

## Diagnosi di laboratorio del deficit ereditario di $\alpha$ 1-antitripsina

Ilaria Ferrarotti, Marina Gorrini, Roberta Scabini, Maurizio Luisetti

Centro per la Diagnosi del Deficit Ereditario di  $\alpha$ 1-Antitripsina, Clinica di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

### ABSTRACT

**Laboratory diagnosis for inherited  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency.** The laboratory diagnosis of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency has evolved over the last 40 years, since the first cases of the disorder were reported. It is currently performed in specialized centres requiring a combination of different biochemical methods: immunochemical measurement of serum  $\alpha$ 1-antitrypsin concentrations, isoelectric focusing, genotyping, and sequencing. The availability of specimens, such as the dried blood spot, have facilitated the implementation of laboratory analyses for  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency, but have also challenged laboratories to develop more reliable and reproducible techniques starting from dried blood. In this report we briefly review the whole matter and describe the diagnostic flow chart for  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency detection that we have developed in an attempt to provide useful information for physicians and scientists involved in this diagnostic setting.

### INTRODUZIONE

Il deficit di  $\alpha$ 1-antitripsina (AATD) è una malattia autosomica recessiva, che aumenta il rischio di sviluppare vari tipi di patologie tra le quali, di maggior rilievo sociale, quella polmonare [broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), enfisema], e quella epatica (cirrosi, carcinoma epatico) (1). L' $\alpha$ 1-antitripsina (AAT) è una glicoproteina monomerica che appartiene alla famiglia delle Serpine (SERpine Protease INhibitors). Il gene codificante (SERPINA1 o PI-Protease Inhibitor) ha una dimensione di 12,2 kb, è situato sul cromosoma 14 in posizione q31-32.3 ed è organizzato in sette esoni, 4 dei quali codificanti (II, III, IV, V) e 3 non codificanti (Ia, Ib, Ic). La proteina codificata comprende 394 amminoacidi, con il sito attivo corrispondente alla metionina 358-serina 359 (2). Essendo una serpina, l'AAT inibisce una serie di serina-proteasi, ma il bersaglio principale è l'elastasi neutrofila (NE), un enzima rilasciato dai neutrofili responsabile della proteolisi di molti componenti della matrice extracellulare, tra cui l'elastina. Quando i neutrofili vengono attivati, l'elastasi neutrofila viene rilasciata nel tessuto polmonare, dove, se non inibita, svolge l'azione proteolitica. Le concentrazioni plasmatiche fisiologiche di AAT (100-200 mg/dL con misurazione immunonefelometrica) sono sufficienti per proteggere i polmoni dall'attacco di NE, grazie all'interazione tra i siti attivi delle due proteine che ne determina l'inattivazione (interazione suicida) (3). La patogenesi del AATD è direttamente correlata alle mutazioni del gene SERPINA1, che è altamente polimorfico. Sono state infatti identificate più di 120 varianti genetiche strettamente associate a specifiche concentrazioni plasmatiche della proteina che vengono così ereditate in maniera codominante (4). Per ragioni cliniche, le varianti di AAT sono state classificate in tre gruppi principali (5): varianti normali (caratterizzate da concentrazioni plasmatiche di AAT entro i limiti di

riferimento della popolazione generale), varianti deficitarie (caratterizzate da ridotte concentrazioni plasmatiche ed associate ad un aumentato rischio di sviluppo di patologie polmonari ed epatiche), e varianti "null" (indicate come Q0, caratterizzate da concentrazioni plasmatiche non rilevabili ed associate ad un elevato rischio di enfisema).

Le due varianti deficitarie più comuni nella popolazione caucasica sono PI\*S e PI\*Z. La maggior prevalenza di variante PI\*Z è stata riscontrata nei paesi europei nord-occidentali (frequenza genica media 0,014) con punte in Scandinavia meridionale, Danimarca e Paesi Bassi. La prevalenza di PI\*Z diminuisce gradualmente attraverso i paesi europei in direzione nord-ovest sud-est. La distribuzione di PI\*S è invece più omogenea rispetto a quella di PI\*Z. La frequenza maggiore di PI\*S è stata trovata nell'Europa meridionale (frequenza genica media 0,056), con picchi nella penisola iberica (frequenza genica >0,14). La prevalenza di PI\*S diminuisce seguendo il gradiente sud-ovest nord-est (6). Recentemente sono stati analizzati tutti i dati disponibili sulla distribuzione geografica di AATD (7). Partendo dalla teoria ampiamente accettata che l'AATD ha avuto origine nella popolazione europea (8), gli Autori hanno voluto allargare le analisi a tutta la popolazione mondiale, considerando anche le differenze etniche nella prevalenza dell'AATD. Considerando le frequenze geniche di PI\*S e PI\*Z riportate in letteratura e in numero di individui nella popolazione generale nei vari paesi, De Serres ha calcolato le stime mondiali dei soggetti affetti da AATD intermedio (portatori) e dei soggetti ad alto rischio di sviluppare patologia polmonare e/o epatica in associazione con AATD (PI\*ZZ, PI\*SZ) (7). Sebbene tale approccio incorpori potenziali confondenti, le stime complessive di circa 116.000.000 individui portatori e 1.100.000 soggetti con severo AATD lasciano attoniti. Di certo questi studi epidemiologici sottolineano la ampia divergenza esistente tra i dati osservati e quelli attesi e

indicano quanto una malattia rara come l'AATD sia, in realtà, una condizione sottodiagnosticata e uno dei più comuni disordini ereditari gravi a livello mondiale.

Nonostante il notevole impegno nell'identificare nuovi casi di AATD, è piuttosto evidente che attualmente solo una porzione di soggetti affetti sono stati riconosciuti. Tra le varie cause che rendono questa patologia sottodiagnosticata, la principale è senza dubbio la sua classificazione come BPCO che, confondendosi per ciò che attiene il fenotipo clinico con la grande maggioranza di soggetti BPCO con livelli normali di AAT, ritarda la diagnosi di AATD. Un recente lavoro ha analizzato l'esperienza diagnostica di oltre 1000 pazienti di AlphaNet (quasi un terzo di tutti i pazienti AATD sintomatici negli Stati Uniti), rilevando che negli ultimi 35 anni non è avvenuto alcun miglioramento nella diagnosi precoce di AATD (9). Negli ultimi anni alcuni documenti hanno enfatizzato l'importanza del ruolo dei programmi di screening sull'intera popolazione per identificare i soggetti affetti da AATD, affinché questi possano venire arruolati nei registri nazionali e internazionali di AATD, per una miglior comprensione della storia di questa patologia (10). La disponibilità della terapia sostitutiva per gli individui affetti da BPCO associata ad AATD ha spinto e incoraggiato la comunità scientifica a stabilire e rafforzare i programmi di screening nei paesi sviluppati e nell'implementazione dei vari registri nazionali di AATD. Per migliorare le procedure diagnostiche e per diminuire la discrepanza tra i casi di AATD attesi e diagnosticati, il documento di consenso dell'"American Thoracic Society-European Respiratory Society" (ATS-ERS) raccomanda l'esecuzione di esami diagnostici per pazienti adulti sintomatici con enfisema, BPCO o asma con ostruzione incompleta e reversibile delle vie aeree, individui con inspiegabile patologia epatica, individui asintomatici ma con ostruzione persistente delle vie respiratorie, diagnosticata sulla base di prove di funzionalità respiratoria, ed esposti a fattori di rischio (fumo di sigaretta, esposizione a polveri), e adulti con pannicolite necrotizzante (5).

## METODI BIOCHIMICI PER LA DIAGNOSI DI AATD

Il parametro più importante per la dimostrazione della presenza di AATD, ed in particolare della presenza del rischio di un danno polmonare, è la misurazione delle concentrazioni plasmatiche della proteina (11). Tuttavia, la precisa caratterizzazione degli alleli deficitari di cui i pazienti AATD sono portatori può facilitare la valutazione del rischio di patologia epatica: gli alleli "null" non rappresentano un indice del rischio dello sviluppo di un'epatopatia, mentre l'identificazione degli alleli associati con la polimerizzazione dell'AAT, come Z o Mmalton (12), potrebbero indicare la necessità di un'accurata indagine epatica.

Dalla prima descrizione del difetto nel 1963, basata su elettroforesi su carta, elettroforesi su gel d'amido ed immunoelettroforesi, la diagnosi di laboratorio di AATD si è evoluta fino alle metodiche odierne. Attualmente, la

diagnosi di AATD viene effettuata in vari centri specializzati presenti in tutto il mondo e richiede la combinazione di differenti metodologie diagnostiche: determinazione della concentrazione sierica della proteina, fenotipizzazione, genotipizzazione ed in alcuni casi il sequenziamento della porzione codificante del gene (13). Ciascun centro di diagnosi conduce lo screening dei soggetti e quindi la diagnosi della patologia seguendo varie strategie (14-20).

Il tipo di campione attualmente richiesto per la diagnosi di AATD è il sangue intero per l'analisi delle concentrazioni proteiche e del fenotipo tramite isoelettrofocalizzazione (IEF), e il DNA per la genotipizzazione. L'utilizzo di sangue intero, se da una parte può costituire un vantaggio per il personale del laboratorio, in quanto sia l'estrazione di DNA che l'ottenimento di plasma sono metodiche di estrema semplicità, dall'altra risulta poco pratico, soprattutto per la difficoltà di conservazione e spedizione del campione su lunghe distanze. Negli ultimi anni ha riscontrato vasto consenso l'utilizzo di gocce di sangue adsorbite su carta da filtro speciale (Whatman 903), note come DBS ("dried blood spot"); questo campione ha il vantaggio di facilitare la conservazione e la spedizione del campione al laboratorio diagnostico, favorendone così l'utilizzo nei programmi di screening per AATD (14,15,18,20). La determinazione della concentrazione plasmatica di AAT viene per lo più eseguita con tecnica immunonefelometrica, anche se in alcuni centri la misurazione quantitativa della proteina viene ancora effettuata utilizzando l'immunodiffusione radiale, che però tende a sovrastimare la concentrazione dell'AAT del 35-40% (5). Questo problema è stato risolto negli Stati Uniti con l'adozione di un "National Heart, Lung, and Blood Institute" standard, con valori espressi in  $\mu\text{mol}$  (21), ma in Europa l'uso di questo materiale non è molto diffuso.

Dal punto di vista qualitativo, alla fenotipizzazione tramite IEF, raccomandata come metodo di elezione dal documento di consenso ATS/ERS (5), viene preferita l'analisi genotipica delle varianti deficitarie più comuni S e Z attraverso metodi basati sull'amplificazione tramite "polimerase chain reaction" (PCR) delle regioni genomiche e successiva digestione degli amplimeri con enzimi di restrizione (14,22) oppure utilizzando coppie di sonde fluorimetriche che in analizzatori "lightcycler" permettono l'identificazioni delle varianti in base all'analisi del punto di melting di una delle due sonde (15). In alcuni laboratori l'utilizzo della fenotipizzazione segue la genotipizzazione per dirimere casi dubbi o confermare i risultati ottenuti (14,16,17,20). L'utilizzo delle metodiche DGGE ("denaturing gradient gel electrophoresis") per la rivelazione di mutazioni sul gene SERPINA1 non sembra del tutto abbandonato (23), ma questa tecnica ha lo svantaggio di non caratterizzare le diverse varianti, che quindi devono essere poi identificate attraverso il sequenziamento del gene. Infine, alcuni laboratori ritengono necessario il sequenziamento parziale del gene per identificare varianti rare e soprattutto le varianti "null" (14,20).

## Metodiche di laboratorio

### Preparazione del DBS

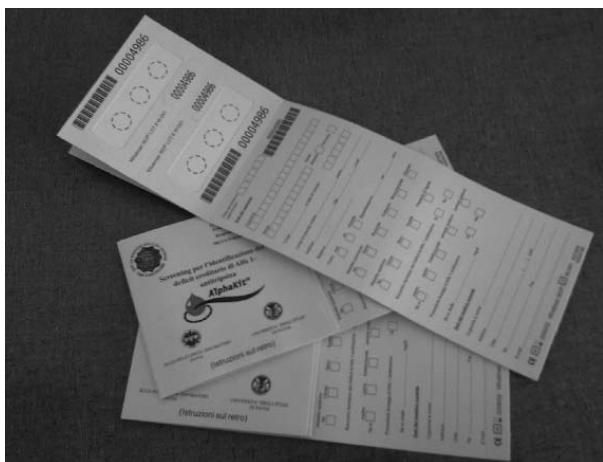
Nel programma italiano di screening di AATD nel 2006 è stato introdotto l'AlphaKit™ (Schleicher & Schuell), costituito da una scheda per la registrazione dei dati anagrafici e clinici del soggetto e da una speciale carta assorbente (Whatman 903), sulla quale sono disegnati sei cerchi aventi ciascuno un diametro di 13 mm (Figura 1). Per una corretta analisi, tali cerchi devono essere riempiti con il sangue intero del soggetto ed asciugati a temperatura ambiente per almeno 12 ore. I campioni così ottenuti possono essere conservati a temperatura ambiente e spediti al laboratorio.

### Misurazione immunonefelometrica della concentrazione plasmatica di AAT

Da ciascun campione di DBS viene ricavato un dischetto di 6 mm di diametro, utilizzando l'apposito apparecchio Wallac DBS Puncher (Perkin Elmer), che viene eluito in 266 µL di acqua distillata sterile e tenuto a temperatura ambiente per una notte. Dall'eluato così ottenuto viene prelevato un volume di circa 200 µL utilizzato per la misurazione immunonefelometrica (24).

### Isoelettofocalizzazione

L'IEF viene utilizzata per l'identificazione dei fenotipi dell'AAT. Il bandeggio dell'AAT (fenotipo elettroforetico) consiste in otto bande a diverso pI. L'eterogeneità del pI dell'AAT dipende dal numero, dal tipo e dalla sede delle catene carboidratiche laterali e da modifiche nella sequenza dei primi amminoacidi della struttura primaria. Di conseguenza, ogni variante appare con un bandeggio specifico. Per la separazione delle bande caratteristiche di ciascuna variante dell'AAT il range di pH scelto è 4,2-4,9. Tale gradiente di pH viene creato mediante l'utilizzo



**Figura 1**  
AlphaKit™ utilizzato nel programma nazionale per la raccolta del campione di sangue per lo screening del deficit ereditario di  $\alpha$ 1-antitripsina.

di due anfoline (Pharmalyte™ 4,2-4,9, 3,75% GE - HealthCare BioSciences - Servalyt 4-5, 1,25%, Serva) in un gel di poliaccrilammide (glicerolo 10%; acido N-(2-acetoamido)-2-aminoetansolfonico (ACES) 0,02 mol; bis-acrilammide 0,15%; acrilammide 4,86%). Per ciascun campione viene utilizzato un dischetto da 6 mm, diluito in 30 µL di acqua deionizzata. La metodica è stata descritta in precedenza (20). Accanto ai campioni da fenotipizzare vengono caricati, come riferimento, controlli a fenotipo noto (M1M2, MS e MZ). Nel caso si sospetti la presenza di varianti rare, il campione viene ripetuto accanto ad opportuni controlli.

### Genotipizzazione

Per l'estrazione del DNA da un disco di 6 mm viene utilizzato il kit "Genomic DNA from tissue" (Macherey-Nagel). La genotipizzazione delle due varianti deficitarie S e Z viene eseguita tramite PCR-restriction fragment length polymorphism secondo il metodo descritto precedentemente (22).

### Sequenziamento

Gli esoni codificanti del gene SERPINA1 vengono sequenziati su CEQ8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter). La prima parte del processo di sequenziamento consiste nell'amplificazione mediante PCR dei singoli esoni utilizzando specifici "primer" (20) e nella purificazione dei prodotti ottenuti su piastra magnetica (Agencourt AMPure PCR Purification, Beckman Coulter). La reazione di sequenza è allestita come indicato dal produttore.

## ALGORITMO PER LA DIAGNOSI DI AATD

Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto e implementato diverse procedure diagnostiche per migliorare la diagnosi nell'ambito del programma nazionale italiano di screening di AATD, utilizzando come campione il DBS. Nell'ambito di tale attività, abbiamo sviluppato un algoritmo per una corretta diagnosi del AATD, che viene applicato dal 2006 (Figura 2). Innanzitutto si procede alla misurazione immunonefelometrica della concentrazione di AAT plasmatica del campione e successivamente alla genotipizzazione per le due varianti deficitarie più comuni (S e Z). Abbiamo stimato che il valore di 113 mg/dL è il migliore cut-off per discriminare tra soggetti normali e soggetti deficitari (24). Tenendo presente i primi risultati ottenuti, ci si può trovare di fronte a quattro differenti situazioni:

- 1) la concentrazione di AAT è >113 mg/dL e l'analisi genotipica risulta negativa (assenza degli alleli S e Z). In questo caso il campione viene considerato normale e non è necessaria alcuna analisi ulteriore;
- 2) la concentrazione di AAT è >113 mg/dL e l'analisi genotipica risulta essere positiva (presenza dell'allele S o dell'allele Z in eterozigosi con l'allele normale M). Il campione viene allora sottoposto a fenotipizzazione tramite IEF e, se il fenotipo ottenuto conferma

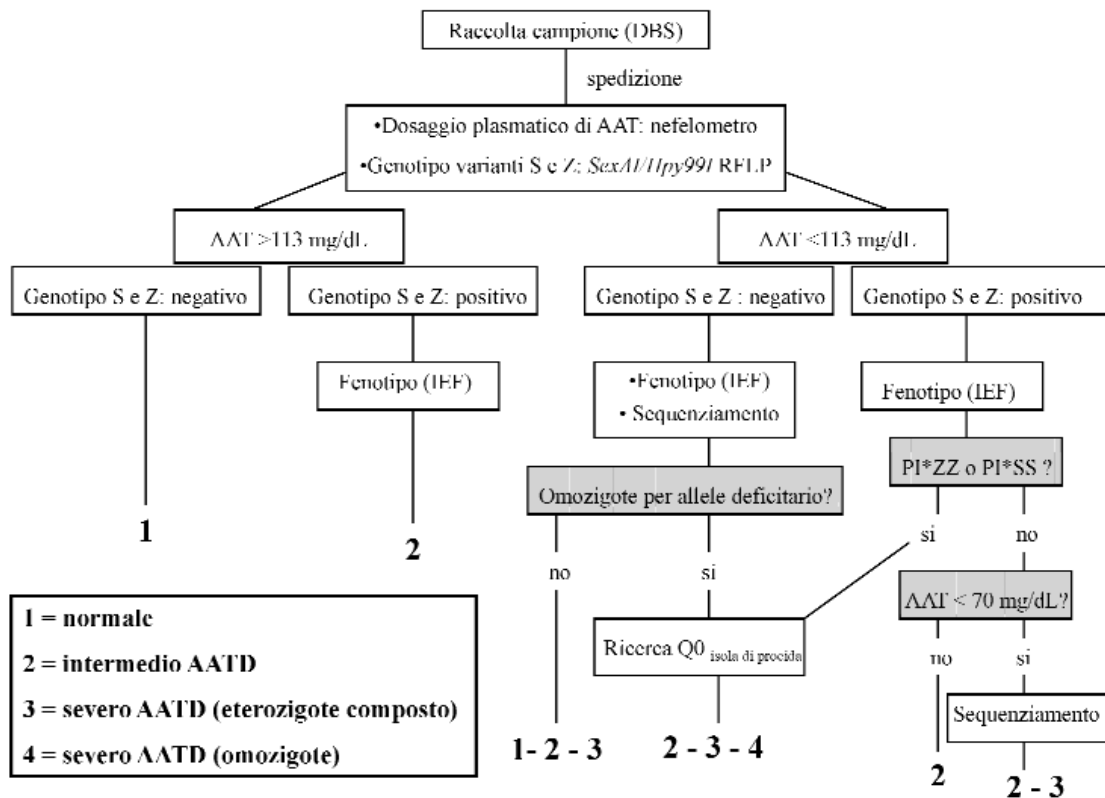


Figura 2

Algoritmo per la diagnosi di deficit ereditario di  $\alpha$ 1-antitripsina.

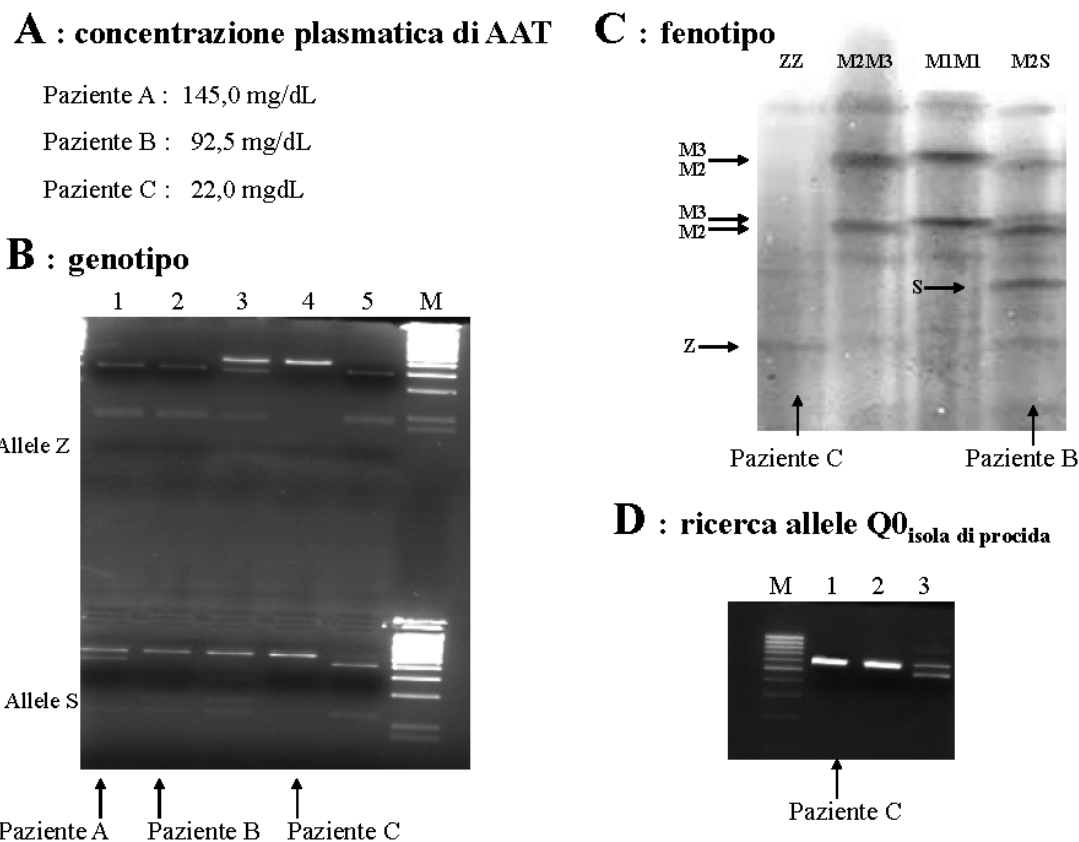
DBS, "dried blood spot"; AAT,  $\alpha$ 1-antitripsina; RFLP, restriction fragment length polymorphism; IEF, isolettrofocalizzazione; AATD, deficit di  $\alpha$ 1-antitripsina.

- il genotipo, il soggetto viene considerato affetto da deficit intermedio, nonostante la concentrazione proteica fisiologica. Si ritiene che l'aumentata concentrazione dell'AAT, inusuale per un deficit intermedio, sia dovuta a cause fisiologiche o all'attivazione delle proteine di fase acuta, di cui l'AAT fa parte, per la presenza nel soggetto di uno stato infiammatorio;
- la concentrazione di AAT è  $\leq 113$  mg/dL e l'analisi genotipica (per l'identificazione delle varianti S e Z) risulta negativa. Il campione viene sottoposto a fenotipizzazione e ad analisi della porzione codificante del gene tramite sequenziamento. Se a questo punto il campione risulta essere omozigote per una variante deficitaria rara, si ricerca l'eventuale presenza della variante "null" Q0<sub>isola di procida</sub> (20). La presenza dell'allele Q0<sub>isola di procida</sub>, che causa una completa delezione degli esoni codificanti l'AAT (25), potrebbe, infatti, portare ad una falsa diagnosi di omozigosi, non essendo identificabile né attraverso il sequenziamento né attraverso la fenotipizzazione;
  - la concentrazione di AAT è  $\leq 113$  mg/dL e l'analisi genotipica risulta positiva (presenza dell'allele S e/o Z). Il campione viene fenotipizzato per confermare il genotipo ottenuto. Se la concentrazione di AAT è compresa tra 70 mg/dL e 113 mg/dL e il genotipo/fenotipo risulta essere PI\*MS o PI\*MZ l'analisi termina ed il campione risulta essere affetto da

deficit intermedio. Se la concentrazione di AAT è  $< 70$  mg/dL e il genotipo/fenotipo risulta essere PI\*MS o PI\*MZ, il campione viene sequenziato per la ricerca di ulteriori mutazioni deficitarie in grado di spiegare la bassa concentrazione. Se il campione risulta essere omozigote per una delle due varianti deficitarie più comuni (PI\*SS, PI\*ZZ), ricerchiamo la presenza o meno della variante Q0<sub>isola di procida</sub> (Figura 3).

## CONCLUSIONI

Le metodologie di laboratorio per la diagnosi di AATD si sono evolute nel corso degli ultimi 40 anni, da quando, nel 1963, Laurell ed Eriksson evidenziarono nel siero di soggetti portatori di enfisema polmonare una diminuzione del picco elettroforetico delle  $\alpha$ -globuline (26). Questa osservazione aprì le porte allo studio sistematico del ruolo del AATD come possibile responsabile dell'insorgenza di patologie polmonari. Da allora si sono sviluppati vari metodi di analisi sempre più sofisticati per l'identificazione della patologia e per un accurato screening dei soggetti con sospetto deficit. L'evoluzione delle tecnologie e l'introduzione di nuove matrici biologiche da cui partire per eseguire la diagnosi del AATD hanno giocato un ruolo importante sia nell'espansione dei programmi di screening e di determinazione del deficit (18,27), che nell'approfon-



**Figura 3**  
 Esempi di soggetti diagnosticati seguendo l'algoritmo descritto nel testo.  
 Fase A: misurazione della concentrazione plasmatica di  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT).  
 Fase B: genotipizzazione per le varianti Z (in alto) e S (in basso): posizione 1,  $PI^*M1(Ala) M1(Val)$ , paziente A; posizione 2,  $PI^*M1(Ala) S$ , paziente B; posizione 3,  $PI^*SZ$ , controllo; posizione 4,  $PI^*ZZ$ , paziente C; posizione 5,  $PI^*M1(Val) M1(Val)$ , controllo; M, marcatore di PM.  
 Fase C: fenotipizzazione tramite isoelettrofocalizzazione per i pazienti B e C.  
 Fase D: ricerca dell'allele  $Q0_{isola di procida}$ : M, marcatore di PM; posizione 1, paziente C; posizione 2, controllo negativo; posizione 3, controllo positivo (M/  $Q0_{isola di procida}$ ).  
 Il paziente A (AAT = 145 mg/dL) non presenta le varianti S e Z ed è diagnosticato come  $PI^*MM$ . Il paziente B (AAT = 92,5 mg/dL) è risultato  $PI^*MS$  dalla genotipizzazione; questo risultato è stato confermato dall'isoelettrofocalizzazione. Il paziente C (AAT = 22 mg/dL) presenta un genotipo  $PI^*ZZ$ , confermato dal fenotipo; la ricerca dell'allele  $Q0_{isola di procida}$  ha dato esito negativo.

dimento delle conoscenze circa la storia naturale di questa patologia (28-30).

A partire dal 1996, in Italia è stato istituito il Programma Nazionale per lo screening di AATD severo, per il quale il nostro laboratorio è dal 2003 Centro di Riferimento sul territorio nazionale. Si tratta di uno screening mirato a soggetti a rischio di AATD, come indicato delle linee guida ATS/ERS, al quale collaborano oltre 500 medici (pneumologi, pediatri, internisti) sparsi sul territorio nazionale, che inviano i campioni al laboratorio. Il programma ha finora identificato 227 soggetti con deficit severo di AAT e 574 soggetti con deficit intermedio di AAT (31). Si tratta di un numero rilevante, soprattutto se consideriamo che l'Italia è una nazione a prevalenza medio-bassa di AATD. L'adozione dei DBS tramite AlphaKit™ nel 2006 ha permesso di ampliare il bacino di utenza, soprattutto in regioni che in precedenza non avevano la possibilità di accedere a

questo servizio. L'algoritmo da noi applicato permette l'identificazione dell'esatto meccanismo molecolare che provoca AATD, promuovendo la definizione del diverso rischio diagnostico mostrato dai vari genotipi AATD (11,32). Questo fornisce, al di là del risvolto meramente diagnostico, un ausilio per migliorare le nostre conoscenze sull'epidemiologia di questo disordine.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Stolk J, Seersholm N, Kalsheker N. Alpha 1-antitrypsin deficiency: current perspective on research, diagnosis, and management. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006;1:151-60.
2. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005;365:2225-36.
3. Lomas DA, Mahadeva R. Alpha 1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002;110:1585-90.

4. DeMeo DL, Silverman EK. Alpha 1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha 1-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 2004;59:259-64.
5. American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement. Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:818-900.
6. Luisetti M, Seersholm N. Alpha 1-antitrypsin deficiency.  $\alpha$ 1: Epidemiology of alpha 1-antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004;59:164-9.
7. De Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. Summary of an analysis of published genetic epidemiology surveys. *Chest* 2002;122:1818-29.
8. Seixas S, Garcia O, Trovoada MJ, et al. Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha 1-antitrypsin polymorphism. *Hum Genet* 2001;108:20-30.
9. Campos MA, Wannner A, Zhang G, et al. Trends in the diagnosis of symptomatic patients with  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency between 1968 and 2003. *Chest* 2005;128:1179-86.
10. Anonymous. Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1997;75:397-415.
11. Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, et al. Prevalence of rare variants in the Italian registry for severe alpha 1-antitrypsin deficiency. *J Med Genet* 2005;42:282-7.
12. Carrell RW, Lomas DA. Alpha 1-antitrypsin deficiency. A model for conformational diseases. *N Engl J Med* 2002;346:45-53.
13. Brantly M. Laboratory diagnosis of AATD. In: Crystal RG, ed. *Alpha 1-antitrypsin deficiency*. New York: Dekker, 1996:211-26.
14. Bals R, Koczulla R, Kotke V, et al. Identification of individuals with alpha 1-antitrypsin deficiency by a targeted screening program. *Respir Med* 2007;101:1708-14.
15. Rodriguez F, Jardì R, Costa X, et al. Rapid screening for  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease using dried blood specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;166:814-7.
16. Bornhorst JA, Procter M, Meadows C, et al. Evaluation of an integrative diagnostic algorithm for the identification of people at risk for alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am J Clin Pathol* 2007;128:482-90.
17. Snyder MR, Katzmann JA, Butz ML, et al. Diagnosis of alpha 1-antitrypsin deficiency: an algorithm of quantification, genotyping, and phenotyping. *Clin Chem* 2006;52:2236-42.
18. Wencker M, Marx A, Konietzko N, et al. Screening for  $\alpha$ 1-Pi deficiency in patients with lung diseases. *Eur Respir J* 2002;20:319-24.
19. Corda L, Bertella E, Pini L, et al. Diagnostic flow chart for targeted detection of Alpha 1-antitrypsin deficiency. *Respir Med* 2006;100:463-70.
20. Ferrarotti I, Scabini R, Campo I, et al. Laboratory diagnosis of Alpha 1-antitrypsin deficiency. *Transl Res* 2007;150:267-74.
21. Brantly M, Wittes JT, Vogelmeier KF, et al. Use of a highly purified  $\alpha$ -1 antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficiency phenotypes. *Chest* 1991;100:703-8.
22. Ferrarotti I, Zorzetto M, Scabini R, et al. A novel method for rapid genotypic identification of Alpha 1-antitrypsin variants. *Diag Mol Pathol* 2004;13:160-3.
23. Ljubic M, Topic A, Divac A, et al. Isoelectric focusing phenotyping and denaturant gel gradient electrophoresis genotyping: a comparison of two methods in detection of alpha 1-antitrypsin variants. *Transl Res* 2008;251:255-9.
24. Gorrini M, Ferrarotti I, Lupi A, et al. Validation of a rapid and simple method to measure  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Clin Chem* 2006;52:899-901.
25. Takahashi H, Crystal RG.  $\alpha$ 1-antitrypsin Null<sub>isola di procida</sub>: an  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency allele caused by deletion of all  $\alpha$ 1-antitrypsin coding exons. *Am J Hum Genet* 1990;47:403-13.
26. Laurell CB, Eriksson S. The serum alpha-1-antitrypsin in families with hypo-alpha-1-antitrypsinemia. *Clin Chim Acta* 1965;11:395-8.
27. De la Roza C, Rodriguez-Frias F, Lara B, et al. Results of a case-detection programme for  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in COPD patients. *Eur Respir J* 2005;26:616-22.
28. McElvany NG, Stoller JK, Buist AS, et al. Baseline characteristics of enrollees in the national Heart, Lung and Blood Institute Registry of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Chest* 1997;111:394-403.
29. Stoller JK, Brantly M, Fleming LE et al. Formation and current results of a patient-organized registry for  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Chest* 2000;118:843-8.
30. Stockley RA, Luisetti M, Miravittles M, et al. Alpha-1-antitrypsin deficiency international registry (A.I.R.) group. 2006. Alpha-1-antitrypsin deficiency International Registry (A.I.R.). Objective and development. *Eur Respir J* 2007;29:582-6.
31. Ferrarotti I, Gorrini M, Scabini R, et al. Secondary outputs of alpha-1-antitrypsin targeted detection programme. *Respir Med* 2008;102:354-8.
32. Gooptu B, Lomas DA. Polymers and inflammation: disease mechanisms of the serpinopathies. *J Exp Med* 2008;205:1529-34.