

Strokovni prispevek/Professional article

GENETSKO TESTIRANJE ZA CISTIČNO FIBROZO PRI ODRASLIH BOLNIKI

GENETIC TESTING FOR CYSTIC FIBROSIS IN ADULT PATIENTS

Marina Mencinger, Mira Šilar, Mitja Košnik, Peter Korošec

Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Bolnišnica Golnik, 4204 Golnik

Prispelo 2005-07-04, sprejeto 2005-12-20; ZDRAV VESTN 2006; 75: 71-7

Ključne besede *recesivno avtosomno dedovanje; gen cfr; mutacije; atipična cistična fibroza*

Izvleček

- Izhodišča** *Cistična fibroza (CF) je avtosomna recesivna bolezen, povzročena z mutacijami v genu, ki kodira transmembranski regulator protein, imenovan CFTR. Prek 1300 mutacij, dokazanih v genu, prispeva h kompleksnosti klinične slike od klasične multiorganske bolezni, ki pogosto prizadene dihala, prebavila ter spolne organe, do monosimptomatskih fenotipov. Pilokarpinska iontoforeza, ki velja za standardni diagnostični test za CF, pogosto pri atipičnih oblikah CF nima diagnostične uporabnosti.*
- Metode** *Da bi pridobili dodatni diagnostični test za potrditev diagnoze CF ter s tem omogočili primerno medicinsko oskrbo bolnikov, smo genetsko testirali 16 odraslih, pri katerih je bil postavljen klinični sum na atipično obliko CF. Po posvetu smo testirali tudi starše bolnikov, pri katerih smo posumili na homozigotno obliko mutacije. Na osebno željo ter po posvetu smo testiranje izvedli tudi pri odrasli sorojenki bolnice z dvema mutacijama zaradi ugotavljanja statusa prenašalca. Uporabili smo alelno specifično polimerazno verižno reakcijo (PCR) za odkrivanje 29 najpogostejših mutacij v genu cfr.*
- Rezultati** *Diagnozo CF smo potrdili pri 3 preiskovancih, homozigotu za $\Delta F508$, ter dveh sestavljenih heterozigotih z genotipom $\Delta F508/3849+10kbC>T$ in $\Delta F508/R1162X$. V 3 primerih smo ugotovili le eno mutacijo: I148T, 2789+5G>A ter $\Delta F508$ v heterozigotni obliki.*
- Zaključki** *Genetsko testiranje za CF je dragocen diagnostični test pri atipičnih oblikah CF. Zaradi raznolike klinične slike CF je potrebno izključiti možne diferencialne diagnoze. Če je verjetnost CF pred testiranjem velika, bi pri bolnikih, pri katerih smo našli samo eno od 29 pričakovanih mutacij, ali nismo našli nobene, morali sekvencionirati celoten gen, da bi izključili redke mutacije ali polimorfizme, ki so lahko vpleteni v patogenezo atipične CF.*

Avtor za dopisovanje / Correspondence author:

Marina Mencinger, Bolnišnica Golnik, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Golnik 36, 4204 Golnik, tel.: 04/25 69 100, faks: 04/25 69 117

CF - cistična fibroza, CFTR - transmembranski regulator cistične fibroze (cystic fibrosis transmembrane regulator), HRCT - računalniška tomografija visoke ločljivosti (high resolution computer tomography), CBAVD - kongenitalna obojestranska odsotnost semenovoda (congenital bilateral absence of vas deferens), PCR - polimerazna verižna reakcija (polymerase chain reaction), DNK - deoksiribonukleinska kislina, CT - računalniška tomografija (computer tomography), ITT - indeks telesne mase (body mass index), VC - vitalna kapaciteta, FEV1 - forsirani ekspiratorni volumen v 1. sekundi, TZKD - trajno zdravljenje s kisikom na domu, ABPA - alergijska bronhopulmonalna aspergiloza, ATP - adenosin trifosfat

Key words *recessive autosomal inheritance; cfr gene; mutations; atypical cystic fibrosis*

Abstract

- Background** *Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in gene encoding cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) protein. Over 1400 mutations found in the gene contribute to the complexity of the CF phenotypes ranging from a classic multiorgan disease commonly involving respiratory, gastrointestinal and reproductive tract to mild and monosymptomatic presentations. Pilocarpine iontophoresis is considered as standard diagnostic test for CF, but it often fails in atypical forms of CF.*
- Methods** *In order to provide an additional diagnostic test to assure the diagnosis and provide patients with a proper medical care, we performed a genetic testing on 16 adults suspected to have atypical form of CF. Following counselling, parents of patients with possible homozygote variant of mutations were tested. On a personal request testing was also performed in an adult sibling of a patient with two known mutations to investigate possible carrier hood. The allele specific polymerase chain reaction method (PCR) was used to detect 29 most common mutations in the cfr gene.*
- Results** *The diagnosis was proved in 3 individuals, a homozygote for $\Delta F508$, and two compound heterozygotes $\Delta F508/R1162X$ and $\Delta F508/3849+10kbC>T$. In three cases only one mutation was found: I148T, 2789+5G>A and $\Delta F508$ in a heterozygote form.*
- Conclusions** *The genetic testing for CF is a valuable diagnostic tool in atypical forms of CF. Exclusion of possible differential diagnosis is warranted because of a variable CF phenotype. In cases where only one or no mutation was detected a necessity of whole gene sequencing is indicated to exclude rare mutations and polymorphisms that could be implicated in the pathogenesis of atypical CF.*

Uvod

Cistična fibroza (CF) ali mukoviscidoza je kot klinična entiteta poznana že več kot 60 let (1). Prelomni kamen v diagnostiki CF je povzročila opazka, da ima koža obolelih otrok okus po slanem (2). Odkritje gena za CF l. 1989, poimenovanega *cfr* (cystic fibrosis transmembrane regulator), je razširilo diagnostične možnosti ter hkrati pomembno prispevalo k razumevanju patofiziologije te multiorganske avtosomno recesivne bolezni (3–5). Gen za CF kodira od c-AMP odvisni membranski protein CFTR, ki preko membrane celic eksokrinih žlez prevaja ione Cl ter pomembno vpliva tudi na delovanje drugih kanalov, ki urejajo prevajanje Na ter ionov HCO_3 (6–9). *Cfr* se izraža na epitelnih celicah dihal ter prebavil, trebušne slinavke, žolčnika, rodil, ledvic, žlez slinavk ter znojnic.

V večini primerov je postavitve diagnoze CF klinična. Glavni vzrok obolevanja in umrljivosti je bolezen pljuč. Prisotni so lahko tudi simptomi in znaki bolezni prebavil, jeter in spolnih organov. Pri približno 15% bolnikov se postavi diagnoza CF šele po 10. letu starosti (10). Pri atipični CF je običajno funkcionalna okvara CFTR manjša oziroma je delež funkcionalnega proteina večji. Klinični simptomi in znaki pri atipični obliki CF so milejši, navadno se pojavijo šele v odrasli dobi in lahko zajemajo en sam organ (11). Primera sta neplodnost pri moškem kot posledica azoospermije (congenital bilateral absence of vas deferens-CBAVD) ali kronični pankreatitis, ki je lahko edini klinični znak pri atipični CF (12–14). K široki paleti klinične slike prispevajo poleg heterogenosti

mutacij tudi polimorfizmi v genu *cfr* ter modificirajoči geni (15–17).

Pri CF je genotip tesno povezan s fenotipom v primeru bolezni trebušne slinavke ali spolnih organov, medtem ko je povezava med genotipom ter fenotipom pri bolezni pljuč precej bolj ohlapna (18). Napoved izida bolezni glede na genotip zato ni enostavna. V pomoč so dosedanja opisi fenotipov določenega genotipa ter razvrstitev mutacij v enega od šestih mutacijskih razredov, ki napovedujejo stopnjo funkcionalne okvare proteina. Mutacijska razreda 4 in 5 npr. napovedujeta normalno delovanje trebušne slinavke (19).

Pogostost heterozigotov za *cfr* v populaciji kavkaške rase je dokaj visoka, saj nosi mutacijo na enem od alelov za *cfr* vsak petindvajseti, oboli pa približno 1/5000 novorojenih (20). Če upoštevamo te podatke, se v Sloveniji rodijo vsako leto 3 do 4 otroci s CF. Ob predpostavki, da znaša njihova povprečna življenjska doba okoli 20 let, je v skupini med 60 in 80 bolnikov (10). Daljše preživetje je rezultat zgodnejšega odkrivanja bolezni, boljše zdravstvene oskrbe ter rednega spremljanja bolnikov s strani multidisciplinarnе skupine (22). Centri za CF, ki delujejo po svetu, dokazano prispevajo k daljšemu preživetju in boljši kakovosti življenja bolnikov s CF (23).

Leta 1998 je bil z namenom postavitve enotnih pravil pri obravnavi bolnikov s CF sprejet dogovor o diagnostičnih merilih za postavitve diagnoze CF. Diagnoza temelji na enem ali več značilnih kliničnih znakov, pozitivni družinski anamnezi ali pozitivnem testu določanja vrednosti serumskega imunoreaktivnega tri-

psina pri novorojenčkih in laboratorijskih izvidih, ki dokazujejo disfunkcijo CFTR proteina ali najmanj 2 mutaciji v genu *cftr* (24).

Določanje koncentracije imunoreaktivnega tripsina se izvaja v nekaterih državah pri vseh novorojenih, vendar daje sorazmerno visok odstotek lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov. Za dokaz disfunkcije CFTR proteina se izvaja preiskava merjenja razlike nosnega potenciala, ki temelji na detekciji motnje sekrecije klorida v nosnih epitelnih celicah (25). Zaradi težavnosti postopka se izvaja le v posameznih visoko specializiranih centrih večinoma v raziskovalne namene. Zlati standard med diagnostičnimi testi ob sumu na CF je še vedno pilokarpinska iontoforeza, s katero merimo količino Na in Cl ionov v znoju. Pri atipičnih oblikah CF pa je izvid pilokarpinske iontoforeze pogosto normalen ali mejen.

Genetsko testiranje je omogočilo, da postavimo diagnozo CF pri vse več bolnikih z atipičnim fenotipom ter jim tako omogočimo primerno medicinsko vodenje. Predlagane so bile evropske smernice za kakovostno genetsko testiranje CF (26). Dokazovanje do sedaj ugotovljenih 1364 mutacij je zaradi dolžine gena *cftr*, ki znaša približno 250 kb, težavno (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). Večina laboratorijev za CF izvaja genetsko testiranje za najpogostejše mutacije, le posamezni večji centri opravljajo testiranje celotnega gena *cftr* vključno s promotorjem. Najpogostejša mutacija, $\Delta F508$, predstavlja 62,7% vseh mutacij v *cftr* v slovenski populaciji. Kljub majhni populaciji pa je heterogenost mutacij v *cftr* v našem prostoru dokaj visoka (27). Odkritih je bilo 18 različnih mutacij, od tega 3 nove ter 8 redkih mutacij glede na pogostost pojavljanja v Evropi (27).

Namen naše raziskave je bil izvesti genetsko testiranje za 29 mutacij pri odraslih, kjer smo na podlagi kliničnih simptomov ali znakov v dihalih in prebavilih ter težav s plodnostjo posumili na atipično obliko CF (Razpr. 1). V študijo smo vključili tudi odrasle bolnike z negativnim izvidom pilokarpinske iontoforeze, ki so jih že vodili s klinično diagnozo CF na Pediatrični kliniki.

Hkrati smo želeli opisati fenotip pri opredeljenih genotipih.

Materiali in metode

Vsi testirani, v določenih primerih tudi družinski člani, so bili prej povabljeni na pogovor glede genetskega testiranja.

Genetsko testiranje za 29 mutacij v genu *cftr* smo opravili pri 16 bolnikih, pri katerih smo na osnovi kliničnih simptomov ali znakov predvsem v dihalih (povzročajoče se okužbe, najdba bronhiektazij, osamitev specifičnih patogenov v izpljunku, izvidi pljučne funkcije), nosne polipoze, simptomov in znakov v prebavilih, indeksa telesne teže ter težav s plodnostjo posumili na atipično obliko CF (Razpr. 1). Zaradi suma na homozigotno mutacijo pri dveh preiskovancih smo testiranje opravili tudi pri njunih starših ter na željo asimptomatske odrasle sorojenke zaradi morebitnega statusa prenašalca mutacij.

Najmlajša bolnica je imela 18 let, najstarejša pa 73 let. DNK smo osamili iz celotne EDTA krvi z mini kitom QIAamp DNK (Qiagen, Hilden, Nemčija). Analizo smo izvedli z multipleks PCR ARMS (Amplification Refractory Mutation System) sistemom (28) z imenom Elucigene CF 29 (Tepnel Diagnostics, Oxfordshire, Velika Britanija). Ugotavljali smo naslednje mutacije: D1152H, 1717-1G>A, G542X, W1282X, N1303K, $\Delta F508$ (hetero- in homozigot), 3849+10kbC>T, 621+1G>T, R553X, G551D, R117H, R1162X, R334W, A455E, 2183AA>G, 3659delC, 1078delT, $\Delta I507$, R347P, S1251N, E60X, 3120+1G>A, 2789+5G>A, 1898+1G>A, 711+1G>T, G85E, 2184delA, I148T in R560T.

Rezultati

Pri treh bolnikih od 16 smo našli mutacije na obeh alelih, in sicer pri enem $\Delta F508$ v homozigotni obliki ter pri dveh testiranih kombinacijo $\Delta F508$ z dvema različnima mutacijama. Ta dva primera sta sestavljena heterozigota z genotipoma $\Delta F508$ /R1162X ter $\Delta F508$ /3849+10kbC>T.

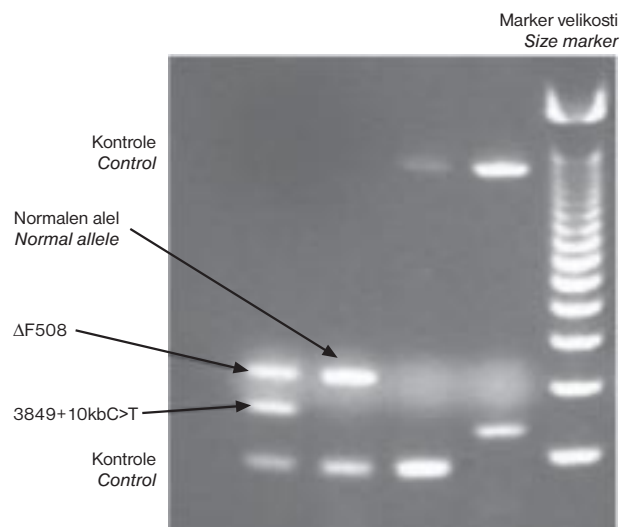
Pri treh bolnikih smo našli eno mutacijo, in sicer I148T, 2789+5G>A ter $\Delta F508$, v heterozigotni obliki.

Pri bolnikih z I148T ter 2789+5G>A smo testirali tudi starše. Mutacijo I148T smo dokazali le pri očetu preiskovanke (Sl. 1).

Mutacijo 2789+5G>A smo ugotovili pri materi preiskovanke, medtem ko smo pri njenem očetu dokazali $\Delta F508$ v heterozigotni obliki.

Pri odrasli sorojenki bolnice z dvema mutacijama nismo našli mutacij.

Pri 10 bolnikih mutacij nismo našli.



Sl. 1. Gel elektroforeza PCR produktov. S puščico so označeni produkti PCR, ki predstavljajo opisano mutacijo ter normalen alel. Označen je označevalec velikosti, zgornji ter spodnji kontrolni produkti PCR.

Figure 1. Gel electrophoresis of the PCR products. PCR products, that represent bands corresponding to the described mutation, and a PCR band representing normal allele are indicated with arrows. Size marker, large and small control PCR bands are indicated.

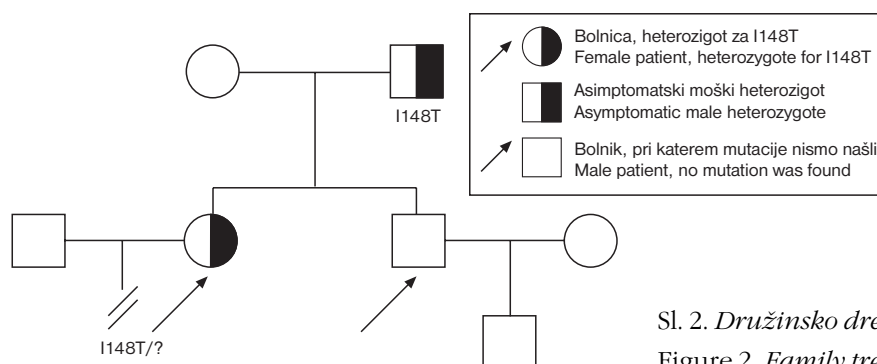
Razpr. 1. Vključitvena merila za testiranje ter rezultati genetskega testiranja za CF.

PI – pilokapinska iontoforeza, B – bronhiektazije, RI – respiratorni infekti, patogeni – patogeni v sputumu, NP – nosna polipoza, ITT – indeks telesne teže, eks. in end. IP – eksokrina in endokrina insuficienca trebušne slinavke, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, SA – *Staphylococcus aureus*, AF – *Aspergillus fumigatus*, SP – *Streptococcus pneumoniae*, HI – *Haemophilus influenzae*, KO – *Klebsiella ozaenae*, ? – ni poznano.

Table 1. Inclusion criteria for genetic testing and the results of genetic testing for CF.

PI – sweat chloride test, B – bronchiectasis, RI – respiratory infections, pathogens – pathogens in sputum, NP – nasal polyposis, ITT – body mass index, eks. and end. IP – exocrine and endocrine pancreatic insufficiency, PA – *Pseudomonas aeruginosa*, SA – *Staphylococcus aureus*, AF – *Aspergillus fumigatus*, SP – *Streptococcus pneumoniae*, HI – *Haemophilus influenzae*, KO – *Klebsiella ozaenae*, ? – not known.

Št. No.	Leto rojstva Year of birth	Spol Gender	PI	RI	B	Patogeni Pathogens	Respiratorni volumen Respiratory volume	NP	Gastrointestinalni znaki Gastrointestinal signs	ITT	Neplodnost Infertility	Mutacije Mutation
1	1968	Ž F	neznano unknown	da yes	da yes	PA	FEV1 85%, VC 100%	da yes	eks. IP, jetrna steatoza eks. IP, liver steatosis	znižan reduced	?	ΔF508 homozigot
2	1981	Ž F	neg. neg.	da yes	da yes	PA	FEV1 29%, VC 58%	da yes	eks. in end. IP, steatoza jeter eks and end. IP, liver steatosis	znižan reduced	?	ΔF508 heterozigot / R1162X
3	1980	Ž F	neg. neg.	da yes	da yes	PA	FEV1 49%, VC 67%	da yes	ne no	primeren adequate	?	ΔF508 heterozigot, 3849+10kbC>T
4	1978	M M	neg. neg.	da yes	da yes	SA	FEV1 36%, VC 65%	ne no	jetrna steatoza, eks. in end. IP liver steatosis, eks. and end. IP	znižan reduced	?	ΔF508 heterozigot
5	1955	Ž F	neg. neg.	da yes	da yes	PA	FEV1 21%, VC 31%	da yes	akutni holecistitis acute cholecystitis	primeren adequate	da yes	I148T
6	1987	Ž F	neg. neg.	da yes	da yes	AF	ni opravila not done	ne no	ne no	znižan reduced	?	2789+5G>A
7	1951	M M	neg. neg.	da yes	da yes	PA, HI	FEV1 1150, VC 39%	ne no	ne no	znižan reduced	ne no	neg
8	1962	M M	ni opravi not done	da yes	da yes	KO, SP	FEV1 58%, VC 50%	da yes	ne no	primeren adequate	da yes	neg
9	1980	Ž F	neg. neg.	da yes	da yes	HI	FEV1 37%, VC 49%	ne no	ne no	znižan reduced	?	neg
10	1954	Ž F	neg. neg.	da yes	da yes	PA	FEV1 95%, VC 81%	ne no	ne no	primeren adequate	ne no	neg
11	1971	Ž F	mejen borderline	da yes	da yes	brez no	FEV1 99%, VC 90%	ne no	Mb. Crohn, žolčni kamni Mb. Crohn, gallbladder stones	primeren adequate	?	neg
12	1932	Ž F	ni opravila not done	da yes	da yes	HI, PA	FEV1 42%, VC 50%	ne no	steatoza jeter liver steatosis	primeren adequate	ne no	neg
13	1957	Ž F	ni opravila not done	da yes	ne no	brez no	FEV1 76%, VC 83%	ne no	ne no	primeren adequate	ne no	neg
14	1964	Ž F	ni opravila not done	da yes	ne no	PA	FEV1 94%, VC 106%	ne no	ne no	primeren adequate	ne no	neg
15	1965	Ž F	ni opravila not done	da yes	da yes	HI	FEV1 47%, VC 63%	da yes	ne no	primeren adequate	?	neg
16	1985	Ž F	neg. neg.	da yes	da yes	HI	FEV1 110%, VC 84%	ne no	ne no	primeren adequate	ne no	neg



Sl. 2. Družinsko drevo.

Figure 2. Family tree.

Razpravljanje

Genetsko testiranje za 29 mutacij v genu *cfr*, ki so vzročno povezane z nastankom CF, smo opravili pri 16 bolnikih. Mutacije smo ugotovili na 9 alelih, in sicer 5 različnih mutacij. Če upoštevamo tudi družinske člane, ki smo jih testirali, smo ugotovili mutacije na 12 alelih.

Pri treh bolnikih smo potrdili diagnozo CF, saj smo pri enem dokazali $\Delta F508$ v homozigotni obliki, ter pri dveh bolnicah kombinacijo $\Delta F508$ z drugo mutacijo. Pri 36-letni bolnici, ki so jo že kot otroka vodili na Pediatrični kliniki s klinično diagnozo CF, smo ugotovili mutacijo $\Delta F508$ v homozigotni obliki. Mutacija $\Delta F508$ povzroči delecijo fenilalanina na mestu 508, kar moti procesiranje proteina, ki se razgradi, še preden prispe do apikalne membrane epitelnih celic. Običajno homozigotno stanje za $\Delta F508$ napoveduje težjo klinično sliko, čeprav so poročila o homozigotih za $\Delta F508$, ki so bili fenotipsko normalni (29). Lažjo prizadetost dihal pri naši bolnici potrjuje FEV1, ki znaša pri sorazmerno visoki starosti bolnice kar 83% referenčne vrednosti. Zaradi slednjega smo bolnico uvrstili med atipične primere CF.

Diagnozo CF smo potrdili tudi pri 24-letni bolnici, ki je glede na genotip sestavljeni heterozigot $\Delta F508/3849+10kbC>T$ (Sl. 1). Mutacija $3849+10kbC>T$ doslej v slovenski populaciji v literaturi še ni bila zabeležena, pogosto pa se pojavlja v Litvi, na Poljskem ter v Izraelu (30). Mutacija leži v intronu 19 ter ustvarja mesto za nepravilno izrezovanje eksona 19. Bolniki s to mutacijo imajo praviloma lažjo obliko bolezni, kar se ujema s sorazmerno blagimi simptomi pri naši bolnici, ki je bila prvič obravnavana v bolnišnici pri 16 letih (31). V ospredju je bolezen pljuč z zmernim upadom pljučne funkcije (FEV1 49%). Indeks telesne mase je primeren.

Zaradi morebitnega statusa prenašalca smo testirali tudi sorojenko preiskovanke. Genetsko testiranje za CF se lahko izvede na željo odraslih sorojencev bolnikov z znanimi mutacijami v genu *cfr* ter njihovih partnerjih po genetskem svetovanju (26). Verjetnost CF pri otroku staršev, od katerih je eden prenašalec mutacije v *cfr*, drugi pa »ne«, je ob občutljivosti genetskega testa 80%, približno 1/100 (26). Če pa sta oba partnerja heterozigota, je verjetnost, da otrok podeduje mutirani gen *cfr* od obeh staršev, kar 1/4.

Pri 23-letni bolnici s kliničnim sumom na CF ter z negativnim izvidom iontoforeze smo ugotovili dve različni mutaciji, in sicer $\Delta F508$ v kombinaciji z R1162X. Mutacija R1162X je nesmiselna mutacija, kjer preide do zamenjave arginina s kodonom stop, kar povzroči skrajšanje proteina (32). Pri bolnici je bila prisotna eksokrina ter endokrina insuficienca trebušne slinavke, kar je v skladu z opažanjem, da R1162X v homozigotni obliki povzroča hudo insuficienco trebušne slinavke. V nasprotju s tem pa naj bi R1162X v homozigotni obliki povzročala le lažjo do zmerno bolezen pljuč (33). Bolnica je nekaj mesecev po testiranju umrla zaradi neobvladane okužbe v pljuči s posledično multiorgansko odpovedjo. Ker so bila pljuča pri bolnici hudo prizadeta (FEV1 29%), sklepamo, da je $\Delta F508$ v kombinaciji z R1162X pomembna pri patogenetskem razvoju dihal.

Pri treh bolnikih smo našli mutacijo le na enem alelu ter s tem nakazali potrebo po nadaljnjih raziskavah za potrditev diagnoze CF.

Ugotovitev $\Delta F508$ v heterozigotni obliki pri 26-letnem bolniku z negativnim izvidom pilokarpinske iontoforeze ne zadošča, čeprav je nujna potrditev diagnoze zaradi možne transplantacije pljuč. Transplantacija pljuč je uveljavljena terapevtska možnost pri bolnikih s hudo napredovalo stopnjo CF. Glede na statistične podatke »International Society for Heart and Lung Transplantation« znaša 3-letno preživetje bolnikov s CF po transplantaciji pljuč 66% (34).

Pri 18-letni bolnici z bronhiektazijami, ki se je zadnje pol leta zdravila zaradi dolgotrajne okužbe dihal, smo ugotovili mutacijo 2789+5G>A. Mutacija povzroči napako prevajanje proteina. Pogosto se pojavlja v južni Evropi, kjer so jo našli v nekaj primerih tudi v homozigotni obliki (35). Z namenom, da bi ugotovili morebitno homozigotno stanje mutacije, smo testirali tudi starše. Mutacijo 2789+5G>A smo našli pri materi, pri očetu pa $\Delta F508$ v heterozigotni obliki. Glede na to, da sta starša brez simptomov, ni verjetno, da bi preiskovanka podedovala dodatno mutacijo, ki je z izvedenim testom tudi nismo našli. Verjetnost, da bolnica nosi mutacijo »de novo«, ki je s testom nismo našli, je prav tako minimalna. Izvid pilokarpinske iontoforeze ni pokazal odstopanj od normale. Z dodatnimi preiskavami smo pri preiskovanki potrdili ABPA. Pri sorojencih, bratu in sestri, ki se vrsto let vodita na naši kliniki zaradi ponavljajočih se okužb dihal, hude funkcionalne prizadetosti dihal ter imata kronično respiracijsko insuficienco, smo ugotovili mutacijo I148T pri sestri ter njenem očetu, medtem ko pri bratu mutacij nismo našli (Sl. 2). Nenavadno je, da ima bolnik potomca, kajti CBAVD je opisana pri kar 95% moških s CF (36). Mutacija I148T, kjer pride do zamenjave izolevcina s treoninom na mestu 148, je bila sprva opisana kot mutacija, ki povzroča v homozigotni obliki težjo klinično sliko (37). Kasnejša literatura navaja, da se I148T pojavlja pogostejše pri asimptomatskih družinskih članah kot pa pri bolnikih s CF, kar postavlja dvom o vlogi I148T kot mutacije (38). Nadalje je I148T pomemben pri patogenezi CF le v cis (spremembi na istem kromosomu) navezi s c3199del6 ali s c3395_3396insA (39, 40). Avtorji nedavne študije pa so dokazali, da c3199del6 ter c3395_3396insA nastopata kot mutaciji lahko tudi samostojno ter menijo, da je I148T verjetno le polimorfizem (41).

Vloga I148T v genu *cfr* pri bolnici ostaja nepojasnjena.

Pri 10 bolnikih nismo dokazali nobene od 29 testiranih mutacij, kar pa diagnoze CF ne izključuje. Ob retrogradni analizi popisov teh bolnikov smo ugotovili, da sta 2 bolnika že imela dokazan deficit IgG oziroma IgA, kar pojasnjuje njuno klinično stanje (št. 9 in 15 v razpredelnici 1). Pri dveh bolnicah (št. 6 in 13 v razpredelnici 1) smo ugotovili ABPA, pri kateri so sicer opisali povečano število mutacij v genu *cfr*, vendar vloga teh mutacij pri patofiziologiji ABPA ni jasna (42, 43). Potrebno pa je vedeti, da je ABPA pogost zaplet CF (44). Ugotavljamo, da je bil glavni razlog za negativni rezultat genetskega testiranja raznolikost klinične slike pri CF ter zato večja verjetnost diferencialnih diagnoz.

Dodatno pa bi negativni rezultat lahko pojasnili tudi z dejstvom, da so atipične oblike CF, ki jih odkrivamo v odrasli dobi, pogostejše povezane z redkimi mutacijami, ki morda niso zajete v panel 29 mutacij, za katere testiramo (11). Pri bolnikih s kliničnim sumom na CF, pri katerih mutacij nismo našli in pri katerih smo izključili možnost drugih diferencialnih diagnoz, kot so npr. imunodeficienca ali okvara ciliarnega aparata, je zato smiselno testiranje celotne sekvence gena, vključno s promotorjem (26).

Glede na rezultate dosedanjih študij o pogostosti mutacij v genu *cftr* v slovenski populaciji in sosednjih državah je ocenjena občutljivost testa CF 29 med 80 in 85% (28, 30). Občutljivost testa je manjša pri atipičnih oblikah CF, ki so pogostejše vezane na redkejšje mutacije, za katere pa ne testiramo (11). V naši študiji nismo zajeli 3 mutacij, ki so specifične za slovensko populacijo in predstavljajo po pogostnosti vsaka po 1% (27, 46–47). Glede na ta odstotek bi bilo smiselno, da jih v prihodnje uvrstimo v testni panel poleg ostalih 29 mutacij.

Zaključki

Genetsko testiranje je pomembna diagnostična pridobitev za postavitve diagnoze CF. Za testiranje se odločamo pri osebah z negativno ali mejno vrednostjo pilokarpinske iontoforeze, pri sumu na atipično CF, ki se pogosto pokaže šele pri odraslih s simptomatiko v dihalih in prebavilih ali s težavami pri plodnosti. Zaradi raznolike klinične slike CF je potrebno izključiti možne diferencialne diagnoze. Če je pred testiranjem verjetnost CF pri bolnikih, pri katerih smo našli samo eno ali nismo našli nobene od 29 testiranih mutacij, velika, bi morali sekvencionirati celoten gen za izključitev redkih mutacij ali polimorfizmov, ki so lahko vpleteni v patogenezo atipične CF.

Literatura

- Andersen D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 1938; 56: 344–9.
- Sant'Agnes PD, Darling R, Perera G, Sheamias E. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance and relationship to disease. *Pediatrics* 1953; 12: 549–63.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059–65.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066–73.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073–80.
- Reddy MM, Quinton PM. cAMP-independent phosphorylation activation of CFTR by G proteins in native human sweat duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C604–13.
- Choi JY, Lee MG, Ko S, Muallem S. Cl(-)-dependent HCO₃⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *JOP* 2001; 2: 243–6.
- Konig J, Schreiber R, Voelcker T, Mall M, Kunzelmann K. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibits ENaC through an increase in the intracellular Cl⁻ concentration. *EMBO Rep* 2001; 2: 1047–51.
- Kunzelmann K, Schreiber R, Boucherot A. Mechanisms of the inhibition of epithelial Na⁺ channels by CFTR and purinergic stimulation. *Kidney Int* 2001; 60: 455–61.
- Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2000 Annual Report. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation. 2001.
- Gilljam M, Ellis L, Corey M, Zielenski J, Durie P, Tullis DE. Clinical manifestations of cystic fibrosis among patients with diagnosis in adulthood. *Chest* 2004; 126: 1215–24.
- Ockenga J, Stuhmann M, Ballmann M, Teich N, Keim V, Dork T, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene, are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2061–7.
- Gross V, Schoelmerich J, Denzel K, Gerok W. Relapsing pancreatitis as initial manifestation of cystic fibrosis in a young man without pulmonary disease. *Int J Pancreatol* 1989; 4: 221–8.
- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332: 1475–80.
- Dork T, Wulbrand U, Richter T, Neumann T, Wolfes H, Wulf B, et al. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet* 1991; 87: 441–6.
- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 1993; 3: 151–6.
- Rozmahel R, Wilschanski M, Matin A, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, et al. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet* 1996; 12: 280–7.
- Welsh MJ, Smith AE. Cystic fibrosis. *Sci Am* 1995; 273: 52–9.
- Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274: 21873–7.
- Dodge JA, Morison S, Lewis PA, Coles EC, Geddes D, Russell G, et al. Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968–95. UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee. *Arch Dis Child* 1997; 77: 493–6.
- Khouri MJ, McCabe LL, McCabe ER. Population screening in the age of genomic medicine. *N Engl J Med* 2003; 348: 50–8.
- Mahadeva R, Webb K, Westerbeek RC, Carroll NR, Dodd ME, Bilton D, et al. Clinical outcome in relation to care in centres specialising in cystic fibrosis: cross sectional study. *BMJ* 1998; 316: 1771–5.
- Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132: 589–95.
- Middleton PG, Geddes DM, Alton EW. Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. *Eur Respir J* 1994; 7: 2050–6.
- Dequer E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goossens M, Pignatti PF, et al. The recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis European Concerted Action on Cystic Fibrosis. *Eur J Hum Gen* 2000; 8: S2–S24.
- Vouk K, Strmecki L, Liovic M, Kopriova S, Micetic-Turk D, Komel R. Mutational analysis of 30 Slovenian cystic fibrosis patients compared to known Slovenian and European CF mutation spectra. *Pflugers Arch* 2000; 439: R63–5.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2503–16.
- Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis—analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517–22.
- Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1997; 10: 135–54.
- Dugueperoux I, De Braekeleer M. The CFTR 3849+10kbC>T and 2789+5G>A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur Respir J* 2005; 25: 468–73.
- Wong LJ, Wang J, Bowman CM. Two novel frame shift mutations of CFTR causing null alleles in a patient with a severe course of CF. *Am J Med Genet* 2001; 102: 389–90.

33. Gasparini P, Borgo G, Mastella G, Bonizzato A, Dognini M, Pignatti PF. Nine cystic fibrosis patients homozygous for the CFTR nonsense mutation R1162X have mild or moderate lung disease. *Med Genet* 1992; 29: 558–62.
34. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Deng MC, Keck BM, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult heart transplant report—2005. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 945–55.
35. Kilinc MO, Ninis VN, Tolun A, Estvill X, Casals T, Savov A, et al. Genotype-phenotype correlation in three homozygotes for cystic fibrosis mutation 2183AA>G shows severe phenotype. *J Med Genet* 2000; 37: 307–9.
36. Dodge JA. Male infertility in cystic fibrosis. *Lancet* 1995; 346: 587.
37. Bozon D, Zielinski J, Rininsland F, Tsui LC. Identification of 4 new mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: I148T, L1077P, Y1092X, 2183AA→G. *Hum Mutat* 1994; 3: 330–2.
38. Strom CM, Huang D, Buller A, Redman J, Crossley B, Anderson B, et al. Cystic fibrosis screening using the College panel platform comparison and lessons learned from the first 20,000 samples. *Genet Med* 2002; 4: 289–96.
39. Monaghan KG, Highsmith WE, Amos J, Pratt VM, Roa B, Friez M, et al. Genotype-phenotype correlation and frequency of the 3199del6 cystic fibrosis mutation among I148T carriers: results from a collaborative study. *Genet Med* 2004; 6: 421–5.
40. Rohlfes EM, Zhou Z, Sugarman EA, Heim RA, Pace RG, Knowles MR, et al. The I148T CFTR allele occurs on multiple haplotypes a complex allele is associated with cystic fibrosis. *Genet Med* 2002; 4: 319–23.
41. Claustres M, Altieri JP, Guittard C, Templin C, Chevalier-Porst F, Des Georges M. Are p.I148T, p.R74W and p.D1270N cystic fibrosis causing mutations? *BMC Med Genet* 2004; 5: 19.
42. Miller PW, Hamosh A, Macek M Jr, Greenberger PA, MacLean J, Walden SM, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 45–51.
43. Marchand E, Verellen-Dumoulin C, Mairesse M, Delaunois L, Brancalone P, Rahier JF, et al. Frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and 5T allele in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest* 2001; 119: 762–7.
44. Mastella G, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Navarro J, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. *Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. Eur Respir J* 2000; 16: 464–71.
45. Audrezet MP, Canki-Klain N, Mercier B, Bracar D, Verlingue C, Ferec C. Identification of three novel mutations (457 TAT→G, D192G, Q685X) in the Slovenian CF patients. *Hum Genet* 1994; 93: 659–62.
46. Glavac D, Ravnik-Glavac M, Dean M. Identification of a rare cystic fibrosis mutation (S4X) in a Slovenian population. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 315–6.
47. Ravnik-Glavac M, Glavac D, Komel R, Dean M. Single-stranded conformation polymorphism analysis of the CFTR gene in Slovenian cystic fibrosis patients detection of mutations and sequence variations. *Hum Mutat* 1993; 2: 286–92.