení autora:	Pavel Votýpka
Název bakalářské práce:	Molekulárně genetické vyšetření <i>CFTR</i> genu v rámci novorozeneckého screeningu v České republice
Pracoviště:	Ústav biologie a lékařské genetiky – Centrum cystické fibrózy, FN Motol, Praha
Vedoucí práce:	RNDr. Hana Klusoňová, PhD.
Konzultant:	MUDr. Miroslava Balašáková, PhD.
Rok obhajoby bakalářské práce:	2013

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem MUDr. Miroslavy Balaščakové, PhD., a v seznamu literatury jsem uvedl všechny použité literární a odborné zdroje. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 20.4.2013

.....

Pavel Votýpka

## **Poděkování**

Touto cestou bych rád poděkoval MUDr. Miroslavě Balaščakové, PhD., za naprosto profesionální přístup, cenné rady a čas, který mi při psaní této práce poskytla. Poděkování také patří panu přednostovi ÚBLG prof. MUDr. Milanu Mackovi, DrSc. a vedoucí CF Centra RNDr. Alexandře Štambergové, CSc. za umožnění studia při zaměstnání a napsání této bakalářské práce. Dále také děkuji celému kolektivu CF Centra ÚBLG, FN Motol v Praze, kteří trpělivě odpovídali na mé všetečné otázky a pomohli mi tak dokončit tuto bakalářskou práci.

## Souhrn

Cystická fibróza (CF) je nejčastější závažné autozomálně recesivní genetické onemocnění. Je způsobena mutací/cemi v genu kódujícím chloridový transportér na buněčné membráně (66). Statistiky uvádějí, že se toto onemocnění objevuje u jednoho z 2500 až 3500 živě narozených dětí v evropských populacích, přičemž v České republice se takto postižených dětí narodí asi 40 za rok (63). S ohledem na velmi závažné klinické projevy nemoci, které výrazně zkracují život postiženého, se u všech novorozenců narozených na území ČR od 1. října 2009 provádí novorozenecký screening CF ze suché kapky krve. Krevní vzorky novorozenců, kteří mají v prvotním testu zvýšené hodnoty IRT na daný cut off, jsou zasílány do laboratoře molekulární genetiky k analýze nejčastějších, patogenních a populačně významných mutací v genu *CFTR*.

Izolace DNA se provádí ze stejných suchých kapek krve na screeningové kartičce, ve kterých byla zjištěna zvýšená koncentrace IRT. Důležitý je správný výběr izolační metody, s ohledem na výtěžnost a kvalitu DNA. Ta zásadně ovlivní kvalitu a rychlost výsledků molekulárně genetického vyšetření a má vliv na následné získání informací během molekulárně genetické analýzy. U postižených jedinců jsou nalézány 2 mutace, event. 1 mutace v homozygotním stavu v genu *CFTR* v pozici trans. Do dnešního dne bylo popsáno více než 1500 mutací v tomto genu a jejich rychlá identifikace hraje roli při včasné terapii pacienta. V současné době se pacienti s CF dožívají průměrně 30 - 35 let, což je zlepšení, kterého bylo dosaženo nejen novými metodami péče o takto nemocné, ale také možnostmi včasného stanovení diagnózy pomocí NS (18). Novorozenecký screening v současnosti zásadně ovlivní přežití i kvalitu života těchto dětí, vzhledem k novým možnostem zavádění cílené genové terapie (20). Pro tu je důležité, aby tyto jedinci neměli ireverzibilní poškození tkání, zejména sinopulmonálního traktu. Spektrum nabízených metod vyšetření je velmi široké, a z tohoto důvodu je velmi důležitý správný algoritmus při výběru jednotlivých analytických protokolů pro potvrzení nebo vyloučení mutací v genu *CFTR*.

**Klíčová slova:** DNA, cystická fibróza, novorozenecký screening, gen *CFTR*, IRT, genetické vyšetření, molekulární diagnostika, mutační analýza

## Summary

Cystic fibrosis (CF) is the most frequent serious autosomal recessive genetic disease. CF is caused by mutations in the gene coding for Chloride transporter on the cell membrane (66). According to the statistics, this disease has prevalence 1 in 2500 to 3500 live newborns in European populations, where in Czech republic about 40 affected children a year are born (63). With respect to very serious clinical symptoms of this disorder (which substantially shortens the life expectancy of affected individual) in all newborns born in Czech Republic since October 1, 2009 the newborn screening from the dry blot spot is being performed. Blood samples from newborns who have in the primary test increased levels of IRT over given cut off are being sent to molecular genetic laboratory for analysis of the most frequent, pathogenic and population-wise important mutations in the *CFTR* gene.

DNA isolation is being performed from the same dry blood spots on the screening card, which correspond to those where the increased IRT were found. It is important to choose the most suitable isolation method with respect to DNA yield and concentration. Those are crucial for quality and turn around time of molecular genetic analysis results and influence the following information retrieval. There are 2 mutations found in affected individuals, sometimes 1 homozygous mutation in trans position, in the *CFTR* gene. Until today there was described more than 1500 mutations in this gene and their rapid identification plays important role in the patient's early therapy. Currently, the patients with CF have average life expectancy 30-35 years. This is improvement accomplished by new approaches in the patient's care and as well as by the possibility of early diagnosis through the newborn screening. Currently newborn screening crucially influences survival and the quality of live of the affected children thanks to the new approaches introducing targeted gene therapy. Important criterion for this therapy is absence of irreversible tissue damage especially in sinopulmonal tract (20). Spectrum of offered analytical methods is very broad and so it is important the employ the correct algorithm while choosing particular analytical protocol for *CFTR* gene mutation confirmation or exclusion.

**Key words:** DNA, cystic fibrosis, newborn screening, *CFTR* gene, IRT, genetic analysis, molecular diagnostic, mutation testing

# Obsah

<b>1. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Cystická fibróza .....</b>	<b>10</b>
1.1.1. Klinická charakteristika cystické fibrózy .....	10
1.1.2. Patofyziologie .....	11
1.1.3. Genetická podstata cystické fibrózy .....	12
1.1.3.1. Gen <i>CFTR</i> .....	12
1.1.3.2. Protein <i>CFTR</i> .....	12
1.1.4. Laboratorní diagnostika cystické fibrózy .....	13
1.1.5. Mutace genu <i>CFTR</i> .....	14
1.1.6. Polythymidinový a poly-TG trakt .....	14
1.1.7. Výskyt mutací <i>CFTR</i> genu v české populaci .....	15
<b>1.2. Novorozenecký screening .....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Historie a vývoj novorozeneckého screeningu v ČR a zahraničí .....	15
1.2.2. Novorozenecký screening cystické fibrózy .....	17
1.2.2.1. Protokoly novorozeneckého screeningu CF .....	17
<b>1.3. Základní molekulárně genetické principy a postupy .....</b>	<b>19</b>
1.3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	19
1.3.1.1. ARMS-PCR .....	20
1.3.1.2. Kontrola úspěšnosti amplifikace .....	21
1.3.2. Restrikční analýza (RFLP) .....	23
1.3.3. Reverzní hybridizace .....	24
1.3.4. DNA sekvenování .....	24
<b>2. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE .....</b>	<b>27</b>
<b>3. PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Preanalytická fáze .....</b>	<b>28</b>
3.1.1. Izolace DNA ze suché kapky krve .....	28
3.1.1.1. QIAamp DNA Blood Mini Kit .....	29
3.1.1.2. innuPREP Forensic Kit .....	29
3.1.1.3. Chelex 100 Resin .....	30
3.1.2. Měření koncentrace a čistoty DNA .....	30
<b>3.2. Postup laboratorního vyšetření při NSCF .....</b>	<b>32</b>
3.2.1. Elucigene CFEU2 .....	32
3.2.2. Ověření nálezu mutace F508del .....	37
3.2.3. Ověření nálezu mutace <i>CFTR</i> dele 2,3 .....	39
3.2.4. Ověření mutací genu <i>CFTR</i> metodou RFLP .....	40
3.2.5. Detekce velkých přestaveb <i>CFTR</i> genu metodou MLPA .....	41
3.2.6. Sekvenační analýza <i>CFTR</i> genu .....	43
<b>3.3. Ostatní použité vyšetřovací metody .....</b>	<b>46</b>
3.3.1. Devyser <i>CFTR</i> Core .....	46
3.3.2. Cystic Fibrosis Genotyping Assay - OLA .....	47
3.3.3. Stripy INNO - LiPA .....	48
3.3.4. CF StripAssay ViennaLab .....	50
3.3.5. Stripy AMPLICOR Cystic Fibrosis Roche .....	50
<b>3.4. Postanalytická fáze .....</b>	<b>51</b>

<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>52</b>
4.1. Porovnání metod pro izolaci DNA z krevních skvrn .....	52
4.2. Porovnání multiplexních metod vyšetření.....	55
<b>5. STATISTICKÉ HODNOCENÍ.....</b>	<b>56</b>
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>58</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>59</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>60</b>



## Seznam použitých zkratek

CF.....	cystická fibróza
CFTR.....	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, transmembránový regulátor vodivosti
IRT .....	imunoreaktivní trypsinogen
PAP .....	pancreatitis associated protein, protein asociovaný s pankreatitidou
DNA.....	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
NSCF.....	novorozenecký screening cystické fibrózy
NS .....	novorozenecký screening
MG .....	molekulární genetika
BP, PB.....	base pair, pár bází
MS/MS.....	tandem mass spektrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie
NBD .....	nukleotide binding domain, doména vázající nukleotid
PCR.....	polymerase chain reaction
NTC.....	non template control, kontrola bez templátového vzorku
AE .....	acetát/EDTA
TE.....	tris/EDTA
UV .....	ultraviolet, ultrafialové
EB .....	elution buffer, eluční pufr
PB.....	phosphate buffer, fosfátový pufr
CCD .....	charge-coupled device, zařízení s vázanými náboji
ARMS .....	amplification refractory mutation system
RFLP .....	restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů
MLPA .....	multiplex ligation-dependent probe amplification
DC .....	DNA control, kontrolní vzorek DNA
OLA .....	oligonucleotide ligation assay
HGVS.....	Human genome variation society

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF; OMIM #217900); patří mezi nejčastější závažná autozomálně recesivní onemocnění evropské populace (66). Údaje o jejím výskytu se značně liší. Obecně se udává incidence v evropské populaci 1: 2500 -1: 5500 (1,2). V České republice byla incidence CF stanovena na 1: 2833 (67). Na základě novorozeneckého screeningu prováděného v letech 2009 - 2010 byla incidence spočítána na 1: 5000 novorozenců (63).

Jedná se o multiorgánové onemocnění primárně postihující plíce, exokrinní funkci pankreatu, játra, střeva a mužský reprodukční systém (3). K dispozici doposud není kauzální léčba, ovšem kvalita a délka života pacientů s CF se v posledních desetiletích výrazně zlepšila. Zatímco v 50. letech minulého století umírala většina postižených dětí již v kojeneckém věku, v současnosti se ve vyspělých zemích nemocní mohou dožít i 50 let (2). Je zlepšována také kvalita života nemocných. V ČR je podle dat z národního registru ([www.cfregistr.cz](http://www.cfregistr.cz)) medián věku cca 26 let a např. v USA činí medián zhruba 37 let. Intenzivní léčba prodlužuje střední délku života, ovšem na druhou stranu přispívá k rozvoji sekundárních komplikací CF (3).

### 1.1.1. Klinická charakteristika cystické fibrózy

Jedná se o multiorgánové onemocnění, které je charakterizováno progresivním postižením sino-pulmonálního systému a vývoje mužského reprodukčního traktu, insuficiencí zevní sekrece pankreatu a také vysokou koncentrací chloridů v potu. Vedle těchto základních příznaků, které by vždy měly ošetřujícího lékaře upozornit na diagnózu, však CF postihuje téměř všechny systémy těla (2,5).

Průběh nemoci se může značně lišit podle závažnosti klinických projevů, o délce života rozhoduje především progresivní postižení plic, které se podílí na úmrtnosti pacientů s CF v 85%. Postižení plic je způsobeno přítomností hustého hlenu v dýchacích cestách. Dochází k rozvoji chronických zánětů plic způsobených převážně kmeny bakterií *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burgholderia cepacia*, které ve svém důsledku vedou k tvorbě bronchiektázií a rozvoji respiračního selhání. V rámci postižení gastrointestinálního traktu se již prenatálně objevuje postižení zevní sekrece pankreatu,

kteří způsobuje po narození poruchu vstřebávání živin (tzv. pankreatickou insuficienci). Vlivem toho je narušen stav výživy, vývoj a růst pacientů. Někteří pacienti mohou mít zbytkovou funkci pankreatu zachovanou (2,5).

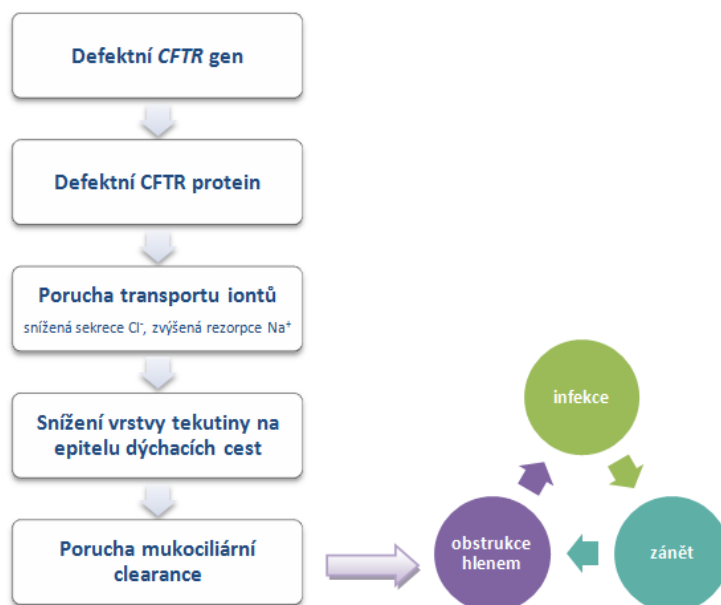
Novorozenecký mekoniový ileus, který je způsobený ucpáním střeva zvýšeně vazkou smolkou (mekoniem) se vyskytuje u zhruba 13 % novorozenců s CF, a je velmi často prvním příznakem tohoto onemocnění (4,11). U dospělých mužů se CF také projevuje jako porucha reprodukce ve formě obstrukční azoospermie (2).

Z tohoto stručného výčtu klinických projevů vyplývá, že klinická diagnostika je často velmi obtížná. I základní příznaky se nemusí projevit, nebo se mohou rozvinout ve vyšším věku (1,2,5). CF má tedy relativně široké spektrum příznaků, které mají navíc i různý věk nástupu a odlišnou míru progresu klinického vývoje (3,5).

### **1.1.2. Patofyziologie**

Patogeneze cystické fibrózy je orgánově specifická a u jednotlivých cílových orgánů se projevuje v různé míře. I přes velmi intenzivní výzkum nebyla regulace CFTR exprese u postižených orgánů doposud zcela objasněna. Gen *CFTR* je u člověka exprimován na povrchu epiteliálních tkání, které se shodují s orgány postiženými cystickou fibrózou. Dnes je jisté, že protein CFTR funguje především jako chloridový kanál na apikální membráně buněk, který je zodpovědný za transport elektrolytů a vody epiteliálními membránami, současně však také reguluje funkci dalších proteinů (68). Poruchou jeho funkce je omezena sekrece chloridů a podporována resorpce sodíku, což vede ke změně složení i vlastností sekretů na epiteliálním povrchu buněk (viz. Schéma č. 1). Zahuštěný hlen je zodpovědný za obstrukci dýchacích cest, následně dochází k osídlení bakteriemi a k chronické infekci. U proteinu CFTR byla popsána jeho úloha jako internalizačního-fagocytárního receptoru pro *Pseudomonas aeruginosa* a *Burgholderia cepacia*. Reakcí na infekci je nepřiměřená zánětlivá odpověď, která vede k ireverzibilnímu poškození epitelu dýchacích cest proteázami a prozánětlivými cytokiny (2).

Schéma č. 1: Patofyziologie respiračního onemocnění CF



### 1.1.3. Genetická podstata cystické fibrózy

#### 1.1.3.1. Gen *CFTR*

Ani padesát let od prvního popisu cystické fibrózy (7) nebyla biochemická podstata nemoci objasněna. V roce 1989 byl konečně s definitivní platností metodou pozičního klonování, kombinací techniky „chromosome jumping“ a fyzikálního mapování, izolací potenciálních exonových sekvencí a genetickou analýzou segregace kandidátních regionů v rodinách s CF určen gen *CFTR* (z angl. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; 26, 27, 28). Gen *CFTR* má 27 exonů, rozprostírá se přibližně v oblasti 250 kpb a tvoří mRNA dlouhou 6.5 kpb (26, 27).

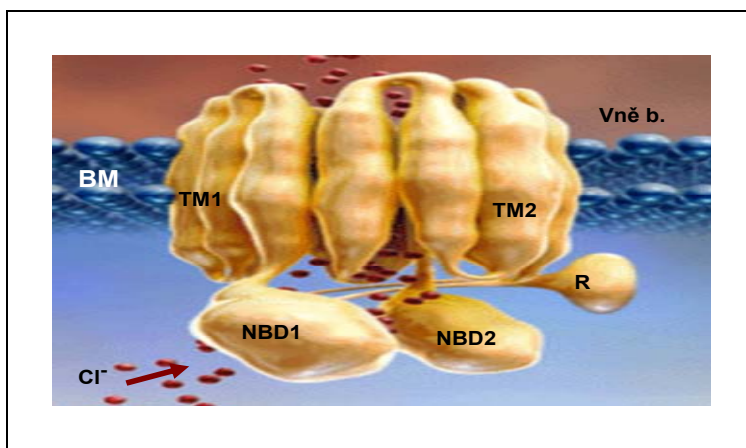
#### 1.1.3.2. Protein *CFTR*

Protein *CFTR* se skládá z 1480 aminokyselin a patří do skupiny tzv. „ATP-binding cassette“ transmembránových transportních proteinů. Plní funkci kanálu, přes který jsou transportovány ionty (především chloridy, ale i bikarbonát; 64). Další jeho funkcí je regulace funkce resorpčního, na amilorid senzitivního, epitelového sodíkového kanálu (ENaC-amiloride sensitive epithelial sodium channel; 32,33) a pomocí exkrece ATP

ovlivňuje i funkci dalšího důležitého chloridového kanálu – ORCC (outwardly rectified chloride channel; 65).

CFTR protein se skládá z 5 základních domén. Obsahuje dva opakující se transmembránové segmenty (Transmembrane Domains) TM1 a TM2, které tvoří vlastní kanál v apikální buněčné membráně. Dále 2 domény lokalizované v cytoplazmě, které váží aktivované nukleotidy (hlavně ATP - adenosintrifosfát) – tzv. NBD1 a NBD2 (Nucleotide Binding Domains) a nepárovou regulační doménu "R" (Regulatory Domain), která funguje jako ventil a otevírá či zavírá chloridový kanál (32,33). Celý protein CFTR je schématicky znázorněn na obrázku č. 1.

*Obr. č. 1:* Schéma terciární struktury proteinu CFTR



Legenda: BM – bazální membrána; TM1, TM2 – transmembránová doména 1,2; NBD1, NBD2 – nukleotidy vázající domény; R – regulační doména; sekrece chloridových iontů přes membránu.

#### 1.1.4. Laboratorní diagnostika cystické fibrózy

Diagnostika cystické fibrózy se opírá převážně o klinické příznaky. Klinické podezření je však nutné potvrdit laboratorním vyšetřením. To spočívá ve stanovení koncentrace chloridů v potu tzv. potním testem, jelikož pot dětí s CF obsahuje mnohem více solí než je tomu u potu dětí zdravých. Dále je prováděn průkaz přítomnosti 2 patogenních mutací *CFTR* genu v pozici trans (2).

### 1.1.5. Mutace genu *CFTR*

V genu *CFTR* bylo dosud celosvětově popsáno více než 1900 sekvenčních variací (viz <http://www.genet.sick-kids.on.ca/cftr/>)(8). Nejčastěji nacházenou je mutace F508del (c. 1521-1523delCTT,p.Phe508del(50,1)). Tato mutace se nachází v průměru u 70 % testovaných alel genu *CFTR*. V Evropě frekvence jejího výskytu vykazuje sestupný gradient od severovýchodu na jihozápad.

Převážná většina dalších mutací je privátních a pouze 30 mutací se vyskytuje s četností více než 0,1 % (1717-1G>A, 1898+1G>A, 2184delA, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 3659delC, 3849+10kbC>T, 621+1G>T, 711+1G>T, A455E, F508del, I507del, G542X, G551D, G85E, N1303K, R1162X, 1161delC, S549N, R117H, R334W, R347P, R553X, R560T,W1282X, 1078delT, 394delTT, CFTRdele2,3(21kb), 3272-26A>G a D1152H), mnohé z těchto mutací jsou populačně specifické (9). V Evropě v zásadě narůstá heterogenita mutací od severu na jihovýchod (10).

### 1.1.6. Polythymidinový a poly-TG trakt

Na hranici intronu 8 a exonu 9 v *CFTR* genu se nachází úsek označovaný jako polythymidinový (poly-T) trakt tvořený 5T (IVS-5T), 7T (IVS-7T) či 9T (IVS-9T) zbytky, po němž následuje 10-13 TG opakování (poly-TG trakt). Oba tyto trakty mají vliv na sestřih exonu 9, přičemž u poly-T traktu se s klesajícím počtem thymidinových zbytků zvyšuje počet kopií genu, kde chybí exon 9. To vede k defektní tvorbě *CFTR* proteinu a následně porušené funkci chloridového kanálu. V kombinaci s další mutací *CFTR* genu na druhé alele tak dochází k částečné poruše tvorby proteinu a fenotypově se tento stav může projevit např. infertilitou či lehkou formou CF. Na samotném sestřihu exonu 9 a fenotypovém projevu se podílí i způsob kombinace poly-T traktu s různým počtem následujících TG opakování. Byly pozorovány rozdíly ve fenotypu IVS8-5T v kombinaci s TG12 či TG13 od kombinace IVS8-5T v kombinaci s TG10 či TG11. Se vzrůstajícím počtem repetice TG(n) a naopak se snižujícím se počtem repetice T(n) se snižuje i podíl správně sestřižených exonů 8 a 9 v průběhu sestřihu pre-mRNA genu *CFTR* (40, 41).

### **1.1.7. Výskyt mutací *CFTR* genu v české populaci**

Mutace, které se v naší populaci vyskytují, odráží geopolitické vlivy, kterými naše území během historického vývoje prošlo. Nejvíce jsou v populaci patrné vlivy německé, rakouské, polské, slovenské a maďarské. Českou republiku lze považovat za relativně homogenní a díky složení jejího obyvatelstva ji můžeme zařadit jako reprezentativního zástupce středoevropské populace (46). Jednou ze zajímavostí naší populace je relativně vysoký výskyt mutace G551D, která je v podobném procentu nacházena ve Velké Británii, Irsku, francouzské Bretani a Rakousku a její rozšíření do střední Evropy je přisuzováno migraci Keltů do této oblasti (46, 59).

Na konci roku 2012 byla zveřejněna dvě desítky let trvající studie, která měla za cíl zjištění incidence jednotlivých mutací *CFTR* genu na našem území a následné zlepšení diagnostiky i léčby pacientů s cystickou fibrózou. Do této doby bylo v CF Centru geneticky vyšetřeno téměř 3000 rodin s podezřením na CF. Během studie byly mutace vyšetřovány u 600 nepříbuzných pacientů, u kterých byla diagnóza CF stanovena na základě klinických a laboratorních kritérií. Při detekci mutací a jejich ověřování byly použity metody Elucigene CFEU2, MLPA a sekvenační analýza. Z 1200 patogenních mutací bylo identifikováno 1194, tedy 99,5%. Celkem bylo u testovaných pacientů v tomto souboru detekováno 91 různých mutací a jejich četnost v české populaci je uvedena v příloze č. 1 (46).

## **1.2. Novorozenecký screening**

### **1.2.1. Historie a vývoj novorozeneckého screeningu v ČR a zahraničí**

Novorozenecký screening je celoplošné aktivní vyhledávání choroby ve stadiu, kdy ještě nejsou patrné klinické příznaky a to pomocí stanovení koncentrace specifické látky (případně průkazem mutace) v suché krevní skvrně. Ta se odebírá všem novorozencům na filtrační papír z patičky. Za zakladatele NS je všeobecně považován profesor Robert Guthrie, který v roce 1963 vynalezl a následně zavedl do celoplošného provádění jednoduchou, spolehlivou a současně levnou semikvantitativní metodu měření koncentrace fenylalaninu pro NS fenylketonurie (12,13). V následujících obdobích došlo k celosvětovému rozšíření NS. Screening fenylketonurie se stal historicky prvním NS i na našem území.

Celoplošně a pravidelně je u nás prováděn již od roku 1975 (14,15,16). V současné době se základní odběr provádí mezi 48. až 72. hodinou života.

Díky technologickému a vědeckému pokroku se počet chorob, které je možno ze suché kapky krve na filtračním papírku diagnostikovat, stále zvyšuje. Významným momentem bylo zavedení metodiky tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), která provádí komplexní rozbor celého spektra analytů rozdělených podle hmotnostního čísla (60,61). Tato metodika se používá k paralelnímu vyšetření dědičných metabolických poruch. Hlavním smyslem je zachytit choroby, u kterých je možno pomocí terapeutických postupů předejít život ohrožujícímu metabolickému či energetickému rozvratu a/nebo k dlouhodobému poškození zdraví (především v případě CNS).

### **Současný novorozenecký screening v České republice**

Pilotní studie, která měla zjistit proveditelnost NSCF v České republice, byla v CF Centru zahájena 17.8.2009. Samotný celoplošný screening byl pro oblast Čech zahájen 1.10.2009 a pro oblast Moravy dne 1.12.2009. Spolu s cystickou fibrózou začalo screeningové testování i dalších vrozených onemocnění a jejich spektrum se tak rozšířilo z 3 na 13. Celkové riziko onemocnění novorozence některou ze 13 takto vyšetřovaných chorob činí 1: 1200; některou z endokrinních chorob 1: 2900 a některou z dědičných metabolických poruch 1: 4000 (63).

### **Novorozenecký screening v zahraničí**

Z pohledu Evropského kontinentu je pro systémy NS v jednotlivých státech typická značná nejednotnost (18-21). Příčinou tohoto jevu je fakt, že se jednotlivé systémy NS vyvíjely na základě konkrétních historických, geografických, medicínských, ale i socio-ekonomických podmínek daného státu, přičemž tyto vlivy i nadále ovlivňují funkci celého systému. V dnešní době neexistuje jeden univerzální systém NS, který bychom mohli označit za nejlepší. V posledních letech je pozorován trend rozšiřování množství testovaných nemocí a zavádění nových forem novorozeneckého screeningu. Začínají se uplatňovat nové technologie typu multiplexních „microarrays“ k rozboru analytu nebo DNA. Velikost a jednoduchost použití těchto nástrojů naznačuje další možný směr vývoje NS, tedy diagnostiku přímo u lůžka novorozence (22-26).



### 1.2.2. Novorozenecký screening cystické fibrózy

Argumenty, které stály za zavedením screeningu CF, lze shrnout do následujících bodů:

- Průběh nemoci a její mechanismy jsou známy
- Choroba je výrazným celospolečenským sociálně-ekonomickým problémem (převážně z důvodu finančně nákladné léčby).
- Jedná se o relativně časté onemocnění.
- Včasná diagnostika zkvalitňuje i prodlužuje život pacientů; tj. zlepšení stavu nutrice, zlepšení růstu, méně agresivní terapie; studie z nedávné doby ukazují, že pacienti s CF diagnostikovaní do 2 měsíců mají příznivější průběh choroby a dlouhodobě lepší klinický stav s vyhlídkou delšího dožití (27, 28). Klinicky CF diagnostikovat je však v tomto věku obtížné (2).
- Včasná diagnostika je prevencí úmrtí z nediagnostikované choroby – např. při metabolickém solném rozvratu kojenců, či při rychlé progresi plicního postižení.
- Předpokládané náklady screeningu jsou nižší než náklady na léčbu komplikací choroby při pozdní diagnostice (27).
- Včasnou diagnostikou lze redukovat stres rodiny nemocného dítěte s nejasnou příčinou obtíží při pozdní diagnostice, čímž se i obecně zvyšuje důvěra v celý zdravotnický systém.
- Včasná diagnostika napomáhá optimalizaci genetického poradenství a informované reprodukce v rodinách s prvorozeným dítětem s CF. Při absenci NSCF docházelo k situacím, kdy byla CF diagnostikována u staršího sourozence až na základě průkazu choroby u mladšího sourozence.
- Při celoplošném NSCF lze pacienty efektivněji soustředit do specializovaných klinických center, které mají s nemocí bohaté zkušenosti a kde jim je zajištěna komplexní péče. Tím je možné odstranit nerovnoměrnost v péči mezi pacienty.

#### 1.2.2.1. Protokoly novorozeneckého screeningu CF

Snahy o zavedení novorozeneckého screeningu cystické fibrózy jsou známy již od roku 1979 (29), kdy bylo prokázáno, že se v krvi novorozenců s CF vyskytuje zvýšená koncentrace imunoreaktivního trypsinogenu/trypsinu (IRT). Stanovení tohoto analytu bylo možné i ze suché kapky krve na filtračním papírku, který se využíval pro jiné NS. Hladina trypsinu i jeho prekurzoru – trypsinogenu jsou v rovnovážném stavu a většina metodik tak měří koncentrace obou látek. Acinární ducty pankreatu, které produkují trypsinogen, jsou u

pacientů již prenatálně poškozeny z důvodu blokády vazkým hlenem. Blokáda ductů způsobí, že trypsinogen prostoupí do krve ve vyšší koncentraci (30). S postupujícím věkem a atrofizací pankreatu produkce enzymu postupně klesá (31-34), proto není vhodný pro pozdější diagnostiku. IRT je dostatečně stabilním a specifickým markerem, má ovšem nižší specifitu. Vysoké hodnoty IRT jsou nacházeny i u části zdravé populace – hlavně u nosičů mutace genu *CFTR*, vliv má také etnický původ (35, 36). Dále je uváděno, že ke zvýšení IRT může docházet následkem perinatální hypoxie, u chromozomálních aberací (Downův syndrom), některých vrozených vývojových vad ledvin, srdce či neurální trubice (31-34). V této souvislosti se uvádí, že asi 25% novorozenců s cystickou fibrózou a mekoniovým ileem má normální, tedy nižší než „cut off“, hodnotu IRT.

Prozatím jedinou možností, jak zvýšit specifitu při NSCF, je zavedení dvoustupňových, event. víceúrovňových protokolů. V prvním stupni jsou vyselektováni rizikovní novorozenci, u nichž je zvýšena koncentrace IRT, teprve až ve druhém kroku jsou vyhledáni cíleně pacienti s CF pomocí dalšího testování. Doposud je v celém světě použito přibližně 70 protokolů. Aktuálně nejčastěji používaným je tzv. IRT/DNA (2, 37).

**Protokol IRT/DNA** – v případě tohoto protokolu se u novorozenců jako druhý stupeň provádí molekulárně genetické vyšetření mutací genu *CFTR*. Pokud je prokázána mutace na obou alelách, je pacient spolu s rodiči pozván k edukačně-diagnosticko-terapeutickému pobytu v CF Centru. V případě nálezu jedné mutace, následuje potní test. Senzitivita tohoto postupu závisí na počtu testovaných mutací a populačním spektru (37).

### 1.3. Základní molekulárně genetické principy a postupy

#### 1.3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction) byla poprvé popsána na počátku 80. let 20. století americkým biochemikem Dr. Kary Mullisem, který metodu pod tímto názvem poprvé veřejně publikoval v časopise Science v roce 1985. Od této doby se metoda začala díky své rychlosti a citlivosti uplatňovat v rutinní diagnostice a je dodnes v mnoha modifikacích nejčastěji používanou metodou v laboratořích molekulární genetiky (49).

PCR je metoda, při níž dochází k enzymatické amplifikaci DNA pomocí tvorby velkého množství kopií námi vybrané sekvence genu. Toho je docíleno cyklickým opakování tří kroků: denaturační fáze, anelační fáze a fáze syntetické. Základní podmínkou pro úspěšnost PCR reakce je znalost pořadí bazí na začátku a na konci námi požadovaného úseku DNA, aby bylo možno použít specifické primery, neboli synteticky připravené jednovláknové oligonukleotidy (z řeckého „oligo“ = málo) o délce přibližně 18-25 bazí, které obsahují sekvenci komplementární se sekvencemi na 3'-OH konci obou vláken námi požadovaného úseku (50,51).

Pro standardní PCR reakci, při které chceme namnožit jeden fragment DNA, se používá dvojice primerů označovaných jako forward a reverse, jejichž délka by měla být shodná a oba primery by měly obsahovat přibližně stejný počet purinových a pyrimidinových bazí, čímž je docílena i podobná teplota tání obou primerů, která by se neměla lišit o více než 5 °C. Znalost teploty tání primerů je důležitá pro správně zvolenou anelační teplotu v PCR cyklu a hraje tak důležitou roli v úspěšném nasedání primerů na cílové sekvence DNA (50,51).

Dále základní směs pro PCR obsahuje hořčičnaté ionty, které slouží jako kofaktor a tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleotid-5'-trifosfáty (dNTPs), který je následně rozeznáván Taq polymerázou. Ty jsou do směsi většinou dodávány v podobě MgCl<sub>2</sub>, nukleotidy sloužící jako základní stavební kameny pro tvorbu nového vlákna a Taq polymerázu. PCR směs je vždy připravována v oddělené zóně označené „PRE-PCR“ v biohazard boxu, aby bylo zamezeno případné kontaminaci. Spolu se sérií vyšetřovaných vzorků je vždy nutno provést kontrolu kontaminace (NTC, z angl. Non Template Control),

kteřá obsahuje všechny složky reakční směsi kromě templátové DNA. Tu je vhodné pro zachování objemu směsi nahradit vodou pro PCR. Dále je podle typu vyšetřeni vhodné použít pozitivní či negativní kontroly, ve kterých je použita DNA o známém genotypu s přítomností resp. nepřítomností vyšetřované mutace (50,51).

Celá reakce probíhá v termocyklerech, jejichž funkcí je přesně stanovená změna teplot podle nastaveného PCR programu. Reakce je zahájena počáteční denaturací, po které následuje PCR cyklus, ve kterém probíhají 3 fáze - denaturační, anelační a syntetická. Tento cyklus je opakován 15 - 40x a celá reakce je zakončena finální elongací, při které dochází k dokončení syntézy částečných produktů a ochlazením produktu reakce na teplotu 4°C, ve které může být produkt uchováván před dalším zpracováním po dobu několika dnů. Opakováním cyklů dlouhých 2-5 minut lze touto metodou získat za dobu méně než 3 hodiny až  $10^9$  kopií potřebného úseku (50,51).

#### **1.3.1.1. ARMS-PCR**

Metoda ARMS (z angl. Amplification Refractory Mutation System) je jednoduchá metoda založená na bázi alelově specifické PCR reakce k diagnostice mutací způsobených záměnou jednoho nukleotidu, případně inzercí či delecí. ARMS-PCR se provádí jako dvojice nezávislých reakcí. Do každé reakce je přidán primer společný (s), v první PCR reakci je použita sekvence oligonukleotidů komplementární k normální sekvenci DNA (n) a v druhé reakci sekvence komplementární k mutované DNA (m). Ke vzniku produktů tak dochází pouze ve zkumavce, kde dojde k úspěšnému nasednutí odpovídajícího primeru.

Při této metodě je bezpodmínečně nutné použití interní kontroly, aby se potvrdilo, že reakce v obou zkumavkách probíhá správně. Ideální je v případě jednoduché ARMS reakce použití heterozygotní kontroly, u níž dojde v případě dodržení podmínek amplifikace k vytvoření produktu v obou reakčních mixech. Je také možné jako kontrolu použít dvojici kontrolních primerů, které jsou přidány do reakce a které amplifikují produkt lišící se od vyšetřované sekvence (51).

### 1.3.1.2. Kontrola úspěšnosti amplifikace

Ke kontrole amplikonu po PCR reakci je v dnešní DNA diagnostice stále nejčastěji používána desková gelová a kapilární gelová elektroforéza. Tyto metody využívají faktu, že molekuly DNA obsahují záporně nabitě fosfátové skupiny ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), díky nimž mají tyto částice celkově negativní náboj a pohybují se tedy v elektrickém poli směrem ke kladné elektrodě (50).

#### Plošná gelová elektroforéza

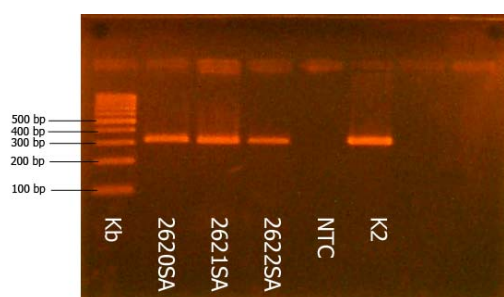
V minulosti bylo v molekulární genetice nejčastěji používáno dvou druhů gelů – agarózového pro vyšetření delších molekul a polyakrylamidového pro vyšetřování kratších molekul. Výhodou polyakrylamidového gelu je schopnost odlišit velmi krátké fragmenty lišící se např. jen o jeden pár bazí. Z důvodu náročnosti přípravy gelu a toxicitě jeho složek je v dnešní době od používání polyakrylamidových gelů v molekulární diagnostice ustupováno a jsou nahrazovány citlivou kapilární gelovou elektroforézou, zatímco agarová elektroforéza si díky své nenáročnosti stále zachovává své místo hlavně v orientačních metodách kontroly amplifikace či při fragmentační analýze.

Agarózová elektroforéza využívá polysacharidu získávaného z mořské řasy rodu *Floridae*. Agarový gel je podle velikosti analyzovaných fragmentů v laboratoři připravován o koncentraci 0,5 – 4%, přičemž standardně je pro potřeby PCR a RFLP diagnostiky *CFTR* genu s fragmenty o velikosti 50 - 500 bp v laboratoři CF Centra připravován gel o koncentraci 3% (50). Jeho příprava spočívá v navážení potřebného množství suchého agaru a jeho rozpuštění v ekvivalentním objemu TE pufru za vysoké teploty v mikrovlnné troubě či vodní lázni. Následně je do gelu vmíšeno barvivo zviditelňující DNA fragmenty, gel je nalit do obdélníkových forem a opatřen speciálním hřebenem pro tvorbu jamek. Jako barvivo je zde použito barvivo GelRed (Biotium, USA), které na rozdíl od dříve používaného ethidium bromidu, neprostupuje buněčnou stěnou a nehrozí tak mutagenní účinky, ze kterých je ethidium bromid podezírán (52).

Po ztuhnutí je gel vložen do elektroforetické vany a ponořen v TE pufru. Do vytvořených jamek v gelu je nanášen PCR produkt smíšený s glycerinovým barvivem, aby nedocházelo k jeho vyplavování a současně došlo ke zvýraznění produktu. Spolu s každou

sérií vyšetřovaných vzorků je použit i velikostní standard (Kb), který je komerčně dodávanou směsí DNA fragmentů o předem známé velikosti, který na gelu vytváří pruhy označované jako „ladder“ neboli „žebřík“ a je kontrolou vzdálenosti, do které fragmenty doputovaly. Agarózový gel v elektrickém poli funguje jako jakési molekulární síto, ve kterém menší fragmenty DNA putují rychleji a tím pádem i dále, zatímco větší fragmenty ztrácejí vlivem tření na rychlosti a doputují tak do kratší vzdálenosti. Po proběhnutí elektroforézy je gel vložen na plochu transiluminátoru, který pomocí UV-záření zviditelní fragmenty DNA a následně vyfocen pro další popis a elektronické uchování.

**Obr. č. 2:** Kontrola PCR reakce pomocí agarózové elektroforézy



Legenda: Produkt o velikosti 305 bp při kontrole amplifikace před restrikční analýzou mutace 2789+5G > A; Kb – velikostní marker, 2620SA, 2621SA, 2622SA – vzorky izolované z krevních skvrn, NTC – non template control, K2 – heterozygotní kontrola

### **Kapilární gelová elektroforéza**

Tento typ elektroforézy je vysoce citlivý a je proto vhodný pro zachycení malých fragmentů a rozlišení fragmentů lišících se o malé množství bp. Probíhá v tenké kapiláře, která může dosahovat délky až 1 metr a průměru několika desítek až stovek mikrometrů. Napětí mezi oběma konci kapiláry je způsobené jejich ponořením do nádobek se základním elektrolytem – pufrem, z nichž v jedné je kladně nabitá elektroda (anoda) a v druhé záporně nabitá (katoda). Molekulární síto zde tvoří polymerní gel, kterým díky napětí mezi oběma konci kapiláry putují molekuly DNA (50).

V CF Centru je k tomuto účelu používán 16-ti kapilární genetický analyzátor ABI 3130xl (Applied Biosystems, USA), ve kterém probíhá analýza vzorků pomocí polymeru POP-7 v kapiláře dlouhé 36 cm o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Doba fragmentační analýzy 16

vzorků trvá od 20 do 40 minut. V genetickém analyzátoru je možno provádět fragmentační i sekvenační analýzu. K vizualizaci molekul DNA je použit systém fluorescenčního barvení založený na fyzikálních jevech emisi a excitaci světla při různých vlnových délkách.

Fluorescenční značkou je nejčastěji označen příslušný primer, se kterým je provedena PCR reakce a následná kapilární elektroforéza. V genetickém analyzátoru ABI 3130xl je možno použít 5 různých fluorescenčních barev – žlutá, modrá, zelená, červená a oranžová, z nichž jedna je v případě fragmentační analýzy vždy vyhrazena pro velikostní standard (nejčastěji červená či oranžová). K samotnému vyhodnocení je pak použit argon-iontový laser, který využívá vlnových délek 488 a 514 nm a následně CCD snímač, který zachycuje emisi záření ze vzorku v každé z 16-ti kapilár (60). Snímač je propojen s počítačem, kde jsou výsledky fragmentační analýzy hodnoceny programem GeneMapper 4.0. Výsledkem vyšetření fragmentační analýzy je graf skládající se z jednotlivých křivek – píků, jejichž vzhled svědčí o kvalitě PCR amplifikace a rozdělení fragmentů. Čím vyšší a užší píky, tím je rozdělovací schopnost lepší.

### 1.3.2. Restrikční analýza (RFLP)

Analýza bodových mutací pomocí štěpení DNA na různě dlouhé fragmenty restrikční endonukleázou (RFLP z angl. Restriction Fragment Length Polymorphism) je jednou z nejzákladnějších a nejstarších metod používaných v molekulární diagnostice. Endonukleázy jsou skupinou enzymů, které jsou izolovány z různých kmenů bakterií, od nichž dostávají svůj zkrácený název (např. EcoRI – *Escherichia coli* restriktáza č.1). Jejich původní význam je obrana bakterií proti bakteriálním virům. Vlastností endonukleáz, které jsou v molekulární diagnostice využívány, je schopnost štěpit úsek DNA obsahující přesnou sekvenci nukleotidů v tzv. restrikčních místech na menší fragmenty, zatímco při nepřítomnosti požadované sekvence k tomuto štěpení nedochází. Nejčastějším místem pro štěpení restriktázami bývá úsek označovaný jako „palindrom“, tedy úsek DNA, který je na obou vlákních při čtení ve stejném směru (např. 5'→3') shodný. Polymorfismus délky fragmentů tak vzniká na základě přítomnosti či nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst pro restrikční endonukleázy (50,51).

### 1.3.3. Reverzní hybridizace

Pojem hybridizace v molekulární biologii obecně označuje spojení dvou komplementárních řetězců různého původu. Jedním z těchto řetězců je nejčastěji vyšetřovaná DNA (případně RNA) a druhým uměle připravená sonda (próba). V případě reverzní hybridizace jsou próby komplementární k vyšetřovaným úsekům DNA imobilizovány na pevném nosiči. V rutinní diagnostice *CFTR* genu se dnes nejvíce využívá tzv. stripů, tedy nosičů s nitrocelulóзовými filtry či nylonovými membránami, na nichž je umístěno až 50 specifických prób (50,51).

V první fázi je provedena multiplex PCR reakce se směsí primerů, vzniklé produkty jsou následně denaturovány na jednořetězcové amplikony a ty jsou hybridizovány s komplementárními próbami na stripech. Následuje striktní promytí, které má za úkol odstranit všechny neodpovídající amplifikovaný materiál. V dalším kroku je přidán enzym, který se naváže na všechny hybridizované amplikony. Následuje inkubace s roztokem substrátu, jež obsahuje chromogen. Díky němu vzniká barevný precipitát vhodný pro vizualizaci výsledků reakce. Zastavení reakce je provedeno promytím v pufru a následně destilované vodě a výsledek je odečítán na základě umístění obarvených prób na stripu (50,51).

### 1.3.4. DNA sekvenování

Mezi nejcitlivější a nejpřesnější dnes používané molekulárně genetické metody patří metoda sekvenování, která umožňuje určení přesné nukleotidové sekvence DNA. Historie této metody sahá do roku 1977, kdy byly vyvinuty téměř současně dvě metody nazvané podle svých autorů – metoda Maxamova-Gilbertova založená na chemickém degradačním sekvenování a enzymatická metoda dle Sangera. Druhá ze jmenovaných metod si zejména díky možnosti automatizace získala mnohem větší pozornost a je dodnes nejpoužívanější metodou, na jejímž principu je prováděno sekvenování na většině molekulárně genetických pracovišť.



### **Sangerova metoda sekvenování**

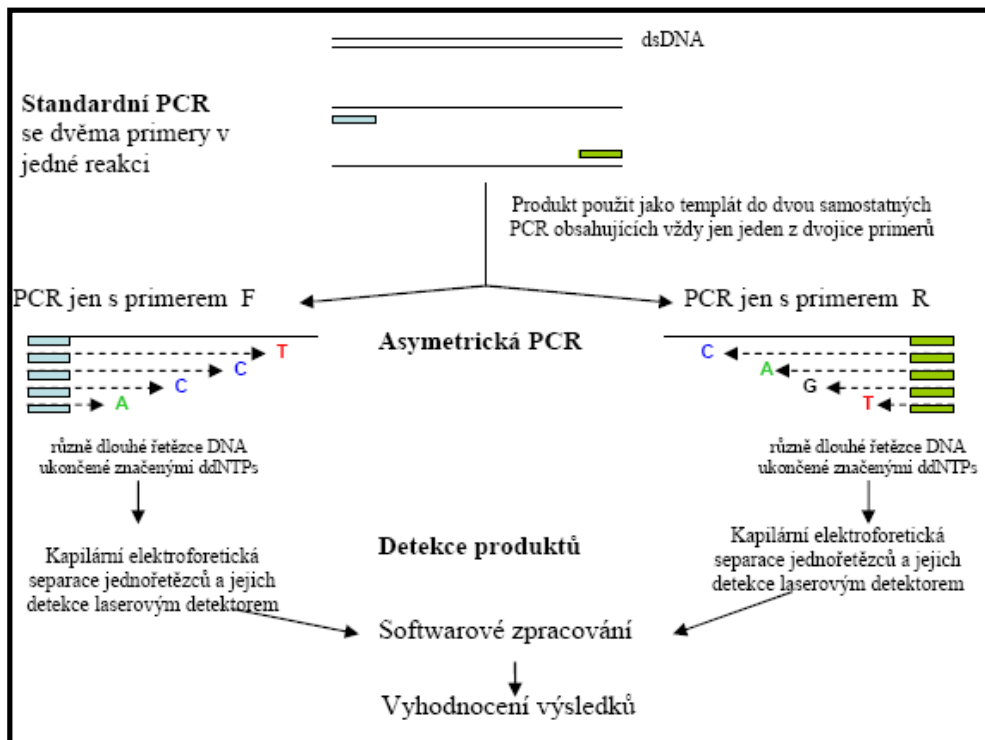
Tato enzymatická metoda využívá schopnosti DNA polymerázy vytvářet komplementární vlákna ve směru 5'→3' k vláknům templátovým a možnosti specifického zakončení tvorby vláken v místě výskytu určité báze. Toto zakončení je způsobeno náhodným zařazením 2', 3'- dideoxyribonukleotidtrifosfátu (ddNTP), který na rozdíl od „přirozeného“ deoxyribonukleotidtrifosfátu postrádá 3'OH skupinu. Absence této skupiny je příčinou toho, že při zařazení specifického ddNTP – např. ddATP, dojde k přerušení syntézy vlákna v místě přítomnosti komplementární báze, v tomto případě thyminu. Syntetizování na ostatních templátových vlákních ovšem pokračuje opět do zastavení syntézy zařazením dideoxyribonukleotidtrifosfátu. Výsledkem reakce je tak směs různě dlouhých úseků DNA řetězců, jejichž délka je závislá na výskytu určité sledované báze (50,51).

Klasická reakce při Sangerově metodě sekvenování probíhá ve 4 zkumavkách, z nichž každá obsahuje DNA, jejíž sekvence nukleotidů má být stanovena, dále primer, který se k DNA připojí a umožní připojování nukleotidů, směs přirozených dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a jeden typ ddNTP, který je přidáván do směsi v menším množství oproti dNTP. Většinou se používá poměr dNTP: ddNTP 100:1. Tento poměr, kdy je přítomno ve směsi pouze 1% ddNTP zajišťuje jejich náhodné začleňování do řetězců, zatímco u ostatních stále probíhá syntéza komplementárního vlákna (50,51).

### **Automatizace Sangerovy metody**

Vývoj genetických přístrojů využívajících kapilární elektroforézu znamenal mimo jiné rozvoj automatizace sekvenování enzymatickou metodou. Při sekvenační kapilární elektroforéze je na rozdíl od původně používaného polyakrilamidového gelu, k detekci používán tekutý polymer a výsledné produkty jsou detekovány pomocí laseru. Tento pokrok vedl ke značnému zjednodušení, zrychlení a také možnosti vyšetřování delších sekvencí DNA. K detekci je používáno fluorescenční značení dideoxynukleotidů, kdy je pro každý typ lišící se nukleotidovou bází použita specifická barva a reakce tak může probíhat v jedné zkumavce. K získání vhodných jednořetězců pro analýzu je používáno tzv. asymetrická PCR reakce, při níž je přidáván jeden z dvojice primerů v nadbytku. Po vyčerpání jednoho z primerů pak dochází k syntéze jednořetězcových vláken (50,51).

Obr. č. 3: Schéma sekvenování podle Sangerovy metody (61)



## **2. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE**

1. Vypracování kompletního přehledu molekulárně genetického vyšetření v rámci novorozeneckého screeningu cystické fibrózy v Národní referenční laboratoři pro diagnostiku mutací genu *CFTR* – Centru cystické fibrózy, Ústavu biologie a lékařské genetiky, FN Motol v Praze.
2. Posouzení vhodnosti výběru používaných metod při laboratorní diagnostice cystické fibrózy v rámci novorozeneckého screeningu, úskalí metod a jejich optimalizace.

### **3. PRAKTICKÁ ČÁST**

#### **3.1. Preanalytická fáze**

Vhodně zvolený a správně prováděný postup preanalytické fáze na každém laboratorním pracovišti velice ovlivňuje kvalitu celého vyšetření a je jedním z hlavních faktorů pro vydání správného a přesného výsledku laboratoří. V případě novorozeneckého screeningu se tento postup týká správného odběru vzorku suché kapky krve, transportu, uchování, dostatečné a jasné identifikace vzorku. Posledním krokem preanalytické fáze je izolace DNA o dostatečné koncentraci a čistotě. Odběr vzorku se od klasického žilního odběru značně liší a je tomu nutno přizpůsobit také postup. Pro novorozenecký screening se využívá kapilární krev odebíraná vpichem z paty novorozence na označený filtrační papír. Je důležité, aby bylo nasbíráno dostatečné množství krve, tedy aby filtrační papír byl prosáklý. Takto odebraný vzorek je nutné nechat důkladně zaschnout a zároveň zamezit kontaminaci ať už přenosem biologického materiálu dotykem na zónu krevní skvrny či kontaktem dvou takto odebraných vzorků. Po důkladném zaschnutí je nutné vzorek opatřit plastovým obalem a dopravit do laboratoře molekulárně genetického pracoviště.

Vzorky krevních skvrn jsou zasílány do CF Centra poštou jedenkrát týdně. Ke každému vzorku krevní skvrny je přibalen vyplněný formulář s údaji o novorozenci, který současně slouží jako žádanka k molekulárně genetickému vyšetření. Každý formulář je označen identifikačním číslem shodným s číslem na filtračním papírku s krevní skvrnou tak, aby nedošlo k jejich záměně. Pracovník zodpovědný za příjem vzorků zkontroluje shodnost identifikačních čísel a údaje z formuláře zadá do počítačové databáze. Dále jsou vzorky krevních skvrn předány pracovníkům laboratoře k extrakci DNA.

##### **3.1.1. Izolace DNA ze suché kapky krve**

Při výběru vhodné izolační metody je potřeba brát v úvahu určitá specifika, která s sebou použitý způsob odběru přináší. Skutečnost, že je izolace prováděna ze suché krevní skvrny přibližuje volené extrakční metody spíše forenzní diagnostice, než rutinnímu molekulárně genetickému vyšetření. Použité extrakční metody musí tedy umět extrahovat DNA i z minimálního množství biologického materiálu. I přes optimalizaci odběru krevních skvrn je ve výjimečných případech znemožněno opakování izolace právě

z důvodu nedostatku materiálu. Opakovaný odběr by znamenal zbytečný stres pro novorozence, proto je u izolačních technik kladen velký důraz na jejich výtěžnost a spolehlivost.

V průběhu pilotní studie a následně prováděného celoplošného screeningu mutací *CFTR* genu byly v laboratoři CF Centra postupně testovány 3 metody extrakce DNA z krevních skvrn. Jedná se o chemickou metodu izolace pomocí Chelex 100 resin (Biorad, USA) a komerční kity QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA), innuPREP Forensic Kit (Analytik Jena AG, Německo). K extrakci jsou podle použité metody používány 2-3 disky o průměru 3 mm, které jsou z kartičky s krevní skvrnou vyraženy pomocí speciálních kleští. Při vyrážení disků je nutné zamezit křížové kontaminaci mezi jednotlivými vzorky dostatečným očištěním ústí kleští vatovým tamponem a následným vyžiháním v plameni lihového kahanu po každém použití.

#### **3.1.1.1. QIAamp DNA Blood Mini Kit**

QIAamp DNA Blood Mini Kit umožňuje rychlou izolaci DNA z různých biologických materiálů, jakými jsou plná krev, sérum, krevní plasma, plodová voda, kostní dřeň, tělesné tekutiny, lymfocyty, kultivované buňky, tkáně a suché krevní skvrny. K lýze buněk je spolu s lyzačním pufrem použit roztok proteinázy K. Postup purifikace obsahuje tři kroky a provádí se pomocí QIAamp kolonek s využitím centrifugace. Po lýze buněk se DNA uvolněná z jader adsorbuje na QIAamp silikagelovou membránu kolonky v průběhu centrifugace. Proteiny a další kontaminanty, které by mohly být zodpovědné za inhibici PCR a jiných enzymatických reakcí, se na QIAamp membránu neváží. Navázaná DNA je pro odstranění kontaminantů promývána ve dvou krocích. Čistá DNA je uvolněna elučním pufrem při poslední centrifugaci (42).

#### **3.1.1.2. innuPREP Forensic Kit**

Další možnost izolace představuje souprava „innuPREP Forensic Kit“, který je primárně určen pro forenzní diagnostiku. Umožňuje rychlou izolaci genomické DNA z malého množství různých typů vzorků, jakými jsou vlasové kořínky, krevní skvrny, sliny, sperma, nehty, bukalní výtěry a další. Souprava je tedy velmi efektivním nástrojem pro izolaci DNA z omezeného množství výchozího materiálu a materiálu horší kvality.

Extrakční postup kombinuje extrémně rychlý lyzační krok s následnou efektivní vazbou genomické DNA na povrch membrány kolonky. Postup izolace se skládá z lýzy buněk lyzačním roztokem a proteinázou K, vazby DNA na povrch membrány kolonky, promytí navázané DNA a jejího finálního uvolnění elučním roztokem (43).

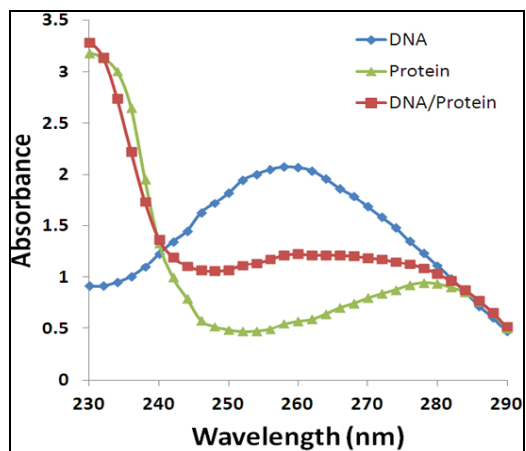
### **3.1.1.3. Chelex 100 Resin**

DNA se může z materiálu karet uvolnit působením vysoké teploty. Chelex 100 Resin je chelatující pryskyřice, která se vyznačuje vysokou afinitou k polyvalentním kovovým iontům. Přítomnost Chelexu v průběhu působení vysoké teploty zabraňuje degradaci DNA vychytáváním kovových iontů, které mohou katalyzovat rozpad DNA při vysoké teplotě (44).

### **3.1.2. Měření koncentrace a čistoty DNA**

Po rozpuštění je DNA v roztoku měřena přístrojem NanoDrop™ ND 2000 (Thermo Scientific, USA). Tento nízkoobjemový UV-Vis spektrofotometr využívá k měření celé spektrum vlnových délek 190–840 nm. Minimální objem měřeného vzorku DNA je výrobcem stanoven na 0,5  $\mu$ l a koncentrační rozmezí, ve kterém je přístroj schopen koncentraci měřit, je 2 - 15 000 ng/ $\mu$ l. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem kolem vlnové délky 260 nm, proteiny kolem 280 nm. Při měření DNA je možné stanovit také čistotu zaznamenáním poměru mezi koncentrací DNA a proteinů (A260/A280). Tento poměr by se v ideálním případě měl pohybovat v rozmezí 1,75 – 2,0. Hodnoty nižší než 1,75 svědčí o kontaminaci vzorku proteiny. Naopak poměr vyšší než 2,0 svědčí nejčastěji o kontaminaci vzorku RNA. Vyšší hodnoty u RNA vychází z jejího složení, kdy na rozdíl od DNA obsahuje uracil. Jeho absorbanční poměr je téměř 3x vyšší, než je tomu v případě thyminu u DNA. Obecně jsou přijímány jako ideální poměry 1,8 pro DNA a 2,0 pro RNA, přesný poměr však závisí na složení nukleové kyseliny. Druhým měřítkem čistoty DNA je poměr vlnových délek A230/A260, který by se měl pohybovat mezi 2,0-2,2. Hodnoty výrazně nižší znamenají přítomnost látek, které absorbují při 230 nm, tedy např. fenolu či guanidinu (45,47,50).

**Obr. č. 4:** Porovnání absorbančních profilů DNA a proteinů (48).



Legenda: červená křivka - DNA/proteiny smíšené v poměru 1:10

**Tabulka č. 1:** Poměr absorbancí pro jednotlivé nukleotidy při vlnových délkách 260 a 280 nm (47).

Nukleotid:	Poměr A260/A280:
Guanin	1.15
Adenin	4.50
Cytosin	1.51
Uracil	4.00
Thymin	1.47

## **3.2. Postup laboratorního vyšetření při NSCF**

Na základě dnes používaného protokolu je u vyselektovaných vzorků, které mají vysokou koncentraci IRT provedena MG analýza mutací *CFTR* genu. Spektrum vyšetřených mutací zahrnuje 50 nejčastějších patogenních mutací se záchytností 90,66% pro českou populaci pomocí kitu Elucigene CFEU2. V případě, že není nalezena žádná mutace, je vyšetření ukončeno s negativním závěrem. V případě nálezu jedné mutace je tento výsledek ověřován druhou nezávislou metodou po nové izolaci vzorku z téhož materiálu. V případě nálezu dvou mutací je zvolen stejný postup, jako v předchozím případě, navíc je však diagnóza CF potvrzena vyšetřením DNA z žilního odběru.

### **3.2.1. Elucigene CFEU2**

Kit ELUCIGENE CF-EU2 je určen pro simultánní in vitro detekci a identifikaci 50 nejčastějších mutací v *CFTR* genu, poly-T polymorfismu a jejich wild type sekvencí v evropské populaci. Je založen na metodě multiplex ARMS-PCR s alelově specifickou amplifikací a analýze za použití kapilární elektroforózy. Hodnocení výsledků probíhá v programu GeneMapper 4.0. Detekuje bodové mutace, inserce nebo delece v DNA. Kit je schopen rozlišit heterozygotní i homozygotní formy mutací u všech 50 vyšetřovaných mutací, uvedených v příloze č. 2, kromě mutace S549R. Metoda je pro svou vysokou citlivost velice vhodná pro vyšetření DNA o nízké koncentraci, jakými jsou vzorky izolované z krevních skvrn. Doporučené koncentrační rozmezí uváděné výrobcem kitu je 1,5 - 25 ng/μl (62).

### **Příprava PCR směsi**

U každého vzorku jsou připravovány 2 zkumavky označené číslem vzorku a písmenem A či B, z nich každá obsahuje hlavní směs pro PCR (TM), směs primerů (TA) pro zkumavku A, směs primerů (TB) pro zkumavku B a templátovou DNA, která je přidána do obou zkumavek ve stejném množství. Hlavní směs (TM) obsahuje HotStart Taq DNA Polymerázu a dNTPs v pufru. Spolu se sérií vyšetřovaných vzorků jsou připravovány i dvě kontroly – kontrola případné kontaminace (NTC), která obsahuje všechny složky reakční směsi kromě templátové DNA. Ta je v reakční směsi nahrazena 2,5 μl sterilní deionizované vody a negativní kontrola (DC), v níž je namísto vyšetřované, použita



kontrolní DNA o známém genotypu dodávaná spolu s kitem a která neobsahuje žádnou z mutací *CFTR* genu vyšetřovaných tímto kitem (62).

**Tabulka č. 2:** Složení PCR pro vyšetření Elucigene® CF-EU2

Složka PCR směsi:	Objem:	Koncentrace:
Hlavní směs pro PCR (TM)	6,5	
Směs primerů (TA či TB)	3,5	
Templátová DNA	2,5 µl	1,5 ng/µl - 25 ng/µl
Celkový objem:	12,5 µl	

Připravené zkumavky s reakční směsí jsou vloženy do bloku termocyklieru, kde proběhne amplifikace. Po skončení PCR reakce je možno vzorky skladovat při teplotě 2-8 °C po dobu 7 dnů, případně přes noc při laboratorní teplotě (62).

**Tabulka č. 3:** Podmínky PCR reakce pro vyšetření Elucigene® CF-EU2

Složka PCR směsi:	Teplota:	Čas:	Počet cyklů:
Počáteční denaturace	94 °C	20 min.	30x
Denaturace	94 °C	1 min.	
Připojení primerů	58 °C	2 min.	
Extenze	72 °C	1 min.	
Konečná extenze	72 °C	20 min.	
Chlazení	4 °C	∞	

### Analýza PCR amplikonů

PCR produkt je analyzován pomocí kapilární elektroforézy v genetickém analyzátoru ABI 3130xl. K vyšetření v analyzátoru jsou vzorky pipetovány do platíček s 96 jamkami do reakční směsi obsahující Hi-Di formamid a velikostní standard GS600 LIZ. Směs formamidu a velikostního standardu je namíchána pro příslušný počet vzorků podle tabulky č. 4 a rozpipetována do jednotlivých jamek. Do jamek je ke směsi přidán PCR produkt.

**Tabulka č. 4:** Složení směsi pro kapilární elektroforézu Elucigene® CF-EU2

Složka směsi pro kapilární elektroforézu:	Objem:
Hi-Di Formamid (Applied Biosystems, USA)	14,5 µl
Velikostní standard GS600 LIZ (Applied Biosystems, USA)	0,5 µl
PCR produkt	3 µl

Rozdělení a analýza DNA fragmentů probíhá v 36 cm dlouhé kapiláře pomocí polymeru Pop7. Kapilární modul a protokol byly nastaveny podle doporučení výrobce, optimalizace pro DNA izolovanou z krevních skvrn spočívala pouze ve zvýšení doby nástřiku (injection time) z 12 na 20 sekund.

**Obr. č. 5:** Nastavení kapilárního modulu ABI 3130xl pro vyšetření DNA z krevních skvrn

Name	Value	Range
Oven_Temperature	60	18...65 Deg. C
Poly_Fill_Vol	6500	6500...38000 steps
Current_Stability	5.0	0...2000 uAmps
PreRun_Voltage	15.0	0...15 kVolts
Pre_Run_Time	180	1...1000 sec.
Injection_Voltage	3.0	1...15 kVolts
Injection_Time	20	1...600 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	20	1...100 nk
Voltage_Step_Interval	15	1...60 sec
Data_Delay_Time	60	1...3600 sec.
Run_Voltage	15.0	0...15 kVolts
Run_Time	1200	300...14000 sec.

### Hodnocení výsledků

Jednotlivé fragmenty jsou na základě velikosti rozděleny kapilární elektroforézou a vizualizovány díky fluorescenčnímu značení. V kitu je výrobcem používán fluorescenční set G5 (Applied Biosystems, USA), který obsahuje 4 základní barvy, jimiž jsou značeny použité primery. Jedná se o 6-FAM (modrá), VIC (zelená), NED (žlutá) a PET (červená). Pátá fluorescenční barva LIZ (oranžová) je použita k označení velikostního standardu. Výsledky analýzy jsou hodnoceny v analytickém softwaru GeneMapper 4.0. Při vyhodnocování vzorku jsou současně analyzovány a porovnávány sety A i B vyšetřovaného pacienta. V setu A jsou píky automaticky označovány názvy mutací a označením pro Poly-T. V setu B je značení pro přehlednost zjednodušeno a píky jsou označeny čísly odpovídajícími příslušné mutaci (62).

V setu A se zobrazují mutované alely označené modrou fluorescenční značkou a píky pro Poly T trakt označené žlutou fluorescenční značkou (černé píky). V setu B jsou zobrazeny negativní alely označené zelenou fluorescenční značkou. Jedinou výjimku tvoří pík pro wildtype alelu F508del, který je umístěn v setu A a slouží tak spolu s STR markery jako kontrola amplifikace a správného značení v tomto setu (62).

Obr. č. 5: Ukázka negativního výsledku u kitu Elucigene CFEU2



Obr. č. 6: Ukázka heterozygotního výsledku pro mutaci F508del

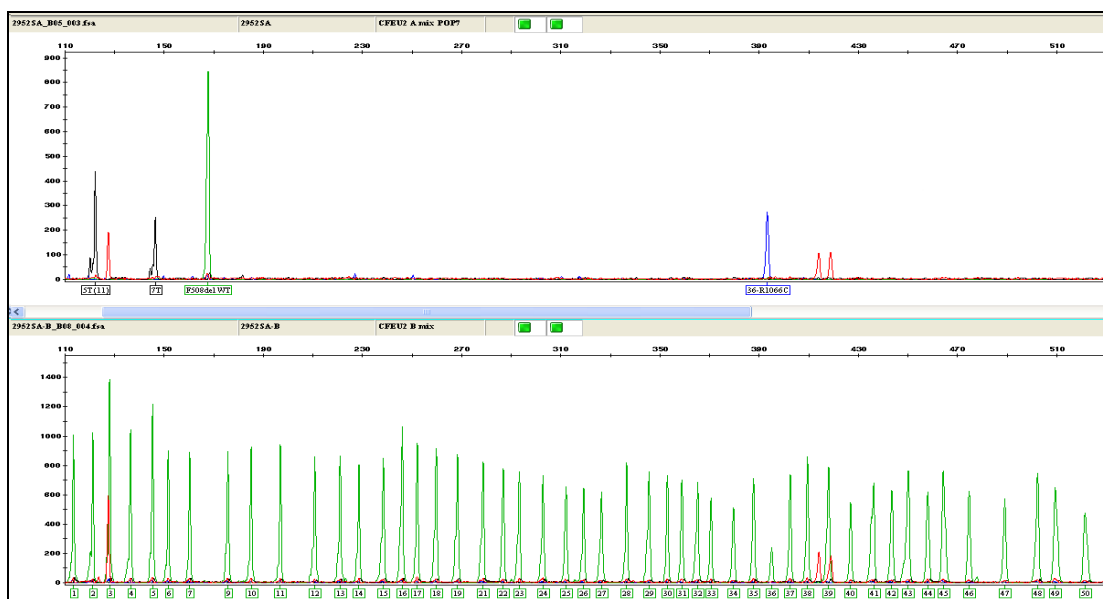


U heterozygota pro mutaci F508del v setu A pozorujeme píky pro mutovanou (modrý) i nemutovanou (zelený) alelu. Současně s tím dochází v setu B ke zdvojení píků 10 a 12. U homozygota pro mutaci F508del dochází k vymizení píku pro negativní alelu, ke zdvojení píků v setu B na rozdíl od heterozygota nedochází. Při heterozygotním nálezu jiných mutací než F508del v setu B ke zdvojení píků nedochází, pouze dojde ke snížení původní výšky píku na polovinu (62).

Obr. č. 7: Ukázka homozygotního výsledku mutace F508del



Obr. č. 8: Ukázka heterozygotního výsledku mutace R1066C



Mimo vyšetření 50 nejčastějších mutací *CFTR* genu umožňuje kit také analýzu řetězce thyminových bází v intronu 8, označovaný jako polythymidinový trakt (Poly-T). Jejich analýza v kitu Elucigene CFEU2 je usnadněna použitím odlišného fluorescenčního značení. V setu A tak Poly-T odpovídají černé píky. Jeden pík značí, že délka Poly-T i počet TG opakování za poly-T je na obou alelách shodná. V případě, že nacházíme dva

píky pro stejné poly-T např. 5T (9) a 5T (10), znamená to, že délka poly-T traktu je na obou alelách shodná, rozdílný je však počet TG opakování za poly-T. V případě nálezu dvou píků pro odlišné poly-T (5T/7T, 7T/9T, 5T/9T), znamená to různou délku poly-T na obou alelách (62).

### Kontrola záměny vzorku

Provedení reakce ve 2 zkumavkách a provedení vyšetření v sérii velmi zvyšuje riziko laboratorní záměny jednoho ze dvojice vzorků. Právě z tohoto důvodu jsou do obou setů přidány hypervariabilní STR (z angl. Short Tandem Repeats) markery, které umožňují oba sety srovnávat. Tyto markery jsou výrobcem označeny červenou fluorescenční značkou a proto se na elektroforeogramu zobrazí jako červené píky. Rozdílnost markerů v obou setech ukazuje na záměnu vzorku. Jejich slabá fluorescence značí slabou koncentraci DNA vzorků a tyto vzorky je nutné hodnotit s velkou opatrností, v případě úplného chybění či nehodnotitelnosti markerů je doporučeno analýzu opakovat. Přesné zobrazení pozic STR markerů na setiny bp je umožněno použitým analytickým softwarem a rozdíl vzdálenosti stejných píků v jednotlivých setech by neměl přesáhnout 1 bp (62).

**Obr. č. 9:** Tabulka s velikostí STR markerů pro kontrolu záměny vzorku

Dye/Sample Peak	Sample File Name	Size	Height	Area	Data Point	
■ R,4	2457SA-A_E08_010.fsa	131.32	103	811	2272	SET A
■ R,5	2457SA-A_E08_010.fsa	143.47	91	690	2389	
■ R,7	2457SA-A_E08_010.fsa	400.2	127	1304	4941	
■ R,8	2457SA-A_E08_010.fsa	433.46	100	1006	5269	
■ R,5	2457SA-B_E11_009.fsa	131.35	75	589	2271	SET B
■ R,6	2457SA-B_E11_009.fsa	143.51	67	523	2390	
■ R,9	2457SA-B_E11_009.fsa	400.39	90	949	4986	
■ R,11	2457SA-B_E11_009.fsa	433.68	68	769	5318	

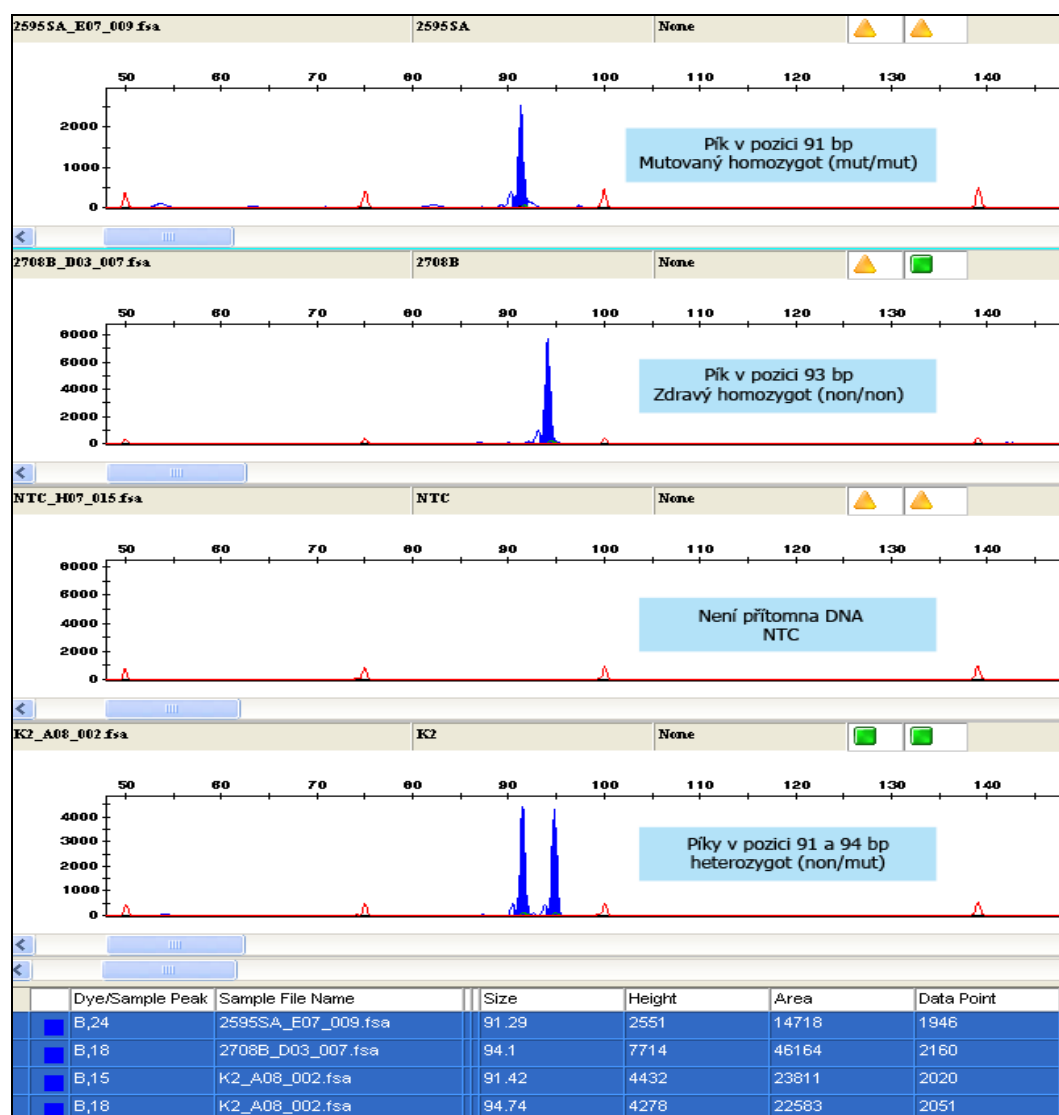
### 3.2.2. Ověření nálezu mutace F508del

Metoda k ověření mutace F508del byla vyvinuta jako „in-house“ metoda v laboratoři CF Centra. V prvním kroku provádíme amplifikaci oblasti obsahující delecii pomocí PCR reakce s fluorescenčně značeným párem primerů. Jako fluorescenční značení alel je použita barva 6-FAM (modrá), kterou je označen 5' konec forward primeru. PCR produkt je denaturován pomocí formamidu a spolu s velikostním standardem, pro jehož

označení je použita barva ROX (červená) je analyzován kapilární elektroforézou. Z nemutované alely (wildtype) se amplifikuje produkt o velikosti 94 bp, mutovaná (deletovaná) alela má velikost 91 bp.

U produktů analýzy je změřen jejich fluorescenční signál. Rychlost průchodu produktu kapilárou s polymerem odpovídá velikosti molekuly, intenzita fluorescence závisí na množství značeného produktu vzniklého amplifikací. Nespornou výhodou této metody je její ekonomická i časová nenáročnost. Při použití PyroStart Fast PCR Master Mixu (Fermentas, USA) lze získat výsledky vyšetření do 2 hodin.

**Obr. č. 10:** Výsledek kapilární elektroforézy při vyšetření mutace F508del



### 3.2.3. Ověření nálezu mutace CFTR dele 2,3

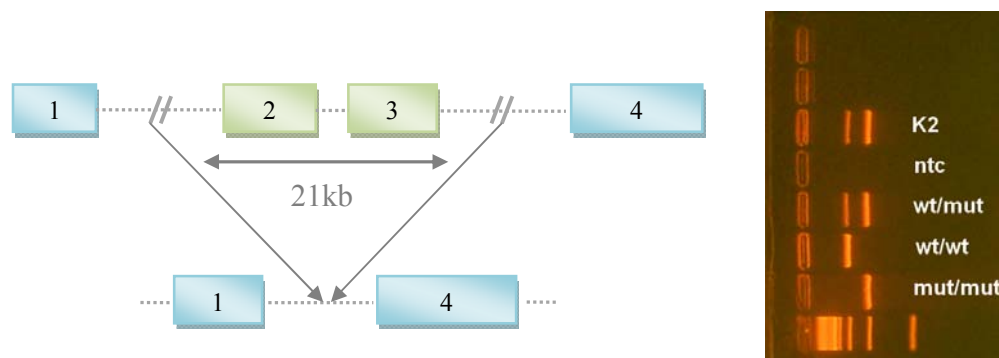
Také pro ověřování této mutace byla v CF Centru vytvořena „in-house“ metoda založená na duplexní polymerázové řetězové reakci, kdy do PCR směsi přidáváme namísto dvojice primery, primery čtyři – dva pro každý požadovaný úsek. Výsledkem je amplifikace dvou fragmentů DNA v jedné reakci. Metoda je v rámci vyšetření *CFTR* genu využívána k identifikaci delece zasahující exony 2 a 3 *CFTR* genu o velikost 21 080 bp označovaná jako mutace CFTR dele 2,3. První dvojice primeru je navržena pro cílové sekvence ohraničující místo, kde dochází k deleci a využívá faktu, že v případě nepřítomnosti delece je vzdálenost mezi oběma primery příliš velká, polymeráza není schopná amplifikovat úsek o délce 21kb a produkt tak nevzniká. V opačném případě, kdy je přítomna delece oblasti, dochází k přiblížení primerů a k amplifikaci produktu o velikosti 230 bp.

Druhý kontrolní pár primerů je namířen přímo do oblasti, kde se delece vyskytuje a produkt o velikosti 310 bp vzniká pouze v případě, že se v úseku delece nenachází, jelikož v opačném případě chybí místo pro jejich nasednutí. V případě přítomnosti mutované i nemutované alely vznikají oba produkty o velikostech 230 bp a 310 bp. Vzniklé produkty jsou separovány elektroforézou v 3% agarózovém gelu, obarveny barvivem GelRed a vizualizovány pomocí UV světla.

Tabulka č. 5: Sekvence primerů pro vyšetření mutace CFTR dele 2,3

<b>3i3</b>	5'- ATT CAC CAG ATT TCG TAG TC-3'
<b>3i5</b>	5'- CTT GGG TTA ATC TCC TTG GA-3'
<b>CF2,3R</b>	5'- GAA CCC ATC ATA GGA TAC AAT G-3'
<b>CF2,3F</b>	5'- GAG CTT CTG AAA TTA ATT GAC CAC-3'

Obr. č. 11 a 12: Schématické znázornění delece o velikosti 21kb a výsledek PCR reakce



### 3.2.4. Ověření mutací genu *CFTR* metodou RFLP

V CF Centru je možno ověřit 26 mutací *CFTR* genu pomocí 15 různých restričních enzymů metodou RFLP. Základem metody je výše popsaná polymerázová řetězová reakce (PCR) s párem specifických primerů. Velikost výsledného produktu amplifikace je zkontrolována pomocí elektroforézy v 3% agarózovém gelu po dobu 30 minut a PCR produkt je následně štěpen specifickou restriční endonukleázou v rozpoznávacích sekvencích. Vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí 3% agarózové elektroforézy po dobu 60 minut.

Při začlenění vzorků novorozeneckého screeningu do rutinního provozu, kde jsou vyšetřovány paralelně s DNA vzorky o vyšší koncentraci, bylo nutné optimalizovat podmínky PCR reakce. Původně používaných několik typů reakčních PCR mixů bylo sjednoceno v jeden – 2X PCR Master Mix (Fermentas, USA), který dosahoval nejlepších výsledků při reakci s DNA o nízké koncentraci. Všechny 26 reakcí se tak liší pouze párem použitých primerů, jejichž sekvence odpovídá místu, ve kterém se mutace vyskytuje a následně anelační teplotou. PCR program v termocykleru byl rovněž sjednocen a počet cyklů reakce byl optimalizován na 33x, přičemž snížení těchto cyklů u některých mutací vedlo k nedostatečné amplifikaci, naopak jejich zvýšení ke vzniku nespecifických produktů reakce.

**Tabulka č. 6:** Složení PCR směsi k reakci pro vyšetření RFLP

Složka PCR směsi:	Objem:	Koncentrace:
2x PCR Master Mix (Fermentas, USA)	12,5 µl	10-20 pmol/µl 2-100 ng/µl
Water, nuclease-free (Fermentas, USA)	8,5 µl	
Primer F + Primer R	1 µl + 1 µl	
Templátová DNA	2 µl	
Celkový objem:	25 µl	

**Tabulka č. 7:** PCR program pro vyšetření RFLP

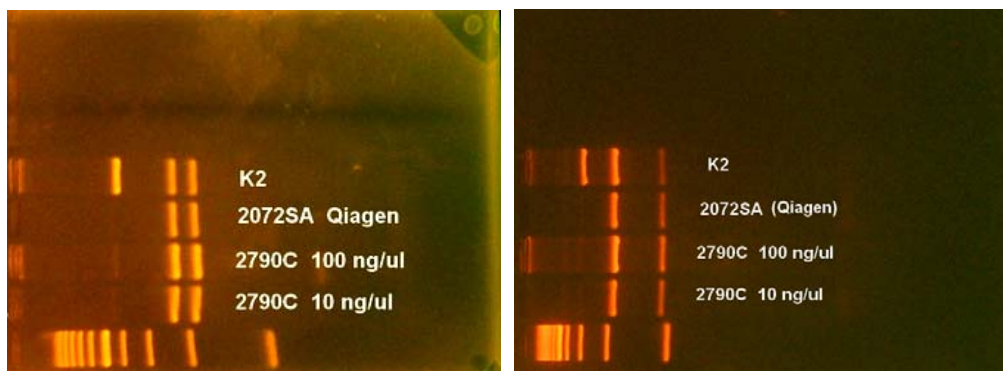
Fáze PCR cyklu:	Teplota:	Čas:	Počet cyklů:
Počáteční denaturace	92 °C	5 min.	1x
Denaturace	92 °C	1 min.	33x
Připojení primerů	TA °C	1 min.	
Extenze	72 °C	1 min.	
Konečná extenze	72 °C	10 min.	1x
Chlazení	4 °C	∞	



S každou sérií vzorků je vyšetřována také interní kontrola (K2) o předem známém genotypu obsahující stanovenou mutaci v heterozygotní formě (WT/MUT), která byla v minulosti vyšetřena dvěma nezávislými metodami a je tudíž kontrolou správnosti amplifikace i podmínek štěpení použitého enzymu. Při restrikční analýze je velice nutné zachovat požadovanou teplotu a dobu štěpení uváděnou výrobcem pro daný enzym, jelikož použití jiné než optimální teploty může vést k jeho inaktivaci a tím nedostatečné restrikci.

Zatímco doba restrikce s použitím běžného enzymu se pohybuje mezi 1-16 hodinami, v posledních letech vyvinula společnost Fermentas skupinu enzymů označovaných jako FastDigest, jejichž restrikční doba byla zkrácena na 5-15 minut. Tato skupina enzymů byla rychle zavedena i v diagnostice NSCF a některé z nich jsou dnes používány v rutinní diagnostice mutací *CFTR* genu. Doba celé restrikční analýzy je tak možno zkrátit přibližně na 5 hodin.

**Obr. č. 13 a 14:** Výsledky restrikční analýzy mutací I336K (vlevo) a W1298X (vpravo)



Legenda: Vzorek 2072SA byl izolován z krevní skvrny metodou Qiagen a použit v koncentraci 10 ng/ $\mu$ l. Vzorek 2790C byl izolován z 6 ml venózní krve automatickou izolační technikou FlexGen (Autogen, USA) a byl použit v koncentracích 10 a 100 ng/ $\mu$ l.

### 3.2.5. Detekce velkých přestaveb *CFTR* genu metodou MLPA

Standardní techniky používané k detekci mutací založené pouze na PCR amplifikaci nejsou schopny detekovat velké DNA přestavby. Proto se k detekci takových přestaveb, zahrnující delece či duplikace jednoho nebo více exonů *CFTR* genu, používá speciální metoda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). K metodě je používán komerčně dostupný kit MLPA SALSA Kit P091 *CFTR* (MRC-Holland, Holandsko). Jedná

se o velmi časově i manuálně náročnou metodu, nejdelší krok trvající 16-20 hodin je prováděn přes noc. Celá metoda se skládá z 5-ti po sobě následujících kroků, při nichž provádíme denaturaci DNA, hybridizaci, ligaci MLPA prób, PCR reakci a analýzu vzniklých produktů.

### **Denaturace vzorků**

Denaturaci vzorku DNA provádíme v termocykleru při 98 °C po dobu 5-10 minut. Při této teplotě dojde k oddělení obou vláken, u nichž může následně dojít k hybridizaci prób.

### **Hybridizace MLPA prób**

V tomto kroku přidáváme k denaturované DNA 3 µl hybridizační směsi (SALSA Probe-Mix + SALSA MLPA Buffer v poměru 1:1). Po přidání směsi ke vzorku směs lehce promísíme pipetováním a inkubujeme 1 minutu při teplotě 95 °C, poté snížíme teplotu na 60 °C a při této teplotě inkubujeme 16-20 hodin.

### **Ligace MLPA prób**

Namícháme si ligační směs v objemu 32 µl pro každý vzorek (25 µl sterilní vody, 3 µl Ligase buffer A, 3µl Ligace buffer B a 1µl Ligase-65). Teplotu v termocykleru necháme snížit z 60 °C na 54 °C a při této teplotě ke vzorkům přidáme namíchanou ligační směs. Vzorky po přidání směsi dále inkubujeme při stejné teplotě 15 minut, poté teplotu zvýšíme na 98 °C na dobu 5 minut. Po uplynutí této doby ukončíme ligaci snížením teploty na 20 °C

### **PCR reakce**

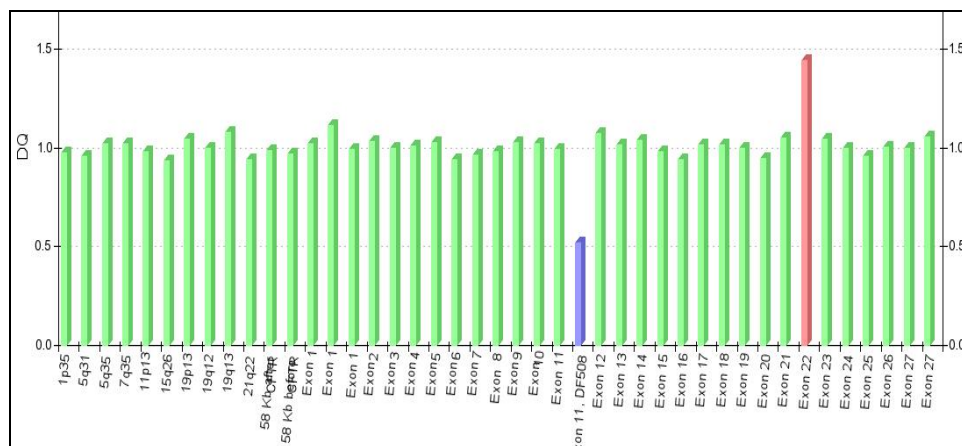
Těsně před ukončením ligačního kroku si namícháme PCR reakční směs v objemu 10 µl pro každý vzorek (7,5 µl sterilní vody, 2,0 µl SALSA PCR primers a 0,5 µl SALSA Polymerase). Při laboratorní teplotě napipetujeme 10 µl směsi do každé zkumavky, jemně promísíme pipetováním a spustíme PCR program: [95 °C/30 sek, 60 °C/30 sek, 72 °C/1 min]35x, 72 °C /20 min, 15 °C/∞.

### **Analýza produktů reakce**

Analýza produktů je prováděna kapilární elektroforézou na přístroji ABI 3130xl. Výsledkem jsou píky, které jsou podrobeny analýze v on-line programu E-MLPA

(<https://emlpa.lf2.cuni.cz/>), který byl k tomuto účelu vyvinut přímo v CF Centru a ve kterém je vyšetřovaná DNA porovnávána s několika kontrolními vzorky.

**Obr. č. 15:** Výsledek analýzy MLPA v programu E-MLPA



Legenda: Výsledek zobrazuje mutaci F508del (modrý pik) spolu s duplikací exonu 22 (červený pik)

### 3.2.6. Sekvenační analýza *CFTR* genu

K sekvenační analýze genu je přistupováno v případě, že při prvotním vyšetření dojde k nálezmu mutace, kterou není možno ověřit jinou metodou. V takovém případě je sekvenován cíleně pouze exon, ve kterém se tato mutace nachází. Druhým případem použití sekvenační analýzy v novorozeneckém screeningu je výskyt klinických příznaků odpovídajících CF u novorozence, u něhož byla běžným vyšetřením zjištěna jedna či žádná mutace. V takovémto případě je nutné osekvenovat celý gen.

#### PCR reakce

PCR reakce s párem specifických primerů je prováděna ve 2 provedeních podle vyšetřovaného exonu *CFTR* genu. Pro exony 1, 2, 3, 4, 5, 6a, 8, 10, 11, 12, 14a, 15, 16, 17a, 18, 19, 20, 21, 22, 23 a 24 se používá PCR mix firmy Roche (tabulka č. 8) a pro exony 6b, 7, 9, 13.1, 13.2, 14b a, 17b mix firmy Applied Biosystems (tabulka č. 9). V obou případech je samotná reakce provedena v klasickém termocykleru s anelační teplotou odpovídající použitému páru primerů a získaný produkt amplifikace je zkontrolován na 2% agarózovém gelu.

**Tabulka č. 8:** PCR reakční směs pro sekvenační analýzu – typ 1

Složka PCR směsi:	Objem:	Koncentrace:
LC 480 Master Mixu (Roche, Švýcarsko)	5 µl	2X
MgCl <sub>2</sub> (Roche, Švýcarsko)	1 µl	25mM
dH <sub>2</sub> O	1 µl	
Primer F + Primer R	0,5 µl + 0,5 µl	10 pmol/µl
Templátová DNA	2 µl	15 ng/µl
Celkový objem:	10 µl	

**Tabulka č. 9:** PCR reakční směs pro sekvenační analýzu – typ 2

Složka PCR směsi:	Objem:	Koncentrace:
dH <sub>2</sub> O	14,0 µl	
PCR pufr II (Applied Biosystems, USA)	2,5 µl	2X
MgCl <sub>2</sub> ,Solution (Applied Biosystems, USA)	2,0 µl	25mM
Primer F + Primer R	1,0 µl + 1,0 µl	10 pmol/µl
dNTP's (Applied Biosystems, USA)	1,25 µl	
Ampli Taq Gold Polymerasa (Applied Biosystems, USA)	0,25 µl	
Templátová DNA	3,0 µl	15 ng/µl
Celkový objem:	25 µl	

### **Purifikace PCR produktu**

V tomto kroku, který následuje bezprostředně po první PCR reakci je nutno odstranit zbylé primery a nukleotidy, které nebyly inkorporovány. Tyto zbytky nutné odstranit proto, aby nedocházelo k jejich interakci při druhé PCR reakci. Purifikace je prováděna pomocí komerční soupravy QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, USA). Ke každému vzorku je přidán pětinasobný objem PB pufru, směs je promísena, přenesena na 2ml Qia kolonku a přes kolonku přefiltrována centrifugací při 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Následně je do kolonky přidáno 0,75 ml PE pufru a centrifugace je opakována. Kolonka je přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky a je na ní přidáno 40 µl EB pufru. Po 1 minutě stání při laboratorní teplotě je provedena centrifugace 1 minutu při 13 000 rpm. Druhou alternativou purifikace PCR produktů je příprava směsi Shrimp alkalické fosfatázy a Exonukleázy I (3,0 µl + 0,5 µl pro jeden vzorek), kterou přidáme k přečištěnému vzorku. Následně je vzorek vložen do termocyklu, kde je inkubován při 37 °C po dobu 60 min a poté při 80 °C po dobu 20 min.

## Sekvenační PCR

PCR je prováděno s jedním sekvenčně specifickým primerem, je proto nutné pro každý vzorek připravit 2 zkumavky o objemu 0,2 ml. Každá zkumavka obsahuje 2 μl Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, 4 μl přečištěného PCR produktu a 1 μl sekvenčně specifického primeru (reverse či forward). Takto připravená směs je vložena do termocykleru a je provedena PCR reakce.

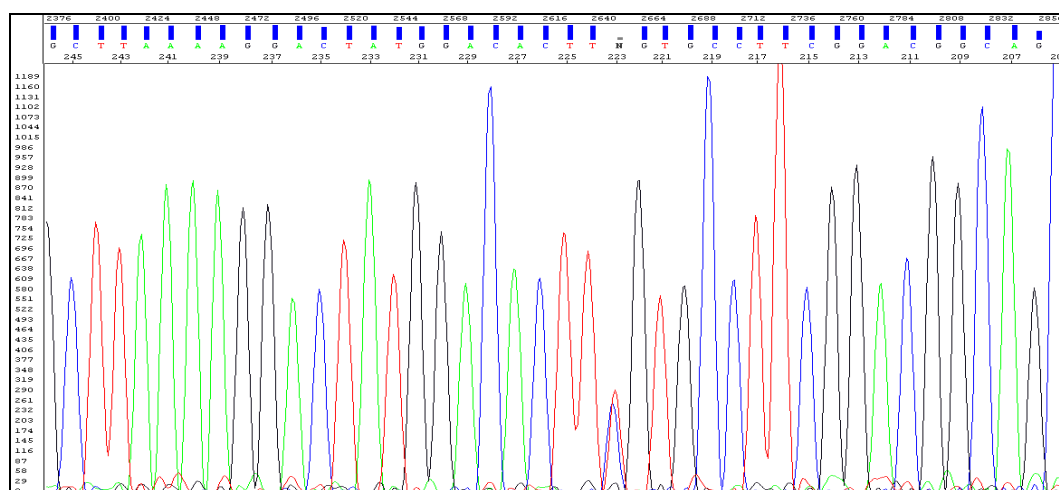
## Etanolvá purifikace

K 7 μl sekvenačního PCR se napipetuje 40 μl roztoku acetátu, směs je promísena na třepače a přenesena do 1,5 ml zkumavky. Zkumavka je centrifugována 20 minut při 13000 rpm, supernatant je důsledně odsát vývěvou a do každé zkumavky je přidáno 300 μl 70% etanolu. Následně je směs důkladně promísena a centrifugována 10 minut při 13 000 rpm. Supernatant je opět odsát vodní vývěvou. Pelet je rozpuštěn ve 25 μl Hi-Di formamidu, následuje centrifugace a analýza v genetickém analyzátoru.

## Analýza produktu

Analýza je prováděna pomocí kapilární elektroforézy ABI 3130xl a data jsou vyhodnocena v programu SeqScape 3.0. Výsledkem analýzy jsou barevně odlišené píky, u nichž každá barva odpovídá jednomu nukleotidu.

**Obr. č. 16:** Výsledek sekvenační analýzy při ověření mutace R1066C



### 3.3. Ostatní použité vyšetřovací metody

Laboratoř CF Centra je současně Národní referenční laboratoří pro diagnostiku cystické fibrózy, z tohoto důvodu byla v jejich prostorách vyzkoušena řada metod, během jejichž testování a validaci byly použity i vzorky novorozeneckého screeningu. Některé z metod byly z rutinní diagnostiky vyloučeny, jiné našly uplatnění jako záložní metody, které mohou v případě nutnosti zastoupit hlavní vyšetřovací metodu, tedy Elucigene CFEU2. Všechny použité metody jsou shrnuty v následující kapitole.

#### 3.3.1. Devyser CFTR Core

Kit Devyser CFTR Core je založen na principu multiplexní alelicky specifické PCR amplifikaci a detekci nemutovaných a mutovaných alel v *CFTR* genu. Výsledkem alelicky specifické PCR amplifikace jsou fluorescenčně značené fragmenty, které jsou následně analyzovány kapilární elektroforézou na genetickém analyzátoru a identifikovány podle své délky a použitého fluorescenčního značení. Metoda umožňuje vyšetření 36 mutací *CFTR* genu a 3 variant poly-T (54). Směs je pro všechny vzorky připravována do zásoby podle následujícího postupu:

#### Příprava reakčního mixu

1. Stočit krátce zkumavky Core 1, Core 2 a PCR Aktivátoru
2. Přidat 500  $\mu$ l mixu Core 1 či Core 2 do zkumavky s PCR Aktivátorem.
3. Promísit reakční master mix na třepačce a lehce centrifugovat.
4. Napipetovat 10  $\mu$ l smíchaného master mixu do 0,2  $\mu$ l PCR zkumavek.
5. Uzavřít zkumavky a krátce je stočit.

Takto namíchaný reakční master mix je stabilní při +2 až +8 °C po dobu 7 dní, případně po dobu 60 dní při teplotě nižší než -18 °C.

#### PCR reakce

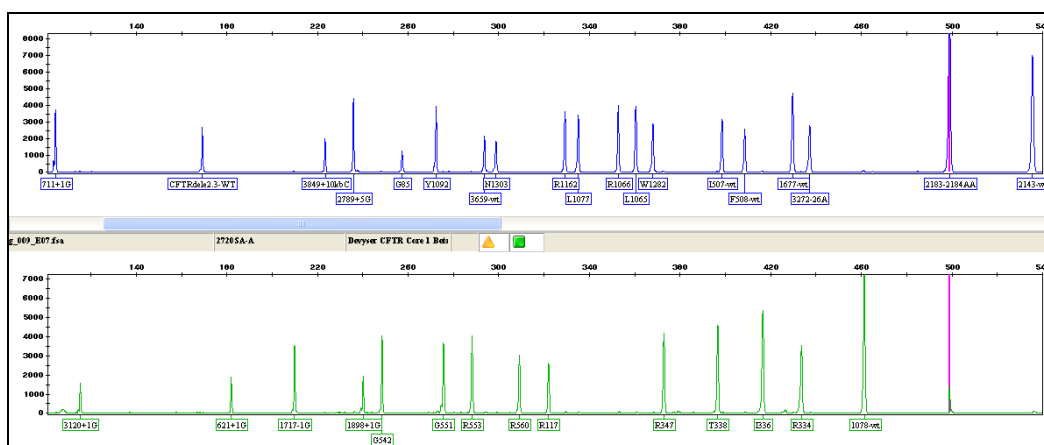
Při vyšetřování vzorků vyjmeme pro každý vzorek připravené mixy Core 1 a Core 2 z mrazicího boxu. Směs necháme rozmraznout, do každé zkumavky přidáme 2,5  $\mu$ l DNA o koncentraci 1-10 ng/ $\mu$ l, lehce stočíme a po vložení do termocykleru spustíme PCR

program: 95 °C 15 min [94 °C/ 30 sec., 62 °C/ 60 sec, 72 °C/ 60 sec.] 31x, 72 °C/ 15 min, 4 °C/∞

### Analýza produktu

Produkt je analyzován pomocí kapilární elektroforézy ABI 3130xl po smísení 1,5 µl PCR amplifikátu s velikostním standardem a Hi-Di formamidem. Jako standard je zde použit 560 SIZER ORANGE (Applied Biosystems, USA). Po elektroforéze a laserové detekci jsou získaná data analyzována v programu GeneMapper 4.0.

*Obr. č. 17:* Výsledek vyšetření kitem Devyser CFTR Core 1 Bets v setu 1 se zobrazením negativních alel



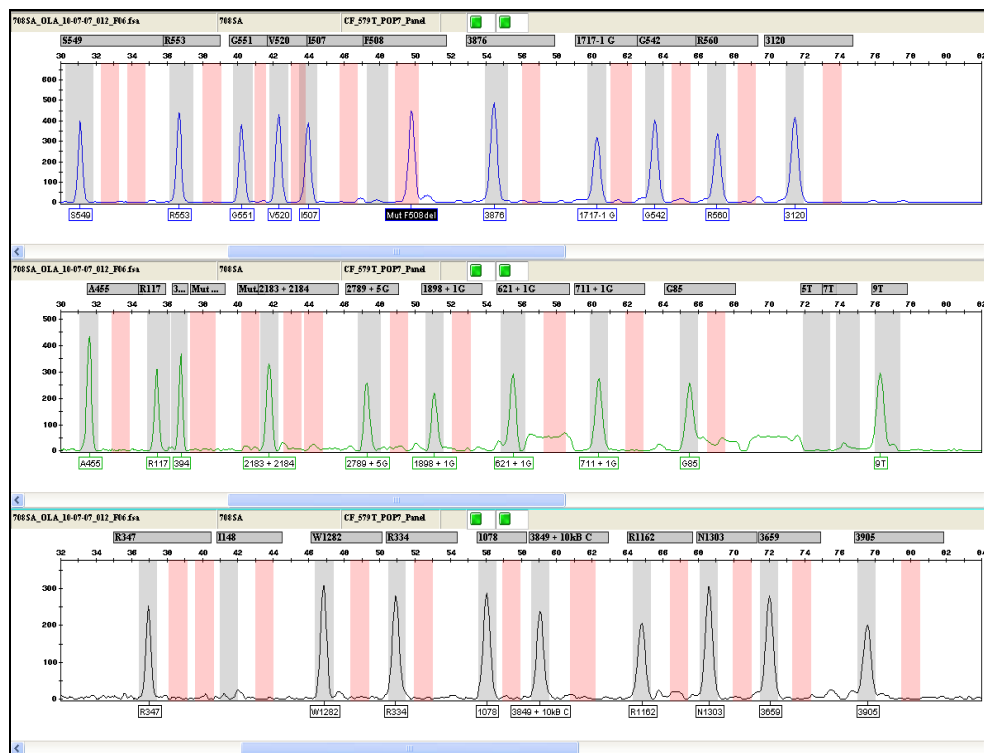
### 3.3.2. Cystic Fibrosis Genotyping Assay - OLA

Principem metody jsou dvě reakce - multiplex PCR amplifikace a multiplex OLA (z angl. Oligonucleotide Ligation Assay). Obě reakce jsou prováděny pro každý vzorek postupně v jedné zkumavce. Při multiplexní polymerázové řetězové reakci dochází k amplifikaci vzorku genomické DNA se 16 páry primerů a DNA polymerázou. Primery jsou navrženy tak, že jejich sekvence na 3' konci odpovídá normální či mutované sekvenci vyšetřované DNA. V druhé fázi se provádí ligace oligonukleotidů na CFTR amplikonech. Alelově specifické sondy hybridizují k příslušným normálním, mutantním a variantním alelám a jsou po úspěšném nasednutí ligovány enzymem ligázou s fluorescenčně značenými společnými sondami. Jednotlivé sondy se liší v délce díky přidání inertních modifikátorů mobility (55).

## Analýza PCR produktů

Po ligaci jsou označené DNA fragmenty separovány kapilární elektroforézou na genetickém analyzátoru ABI 3130xl. Při detekci jsou jednotlivé fragmenty rozlišovány na základě své délky a použitého fluorescenčního značení, jejich následná identifikace a genotypování je prováděno pomocí softwaru GeneMapper 4.0. Jako fluorescenční barvy jsou použity HEX (zelená), FAM (modrá) a TAMRA (černá). Při vyhodnocování metody je výsledek rozdělen do 3 podoken, z nichž každé odpovídá jedné fluorescenční barvě. Rozlišení mutovaných a nemutovaných alel je pak provedeno softwarově podle velikosti výsledného produktu.

Obr. č. 18: Výsledek vyšetření pacienta s homozygotní formou mutace F508del



Legenda: Píky odpovídající wildtype alele jsou umístěny v šedých sloupcích a píky odpovídající mutované alele ve sloupcích červených. V tomto případě je homozygotní forma mutace F508del znázorněna chybějícím píkem pro wildtype alelu.

### 3.3.3. Stripy INNO - LiPA

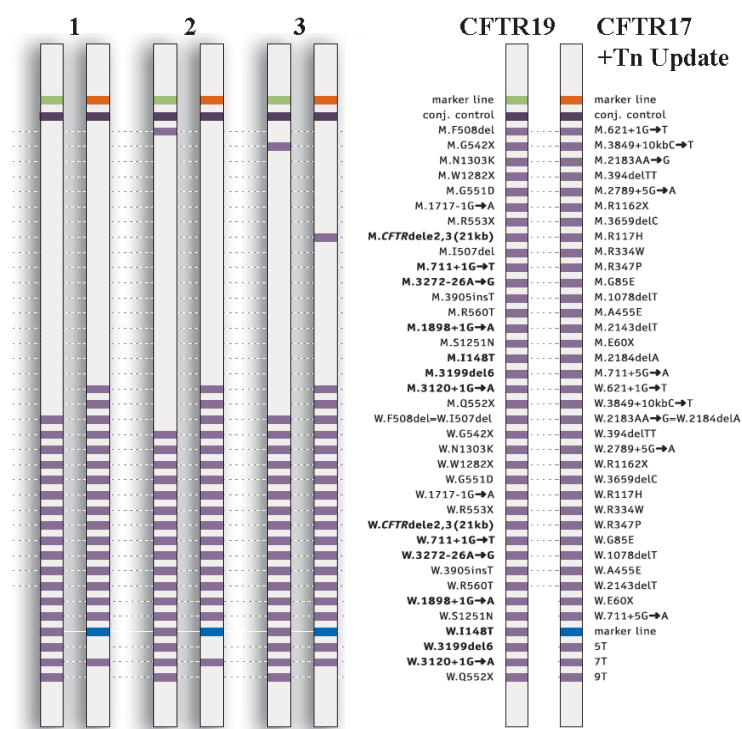
Firma Innogenetics nabízí pro diagnostiku mutací *CFTR* genu dvojici stripů na principu reverzní hybridizace. První strip, označený „CFTR17+Tn Update strip“, obsahuje



imobilizované próby pro 17 mutací *CFTR* genu a 3 pro vyšetření Poly-T traktu. Druhý strip označený „CFTR19“ obsahuje próby pro dalších 19 mutací *CFTR* genu. PCR reakce je prováděna smísením DNA vyšetřovaného vzorku, amplifikačního pufru a roztoku primerů pro jeden či druhý typ stripu. Během PCR reakce dochází k biotinylování vzorku DNA (56,57).

Po ukončení amplifikace je dvouřetězcová DNA chemicky denaturována a jednořetězcové amplikony jsou hybridizovány se specifickými oligonukleotidovými próbami na stripech. Po hybridizaci následuje promytí, které odstraní neodpovídající amplifikovaný materiál. Po promytí je ke stripům přidána streptavidinem konjugovaná alkalická fosfatáza. Ta se naváže na všechny biotinylované amplikony hybridizované s próbami. K vizualizaci reakce je použit chromogenní substrát, který vytvoří v místě hybridizace na stripu hnědofialovou precipitační linii, která je po zastavení barevné reakce a promytí ve vodě vyhodnocena podle přiložené šablony (56,57).

**Obr. č. 19:** Šablona pro hodnocení stripů INNO-Lipa a ukázka výsledků (56)



Legenda:

Strip č. 1 - genotyp WT/WT, poly T 7T/7T

Strip č. 2 - genotyp F508del/F508del, poly T 7T/7T

Strip č. 3 - genotyp G542X/R117H, poly T 5T/7T

### 3.3.4. CF StripAssay ViennaLab

Tato metoda, založená rovněž na reverzní hybridizaci, dokáže identifikovat 34 mutací *CFTR* genu a 3 varianty Poly-T. Pro každý vzorek jsou připravovány 2 reakční mixy (A a B). Před zahájením přípravy PCR reakčního mixu je nutno naředit Taq DNA polymerázu pomocí Taq Dilution Buffer na pracovní koncentraci (0,2U/μl). Do reakce je poté přidáváno 5 μl takto naředěné polymerázy, což odpovídá 1U, dále 25-200 ng DNA a 15 μl směsi označené Amplification Mix A či B. Následuje amplifikace, po níž je provedena chemická denaturace a oba amplikony jsou následně smíseny s hybridizačním pufrem, do něhož je vložen odpovídající strip. K promývání a hybridizaci je u této metody používán robotický přístroj Bee20 (Bee Robotics Ltd., USA), který umožňuje vyšetření 20 stripů v jedné sérii (58).

*Obr. č. 20:* Robotický přístroj Bee20

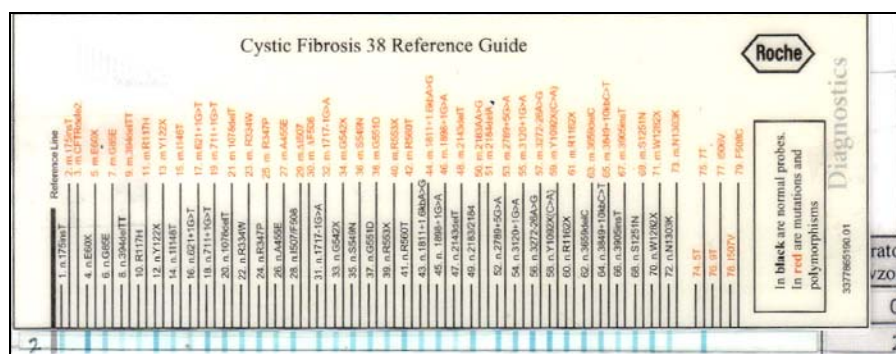


### 3.3.5. Stripy AMPLICOR Cystic Fibrosis Roche

Pro sekvenčně specifickou PCR amplifikaci je u této metody použito biotinem značených primerů. Oligonukleotidové próby, specifické pro vyšetřované sekvence *CFTR* genu, jsou vázané na nylonovou membránu a jsou určeny pro specifické vychytávání amplikonů. Jako detekční systém je zde použit konjugát streptavidinu s křenovou peroxidádou, ten se váže na produkty navázané na membránu stripu. K barevné vizualizaci

je použita směs peroxidu vodíku a tetramethylbenzidinu. Podle použitého reakčního mixtu a odpovídajícího stripu je metoda schopna vyšetřit 16 či 38 mutací *CFTR* genu a 3 varianty poly-T.

**Obr. č. 21:** Hodnocení výsledku vyšetření 38 mutací pomocí kitu AMPLICOR® CF



Legenda: Na hodnotící šabloně jsou černě znázorněny pozice proužků pro negativní alely, červeně pro mutované alely.

### 3.4. Postanalytická fáze

Postanalytická fáze je nedílnou součástí celého procesu, která umožňuje případné opakování analýzy či testování nových vyšetřovacích metod. Vzorky krevních skvrn jsou po analýze skladovány na suchém místě při laboratorní teplotě. Vyizolované vzorky DNA jsou skladovány v mrazicím boxu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , při dlouhodobějším skladování je plánováno uskladnění vzorků při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Porovnání metod pro izolaci DNA z krevních skvrn

V následujícím srovnání byly testovány všechny 3 extrakční metody používané v CF Centru v rámci novorozeneckého screeningu. K tomuto účelu bylo zvoleno 100 krevních skvrn, u kterých byly provedeny 3 nezávislé izolace výše popsanými metodami. DNA byla v závěru izolace rozpuštěna v příslušném médiu a byla změřena její koncentrace. Měření čistoty DNA izolované z krevních skvrn je značně problematické. Jak ukazuje tabulka č. 10, je stanovení poměru A260/A280 u vzorků s koncentrací nižší než 10 ng/μl na přístroji Nanodrop 2000 zatíženo značnou chybou měření. Z tohoto důvodu byla k porovnání výsledků izolace měřena pouze koncentrace finálního roztoku DNA a následně byly vzorky porovnány na základě úspěšnosti PCR amplifikace pomocí kapilární elektroforézy.

**Tabulka č. 10:** Ověření chyby přístroje NanoDrop 2000 při měření nízkých koncentrací DNA

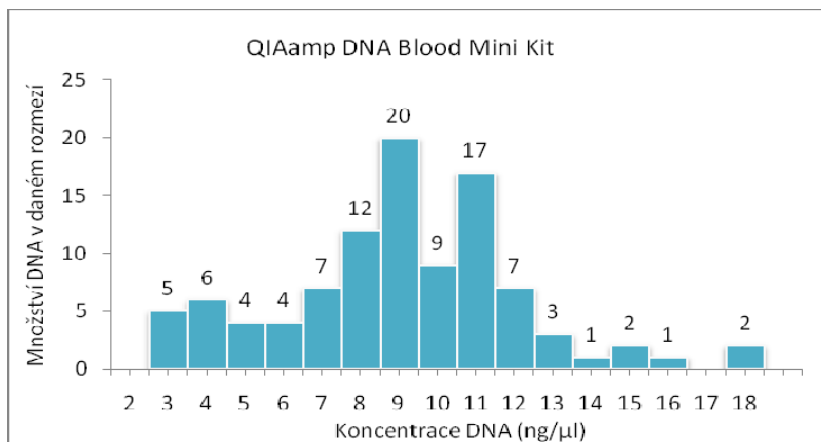
DNA	Vzorek před naředěním:		Vzorek po naředění:		Ředěno:	Chyba měření [%]
	Koncentrace [ng/μl]	Poměr A260/A280	Koncentrace [ng/μl]	Poměr A260/A280		
1.	112,7	1,84	9,6	1,85	pufr	0,54
2.	118,2	1,90	9,5	2,02	voda	6,32
3.	111,5	1,84	8,4	2,08	pufr	13,04
4.	93,9	1,83	8,4	2,00	voda	9,29
5.	109,1	1,85	8,2	2,10	pufr	13,51
6.	111,8	1,83	8,0	2,04	voda	11,48
7.	117,3	1,85	7,7	2,08	pufr	12,43
8.	101,3	1,84	7,4	2,10	voda	14,13
9.	96,8	1,87	6,3	2,15	pufr	14,97
10.	92,6	1,85	5,6	2,29	voda	23,78

Legenda: K vyloučení výkyvů způsobených změnou pH byla k ředění použita 2 média – nuclease free water (Fermentas, USA) a AE Buffer (Qiagen, USA)

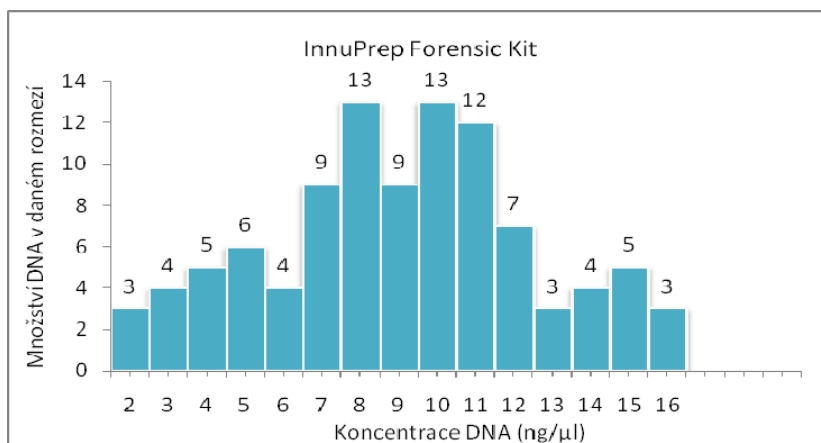
**Tabulka č. 11:** Porovnání izolačních kitů

Název izolační metody:	QIAamp DNA Blood Mini Kit	innuPREP Forensic Kit	Chelex 100 Resin
Počet izolovaných vzorků:	100	100	100
Nejnižší naměřená koncentrace (ng/μl):	2,4	1,1	18,5
Nejvyšší naměřená koncentrace (ng/μl):	17,6	16,0	78,1
Medián koncentrace DNA (ng/μl):	<b>8,65</b>	<b>8,60</b>	<b>33,30</b>
Rozpuštěno v objemu (μl):	80	60	80

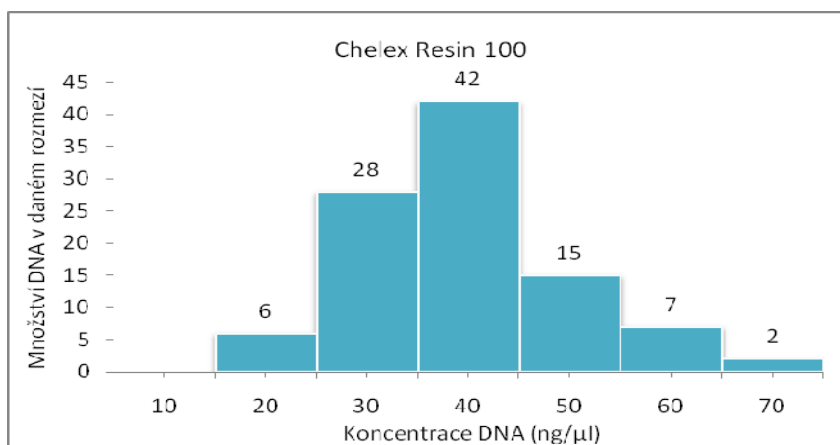
**Obr. č. 22:** Histogram četnosti vzorků izolovaných kitem QIAamp podle výsledné koncentrace DNA



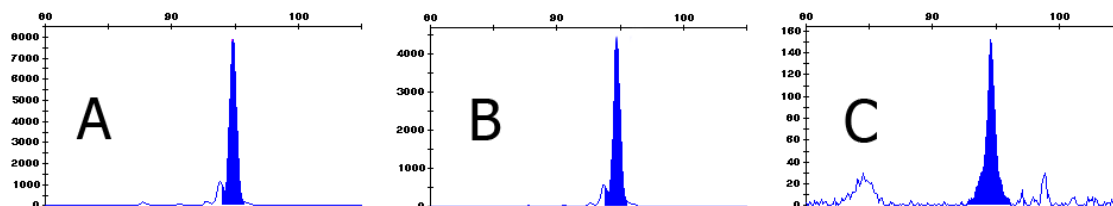
**Obr. č. 23:** Histogram četnosti vzorků izolovaných kitem innuPrep podle výsledné koncentrace



**Obr. č. 24:** Histogram četnosti vzorků izolovaných metodou Chelex 100 resin podle výsledné koncentrace



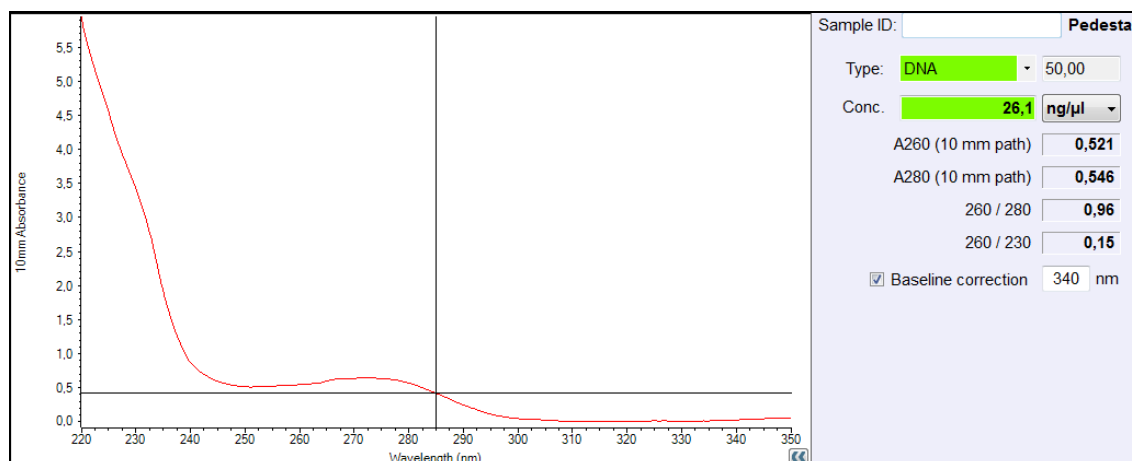
**Obr. č. 25:** Porovnání izolačních metod pomocí PCR reakce a kapilární elektroforézy



Legenda: A – DNA izolovaná kitem QIAamp (konc. 12 ng/μl); B – DNA izolovaná kitem innuPrep (konc 14,5 ng/μl); C - DNA izolovaná metodou Chelex 100 resin (konc. 26,1 ng/μl)

DNA vzorky izolované metodou Chelex 100 resin dosahovaly nejvyšších výtěžností, ovšem při amplifikaci DNA bylo dosaženo nejhorších výsledků (viz obr. č. 25), proto byla zkontrolována absorbanční křivka těchto vzorků přístrojem NanoDrop 2000 (viz obr. č. 26).

**Obr. č. 26:** Absorbanční profil vzorku izolovaného metodou Chelex 100 resin



Legenda: Absorbanční profil měření na přístroji NanoDrop 2000 se zvýšenou absorbancí při 280 nm odpovídající proteinům. Poměr absorbancí A260/A280: 0,96.

## 4.2. Porovnání multiplexních metod vyšetření

V průběhu více než 3 let trvání novorozeneckého screeningu bylo v laboratoři CF Centra testováno a používáno 6 multiplexních komerčně dostupných metod s cílem zachytit co největší procento mutací *CFTR* genu vyskytující se v naší populaci při jednom vyšetření. Na základě nejnovějších dat získaných z 20 let trvající studie (46, příloha č. 1), bylo provedeno porovnání použitých kitů pro detekci nejčastějších mutací *CFTR* genu v České populaci. Výpočet záchytnosti byl proveden součtem procentuálního zastoupení v naší populaci u těch mutací, které dokáže kit detekovat.

Nejlepšího výsledku dosáhl kit *CFTR Core* od firmy *Devyser*. Kit *Elucigene CFEU2*, který je používán jako hlavní vyšetřovací metoda při NSCF, se umístil na druhém místě. Naopak nejhorší výsledek byl zaznamenán u kitu *Cystic Fibrosis Genotyping Assay – OLA* od firmy *Abbot* (pouze 82,60%). Kompletní výsledky porovnání jsou uvedeny v tabulce č. 12.

**Tabulka č. 12:** Porovnání účinnosti komerčních diagnostických kitů k vyšetření mutací *CFTR* genu:

Název metody:	Počet vyšetřovaných mutací:	Záchytnost vyšetřených mutací v ČR (%):
<i>CFTR Core</i> ( <i>Devyser</i> )	36 + poly-T	90,84
<i>Elucigene CFEU2</i> ( <i>Hologic Gen-Probe</i> )	50 + poly-T	90,66
<i>CF StripAssay</i> ( <i>ViennaLab</i> )	34 + poly T	89,93
<i>INNO-LiPA CFTR 17+19</i> ( <i>Innogenetics</i> )	36 + poly T	89,80
<i>Stripy AMPLICOR Cystic Fibrosis 38</i> ( <i>Roche</i> )	38 + poly-T	89,43
<i>Cystic Fibrosis Genotyping Assay - OLA</i> ( <i>Abbott</i> )	36 + poly T	82,60

Pozn: Při výpočtu nebyla brána v úvahu potenciálně patogenní mutace R117H, která je asociována s mírnou formou CF.

## 5. STATISTICKÉ HODNOCENÍ

V celé České republice bylo do 31. 12. 2012 v rámci novorozeneckého screeningu vyšetřeno **368 096** novorozenců, z tohoto počtu byla **57** novorozencům diagnostikována cystická fibróza. To odpovídá **0,015%** z celkového počtu a výsledná prevalence onemocnění je tak **1: 6 458**. Z tohoto souboru bylo **5** pacientů chybně shledáno negativními. Falešná negativita byla ve **4** případech způsobena hodnotou IRT pod stanoveným cut-off při iniciačním testu a v jednom případě se jednalo o přítomnost vzácné mutace genu *CFTR*, která nebyla použitými molekulárně genetickými postupy odhalena. Současně byla diagnóza CF zjištěna u **2** starších sourozenců vyšetřovaných novorozenců (63).

*Tabulka č. 13: Výsledky novorozeneckého screeningu v České republice v období 17. 8. 2009 – 31. 12. 2012*

	Počet pacientů s klasickou formou CF		
	Celá ČR	Čechy	Morava
Zachyceno pomocí screeningu	52	35	17
Falešně negativních	5	4	1
Celkem	57	39	18

Pozn.: Započítány i výsledky pilotní studie NSCF

Na území Čech bylo do konce roku 2012 vyšetřeno v rámci NSCF **244 862** novorozenců, z tohoto množství bylo **2 649** (1,08%) vzorků odesláno k molekulárně genetickému vyšetření mutací *CFTR* genu do CF Centra ÚBLG, FN Motol v Praze. Na základě laboratorního vyšetření byly u **35** pacientů identifikovány **2** mutace genu *CFTR* a u dalších **168** novorozenců byla nalezena **1** mutace. Přehled všech mutací a jejich frekvence je shrnuta v tabulce č. 14 (63).



**Tabulka č. 14:** Mutace identifikované při NSCF pro oblast Čech v období 17. 8. 2009 – 31. 12. 2012

Název mutace – tradiční nomenklatura (legacy name):	Název mutace - HGVS nomenklatura:	Počet mutovaných alel:	Frekvence výskytu mutace (%):
F508del	c.1521_1523delCTT	153	64,29
R117H	c.350G>A	26	10,92
CFTR dele 2,3	c.54-5940_273 + 10250del21kb	15	6,30
D1152H	c.3454 G > C	8	3,36
G542X	c.1624G > T	6	2,52
G551D	c.1652G > A	5	2,10
N1303K	c.3909C > G	3	1,26
R347P	c.1040G > C	3	1,26
R553X	c.1657C > T	3	1,26
1717-1G>A	c.1585-1G > A	2	0,84
1898+1G>A	c.1766 + 1G > A	2	0,84
I507del	c.1519_1521delATC	2	0,84
2143delT	c.2012delT	1	0,42
3272-26A>G	c.3140-26A > G	1	0,42
3659delC	c.3528delC	1	0,42
3849+10kbC>T	c.3718-2477C > T	1	0,42
4259del5	c.4127_4131delTGGAT	1	0,42
621+1G>T	c.489 + 1G > T	1	0,42
Q552X	c.1654C > T	1	0,42
R1066C	c.3196C > T	1	0,42
R117C	c.349C > T	1	0,42
W1282X	c.3846G > A	1	0,42
Celkem:		238	100,00

Pozn.: Započítány i výsledky pilotní studie NSCF; Označení mutací HGVS respektuje jednotné názvosloví mutací od Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

## 6. DISKUZE

Jistým etickým problémem při vyšetření NSCF k diskuzi, stejně jako při každém screeningovém vyšetření, zůstává podíl falešně pozitivních případů, které znamenají psychickou zátěž pro rodiny. Dále pak případy falešně negativních pacientů, kteří měli buď IRT pod sledovaným cut-off, nebo DNA vyšetřením nebyla zachycena žádná mutace. V první fázi vyšetření je dnes zvažována změna stávajícího protokolu z IRT/DNA/IRT na IRT/PAP/DNA, který by při cut-off IRT 60 ng/ml + součinu IRT x PAP  $\geq 75$  měl dosáhnout vyšší senzitivity a tím menšího množství falešně negativních výsledků. Nespornou výhodou navrhovaného protokolu je také nižší cena vyšetření (63).

Porovnáním DNA vzorků izolovaných různými postupy byl jako nejvhodnější kit pro izolaci z krevních skvrn potvrzen QIAamp DNA Blood mini kit. Vzorky izolované metodou Chelex 100 resin dosahovaly nejvyšších výtěžností, ovšem při amplifikaci DNA dosahovaly nejhorších výsledků (viz obr. č. 25) z důvodu vysokého obsahu proteinů ve výsledném vzorku, což bylo potvrzeno vytvořením absorbanční křivky přístrojem NanoDrop 2000 (viz obr. č. 26).

Dalším cílem by mělo být neustálé zlepšování molekulárně genetické diagnostiky. Ve snaze zachytit co největší procento mutací v prvotním vyšetření, je na místě neustálá spolupráce laboratoře s výrobcí vyšetřovacích kitů. Ti na základě dlouhodobých výsledků novorozeneckého screeningu mohou modifikovat diagnostické kity, aby spektrum vyšetřovaných mutací zahrnovalo pouze mutace, které jsou spojeny s klasickou formou CF. A současně aby toto spektrum mělo co nejvyšší záchytnost v naší populaci. Při výběru vhodné diagnostické metody byl v CF Centru vždy kladen především důraz na kvalitu metody s ohledem na statut akreditované referenční laboratoře, na schopnost záchytu co největšího procenta mutací a v neposlední řadě na ekonomickou i technickou náročnost případného rutinního vyšetření. Na základě porovnání záchytnosti používaných diagnostických kitů, je možné zvážit výměnu hlavního vyšetřovacího kitu Elucigene CFEU2 (záchytnost 90,66%) za kit Devyser CF Core (záchytnost 90,84%).

## 7. ZÁVĚR

S odstupem 3 let od zahájení pilotní studie můžeme hodnotit poměrně velký soubor testovaných novorozenců. Screening cystické fibrózy se ukázal jako vhodný nástroj pro včasnou diagnostiku této nemoci ještě před rozvinutím klinických příznaků a efektivně pomáhá se správnými postupy léčby a celým managementem péče o pacienta. Jeho rodičům je nabídnuta možnost primární prevence tohoto onemocnění pro další těhotenství (tzn. preimplantační diagnostika nebo časná prenatalní diagnostika).

V současnosti používaný systém molekulárně genetického vyšetření v CF Centru je plně optimalizován pro vyšetření DNA z krevních skvrn. Jako nejvhodnější pro izolaci DNA byla zvolena metoda QIAamp DNA Blood mini kit, s níž je dlouhodobě dosahováno kvalitních výsledků při různých metodách vyšetření. Jako záložní metoda je ponechána metoda innuPREP Forensic Kit. I přes nízkou cenu a relativně vysokou výtěžnost izolace metodou Chelex 100 resin, byla tato metoda z běžné diagnostiky vyřazena pro vysoký obsah kontaminujících proteinů ve výsledném vzorku, které by bylo nutno v případě používání metody před samotnou analýzou odstranit.

Z použitých vyšetřovacích metod si své hlavní postavení v úvodní fázi laboratorního vyšetření stále udržuje kit Elucigene CFEU2. V laboratoři CF Centra jsou neustále testovány a optimalizovány nové metody a možnosti molekulárně genetické diagnostiky. Všechny používané laboratorní metody jsou v případě nečekaných problémů zástupně podobně kvalitními metodami a celková doba vyšetření se díky novým technologiím neustále zkracuje. V případě záložních metod, kdy je vyšetření prováděno na stripech, je postup vyšetření automatizován, čímž je dosahováno zvýšení efektivnosti práce zaměstnanců laboratoře. Také postup, kdy je v případě nalezení mutace její ověření prováděno z nové nezávislé izolace DNA, se ukázal být účinným nástrojem pro zabránění vydání falešně pozitivního výsledku z důvodu kontaminace.

Tato práce splnila vytyčené cíle, byl popsán kompletní postup laboratorního vyšetření při NSCF, vysvětleny úskalí a možnosti řešení u daných metod, které jsou používány v naší laboratoři.

## 8. SEZNAM LITERATURY

1. Welsh MJ, Ramsey BW. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: s. 5121–5188
2. Vávrová V. et al. *Cystická fibróza*. Praha: Grada Publishing, 2006. 516 s. ISBN 80-247-0531-1
3. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132: s. 589-595
4. Kraemer R, Birrer P, Liechti-Gallati S. Genotype-phenotype association in infants with cystic fibrosis at the time of diagnosis. *Pediatr Res* 1998; 44: s. 920-926
5. Zielenski J. Genotype & phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67: s. 117-133
6. Anderson MP et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1990; 253: s.202-205
7. Andersen, DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. *Am J Dis Child*. 1938; 56: s.344-399
8. Bobadilla JL, Macek M Jr, et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations – correlations with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat*. 2002;19: s. 575–606.
9. The Molecular Genetic Epidemiology of Cystic Fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS <http://www.who.int/genomics/publications/en/> and WHO Geneva, Human Genetics Programme WHO/HGN/CF/WG/04.02.
10. Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, et al. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in population genetics. *Am. J. Hum. Genet*. 1990;84: s. 449–454.
11. De Braekeleer M, et al. Is meconium ileus genetically determined or associated with a more severe evolution of cystic fibrosis? *J Med Genet* 1998; 35: s. 262-263
12. Guthrie R, Susi A.: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 1963, 32, s. 338-343.
13. Guthrie R.: Screening for phenylketonuria. *Triangle*, 1969, 3, s. 104-109.
14. Blehová B, Pažoutová M. et al.: Zhodnocení screeningu fenylketonurie za šest let trvání laboratoře. *Československá Pediatrie*, 1976, 7, s. 399-400.
15. Čechák P, Hejmanová L. et al.: Výsledky screeningu hyperfenylalaninemií v českých zemích v letech 1970-2000. *Československá Pediatrie*, 2001, 11, s. 667-670.
16. Hyánek J., Hoza J., et al.: Výsledky hromadného screeningu vrozených metabolických poruch u novorozenců. *Československá Gynekologie*, 1972, 4, s. 208-209.
17. Wilcken, B., Wiley, V., Hammond, J., et al.: Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *New England Journal of Medicine*, 2003, 348, s. 2304-2312.
18. Loeber, J.G.: Neonatal screening, the European perspective. *Česko-slovenská Pediatrie*, 2009, 4, s. 159-161.
19. Loeber, J.G.: Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2007, 4, s. 430-438.

20. Bodamer, O.A., Hoffmann, G.F., Lindner, M.: Expanded newborn screening in Europe 2007. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2007, 4, s. 439-444.
21. Dhondt, J.L. Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2007, 4, s. 418-422.
22. Waisbren, S.E. Expanded newborn screening: information and resources for the family physician. *American Family Physician*, 2008, 7, s. 987-994.
23. Alexander, D., van Dyck, P.C. A vision of the future of newborn screening. *Pediatrics*, 5, s. 350-354.
24. Green, N.S., Pass, K.A. Neonatal screening by DNA microarray: spots and chips. *Natural Review of Genetics*, 2005, 2, s. 147-151.
25. Tachibana, S., Suzuki, M., Asano, Y. Application of an enzyme chip to the microquantification of l-phenylalanine. *Anales of Biochemistry*, 2006, 1, s. 72-78.
26. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073
27. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-1065
28. Sims EJ, Clark A, McCormick J, Mehta G, Connett G, Mehta A. United Kingdom Cystic Fibrosis Database Steering Committee. Cystic fibrosis diagnosed after 2 months of age leads to worse outcomes and requires more therapy. *Pediatrics* 2007;119: s.19–28.
29. Crossley JR, Elliot RB, Smith PA. Dried blood spot screening for cystic fibrosis in newborn. *Lancet*. 1979;8114: s. 472-474.
30. Lecoq I, Brouard J, Laroche D et al. Blood immunoreactive trypsinogen concentrations are genetically determined in healthy and cystic fibrosis newborns. *Acta Paediatr*. 1999;88: s. 338-341.
31. Bourguignon JP, Deby-Dupont G, Reuter A et al. Variations in dried blood spot immunoreactive trypsin in relation to gestational age and during the first week of life. *Eur. J. Pediatr*.1986;144: s. 547-549
32. Rock MJ, Mischler EH, Farrell PM et al. Newborn screening for cystic fibrosis is complicated by age-related decline in immunoreactive trypsinogen levels. *Pediatrics*. 1990;85: s. 1001-1007.
33. Laroche D, Travert G. Abnormal frequency of delta F508 mutation in neonatal transitory hypertrypsinaemia. *Lancet*. 1991;8732: s. 55.
34. Pederzini F, Mastella G, Giglio L et al. Dried blood spot immunoreactive trypsin (IRT) values. *Eur. J. Pediatr*. 1988;147: s.663.
35. Moya EF, Brocklebank JT, Littlewood JM et al. High serum immunoreactive trypsin not caused by cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed*. 1998;78: s.F78.
36. Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL et al. Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics*. 2004;113: s.1573-1581.
37. Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL et al. Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn

- screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics*. 2004;113: s.1573-1581.
38. Moya EF, Brocklebank JT, Littlewood JM et al. High serum immunoreactive trypsin not caused by cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* 1998;78: s. F78.
  39. Comeau AM, Parad RB, Dorkin HL et al. Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections. *Pediatrics*. 2004;113: s.1573-1581.
  40. Groman J, Hefferon T et al. - Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet*, 2004; 74: s. 176–179.
  41. MILLSON A. et al. Direct Molecular Haplotyping of the IVS8 Poly(TG) and PolyT Repeat Tracts in the Cystic Fibrosis Gene by Melting Curve Analysis of Hybridization Probes. *Clinical Chemistry*. 2005; 51:9: s. 1619-1623.
  42. Qiagen. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook* [online]. 2010, [cit. 2013-01-15]. Dostupné z: [http://www.mun.ca/biology/dmarshall/QIAamp\\_DNA\\_Mini\\_Kit\\_Handbook.pdf](http://www.mun.ca/biology/dmarshall/QIAamp_DNA_Mini_Kit_Handbook.pdf)
  43. Analytik Jena AG. *innuPREP Forensic kit Manual* [online]. 2011, [cit. 2013-02-01]. Dostupné z: <http://www.westburg.eu/uploads/fckconnector/f540d7f4-7e00-48b4-a939-8e085b49e815>
  44. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 2013, 5, s. 134–139
  45. Thermo Scientific. *NanoDrop 2000 – Specifications* [online]. 2009, [cit. 2013-01-18]. Dostupné z: <http://www.nanodrop.com/Productnd2000specs.aspx>
  46. Křenková P. et al. 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. *Journal of cystic fibrosis*. 2012; ISSN 1569-1993
  47. Thermo Scientific. *T009-Technical bulletin - NanoDrop 1000 & 8000* [online]. 2008, [cit. 2013-01-18]. Dostupné z: <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
  48. Brescia P. *Micro-Volume Purity Assessment of Nucleic Acids using A260/A280 Ratio and Spectral Scanning* [online]. 2012, [cit. 2013-01-18]. Dostupné z: <http://www.biocompare.com/Application-Notes/114528-Micro-Volume-Purity-Assessment-of-Nucleic-Acids-using-A-sub-260-sub-A-sub-280-sub-Ratio-and-Spectral-Scanning/>
  49. Kubista M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspekt of medicine* 2006; 27(2-3); s. 95-125
  50. Kočárek, E. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vydání. BRNO: NCO NZO, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4
  51. Šmarda, J. et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. BRNO: MU Brno, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
  52. Biotium. *Safety Report of GelRed and GelGreen* [online]. 2011, [cit. 2013-02-03]. Dostupné z: <http://www.biocompare.com/Application-Notes/114528-Micro-Volume-Purity-Assessment-of-Nucleic-Acids-using-A-sub-260-sub-A-sub-280-sub-Ratio-and-Spectral-Scanning/>

53. Kerem E, Corey M, Kerem B, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis-analysis of the most common mutation DF508. *N Engl J Med* 1990; 323: s. 1517-1522
54. Devyser. *Devyser CFTR Core – Návod k použití* [online]. 2013, [cit. 2013-02-05]. Dostupné z: [http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Manual\\_Devyser\\_CFTR\\_Core.pdf](http://www.pentagen.cz/files/download/devyser/Manual_Devyser_CFTR_Core.pdf)
55. Abbot. *Cystic Fibrosis Genotyping Assay*[online]. 2013, [cit. 2013-02-06] Dostupné z: <http://www.abbottmolecular.com/us/products/genetics/sequencing/cystic-fibrosis.html>
56. INNOGENETICS. *INNO-LiPA CFTR - DNA line probe assay for the identification od CFTR gene mutations* [online]. 2008, [cit. 2013-02-3]. Dostupné z: [http://www.innogenetics.com/documenten/INNO-Lipa\\_CFTR.pdf](http://www.innogenetics.com/documenten/INNO-Lipa_CFTR.pdf)
57. INNOGENETICS. *INNO-LiPA CFTR - Analysis of 36 CFTR mutations and wild types, plus CBAVD-related Tn polymorphism.* [online]. 2009 [cit. 2013-02-05]. Dostupné z: [http://www.innogenetics.com/geneticstesting\\_detail.html?id=13](http://www.innogenetics.com/geneticstesting_detail.html?id=13)
58. ViennaLab. *CF StripAssay Instruction For Use* [online]. 2012, [cit. 2013-01-11]. Dostupné z: <http://www.viennalab.com/filemanager/documents/get/5d8f3c24e9c000a16a1a14188ef40895.pdf>
59. Macek Jr et al.: Population study of the CFTR gene mutations in Bohemia and Moravia: hypothesis on the historical spread of the G551D and F508 mutations in Europe. *American Journal of Human Genetics.* 1991, 49, vol. Suppl. A 2703, s. -, ISSN 0002-9297.
60. Applied Biosystems. *AB 3130 and 3130xl Genetic Analyzers System Profile* [online]. 2005, [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: <http://www.baylor.edu/content/services/document.php/186487.pdf>
61. <http://6sense.xf.cz/image/sanger.png>
62. Gen-Probe. *ELUCIGENE® CF-EU2v2 Instructions for Use* [online]. 2011, [cit. 2013-02-03]. Dostupné z: <http://www.gen-probe.com/pdfs/downloads/genetic-disease-testing/cf-eu2v2/Instructions%20for%20Use.PDF>
63. Krulišová V, Balašáková M. et. al. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur J Pediatr.* 2012; 171(8):1223-9
64. Gray MA, O'Reilly C, Winpenny J, Argent B. Functional interactions of HCO<sub>3</sub>-with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *JOP.* 2001 Jul;2(4Suppl): s.207-11.
65. Schwiebert EM, Flotte TR, Cutting GR, et al: Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to whole cell chloride currents. *Am J Physiol* 1994; s. C1464-77
66. Riordan JR, *Annu. Rev Physiol* 55, 1993; s. 609-630
67. Lucotte G, Hazout S. Complete map of cystic fibrosis station D508 frequencies in Western Europe and correlation between station frequencies and incidenc of dinase. *Hum Biol* 1995, 67.s. 797-803
68. Anderson MP et al.. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selektivty. *Science* 1990. s. 202-205

**Příloha č. 1: Rozložení mutací genu *CFTR* v České republice (46)**

	Mutace (HGVS nomenklatura):	Mutace (legacy name):	Legacy exon/intron	Počet alel	%
1.	c.1521_1523delCTT	F508del	Ex10	809	67.42
2.	c.54-5940_273 + 10250del21kb	CFTRdele2,3/21kb/	In1–In3	69	5.75
3.	c.1652G > A	G551D	Ex11	35	2.92
4.	c.3909C > G	N1303K	Ex21	29	2.42
5.	c.1624G > T	G542X	Ex11	24	2.00
6.	c.3718-2477C > T	3849 + 10kbC > T	In19	20	1.67
7.	c.1766 + 1G > A	1898 + 1G > A	In12	17	1.42
8.	c.1040G > C	R347P	Ex7	11	0.92
9.	c.2012delT	2143delT	Ex13	11	0.92
10.	c.3140-26A > G	3272-26A > G	In17a	8	0.67
11.	c.1007T > A	I336K	Ex7	7	0.58
12.	c.3846G > A	W1282X	Ex20	7	0.58
13.	c.1657C > T	R553X	Ex11	6	0.50
14.	c.2657 + 5G > A	2789 + 5G > A	In14b	6	0.50
15.	c.2834C > T	S945L	Ex15	6	0.50
16.	c.442delA	574delA	Ex4	5	0.42
17.	c.489 + 1G > T	621 + 1G > T	In4	5	0.42
18.	c.2052_2053insA	2184insA	Ex13	5	0.42
19.	c.3009_3017delAGCTATAGC	3141del9 <sup>sk</sup>	Ex17a	5	0.42
20.	c.366T > A	Y122X	Ex4	4	0.33
21.	c.[874G > A] + [2126G > A]	E292K/R709Q	Ex7/Ex13	4	0.33
22.	c.1585-1G > A	1717-1G > A	In10	4	0.33
23.	c.3454 G > C	D1152H	Ex18	4	0.33
24.	c.3484C > T	R1162X	Ex19	4	0.33
25.	c.4242 + 1G > T	4374 + 1G > T	In23	4	0.33
26.	c.1000C > T	R334W	Ex7	3	0.25
27.	c.1767-?_2619 + ?del	CFTRdele13,14a	Ex13–Ex14a	3	0.25
28.	c.3468 + 2_3468 + 3insT	3600 + 2insT	In18	3	0.25
29.	c.3469-?_3717 + ?dup	CFTRdup19	Ex19	3	0.25
30.	c.3964-78_4242 + 577del	CFTRdele22,23	Ex22–Ex23	3	0.25
31.	c.53 + 1G > T	185 + 1G > T	In1	2	0.17
32.	c.54-1161_164 + 1603del2875	CFTRdele2	Ex2	2	0.17
33.	c.169T > G	W57G	Ex3	2	0.17
34.	c.254G > A	G85E	Ex3	2	0.17
35.	c.274G > T	E92X	Ex4	2	0.17
36.	c.328G > C	D110H	Ex4	2	0.17
37.	c.579 + 3A > G	711 + 3A > G	In5	2	0.17
38.	c.3528delC	3659delC	Ex19	2	0.17
39.	c.4127_4131delTGGAT	4259del5	Ex22	2	0.17
40.	c.1-?_1584 + ?del	CFTRdele1,10	Ex1–Ex10	1	0.08
41.	c.115C > T	Q39X	Ex1	1	0.08
42.	c.79G > C	G27R	Ex2	1	0.08
43.	c.[125C > T] + [223C > T]	S42F/R75X	Ex2/Ex3	1	0.08
44.	c.164 + 1G > A	296 + 1G > A	In2	1	0.08
45.	c.274G > A	E92K	Ex4	1	0.08
46.	c.349C > T	R117C	Ex4	1	0.08
47.	c.509G > A	R170H	Ex5	1	0.08
48.	c.533G > A	G178E	Ex5	1	0.08
49.	c.579 + 1G > T	711 + 1G > T	In5	1	0.08
50.	c.902A > G	Y301C	Ex7	1	0.08
51.	c.1040G > A	R347H	Ex7	1	0.08
52.	c.1114C > T	Q372X	Ex7	1	0.08
53.	c.1117-1G > A	1249-1G > A	In7	1	0.08
54.	c.1209 + 1G > A	1341 + 1G > A	In8	1	0.08
55.	c.1519_1521delATC	I507del	Ex10	1	0.08
56.	c.1654C > T	Q552X	Ex11	1	0.08



57.	c.1673T > C	L558S	Ex11	1	0.08
58.	c.1679 + 1G > C	1811 + 1G > C	In11	1	0.08
59.	c.1687T > C	Y563H	Ex12	1	0.08
60.	c.1753G > T	E585X	Ex12	1	0.08
61.	c.1766 + 1G > C	1898 + 1G > C	In12	1	0.08
62.	c.2044delA	2176delA	Ex13	1	0.08
63.	c.2051_2052delAAinsG	2183delAA > G	Ex13	1	0.08
64.	c.2052delA	2184delA	Ex13	1	0.08
65.	c.2290C > T	R764X	Ex13	1	0.08
66.	c.2490 + 1G > A	2622 + 1G > A	In13	1	0.08
67.	c.2538G > A	W846X	Ex14a	1	0.08
68.	c.2551C > T	R851X	Ex14a	1	0.08
69.	c.2589_2599delAATTTGGTGCT	2721del11	Ex14a	1	0.08
70.	c.2705delG	2837delG	Ex15	1	0.08
71.	c.2789delG	2921delG	Ex15	1	0.08
72.	c.2803_2813delCTACCACTGGT	2935del11	Ex15	1	0.08
73.	c.2856G > C	M952I	Ex15	1	0.08
74.	c.2991G > C	L997F	Ex17a	1	0.08
75.	c.3106delA	3238delA	Ex17a	1	0.08
76.	c.3136G > T	E1046X	Ex17a	1	0.08
77.	c.3139G > C	G1047R	Ex17a	1	0.08
78.	c.3196C > T	R1066C	Ex17b	1	0.08
79.	c.3196C > G	R1066G	Ex17b	1	0.08
80.	c.3302T > G	M1101R	Ex17b	1	0.08
81.	c.3310G > A	E1104K	Ex17b	1	0.08
82.	c.3353C > T	S1118F	Ex17b	1	0.08
83.	c.3472C > T	R1158X	Ex19	1	0.08
84.	c.3587C > G	S1196X	Ex19	1	0.08
85.	c.3708delT	3840delT	Ex19	1	0.08
86.	c.3937C > T	Q1313X	Ex21	1	0.08
87.	c.3971T > C	L1324P	Ex22	1	0.08
88.	c.4003C > T	L1335F	Ex22	1	0.08
89.	c.4004T > C	L1335P	Ex22	1	0.08
90.	c.4097T > A	I1366N	Ex22	1	0.08
91.	c.4426C > T	Q1476X	Ex24	1	0.08
92.	Neznámá			6	0.50
	Celkem			1200	100.00

Pozn.: Označení mutací „HGVS“ respektuje jednotné názvosloví mutací od Human Genome Variation

Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), označení mutací „legacy name“ vychází z tradičního názvosloví.

**Příloha č. 2:** Seznam mutací a polymorfismů detekovaných jednotlivými komerčními kity

Elucigene CFEU2 (Hologic Gen-Probe)	INNO-LiPA CFTR 17+19 (Innogenetics)	CF StripAssay (ViennaLab)	CFTR Core (Devyser)	Cystic Fibrosis Genotyping Assay - OLA (Abbott)	Stripy AMPLICOR Cystic Fibrosis 38 (Roche)
1078delT	1078delT	1078delT	1078delT	1078delT	1078delT
1677delTA	1717-1G>A	1717-1G>A	1677delTA	1717-1G→A	1717-1G->A
1717-1G>A	1898+1G>A	1898+1G>A	1717-1G>A	1898+1G→A	175insT
1811+1.6kbA>G	2143delT	2143delT	1898+1G>A	2183AA→G	1811+1.6kb A->G
1898+1G>A	2183AA>G	2183AA>G	2143delT	2184delA	1898+1G->A
2143delT	2184delA	2184delA	2183AA>G	2789+5G→A	2143delT
2184delA	2789+5G>A	2184insA	2184insA	3120+1G→A	2183AA->G
2347delG	3120+1G>A	2789+5G>A	2789+5G>A	3659delC	2184delA
2789+5G>A	3199del6	3120+1G>A	3120+1G>A	3849+10kbC→T	2789+5G->A
3120+1G>A	3272-26A>G	3272-26A>G	3272-26A>G	3876delA	<b>3120+1G-&gt;A</b>
3272-26A>G	3659delC	3659delC	3659delC	3905insT	3272-26A->G
3659delC	3849+10kbC>T	3849+10kbC>T	3849+10kbC>T	394delTT	3659delC
3849+10KbC>T	3905insT	3905insT	621+1G>T	621+1G→T	3849+10kbC->T
3905insT 297-303.5	394delTT	394delTT	711+1G>T	711+1G→T	3905insT
394delTT 377-383	621+1G>T	621+1G>T	CFTRdele2,3 (21kb)	A455E	394delTT
444delA 323-330	711+1G>T	711+1G>T	F508del	F508del	621+1G->T
621+1G>T	711+5G>A	A455E	G542X	delI507	711+1G->A
711+1G>T	A455E	CFTRdel2,3 (21kb)	G551D	G542X	A455E
A455E	CFTRdel2,3 (21kb)	F508del	G85E	G551D	CFTRdele2,3(21kb b)
CFTRdel2,3	E60X	G542X	I336K	G85E	E60X
D1152H	F508del	G551D	I507del	N1303K	F508C
E60X	G542X	G85E	L1065P	R1162X	F508del
F508del	G551D	I507del	L1077P	R117H	G542X
G542X	G85E	N1303K	N1303K	R334W	G551D
G551D	I148T	R1162X	R1066C	R347H	G85E
G85E	I507del	R117H	R1162X	R347P	I148T
I507del	N1303K	R334W	R117C	R553X	I506V
L206W	Q552X	R347H	R117H	R560T	I507del
M1101K	R1162X	R347P	R334W	S549N	I507V
N1303K	R347H	R553X	R347H	S549R	N1303K
P67L	R334W	R560T	R347P	V520F	R1162X
Q890X	R347P	W1282X	R553X	W1282X	R117H
R1066C	R553X	Y1092X	R560T	IVS8-5T/7T/9T	R334W
R1158X	R560T	Y122X	T338I		R347P
R1162X	S1251N	IVS8-5T/7T/9T	W1282X		R553X
R117C	W1282X,		Y1092X(C>A)		R560T
R117H	IVS8-5T/7T/9T		IVS8-5T/7T/9T		S1251N
R334W					S549N
R347H					W1282X
R347P					Y1092X
R553X					Y122X
R560T					IVS8-5T/7T/9T
S1251N					
S549N					
S549R(T>G)					
V520F					
W1282X					
W846X					
Y1092X(C>A)					
Y122X					
IVS8-5T/7T/9T					

Pozn.: Názvy uvedených mutací vychází z tradiční nomenklatury (legacy name).

**Příloha č. 3: Seznam mutací vyšetřovaných v CF Centru metodou RFLP**

	Vyšetřovaná mutace:	Název primeru:	Anelační teplota (TA):	Velikost PCR fragmentu:	Restrikční enzym:	Výsledek restrikčního štěpení (bp):		
						WT/WT	WT/MUT	MUT/MUT
1.	1717+1G > A	1717mis / 11i5	55	137 bp	Ava II	137 bp	171-137	171
2.	2143delT	1204 / 655	52	203 bp	Dde I	203 bp	203-181	181
3.	2789+5G > A	14bi3 / 14bi5	52	305 bp	Ssp I	305 bp	265-217	217
4.	3849+10kbC > T	intr.19i5 / intr.19i3	55	435 bp	Hph I	435 bp	350-222-128-85	222-128-80
5.	4374+1G > T	23i3 / 23i5	55	400 bp	Hph I	400 bp	400-262-138	400
6.	621+1G > T	621mis / 4i5	55	438 bp	Mse I	438 bp	299-245-54	245-54
7.	D1152H	18i3 / 18i5	55	451 bp	AflI II	451 bp	451-247-204	247-204
8.	G542X	G542Xmis / 11i3	52	295 bp	Mva I	295 bp	194-171-101	194-101
9.	G551D	11i3 / 11i5	55	425 bp	Hinc II	425 bp	425-239-186	425
10.	G85E	3i3 / 3i5	55	309 bp	Hinf I	309 bp	277-172-105	277
11.	I336K	7i3 / 7i5	56	410 bp	SSp I	410 bp	410-235-185	410
12.	J3.11	J3.11-F / J3.11-R	61	186 bp	Msp I	186 bp	186-136	136
13.	KM19	KM19-1 / KM19-2	55	206 bp	Pst I	206 bp	206-15	150
14.	M470V	10i3 / 10i5	56	491 bp	Hph I	491 bp	491-312-179	312-179
15.	MetH	Meth-F / Meth-R	58	414 bp	Msp I	414 bp	414-220-194	220-194
16.	N1303K	N1303Kmis / 21i5	52	290 bp	Mva I	290 bp	290-266-24	290
17.	R1162X	19i3 / 19i5	57	454 bp	Dde I	454 bp	197-275-143-132	179-143-132
18.	R117H	R117Hmis / 4i3	56	248 bp	Hha I	248 bp	248-226	248
19.	R334W	7i3 / 7i5	56	410 bp	Msp I	410 bp	410-228-192	410
20.	R347P	7i3 / 7i5	56	410 bp	Hha I	410 bp	410-259-151	410
21.	R560T	11i3.5/11i5.5	55	425 bp	Hph I	425 bp	215-210	425
22.	R553X	11i3 / 11i6	55	425 bp	Mbo I	425 bp	425-239-186	425
23.	S945L	15b-F / 15b-R	55	200 bp	Taq I	200 bp	200-120-80	200
24.	W1282X	20i3 / 20i5	57	473 bp	Mnl I	473 bp	301-178-172-123	301-172
25.	XV2C	XV2C-F / XV2C-R	55	291 bp	Taq I	291 bp	291-159-132	159-132
26.	Y122X	4i3 / 4i5	55	438 bp	Mse I	438 bp	299-181-118	181-118

Pozn.: Názvy uvedených mutací vychází z tradiční nomenklatury (legacy name).