

DIAGNOSI MOLECOLARE DEL DEFICIT DI ALFA1-ANTITRIPSINA: UN NUOVO METODO BASATO SULLA TECNOLOGIA LUMINEX®

Ottaviani Stefania

Centro per la diagnosi del Deficit ereditario di Alfa1-antitripsina, Laboratorio di Biochimica e Genetica, SC Pneumologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

Il Deficit di Alfa1 antitripsina (DAAT) è una condizione ereditaria sotto diagnosticata caratterizzata da ridotti livelli di Alfa1 antitripsina (AAT) e da un aumentato rischio di sviluppare patologie polmonari e/o epatiche.

L'AAT è codificata dal gene altamente polimorfico SERPINA1. Gli alleli deficitari più comuni sono S e Z, ma sono state descritte più di 150 varianti associate a bassi livelli di proteina. Le varianti diverse da S e Z vengono chiamate "rare"; nel Registro italiano dei pazienti con DAAT le varianti rare costituiscono circa il 10% di tutte le mutazioni riscontrate. In base allo specifico meccanismo molecolare legato ad ogni variante, si possono pronosticare diversi gradi di rischio per patologie respiratorie e/o epatiche; è quindi fondamentale riuscire ad individuarle, in modo da poter migliorare il trattamento dei pazienti

portatori di questi alleli. Nel corso degli anni, sono stati convalidati diversi test per la diagnosi del DAAT ma non esiste un algoritmo universalmente utilizzato dai laboratori di tutto il mondo (1). La diagnosi di laboratorio per il DAAT richiede una combinazione di metodi diversi per eseguire test sia quantitativi che qualitativi; solitamente la prima analisi che si effettua è la determinazione nefelometrica del livello plasmatico di AAT, seguono l'isoelettrofocalizzazione (IEF) per determinare il fenotipo della proteina e la genotipizzazione, ovvero la ricerca dei due alleli deficitari più comuni S e Z.

Per identificare varianti alleliche rare, è necessario il sequenziamento delle regioni codificanti del gene SERPINA1 (2).

Poiché il sequenziamento tradizionale è costoso e richiede molto tempo, nel Centro per la diagno-

Varianti alleliche	Alleli associati
c.187C>T	PI*I
c.194C>T	PI*Mprocida
c.226_228delTTC	PI*Mmalton, PI*Mpalermo, PI*Mnichinan
c.230C>T	PI*Siyama
c.551_552delC	PI*Q0granite falls
c.647G>T	PI*Q0west
c.721A>T	PI*Q0bellingham
c.739C>T	PI*F
c.839A>T	PI*Plowell, PI*Pduarte, PI*Q0cardiff, PI*Ybarcelona
c.863A>T	PI*S
c.1096G>A	PI*Z
c.1130_1131insT	PI*Q0mattawa, PI*Q0ourem
c.1156_1157insC	PI*Q0clayton, PI*Q0Saarbruecken
c.1178C>T	PI*Mheerlen

Tabella 1 - Descrizione delle varianti alleliche e degli alleli associati testati dal test di genotipizzazione AAT



Risultati	Frequenza (%)	Incoerente* (N)	Genotipo finale	Frequenza di sequenziamento (%)
Nessuna variante identificata (MM)	75,7	14	5 PI*Mmwurzburg 3 PI*MV 1 PI*MQ0pordenone 1 PI*MQ0perugia 1PI*Msmunich 3 PI*M new mutation	3,3
MZ	12,4	2	1 PI*ZMwurzburg 1 PI*VZ	0,5
MS	4,1			
ZZ	2,2			
MI	1,7	1	PI*Mwurzburg I	0,2
MMprocida	1,0			
SZ	0,5			
MMmalton	0,5			
MPlowell	0,5			
MMheerlen	0,2			
MF	0,2			
SPlowell	0,2			
ZI	0,2			
ZPlowell	0,2			
ZQ0clayton	0,2			
Invalid Test	0,2			

Tabella 2 - Risultati del test di genotipizzazione AAT GT

* Risultati incoerenti con il fenotipo e l'analisi quantitativa dell' algoritmo standard. Questi campioni sono stati sottoposti a sequenziamento

si del Deficit ereditario di Alfa1-antitripsina di Pavia abbiamo voluto valutare l'accuratezza del test di genotipizzazione AAT (AAT GT) utilizzando la tecnologia Luminox®. I vantaggi sono: la possibilità di identificare e genotipizzare contemporaneamente 14 varianti deficitarie (tabella 1) del gene SERPINA1 (compresi gli alleli S e Z) e la possibilità di effettuare l'analisi da campione di DNA estratto sia da sangue venoso, sia da saliva prelevata con tampone boccale (Buccal FLOQSwab™).

Le 14 varianti patologiche sono state scelte dal produttore includendo le più frequenti (S, Z, M_{Malton}, M_{Procida}) e alcune altre varianti ultra rare, per offrire una copertura mondiale. Un totale di 418 campioni consecutivi arrivati presso il nostro laboratorio per sospetto DAAT tra gennaio e aprile 2016 sono stati analizzati appli-

cando sia l'algoritmo diagnostico attualmente in uso, che il test AAT GT.

Il saggio ha dato questi risultati: 101 campioni erano positivi per almeno una delle 14 varianti deficitarie, 316 erano negativi per tutte le varianti analizzate. Un solo campione ha dato un risultato non valido. Le mutazioni identificate hanno mostrato una correlazione del 100% con i risultati ottenuti con il nostro algoritmo diagnostico. Tra le 14 varianti incluse nel test, alcune (come Siyama e Q0west) sono completamente assenti nella popolazione Europea. Al contrario, mutazioni che si riscontrano frequentemente nella popolazione di origine caucasica (come Mwurzburg e V) non sono incluse nel pannello del kit. Di conseguenza, in alcuni casi (4%) è stato necessario sequenziare il gene SERPINA1 per identificare altre mutazioni rare non riscon-



trabili con il nuovo test, correlate a livelli più bassi di proteina o bandeggi anomali all'IEF (tabella 2). Nonostante ciò, abbiamo calcolato che il test AAT GT può permetterci di diminuire il numero di campioni da sequenziare e, di conseguenza, di ridurre i tempi di diagnosi. In conclusione, **il test di genotipizzazione**

AAT GT si è rivelato essere altamente affidabile e accurato. Inoltre, i risultati ottenuti sono di facile interpretazione e i tempi diagnostici più brevi. L'eventuale personalizzazione delle varianti del kit in base al paese utilizzatore potrebbe aumentarne l'efficienza diagnostica.

Bibliografia

1. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. Eur Respir J. 2010;35(5):960-968.
2. Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, et al. Laboratory diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency. Transl Res. 2007;150(5):267-274.

