

VARIANTI RARE DELL'ALFA-1 ANTITRIPSINA E IMPORTANZA DELLO SCREENING

Mario Malerba^{1,2}

¹ Professore di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Dipartimento di Medicina Traslazionale, Scuola di Medicina, Università del Piemonte Orientale, Novara

² Direttore SCU Pneumologia Ospedale S. Andrea, Vercelli

ASPETTI GENERALI DEL DEFICIT DI ALFA-1 ANTITRIPSINA

Il deficit di alfa-1 antitripsina (DAAT) è una condizione ereditaria rara che viene trasmessa come carattere autosomico co-dominante (con penetranza variabile), caratterizzata da ridotti o assenti livelli sierici di alfa-1 antitripsina (AAT), che spesso risulta anche funzionalmente alterata (1). L'AAT è una glicoproteina sierica, prodotta a livello epatico con attività anti-proteasica protettiva a livello polmonare, attraverso l'inibizione dell'elastasi neutrofila prodotta dai leucociti durante i processi infettivi/flogistici polmonari e dal fumo di sigaretta (2). Bassi livelli sierici di AAT e l'assenza del picco delle alfa-1 globuline al quadro proteico elettroforetico, devono far sospettare il deficit e portare alla conferma genetica. Il DAAT determina un incremento del rischio di sviluppare patologie polmonari, come la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) in particolare il fenotipo clinico-radiologico di enfisema polmonare, ma anche malattie epatiche, quali l'epatopatia cronica e la cirrosi, e più raramente manifestazioni cutanee (3,4). Pertanto, il DAAT rappresenta la principale causa di enfisema geneticamente determinato. Si stima che il 2-5% dei pazienti con BPCO possano essere affetti da DAAT, tuttavia, ad oggi, esso resta ancora ampiamente sotto-diagnosticato, quindi risulta estremamente importante sul piano pratico, eseguire come metodica di screening del DAAT il dosaggio sierico di AAT in soggetti potenzialmente deficitari (5,6).

La proteina AAT normale è chiamata M ed è prodotta in quantità sufficienti da svolgere un'azione anti-proteasica protettiva a livello polmonare. Le due varianti deficitarie più comuni sono chiamate Z ed S. La variante Z viene sintetizzata in quantità minore rispetto alla variante M, si ripiega in modo scorretto negli epatociti che la producono e polimerizza a livello epatico; per questo motivo viene rilasciata in misura minore nel plasma (7). L'accumulo di AAT Z nel fegato può anche causare epatopatia. I pazienti omozigoti per la mutazione Z ovvero con genotipo ZZ (PI*ZZ, dove PI significa *Protease Inhibitor*, il nome comunemente utilizzato per il gene che codifica per AAT) hanno l'80-95% di AAT in meno rispetto ai soggetti normali, mentre i pazienti eterozigoti per questa mutazione (PI*MZ) hanno il 50-80% dei livelli normali di AAT (8). La variante S è meno grave della Z; i pazienti omozigoti per questo allele (PI*SS) hanno livelli plasmatici di AAT inferiori alla norma e sono predisposti a sviluppare enfisema polmonare, ma non epatopatia. I pazienti eterozigoti per l'allele S (PI*MS), invece, hanno livelli plasmatici di AAT pressoché a valori di normalità. Un altro genotipo patologico è PI*SZ (un allele S e un allele Z), con livelli di AAT plasmatica del 25-40% del normale ed anche con un aumentato rischio di sviluppare enfisema polmonare ed epatopatia. Ci sono inoltre oltre 100 varianti patologiche deficitarie rare, come I, P, F, Mlike, Null (Q0), le quali conferiscono vari gradi di deficit e di rischio di sviluppare patologia polmonare e/o epatica associata (Tabella 1) (9,10).

	Varianti	Genotipo	Significato clinico
Normale	Omozigote varianti normali	PI*MM (PI*M1M1, PI*M1M2, PI*M2M3)	Soggetto non deficitario
Deficit Intermedio	Eterozigote	PI*MS, PI*MV	Deficit di AAT lieve. Non elevato rischio di sviluppare patologia polmonare e/o epatica
	Eterozigote	PI*MZ, PI*MMmalton, PI*MPowell, PI*MQ0	Deficit di AAT moderato, può sviluppare patologia polmonare, più raramente epatica
Deficit severo	Omozigote varianti deficitarie – Doppio eterozigote	PI*ZZ, PI*SZ, PI*ZQ0, PI*ZMmalton, PI*Q0Q0	Deficit di AAT da moderato a severo, a rischio di patologie epatica e/o polmonare, consigliata l'analisi familiare

Tabella 1 - Classificazioni delle varianti genotipiche e fenotipiche nel DAAT



ASPETTI DIAGNOSTICI

Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la BPCO è la terza causa di morte nel mondo, responsabile di circa il 6% dei decessi totali, ed il DAAT probabilmente contribuisce a circa l'1-2% di tutti i casi di BPCO. Come per altre condizioni che portano a malattia rara, il DAAT è ampiamente sotto-diagnosticato a causa del basso livello di consapevolezza della sua esistenza. Pertanto, la prima questione da affrontare è sollevare il sospetto quando si notano tempestivamente le sue caratteristiche patologiche (11).

La raccomandazione contenuta nel memorandum dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 1997, riaffermata nel documento dell'*European Respiratory Society* (ERS) del 2017 (3), è quella che ogni paziente con diagnosi di BPCO o asma ad esordio in età adulta sia sottoposto ad indagini di primo livello (dosaggio AAT su sangue periferico) per DAAT. Inoltre, i pazienti con bronchiectasie, malattie epatiche di origine sconosciuta, pannicolite o vasculite c-ANCA+ dovrebbero essere sottoposti anche a test specifici per DAAT secondo la Fondazione USA Alpha1 e le linee guida ATS/ERS del 2003 (12). I sintomi respiratori ed epatici sono associati ad alcuni genotipi, in particolare al genotipo Pi*ZZ, poiché Z è l'allele patogeno più comune, e di conseguenza la maggior parte delle conoscenze relative al DAAT provengono da casistiche di soggetti Pi*ZZ.

L'elettroforesi delle proteine sieriche (SPE) è un'indagine a basso costo per controlli di routine o per diagnosticare diverse altre condizioni. Nella SPE possiamo distinguere diverse frazioni proteiche sieriche: dopo il primo picco, corrispondente all'albumina, il secondo picco è dovuto ad un gruppo di proteine globulari del plasma chiamate "alfa-1 globuline", fornite principalmente dall'AAT. Pertanto, la riduzione o le anomalie in questo picco dovrebbero far sorgere il sospetto di deficit o varianti di DAAT.

Le indagini diagnostiche di primo livello nel sospetto di DAAT prevedono la misurazione del livello di AAT nel sangue periferico. Questo test è ampiamente disponibile nella maggior parte dei laboratori clinici, è di basso costo e viene eseguito prevalentemente mediante nefelometria. Tuttavia, è considerato un indicatore insufficiente se utilizzato da solo, poiché l'AAT è una proteina della fase acuta e i suoi livelli possono aumentare in risposta a infiammazioni, infezioni o lesioni. Per questo motivo, è indicato misurare l'AAT in combinazione con i livelli di proteina C-reattiva (PCR), l'indicatore di infiammazione più comunemente utilizzato. Quando si esclude una fase acuta sottostante, i livelli di AAT possono essere considerati normali se sono > 110 mg/dL (quando misurati con metodo nefelometrico). Il cut-off dell'AAT impostato da ciascun laboratorio varia e general-

mente è compreso tra 100 mg/dL e 120 mg/dL. Un cut-off decisionale ottimale di 110 mg/dL può discriminare tra Pi*MM e qualsiasi altri genotipi portatori di almeno un allele S o Z, con una sensibilità del 78,3% e una specificità dell'86,4%. Nei pazienti con livelli normali di PCR e livelli ridotti di AAT \leq 110 mg/dL, dovrebbero essere eseguite indagini di secondo livello, tra cui la genotipizzazione e – se necessario – il sequenziamento genico. Oggi l'esame ritenuto *gold standard* è la genotipizzazione, eseguita per rilevare quei difetti di sequenza per i quali è stato progettato un *primer* specifico (13). Anche se alcuni kit recentemente commercializzati sono in grado di rilevare diverse varianti, per rivelare la presenza di genotipi rari è necessario il sequenziamento del gene. Una volta identificato un paziente con DAAT, le linee guida internazionali indicano di indagare anche i consanguinei di primo grado con o senza sintomi respiratori, che potrebbero beneficiare di uno screening familiare.

ESPERIENZA DELL'AMBULATORIO DELLE MALATTIE RARE DELLA SCDU PNEUMOLOGIA DI VERCELLI. IL RUOLO ED IL BENEFICIO DELLO SCREENING PER VARIANTI RARE DI AAT

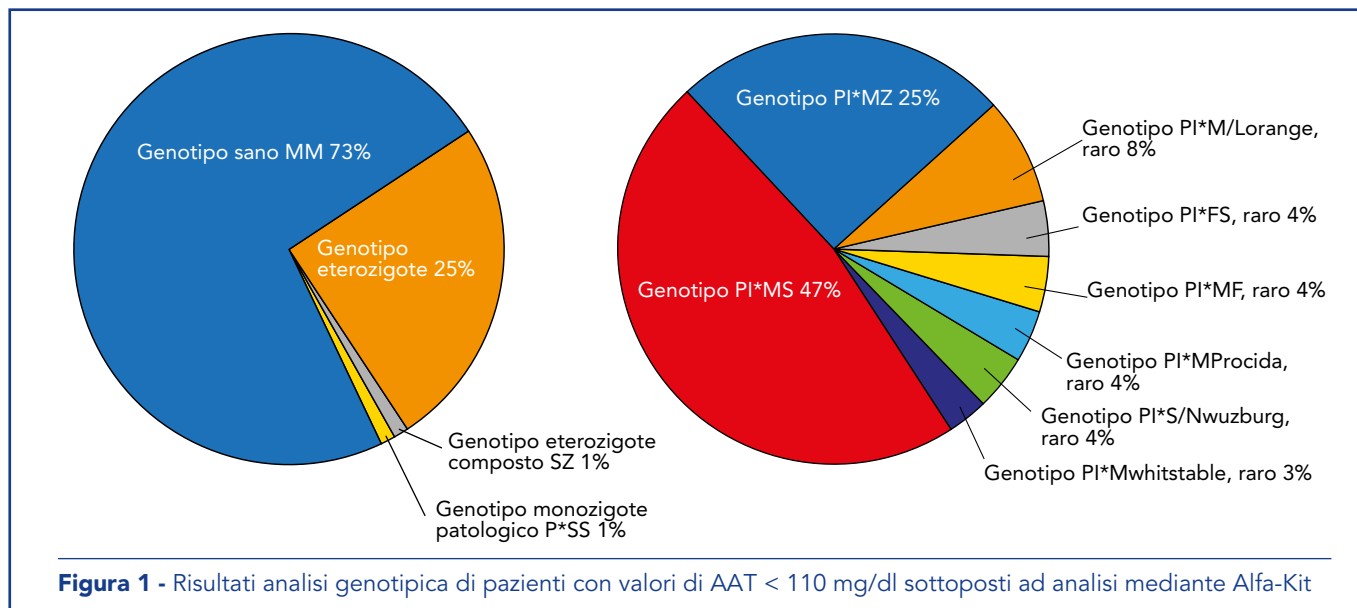
Dal 2018 eseguiamo il dosaggio dell'AAT ai pazienti con diagnosi di asma bronchiale, bronchiectasie, BPCO con fenotipo bronchite cronica e BPCO con fenotipo enfisema polmonare. Circa 400 pazienti affetti da queste patologie tra ricoverati e ambulatoriali hanno eseguito lo screening, i cui risultati sono riportati nella Figura 1. Nella maggior parte dei casi i valori di AAT sono risultati normali; 93 pazienti hanno dimostrato valori di AAT < 110 mg/dl e hanno eseguito analisi fenotipica e poi genotipica con AlphaKit, un kit specifico e utile a raccogliere campioni di sangue secco su cui fare l'indagine genetica per il DAAT in laboratori specializzati.

I risultati delle indagini vengono inviati al medico dell'ambulatorio delle malattie rare del Reparto di PNM Vercelli ed ai pazienti tramite e-mail.

I pazienti vengono successivamente convocati in ambulatorio e informati dell'esito.

Le tecniche di genotipizzazione permettono l'identificazione delle varianti alleliche più diffuse (Z e S), ma anche delle varianti più rare. Questi alleli possono comunque essere riconosciuti tramite sequenziamento, un particolare tipo di genotipizzazione che permette di conoscere l'intera sequenza di DNA. La mutazione MWurzburg rappresenta una delle varianti rare più frequenti nella popolazione caucasica. È una variante deficitaria considerata polimerogenica che determina principalmente enfisema polmonare. Il paziente eterozigote presenta una quantità di proteina nel range di normalità in circolazione che talora non garantisce la "normale protezione" con-





tro agenti esterni quali fumo di sigaretta e/o esposizione professionale e/o agenti microbici. Pertanto, il paziente eterozigote presenta un dosaggio sierico di alfa-1 antitripsina ridotto, ma in un range considerato di "rischio intermedio" per lo sviluppo di segni e sintomi riconducibili al suo genotipo. La sintomatologia in questi pazienti può essere misconosciuta per lungo tempo e la diagnosi può essere molto tardiva. Il ritardo diagnostico dai dati del registro italiano risulta di circa 8-9 anni ed è superiore ai dati noti per Stati Uniti e Germania (circa 6 anni). Tali dati indicano la necessità di promuovere maggiore sensibilizzazione verso questa condizione genetica. Va considerato come la stessa combinazione allelica possa dare luogo a diversi fenotipi clinici, anche a causa della variabilità delle interazioni gene-ambiente. In letteratura, la maggior parte degli studi sul deficit intermedio di alfa-1 antitripsina si focalizza sui soggetti PI*MZ. Dai dati esistenti emerge che vi sono sicuramente fattori non noti ad oggi che modulano l'espressione della proteina. Vi sono studi che hanno documentato la possibile azione di geni modificatori, il che potrebbe spiegare quadri clinici differenti, di diversa gravità, in pazienti con una stessa mutazione o con mutazioni rare. Inoltre, in questi soggetti il fumo di sigaretta svolge indubbiamente un effetto modificatore importante, dal momento che è stato evidenziato un aumentato rischio di sviluppare BPCO nei soggetti PI*MZ fumatori, rispetto ai non fumatori. La diagnosi precoce in questi pazienti è pertanto essenziale per evitare l'esposizione al fumo o fornirne una motivazione ulteriore alla cessazione per ridurre il rischio di danno polmonare. Infine, è necessario che il dosaggio dell'alfa-1 antitripsina sia effettuato in tutti i pazienti asmatici e

affetti da BPCO almeno una volta nella vita, come raccomandato dall'OMS. L'identificazione di questa condizione consentirebbe nel caso appropriato eventuale terapia sostitutiva con alfa-1 antitripsina umana. Tra le oltre 120 varianti conosciute del gene che codifica AAT è presente la variante fenotipica P con frequenza relativamente elevata in alcune popolazioni. In particolare, la proteina P Lowell si presenta con la sostituzione dell'amminoacido Asp-256Val, derivata da una mutazione nell'esone 3, che va incontro ad una rapida degradazione con conseguente riduzione dei livelli sierici. Studi hanno dimostrato che soggetti in omozigosi PP (PlowellPlowell) sono ad alto rischio di sviluppare patologia polmonare, in particolare enfisema. Ultimamente abbiamo individuato tramite lo screening per il DAAT un paziente risultato eterozigote per l'allele deficitario raro Mwhitstable (g.11640del26bp, insGG). Il dato è risultato consistente con i bassi livelli plasmatici di AAT, in accordo con un deficit intermedio di proteina e, trattandosi di variante Mwhitstable, appartiene al gruppo Mlike (14,15).

AREE DI MIGLIORAMENTO

Nell'ambulatorio di Pneumologia la ricerca del DAAT ha un duplice scopo:

1. Individuare i rari casi omozigoti per varianti deficitarie (ZZ, SS, Q0 Q0) e gli eterozigoti per varianti deficitarie che presentano un deficit da grave a moderato rischio di patologia polmonare, per cui è indicata la terapia sostitutiva con inibitore di alfa-1 proteinasi umana ed è, inoltre, consigliato screening familiare per AAT (16).
2. Individuare i fenotipi eterozigoti con singolo allele deficitario (MZ, MS, MMalton, ed altre varianti



rare), come illustrato in Figura 1, che presentano generalmente un deficit da lieve a moderato, ma che possono sviluppare patologia polmonare e più raramente epatica.

CONCLUSIONI

La nostra esperienza ci ha insegnato che perseverare nella individuazione dei soggetti potenzialmente deficitari di AAT, anche anziani, ha prodotto un ottimo risultato diagnostico, che si è riflesso su una efficace ed efficiente gestione del paziente con DAAT. Ciò consente anche di identificare un percorso di follow-up appropriato in condivisione con il MMG che in questo modo ha la possibilità di avvicinarsi e conoscere meglio questa attraente ma anche insidiosa patologia. In tal modo è possibile

attuare il metodo della «medicina di attenzione o di iniziativa» e non quello della «medicina di attesa». La migliore opportunità che abbiamo per curare al meglio il DAAT è quella di incrementare la capacità di individuare la malattia da parte dei professionisti sanitari, in modo tale che i soggetti con DAAT possano essere indirizzati verso gli specialisti pneumologi collegati a gruppi multidisciplinari in Centri di Malattie Rare del Polmone. Bisogna conoscere il DAAT per riconoscerlo, poiché è più comune di quanto si pensi (a tutte le età).

«Se ad Itaca tu volgi la tua rotta, dovrai augurarti che il viaggio sia lungo, ricco di prove e ricco di esperienze» K KAVAFIS 1897 - 1933

Bibliografia

1. Orpha.net. Alpha 1 antitrypsin deficiency; 2022 [Internet]. Available from: https://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=60.
2. Ferrarotti I, Ottaviani S, De Silvestri A, Corsico AG. Update on α 1-antitrypsin deficiency. *Breathe (Sheff)* 2018;14:e17–24.
3. Miravittles M, Dirksen A, Ferrarotti I, Koblizek V, Lange P, Mahadeva r, et al. European Respiratory Society statement: diagnosis and treatment of pulmonary disease in α 1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2017;50:1700610.
4. Dummer J, Dobler CC, Holmes M, Chambers D, Yang IA, Parkin L, et al. Diagnosis and treatment of lung disease associated with alpha one-antitrypsin deficiency: A position statement from the Thoracic Society of Australia and New Zealand. *Respirology* 2020;25:321–35.
5. Cronin T, Rasheed E, Naughton A, McElvaney NG, Carroll TP, Crowley VE, et al. Serendipitous detection of α 1-antitrypsin deficiency: a single institution's experience over a 32 month period. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:e293–5.
6. Scarlata S, Santangelo S, Ferrarotti i, Corsico AG, Ottaviani S, Finamore P, et al. Electrophoretic α 1-globulin for screening of α 1-antitrypsin deficient variants. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1837–45.
7. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J* 2010;35:960–8.
8. McElvaney NG. Diagnosing α 1-antitrypsin deficiency: how to improve the current algorithm. *Eur Respir Rev* 2015;52–7.
9. Balbi B, Benini F, Corda L, Corsico A, Ferrarotti I, Gatta N; IDA Group. An Italian expert consensus on the management of alpha1-antitrypsin deficiency: a comprehensive set of algorithms. *Panminerva Med* 2022;64:215–27.
10. Ottaviani S, Barzon V, Buxens A, Gorrini M, Larruskain A, El Hamss r, et al. Molecular diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: A new method based on Luminex technology. *J Clin Lab Anal* 2020;34:e23279.
11. Strnad P, McElvaney NG, Lomas DA. Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *N Engl J Med* 2020;382:1443–55.
12. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester c, et al.; ATS/ERS Task Force on Pulmonary Rehabilitation. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:e13–64.
13. Greene CM, Marciniak SJ, Teckman J, Ferrarotti I, Brantly ML, Lomas DA, Stoller JK, McElvaney NG. α 1-Antitrypsin deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Jul 28;2:16051.
14. Malerba M, Ragnoli B, Radaeli A Exhaled nitric oxide levels in alpha-1-antitrypsin PiMZ subjects. *J Intern Med*. 2009 Mar;265(3):382-7.
15. M Malerba 1, F Ricciardolo, A Radaeli, C et al Neutrophilic inflammation and IL-8 levels in induced sputum of alpha-1-antitrypsin PiMZ subjects. *Thorax* . 2006 Feb;61(2):129-33.
16. Fraughen DD, Ghosh AJ, Hobbs BD et al. Augmentation therapy for severe Alpha1 antitrypsin deficiency improves survival and is decoupled from spirometric decline. A multinational registry analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2023.

