

## Risultati dello screening epidemiologico sulla malattia di Fabry nell'area sud-est della Sardegna

cap.9

### Malattia di Fabry nel sud-ovest della Sardegna

Piergiorgio Bolasco<sup>1</sup>, Irene Sitzia<sup>1</sup>, Stefano Murtas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unità Operativa Territoriale di Nefrologia e Dialisi, ASSL di Cagliari



Piergiorgio  
Bolasco

#### ABSTRACT

**Introduzione:** In Italia e nel resto del mondo sono state effettuate numerose indagini epidemiologiche relative alla prevalenza/incidenza della sindrome di Fabry (SF) e su altre malattie ad accumulo lisosomiale (LSDs). Le survey epidemiologiche sottostimano ancora la reale prevalenza della SF e delle sue numerose varianti genetiche. La distribuzione varia a seconda delle aree geografiche, e/o delle varie etnie. Oggi anche le donne eterozigoti possono essere colpite da forme severe e pluri-sintomatiche della SF.

**Scopo:** Abbiamo iniziato un'indagine su tutta la popolazione di nefropatici seguiti in circa 20 ambulatori territoriali e nei pazienti in dialisi senza diagnosi certa all'interno della nostra area sanitaria composta da 319.340 abitanti.

**Metodi:** I pazienti selezionati dai nostri ambulatori sono sino ad oggi 2.710, di questi 150 pazienti sono risultati sospetti (73 in dialisi e 77 in trattamento conservativo). Una paziente di sesso femminile in dialisi è risultata positiva; pertanto abbiamo ritenuto indagare su tutti i suoi collaterali rintracciabili individuando così altri 11 pazienti (totale: 4 maschi e 7 femmine). Tutti questi pazienti risiedono in una microarea di 21.822 abitanti. E' risultata così una prevalenza di un caso positivo su 1.818 abitanti. Questi dati si riferiscono ai 18 mesi iniziali di screening.

**Conclusioni:** Nei pazienti con una proteinuria o una microalbuminuria paranormale (150-200 mg/die) appare doveroso effettuare lo screening per la SF specialmente nelle aree con una non chiara alta incidenza e/o prevalenza di nefropatie. Una volta individuati i pazienti positivi di ambo i sessi, in questi dovrebbero essere poi rapidamente valutati gli organi ed apparati più colpiti dalla SF e quindi condurre un'accurata valutazione cardiologica e neurologica.

#### PAROLE CHIAVE:

malattia di Fabry, malattie rare, patrimonio genetico.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Epidemiological data relating to the prevalence and incidence of Fabry disease (FD) and other Lysosomal Storage diseases (LSDs) are largely underestimated and not yet well known. Distribution of the disease varies according to geographical area and to ethnic origin. Heterozygous females are also at risk of contracting severe and multi-symptomatic forms of FD.

**Aim:** To demonstrate the results obtained in outpatient surgeries situated in an area comprising 319,340 inhabitants.

**Methods:** Out of a total of 2710 nephrologist visits, 150 patients with suspected FD (73 undergoing dialysis and 77 conservative management) were selected. The relatives of one female patient on dialysis who had tested positive were investigated and a further 11 patients thus identified (total: 4 males and 7 females) within a micro-area of 21,822 inhabitants, i.e. a prevalence rate of one positive case every 1,818 inhabitants. These data relate to the first 18 months of screening.

**Conclusions:** In the field of nephrology, patients with high levels of proteinuria or microalbuminuria (150-200 mg/day) should be screened for FD, particularly in areas with a high incidence and/or prevalence of kidney disease. Once positive patients of both sexes have been identified, they should immediately be referred for cardiology and neurological assessment.

#### KEYWORDS

Fabry, familiar heritage, rare disease.

## INTRODUZIONE

La malattia di Fabry (SF) è la seconda più comune patologia da accumulo lisosomiale (LSD), dopo la malattia di Gaucher, malgrado ciò resta ancora una sindrome genetica sottovalutata. Esistono già numerose segnalazioni sulle espressioni fenotipiche tardive della SF e la prevalenza può coinvolgere anche tutti i soggetti eterozigoti. Infatti un numero significativo di carriers sono di sesso femminile che può sviluppare sintomi della malattia di Fabry anche seri e progressivi. La prevalenza in tutto il mondo della SF è molto variabile ed è stimata da un caso ogni 40.000 fino ad uno ogni 60.000 abitanti [1], in apparente contrasto con i risultati di un'indagine giapponese che segnala una prevalenza di un caso su 200.000 abitanti. Una valutazione precisa per tutte le categorie di persone con SF (maschi e femmine con una mutazione classica, maschi e femmine con mutazioni atipiche) è tuttavia praticamente impossibile al momento [2]. La valutazione è resa ancora più ardua a causa delle differenti estrinsecazioni fenotipiche come la classe 1, mentre il tipo 2 è una subdola mutazione che colpisce ambo i sessi poiché dimostra un esordio tardivo dei sintomi della malattia [3]. La SF è una malattia da accumulo lisosomiale X-linked causata da un insufficiente attività dell'enzima lisosomiale α-galattosidasi A (α-Gal A). La maggior parte dei maschi senza attività α-Gal A sviluppa il fenotipo classico della malattia di Fabry, che colpisce oltre al rene anche multipli organi ed apparati, raramente estrinsecando le tipiche manifestazioni dermatologiche. I Glicosfingolipidi, prevalentemente globotriaosilceramide (GL-3) e galabiosilceramide, si accumulano nei lisosomi di diverse cellule (ad esempio nell'endotelio vascolare di più organi) a causa della carenza di α-Gal A. L'accumulo di GL-3 nei lisosomi provoca una progressiva disfunzione cellulare; questa, a sua volta, innesca a cascata l'ischemia tissutale e la fibrosi [4]. In una recente *consensus conference* sulle linee KDIGO da adottare per la cura e prevenzione della SF si sono individuati i principali organi colpiti ed i relativi sintomi da considerare nell'ottica di poter iniziare una precoce terapia, in considerazione dell'ampia variabilità di pazienti del tutto asintomatici o affetti da patologie renali, cardiologiche o neurologiche molto severe [5]. Le varianti genetiche sono sempre più numerose. Anche se la maggior parte dei pazienti con la malattia di Fabry è di razza bianca, il morbo è stato descritto in pazienti appartenenti a diversi gruppi etnici: ispanici, africani, asiatici e di origine mediorientale. Nella Sardegna settentrionale su 178 soggetti sospetti, abbiamo già individuato i cambiamenti genomici indiscutibilmente tipici della SF [6]. Nel nord Sardegna sono già stati descritti 9 casi provenienti da due differenti cluster familiari con gravi manifestazioni neurologiche (variante D313Y) e compromissione renale e cardiovascolare (variante R227Q) [7]. Si ritiene pertanto vantaggioso e doveroso effettuare uno screening generale della Malattia di Fabry nei pazienti ambulatoriali già in carico nei nostri ambulatori e, quando possibile, promuovere campagne di screening nella popolazione generale anche per individuare quei casi che possono sviluppare un progressivo peggioramento dell'insufficienza renale [8]. La letteratura segnala numerosi casi di cluster familiari isolati colpiti dalla SF [9]. In ogni caso è indispensabile la ricerca genetica a prescindere dal sesso e dall'età, come suggerito dalla National Society of Genetic Counselors [10-11]. Lo scopo del nostro lavoro è quello di portare all'attenzione dei nefrologi la necessità di screenare tutti i pazienti seguiti nei nostri ambulatori, e quando possibile, effettuare uno screening generale di tutta la popolazione nelle aree sospette come recentemente effettuato dalla nostra Unità Operativa in occasione della Giornata Mondiale del Rene 2017.

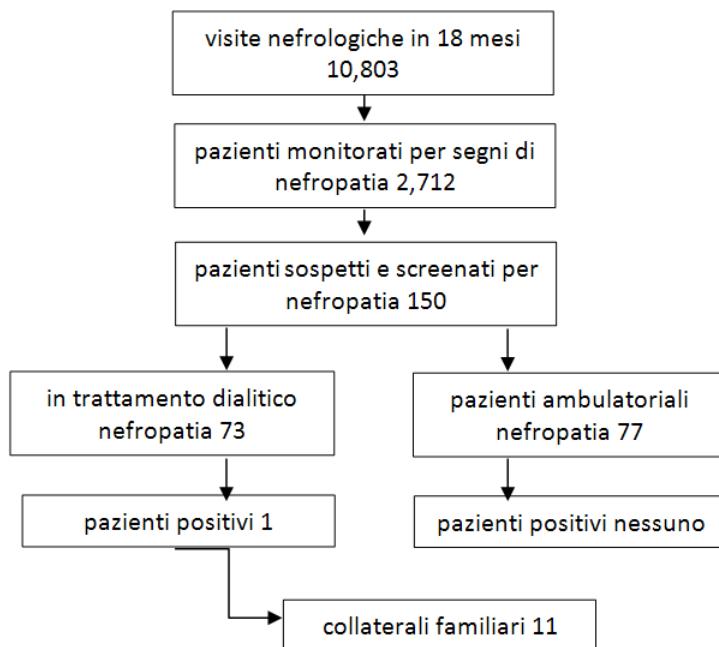
## MATERIALI E METODI

Nel marzo 2014 la nostra Unità Operativa ha ritenuto opportuno iniziare ad effettuare lo screening del Fabry nell'area di nostra pertinenza (Territorio dell'Assl di Cagliari) Lo screening è stato effettuato in 18 mesi e continua ancora sui pazienti che vengono acquisiti nei nostri ambulatori nefrologici. In questo di territorio di 319.340 abitanti operano 22 ambulatori appartenenti alla

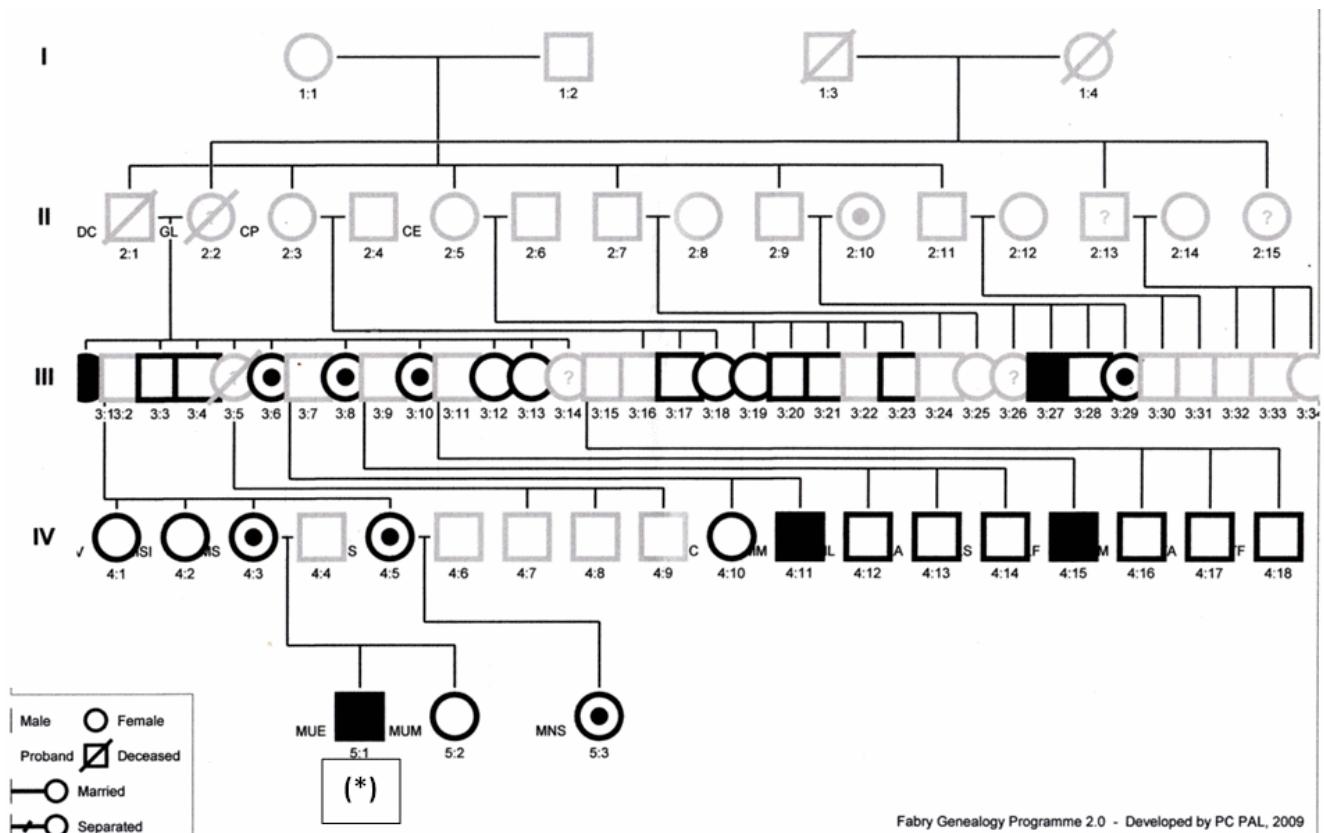
nostra Unità Operativa di Nefrologia dedicati alla cura ed alla prevenzione della malattia renale cronica. Nel periodo 2015-2016 sono state effettuate circa 10.803 valutazioni nefrologiche. Tra queste abbiamo ritenuto di prendere in considerazione 2.712 pazienti; e tra questi sono stati ulteriormente selezionati 156 pazienti, 73 in dialisi e 77 pazienti ambulatoriali. I criteri di selezione per effettuare lo screening enzimatico e genetico viene indifferentemente effettuato in ambo i sessi. Nonostante l'assenza di sospette manifestazioni dermatologiche, gli altri criteri di considerazione per lo screening sono stati quei pazienti che presentavano almeno uno o due dei seguenti rilievi: proteinuria pregressa o attuale tra i 150- 200 mg/die e/o sintomi extra-renali con particolare attenzione a quelli neurologici [12], quali insulti cerebrale di tipo ischemico transitorio, strokes, cardiomiopatia ipertrofica con o senza ipertensione arteriosa, aritmie, valvulopatie, acro parestesie alle estremità degli arti, familiarità di nefropatia da cause mai determinate, alterazioni dermatologiche sospette. Abbiamo escluso i pazienti con diagnosi certa (glomerulonefriti biopsiate, Adult Polycystic Kidney Disease, altre malattie genetiche ben identificate). Non sono stati esclusi dallo screening i pazienti con diabete di tipo 1 e 2. Lo screening è stato effettuato su campione di sangue inviando a laboratori specializzati un prelievo di 1 mL di sangue con EDTA per testare almeno 2 µg di DNA, oppure campioni di sangue raccolti tramite Dried Blood Spot (DBS). In tutti i laboratori per l'analisi è stata utilizzata la spettrometria di massa TripleQuad. Nei pazienti individuati sono stati sempre determinati i livelli di  $\alpha$ -galattosidasi mediante spettrofluorometria di massa (livelli plasmatici normali:> 2,6 nmol/L); inoltre si determinavano i livelli di lyso-GB3 tramite Tandem mass-spectrometry (MRM-MS) (CentoFabry, Centogene®, livelli plasmatici normali < 1,8 nmol/L) [13]. La metodologia per individuare il genotipo (metodo Centogene© AG) utilizza piattaforme di sequenziamento che comprendono l'intera regione di codifica, i confini degli esoni/introni sino a 200 coppie di basi del gene promotore.

## RISULTATI DELLO SCREENING

Tutti pazienti ambulatoriali sottoposti a test genetico sono risultati negativi, compresa una paziente di sesso femminile emodializzata di 65 anni con sintomatologia extrarenale assente e con storia di nefropatia proteinurica ma non più diagnosticamente identificabile. La paziente risultava positiva al test enzimatico ed alla analisi genetica. Questa paziente, componente di una famiglia numerosa, ha stimolato il nostro interesse per screenare tutti i familiari. Abbiamo così esteso l'indagine a tutti i suoi collaterali rintracciabili con la scoperta di ulteriori 11 portatori di Fabry (4 maschi emizigoti e 7 femmine eterozigoti) (figura 1). L'età media dei 12 pazienti screenati è:  $37.0 \pm 21.2$  anni (1 – 65 anni) ; l'età media dei quattro maschi  $26.2 \pm 20.2$  anni (9-54); l'età media delle otto femmine è  $42.4 \pm 20.8$  (1 – 65). Nella figura 2 è illustrato il pedigree familiare.



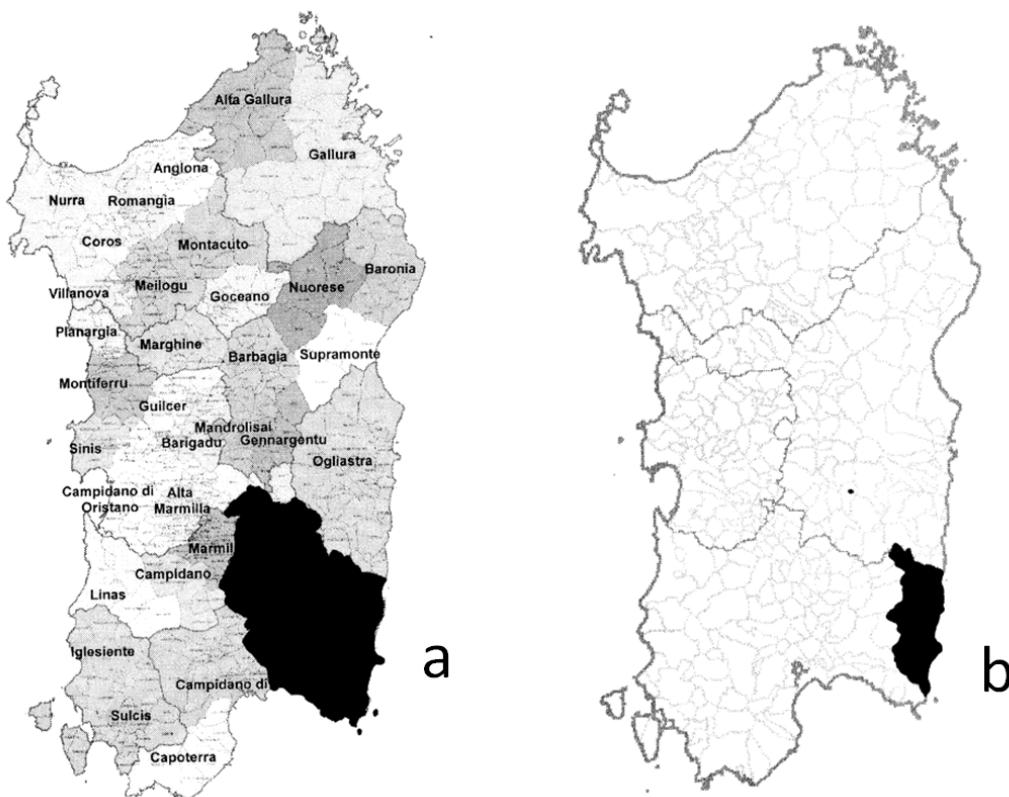
**Figura 1 Algoritmo di ricerca epidemiologica**



**Figura 2 (\*) Caso Trigger: donna di 65 anni in emodialisi cronica**

## RILIEVI E FREQUENZE EPIDEMIOLOGICI

Nell'area vasta di screening composta da 319.340 abitanti abbiamo, al momento, individuato solo questo cluster familiare in una ben delimitata area costiera – montuosa di 21.882 abitanti, denominata Sarrabus-Gerrei (figura 3).



**Figura 3 In nero a) area ASSL Cagliari; b) area screening Sarrabus-Gerrei. Abitanti totali in Sardegna: 1.663.000; area a: abitanti: 319.340, area b : Sarrabus-Gerrei abitanti: 21.882**

Se dovessimo considerare l'area vasta di screening la prevalenza sarebbe di 1: 26.612 abitanti; mentre se dovessimo riferirci all'area del Sarrabus-Gerrei la prevalenza diventerebbe di 1 caso ogni 1.818 abitanti.

Quest'area già da tempo era nota nel censimento SIN regionale di nefrologia-dialisi-trapianto 2010 a causa della alta prevalenza di insufficienza renale cronica terminale rispetto al resto dell'Isola e rispetto al resto d'Italia: rispettivamente Sarrabus-Gerrei: 872 per milione di abitanti, Sardegna 810, Italia 580.

La variazione genetica ritrovata in tutti questi soggetti è stata una sola: *c.159C>A (p.Asn53Lys)*. Tale variante non è presente in letteratura, salvo la segnalazione su un poster di Malesci et al. presentato in occasione del VII° Congresso Nazionale della Società Italiana per lo Studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale a Firenze nel 2015. In nessun'altra pubblicazione è stata riscontrata questa variante, né tanto meno si sono mai citati dei sintomi di SF e/o correlati ad essa.

## RILIEVI EMATOCHIMICI

I livelli di  $\alpha$ -galattosidasi sono stati determinati in tutti dodici pazienti :  $0,62 \pm 0,38$  (min-max: < 0,2 – 1,2  $\mu\text{mol/L}$ ); nei maschi  $0,30 \pm 0,10$  (min-max< 0,2 – 0,4  $\mu\text{mol/L}$ ); nelle femmine  $0,78 \pm 0,36$  (min-max: 0,2 – 1,2  $\mu\text{mol/L}$ ). Il livello di  $\alpha$ -galattosidasi di 0,2  $\mu\text{mol/L}$  si riferisce alla paziente

emodializzata con prelievo pre-dialitico nell'intervallo interdialitico più lungo.

I livelli di LysoGB3 in tutti i pazienti era di  $1,6 \pm 0,6$  ng/mL (min-max: 3,2 – 0,9), nelle femmine  $0,78 \pm 0,36$  ng/mL (min-max: 1,4 – 1,6) e nei maschi  $1,9 \pm 1,04$  ng/mL (min-max: 3,2 – 0,9). Nella tabella 1 è illustrata l'intera casistica, con brevi cenni sui sintomi e livelli enzimatici. Una volta terminato lo screening nefrologico i pazienti vengono avviati per un'accurata valutazione cardiologica, neurologica ed oculistica. La paziente n. 9 dovrà essere rivalutata nel considerare la possibilità che la diagnosi di sclerosi multipla sia non corretta e/o che le due patologie siano associate.

Tutte le procedure sono state effettuate rispettando gli standard etici istituzionali e secondo gli statement della dichiarazione di Helsinki del 1964. Il consenso informato e sottoscritto è stato ottenuto da tutti i pazienti partecipanti ed inclusi nello studio.

## DISCUSSIONE

La malattia di Fabry rappresenta una patologia obsoleta ma ancora trascurata dagli ambulatori nefrologici, neurologici e cardiologici in cui spesso non è possibile individuare con certezza la fonte causale della noxa lesiva. In Nefrologia occorre prestare attenzione in presenza di microalbuminuria e/o proteinuria. Il rilievo di livelli di proteinuria < 200 mg/die possono rappresentare il solo sintomo della SF [14]. Il riscontro di un cluster familiare in un'area geograficamente isolata e scarsamente popolata con un'importante prevalenza di uremia in alcune microaree, nasce dal riscontro di un'analisi genetica di una paziente allora in dialisi ed ora recentemente trapiantata di rene. Linthorst et al. [15] ha stimato la presenza di SF nei pazienti in dialisi dello 0,22%. In Francia su 106 pazienti in emodialisi è stato effettuato lo screening dosando l'attività della  $\alpha$ -galattosidasi; in un paziente è stata identificata la SF ed in ulteriori 7 membri della sua famiglia [8]. Uno studio giapponese riporta una prevalenza dell'1,2% in maschi sottoposti a dialisi [16]. Invece un recente studio del gruppo di Saito et al. ha riscontrato una prevalenza della SF nei pazienti, nello specifico in 5.408 maschi and 3.139 donne in dialisi > 0,02% (0,04% nei maschi, 0,02% nelle femmine), a dimostrazione della ampia variabilità della penetranza fenotipica della malattia [17]. La trasmissione ereditaria della SF in quest'area della Sardegna, ancora oggi geograficamente isolata del territorio del Sarrabus-Gerrei, si può ipotizzare possa nascere da matrimoni con portatrici sane o anche affette da varie compromissioni di organi e/o apparati risalenti a molte generazioni precedenti; fino a cento anni fa questo territorio era particolarmente isolato geograficamente e la tradizione incoraggiava le unioni tra collaterali, con vincoli di parentela talora anche stretti. L'età di esordio e la diagnosi della SF è piuttosto variabile. L'età media di esordio della malattia è dai 9 ai 23 anni nei maschi e dai 13 ai 32 anni nelle femmine, indicando così che la diagnosi di SF può essere misconosciuta o ritardata in entrambi i sessi [18]. Spesso la scoperta della SF è dovuta a sintomi correlati alla compromissione di altri organi ed apparati. Più precoce è il riscontro della malattia e maggiori sono le possibilità di procrastinare la dialisi e/o il trapianto. Esistono anche forme di SF ad esordio decisamente ritardato in cui iniziali manifestazioni cardiologiche si riscontrano oltre i 40 anni [19]. Segnalate anche forme tardive renali di esordio della SF; Wilcox and al. hanno evidenziato alterazioni della funzione renale in donne eterozigoti con età media di 46 anni [20].

In considerazione che nel nostro cluster familiare abbiamo pazienti asintomatici e/o paucisintomatici, ma anche una paziente in dialisi, non è possibile stabilire quale possa essere l'estrinsecazione clinica fenotipica della nuova variante rilevata *c.159C>A p.Asn53Lys*. Il prosieguo della diagnostica neurologica, cardiologica ed oculistica potrà chiarire meglio questo aspetto. Un altro problema pratico è rappresentato dalla scarsa collaborazione dei pazienti e dei genitori dei pazienti minorenni, poiché la SF non ha prodotto in tali soggetti delle importanti sintomatologie

tali da rendere riluttanti i soggetti, come per il paziente n.10 della tabella 1. Rifiutare o proseguire gli accertamenti diagnostici produce pericolosi ritardi al fine di instaurare una necessaria eventuale possibile terapia sostitutiva. Anche in altre casistiche si è riscontrata una paucisintomaticità che può essere stata responsabile di ritardi diagnostici e terapeutici anche con danni renali già irreversibilmente instauratisi [21, 22]. La diagnosi può essere pericolosamente misconosciuta nei bambini poiché molto spesso la SF è clinicamente silente [23]. La nostra casistica contempla anche tra i bambini ed è molto importante la sensibilizzazione dei Pediatri e dei genitori, talvolta riluttanti a sottoporre i loro figli alle necessarie indagini diagnostiche.

Tabella 1: Dati familiari

Pazienti	Età, anni	VFG (ml/min/1.73mq)	Microalbuminuria, mg /die	Altri sintomi specifici	$\alpha$ -galactosidase (v.n.: 2.6 $\mu$ mol/L/h)	Lysogb3 (v.n. < 1.8 ng/mL)
1) F	1	130	9.2	-	0,5	1,3
2) M	9	130	23,5	-	< 0,2	0,9
3) M	14	164	4,5	-	0,3	2,4
4) M	28	137	23,2	-	0,2	1,3
5) F	29	114	8,3	aritmia sinusale, vertigini	0,6	1,6
6) F	34	126	9,5	-	0,7	1,5
7) F	45	105	14,4	-	1,1	1,4
8) F	51	124	31,8		1,2	1,4
9) F	52	141	97,7	in trattamento per sclerosi multipla	0,9	1,6
10) F	54	169	144,7	cataratta, azoospermia, ipoidrosi cutanea	0,4	3,2
11) F	62	73	65,8	acroparestesie delle mani, dolori addominali	0,6	1,6
12) F	65	-	-	insufficienza renale cronica in emodialisi	0,2	1,2

Fig 1 M: maschi; F: femmine. Varianti genetiche comuni a tutti i soggetti: c.159C>A (p.Asn53Lys)

## CONCLUSIONI

Dalle ormai numerose segnalazioni in letteratura si affaccia l'ipotesi che non vi sia una così ovvia e stretta correlazione tra livelli enzimatici di screening ed reale accumulo; ciò non toglie che i vari Medici Specialisti coinvolti debbano screenare i soggetti sospetti specialmente anche i soggetti

femminili giunti all’osservazione [24]. Considerando le numerosi varianti classiche ed atipiche della SF in tutto il mondo, è difficile stabilire quale sia la reale incidenza e frequenza le quali risultano molto variabili. Talvolta la prevalenza della SF ha una distribuzione a “macchia di leopardo”, oppure può colpire alcuni gruppi familiari nei quali è fortemente sospettabile un “riciclo” genetico tra lontani parenti in aree geograficamente e culturalmente chiuse. I nuovi, semplici e rapidi strumenti di screening dovrebbero entrare nella diagnostica di routine del Nefrologo, che dovrebbe effettuare le indagini in tutti i soggetti afferenti agli ambulatori nefrologici, soprattutto nelle aree territoriali a più alta incidenza di insufficienza renale cronica.

## RINGRAZIAMENTI

Particolari ringraziamenti sono dovuti alle Aziende Genzyme® e Shire® per il loro gentile ed efficace contributo alle determinazioni nei laboratori specializzati.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 2.
2. Owada M, Kitigawa T. Lysosomal storage diseases. *Nippon Rinsho*. 2001;8:317–27.
3. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2008; 93:112
4. Desnick R, Ioannou Y, Eng C. Alpha-Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001:3733-3774.
5. Schiffmann R, Hughes DA, Linthorst GE, Ortiz A, Svarstad E, Warnock DG, West ML, Wanner C; Conference Participants. Screening, diagnosis, and management of patients with Fabry disease: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*. 2016 Dec 17. pii: S0085-2538(16)30603-2.
6. Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, Waldek S, Scott CR, Sillence DO, Breunig F, Charrow J, Germain DP, Nicholls K, Banikazemi M. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inherit Metab Dis*. 2007. Apr;30(2):184-92.
7. Fancellu L, Borsini W, Romani I, Pirisi A, Deiana GA, Sechi E, Doneddu PE, Rassu AL, Demurtas R, Scarabotto A, Cassini P, Arbustini E, Sechi G. Exploratory screening for Fabry's disease in young adults with cerebrovascular disorders in northern Sardinia. *BMC Neurol*. 2015 Dec 12;15:256.
8. Bekri S, Enica A, Ghafari T, Plaza G, Champenois I, Choukroun G, Unwin R, Jaeger P. Fabry disease in patients with end-stage renal failure: the potential benefits of screening. *Nephron Clin Pract*. 2005;101(1):c33-8.
9. Michael Beck, and Gere Sunder-Plassmann. Volume *Fabry Disease Perspectives from 5 Years of FOS*. Editors: Atul Mehta, Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006.
10. Bennett RL, Hart KA, O'Rourke E, Barranger JA, Johnson J, MacDermot KD, Pastores GM, Steiner RD, Thadhani R. Fabry disease in genetic counseling practice: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2002 Apr;11(2):121-46.
11. Linthorst GE, De Rie MA, Tjiam KH. Misdiagnosis of Fabry disease: importance of biochemical confirmation of clinical or pathological suspicion. *Br J Dermatol*. 2004 Mar. 150(3):575-7.
12. The neurological complications of Anderson-Fabry disease (alpha-galactosidase A deficiency)-investigation of symptomatic and presymptomatic patients. *Q J Med*. 1990 May. 75(277):491-507.
13. Wang D, Eadala B, Sadilek M, Chamoles NA, Turecek F, Scott CR. et al. Tandem mass spectrometric analysis of dried blood spots for screening of mucopolysaccharidosis I in newborns. *Clin Chem*. 2005;51:898–900.
14. Mignani R, Preda P, Granata A, Maldini L, De Giovanni P, Montevercchi M, Rigotti A, Cagnoli L. Isolated microalbuminuria as the first clinical presentation of Fabry disease in an adult heterozygous female. *NDT Plus*. 2009 Dec;2(6):455-7.
15. Linthorst GE, Hollak CE, Korevaar JC, Van Manen JG, Aerts JM, Boeschoten EW.  $\alpha$ -Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1581–4.
16. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A. et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int*. 2003;64:801–7.
17. Hsu TR, Hung SC, Chang FP, Yu WC, Sung SH, Hsu CL, Dzhagalov I et Al. Later Onset Fabry Disease, Cardiac Damage Progress in Silence: Experience With a Highly Prevalent Mutation. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Dec 13;68(23):2554-2563.
18. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Fabry Registry. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*. 2008 Feb;93(2):112-28.
19. Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, Waldek S, Scott CR, Sillence DO, Breunig F, Charrow J, Germain DP, Nicholls K, Banikazemi M. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inherit Metab Dis*. 2007. Apr;30(2):184-92.
20. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Fabry Registry. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*. 2008 Feb;93(2):112-28a.
21. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, Murray GJ, Quirk JM, Altarescu G. et al. Natural history of Fabry renal disease: influence of  $\alpha$ -galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:122–38.
22. West M, Nicholls K, Mehta A, et al. Agalsidase alfa and kidney dysfunction in Fabry disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009 May. 20(5):1132-9.
23. Ries M, Ramaswami U, Parini R, Lindblad B, Whybra C,

- Willers I. et al. The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *Eur J Pediatr.* 2003;162:767–72.
24. Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, et al. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Investig Med.* 2000 Jul; 48(4):227-35.

**Corrispondenza a:**

Piergiorgio Bolasco

Già Direttore della UOC di Nefrologia e Dialisi ASSL di Cagliari

Membro della Società Italiana di Nefrologia

E-Mail: pg.bolasco@tin.it

## Fabry Disease in Southern Sardinia: epidemiological results from screening in an extensive area

cap.9

Fabry Disease , Mediterranean Epidemiology

Piergiorgio Bolasco<sup>1</sup>, Irene Sitzia<sup>1</sup>, Stefano Murtas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unità Operativa Territoriale di Nefrologia e Dialisi, ASSL di Cagliari



Piergiorgio  
Bolasco

### ABSTRACT

**Introduzione:** In Italia e nel resto del mondo sono state effettuate numerose indagini epidemiologiche relative alla prevalenza/incidenza della sindrome di Fabry (SF) e su altre malattie ad accumulo lisosomiale (LSDs). Le survey epidemiologiche sottostimano ancora la reale prevalenza della SF e delle sue numerose varianti genetiche. La distribuzione varia a seconda delle aree geografiche, e/o delle varie etnie. Oggi anche le donne eterozigoti possono essere colpite da forme severe e pluri-sintomatiche della SF.

**Scopo:** Abbiamo iniziato un'indagine su tutta la popolazione di nefropatici seguiti in circa 20 ambulatori territoriali e nei pazienti in dialisi senza diagnosi certa all'interno della nostra area sanitaria composta da 319.340 abitanti.

**Metodi:** I pazienti selezionati dai nostri ambulatori sono sino ad oggi 2.710, di questi 150 pazienti sono risultati sospetti (73 in dialisi e 77 in trattamento conservativo). Una paziente di sesso femminile in dialisi è risultata positiva; pertanto abbiamo ritenuto indagare su tutti i suoi collaterali rintracciabili individuando così altri 11 pazienti (totale: 4 maschi e 7 femmine). Tutti questi pazienti risiedono in una microarea di 21.822 abitanti. E' risultata così una prevalenza di un caso positivo su 1.818 abitanti. Questi dati si riferiscono ai 18 mesi iniziali di screening.

**Conclusioni:** Nei pazienti con una proteinuria o una microalbuminuria paranormale (150-200 mg/die) appare doveroso effettuare lo screening per la SF specialmente nelle aree con una non chiara alta incidenza e/o prevalenza di nefropatie. Una volta individuati i pazienti positivi di ambo i sessi, in questi dovrebbero essere poi rapidamente valutati gli organi ed apparati più colpiti dalla SF e quindi condurre un'accurata valutazione cardiologica e neurologica.

### PAROLE CHIAVE:

malattia di Fabry, malattie rare, patrimonio genetico.

### ABSTRACT

**Introduction:** Epidemiological data relating to the prevalence and incidence of Fabry disease (FD) and other Lysosomal Storage diseases (LSDs) are largely underestimated and not yet well known. Distribution of the disease varies according to geographical area and to ethnic origin. Heterozygous females are also at risk of contracting severe and multi-symptomatic forms of FD.

**Aim:** To demonstrate the results obtained in outpatient surgeries situated in an area comprising 319,340 inhabitants.

**Methods:** Out of a total of 2710 nephrologist visits, 150 patients with suspected FD (73 undergoing dialysis and 77 conservative management) were selected. The relatives of one female patient on dialysis who had tested positive were investigated and a further 11 patients thus identified (total: 4 males and 7 females) within a micro-area of 21,822 inhabitants, i.e. a prevalence rate of one positive case every 1,818 inhabitants. These data relate to the first 18 months of screening.

**Conclusions:** In the field of nephrology, patients with high levels of proteinuria or microalbuminuria (150-200 mg/day) should be screened for FD, particularly in areas with a high incidence and/or prevalence of kidney disease. Once positive patients of both sexes have been identified, they should immediately be referred for cardiological and neurological assessment.

### KEYWORDS:

Fabry, familiar heritage, rare disease.

## INTRODUZIONE

Epidemiological data reporting the prevalence and incidence of Fabry disease and other LSDs are largely lacking due to a marked diversity in geographic regions and ethnic populations. Accordingly, as the available data are likely underestimated due to missed diagnoses of these rare disorders, the actual diffusion of FD remains to be clarified [1]. In recent years, following numerous reports of a late onset FD, the main focus has been extended to a series of medical specialities, and to investigating prevalence of the disease in heterozygous individuals. Indeed, a significant number of female carriers may develop Fabry disease-related symptoms. The worldwide prevalence of FD is hard to ascertain, although estimates range from one patient per 40,000 to 60,000 individuals [2], to the one every 200,000 inhabitants reported in a Japanese survey. Calculations however are complicated due to the different phenotypes observed in males and females, including classic type 1, type 2 with later onset and atypical mutations [3]. Fabry disease is an X-linked lysosomal storage disease caused by a deficit of lysosomal enzyme  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A). The majority of males lacking  $\alpha$ -Gal A activity develop the classic phenotype of Fabry disease, which affects multiple organ systems. Glycosphingolipids, predominantly globotriaosylceramide (GL-3) and galabiosylceramide, accumulate in the lysosomes of various cells (eg, in the vascular endothelium of multiple organs) owing to  $\alpha$ -Gal A deficiency. Accumulation of GL-3 in the lysosomes causes lysosomal and cellular dysfunction, which, in turn, triggers a cascade of cells and tissue ischemia and fibrosis [4]. A recent consensus conference on the KDIGO guidelines to be adhered to in the treatment and prevention of FD has identified the major affected organs and relative symptoms. Currently, the main aim is to implement early treatment, particularly in view of the wide variability of asymptomatic patients and patients affected by severe kidney, heart or neurological conditions [5]. Genetic variants of the disease are becoming increasingly numerous. Indeed, although the majority of patients with Fabry disease are white, the disorder has been described in patients from a series of ethnic groups, including those with Hispanic, African, Asian, and Middle Eastern ancestry [6]. In northern Sardinia, out of a total of 178 individuals with suspected FD, genomic alterations have already been identified in nine patients from two family clusters characterized by severe neurological manifestations (D313Y) and renal and cardiovascular impairment (R227Q) [7]. Routine screening for FD in the general population should be implemented; the test is extremely simple and would greatly benefit FD patients, as early detection of the disease may prevent progressive renal impairment [8]. Reports of isolated family groups affected by FD have also been published [9], thus supporting recommendations that genetic research should be undertaken on even distant relatives of the patient, as suggested by the National Society of Genetic Counsellors [10]. The aim of the present study was to implement routine screening of the patient population attending specialist nephrology clinics.

## MATERIALS AND METHODS

In March 2014 our Nephrologic Unit commenced screening for Fabry disease in an extensive area covered by the Cagliari (Italy) Primary Care Trust. The results obtained relate to the first 18 months of screening. The area comprises 319,340 inhabitants and 22 regular Nephrology out-clinics for the treatment and prevention of chronic kidney disease. In the period 2015-2016, approximately 10,803 nephrologist visits were scheduled in both patients who periodically attended the clinic and new patients. Of the original 10,803 patients, 2,712 were identified: 156 patients were subsequently screened, 73 of which on dialysis and 77 outpatients. The main selection criteria for molecular genetic screening were as follows: male and female patients, even in the absence of typical skin alterations [11]; additional criteria included the finding of past or current

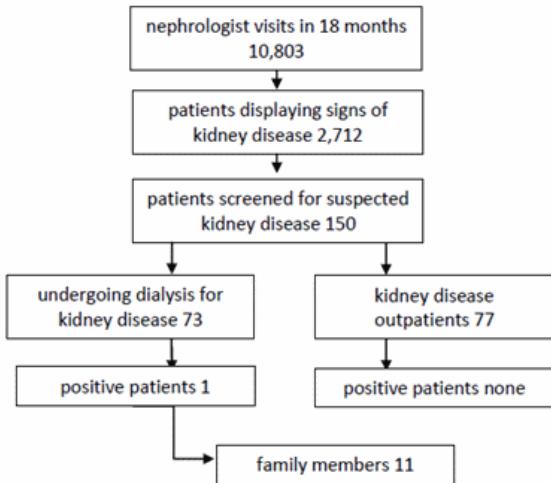
microalbuminuria at levels of 100- 200 mg/day. All extra-renal symptoms should be carefully investigated, particularly those of a neurological nature [12], including previous transient ischaemic attacks and/or stroke, hypertrophic cardiomyopathy with or without arterial hypertension, arrhythmias, valve disease, acroparesthesia, family history for undetermined kidney disease; patients with type 1 and 2 diabetes should not be excluded from screening.

Exclusion criteria: only patients with a confirmed diagnosis (glomerulonephritis, even when identified by means of electron microscopy, Adult Polycystic Kidney Disease, and other well-known genetic diseases).

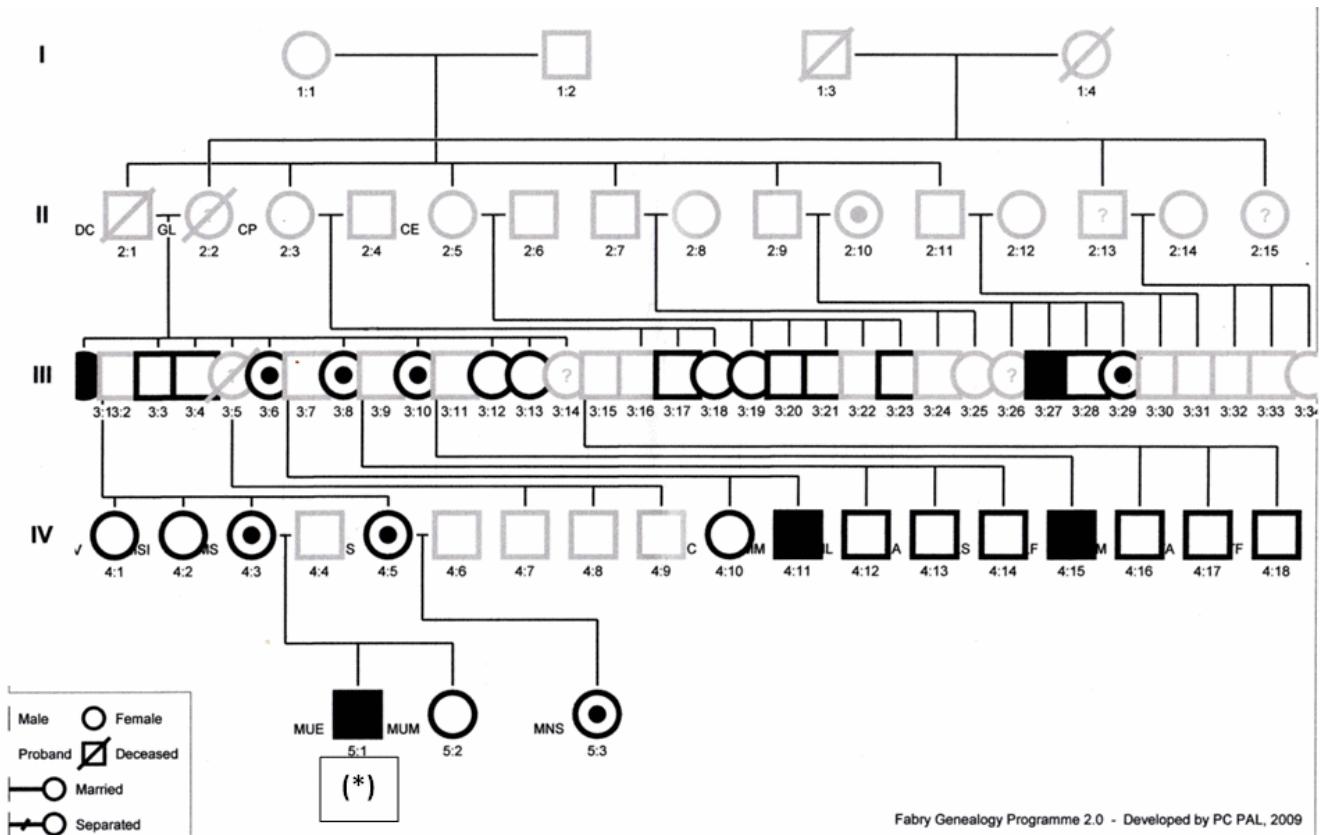
The screening program was carried out on whole blood samples as follows: a 1mL blood sample by means of EDTA to test at least 2 µg DNA. Blood samples collected via DBS were extracted for analysis using TripleQuad mass spectrometry. The levels of  $\alpha$ -galactosidase were assessed in plasma by spectrofluorometry (normal plasma range A> 2.6 nmol/L; lyso-GB3 concentrations were measured in patients with evocative FD DNA mutation and/or single polymorphism in the GLA gene by Tandem mass-spectrometry (MRM-MS) (CentoFabry, Centogene ®); lyso-GB3 normal range < 1.8 ng/mL [13]. Genetic analysis on  $\alpha$ -GAL A or GLA (Centogene ®) was performed by means of high-throughput automated Sanger sequencing enabling a large amount of sequencing data to be generated at the same time. This technique enables genetic analysis of 48 Fabry disease patients in parallel overnight. The Centogene® AG methodology utilizes sequencing platforms from Illumina; before checking GLA full gene sequencing covers the entire coding region, exon/intron boundaries and 200 bp of the gene promoter and after Deletion/duplication analysis/mutational scanning of GLA.

## RESULTS OF SCREENING

Negative findings were reported for all outpatients and dialysis patients who underwent genetic testing, with the exception of an apparently asymptomatic 65-year old haemodialysis patient with a previous history of no longer identifiable proteinuric kidney disease. The patient tested positive at enzyme and genetic assay. As the patient belonged to a very large family, the screening program was extended to all her known relatives, resulting in the detection of an additional 11 carriers of Fabry disease (4 hemizygous males and 7 heterozygous females) (Figure 1). The mean age of the 12 screened patients was:  $37.0 \pm 21.2$  years (1-65 years); mean age of the four males  $26.2 \pm 20.2$  years (9-54); and mean age of the eight females  $42.4 \pm 20.8$  (1- 65). Figure 2 illustrates the family pedigree.

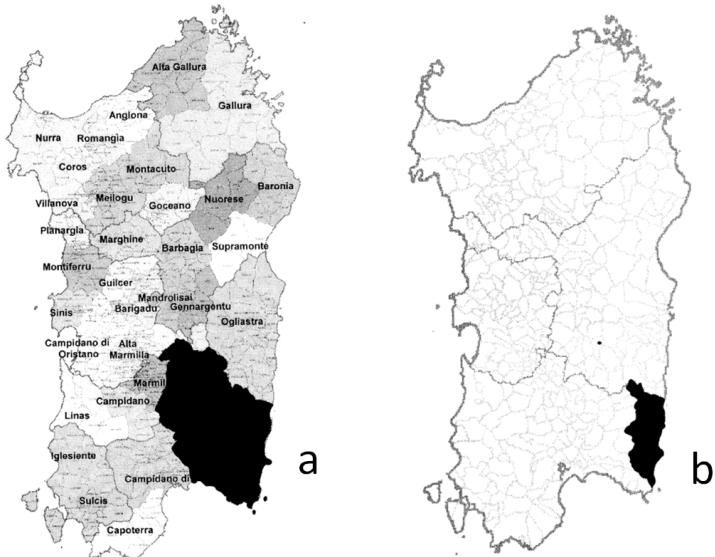


**Figura 1 Epidemiological research algorithm**



## EPIDEMIOLOGICAL FINDINGS AND FREQUENCY

Throughout the extensive screening area comprising 319,340 inhabitants, the above family cluster was identified from the much smaller coastal-mountainous region of Sarrabus-Gerrei, accounting for 21,822 inhabitants (Figure 3).



**Figura 3 Geographic areas of screening in Sardinia: in black – a) extensive screening area; b) Sarrabus-Gerrei screening area. Inhabitants of Sardinia: 1,663.000 - area a: inhabitants: 319,340 area b : Sarrabus-Gerrei inhabitants: 21,882.**

Based on the initial extended screening area the rate of prevalence was 1 case per 26,612 inhabitants; however, when related to the more confined area of the Sarrabus-Gerrei region, prevalence was calculated as 1 case per 1,818 inhabitants.

This area was already renowned for its high prevalence of terminal chronic kidney disease compared to the rest of the island and the rest of Italy: respectively, Sarrabus-Gerrei: 872 cases per one million inhabitants, Sardinia 810, Italy 580 (2012 Census of the Sardinian Section of the Italian Society of Nephrology).

A unique genetic mutation was detected in all these subjects: *c.159C>A (p.Asn53Lys)*. This mutation has not been described previously in literature either as an atypical mutation, or in view of the correlated symptoms of Fabry disease.

## RESULTS OF BLOOD CHEMISTRY TESTS

Alpha-galactosidase levels determined in all 12 patients corresponded to  $0.62 \pm 0.38$  (min-max: < 0.2 – 1.2  $\mu\text{mol/L}$ ); in males  $0.30 \pm 0.10$  ( min-max< 0.2 – 0.4  $\mu\text{mol/L}$ ); in females  $0.78 \pm 0.36$  ( min-max: 0.2 – 1.2  $\mu\text{mol/L}$ ). The 0.2  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha$ -galactosidase levels refer to the female patient undergoing haemodialysis – this sample was collected pre-dialysis during the longer interdialytic interval to avoid dialysis-correlated interferences.

LysoGb3 levels in all patients corresponded to  $1.6 \pm 0.6$  ng/mL (max-min: 3.2 – 0.9), in females  $0.78 \pm 0.36$  ng/mL (max-min: 1.6 – 1.4) and in males  $1.9 \pm 1.04$  ng/mL (max-min: 3.2 – 0.9). Table 1 illustrates the entire case history with a brief description of renal and some extrarenal symptoms and enzymatic levels. Study continuation: patients underwent thorough kidney screening and were subsequently referred for cardiologic, neurological and ophthalmic assessment. The female patient (n. 9) will need to be re-assessed to examine the possibility of an incorrect diagnosis of multiple sclerosis and/or a correlation between the two diseases. An estimated rate of prevalence for Fabry disease in the area concerned corresponds to approximately one affected subject per 1,818 inhabitants.

## DISCUSSION

Fabry disease is viewed as an obsolete, although still largely underestimated, disease, and is rarely taken into consideration as a causal factor in illnesses of unconfirmed origin in the fields of nephrology, neurology and ophthalmology. In nephrology clinics greater attention should be focused on microalbuminuria; the finding of levels below 200 mg/day may be the sole indication of the presence of renal FD [14].

In the present case, the finding of a family cluster in a geographically isolated and scarcely populated micro-area with a high prevalence of uremia, stemmed from the results of genetic testing of a patient undergoing dialysis. Linthorst et al. [15] estimated the prevalence of Fabry disease in patients on dialysis at 0.22%. Consequently, screening for Fabry disease in large renal dialysis clinics has been suggested. In France, 106 patients on haemodialysis were screened for  $\alpha$ -galactosidase activity: one patient with Fabry disease was identified and a further seven family members of this index case carried the same mutation [8]. A study in Japan reported that 1.2% of males receiving renal dialysis were affected by Fabry disease [16]. Conversely, a recent study by Saito et al. reported a 0.02% prevalence of FD in 5,408 male patients and 3,139 female dialysis patients (0.04% in males, 0.0% in females) [17], thus confirming the wide variability of phenotypic penetrance of the disease. Hereditary transmission of FD in the geographically isolated Sarrabus-Gerrei region in Sardinia is likely due to the marriage to healthy carriers of the disease or to people with compromised organs and/or apparatus dating back previous generations. Indeed, up until one hundred years ago this region was even more isolated and cultural tradition encouraged marriages between close family members. Age at onset and at diagnosis of FD is characterised by a wide variability. Mean ages at onset of symptoms and diagnosis of FD were 9 and 23 years (males) and 13 and 32 years (females), respectively, indicating misleading diagnosis or delays in both sexes [18]. In these patients FD was detected during investigation of concurrent involvement of other major organ systems. Closer monitoring and vigilance may contribute towards reducing or postponing progression of the disease and the need for dialysis or transplantation in patients with FD. Delayed onset forms of FD with initial cardiologic manifestations beyond the age of 40 have been reported [19]. Likewise, delayed onset forms of renal FD have been observed; Wilcox et al. reported alterations in renal function in heterozygous females with a mean age of 46 years [20].

In view of the presence in our family cluster of asymptomatic and/or scarcely symptomatic patients, as well as a patient on dialysis, it has not been possible to establish the clinical outcome and phenotypic expression of the newly detected mutation *c.159C>A p.Asn53Lys*. Ongoing neurological, cardiologic and ophthalmic studies may help to clarify this issue, although an additional practical problem is represented by the poor collaboration of patients and parents of minors. As FD has produced no discernible symptoms in these subjects, they are rather reluctant, with some (see patient n. 10 in Table 1) even refusing to undergo diagnostic tests or commence replacement enzymatic therapy when needed. Other studies have also reported a lack of symptoms, which may explain diagnostic and therapeutic delays, at times resulting in irreversible kidney damage [21, 22]. Missed diagnoses often occur in childhood, as many of these cases may be clinically silent [23]. The present study also included three children, thus underlining the need to raise awareness amongst paediatricians and parents, with the latter proving particularly reluctant to subject their currently asymptomatic children to a series of diagnostic tests.

Table 1: Familiar data

Patients	Age, years	VFG (ml/min/1.73mq)	Microalbuminuria, mg /day	Other specific symptoms	$\alpha$ -galactosidase (n.v: 2.6 $\mu$ mol/L/h)	Lysogb3 (n.v. < 1.8 ng/mL)
1) F	1	130	9.2	none	0.5	1.3
2) M	9	130	23.5	none	< 0.2	0.9
3) M	14	164	4.5	none	0.3	2.4
4) M	28	137	23.2	none	0.2	1.3
5) F	29	114	8.3	sinus arrhythmia, vertigo	0.6	1.6
6) F	34	126	9.5	none	0.7	1.5
7) F	45	105	14.4	none	1.1	1.4
8) F	51	124	31.8	none	1.2	1.4
9) F	52	141	97.7	in treatment for multiple sclerosis	0.9	1.6
10) F	54	169	144.7	cataract, azoospermia, hypohidrosis	0.4	3.2
11) F	62	73	65.8	acroparesthesia of hands, abdominal pain	0.6	1.6
12) F	65	—	—	Chronic Kidney Disease: renal transplant	0.2	1.2

M: male; F: female. Genetic variant for all subjects c.159C>A (p.Asn53Lys)

## CONCLUSIONS

Numerous reports published in the literature tend to suggest the absence of a significantly overt correlation between screened enzymatic levels and total accumulation; nevertheless, Consultants in a range of fields should continue to screen all individuals, particularly females, in whom a diagnosis of FD may be suspected [24]. In view of the wide range of classic and atypical variants of FD worldwide, estimation of reliable rates of incidence and prevalence of the disease is virtually impossible. The prevalence of FD may at times be characterized by a somewhat random form of distribution, or affect a series of family groups, thus giving rise to the hypothesis of a genetic recycling between distant relatives in geographically and culturally isolated regions. The imprint is

that the mutation *c.159C>A (p.Asn53Lys)* could have a phenotypic mild and/or belated negative effects on renal function. The currently available innovative screening tools are rapid and easy to use and should be adopted in routine diagnostics in Nephrology. A correct use of these tools will facilitate investigations in subjects attending nephrology clinics, particularly in areas characterized by a high incidence of chronic kidney disease.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

We are grateful to Genzyme® and Shire® for their kind contributions.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 2.
2. Owada M, Kitigawa T. Lysosomal storage diseases. *Nippon Rinsho*. 2001;8:317–27.
3. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2008; 93:112.
4. Desnick R, Ioannou Y, Eng C. Alpha-Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001:3733-3774.
5. Schiffmann R, Hughes DA, Linthorst GE, Ortiz A, Svarstad E, Warnock DG, West ML, Wanner C; Conference Participants. Screening, diagnosis, and management of patients with Fabry disease: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*. 2016 Dec 17. pii: S0085-2538(16)30603-2.
6. Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, Waldek S, Scott CR, Sillence DO, Breunig F, Charrow J, Germain DP, Nicholls K, Banikazemi M. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inherit Metab Dis*. 2007. Apr;30(2):184-92.
7. Fancellu L, Borsini W, Romani I, Pirisi A, Deiana GA, Sechi E, Doneddu PE, Rassu AL, Demurtas R, Scarabotto A, Cassini P, Arbustini E, Sechi G. Exploratory screening for Fabry's disease in young adults with cerebrovascular disorders in northern Sardinia. *BMC Neurol*. 2015 Dec 12;15:256.
8. Bekri S, Enica A, Ghafari T, Plaza G, Champenois I, Choukroun G, Unwin R, Jaeger P. Fabry disease in patients with end-stage renal failure: the potential benefits of screening. *Nephron Clin Pract*. 2005;101(1):c33-8.
9. Michael Beck, and Gere Sunder-Plassmann. Volume Fabry Disease Perspectives from 5 Years of FOS. Editors: Atul Mehta, Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006.
10. Bennett RL, Hart KA, O'Rourke E, Barranger JA, Johnson J, MacDermot KD, Pastores GM, Steiner RD, Thadhani R. Fabry disease in genetic counseling practice: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2002 Apr;11(2):121-46.
11. Linthorst GE, De Rie MA, Tjiam KH. Misdiagnosis of Fabry disease: importance of biochemical confirmation of clinical or pathological suspicion. *Br J Dermatol*. 2004 Mar. 150(3):575-7.
12. The neurological complications of Anderson-Fabry disease ( $\alpha$ -galactosidase A deficiency)-investigation of symptomatic and presymptomatic patients. *Q J Med*. 1990 May. 75(277):491-507.
13. Wang D, Eadala B, Sadilek M, Chamoles NA, Turecek F, Scott CR. et al. Tandem mass spectrometric analysis of dried blood spots for screening of mucopolysaccharidosis I in newborns. *Clin Chem*. 2005;51:898–900.
14. Mignani R, Preda P, Granata A, Maldini L, De Giovanni P, Monteverchi M, Rigotti A, Cagnoli L. Isolated microalbuminuria as the first clinical presentation of Fabry disease in an adult heterozygous female. *NDT Plus*. 2009 Dec;2(6):455-7.
15. Linthorst GE, Hollak CE, Korevaar JC, Van Manen JG, Aerts JM, Boeschoten EW.  $\alpha$ -Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1581–4.
16. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A. et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int*. 2003;64:801–7.
17. Hsu TR, Hung SC, Chang FP, Yu WC, Sung SH, Hsu CL, Dzhagalov I et Al. Later Onset Fabry Disease, Cardiac Damage Progress in Silence: Experience With a Highly Prevalent Mutation. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Dec 13;68(23):2554-2563.
18. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Fabry Registry. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*. 2008 Feb;93(2):112-28.
19. Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, Waldek S, Scott CR, Sillence DO, Breunig F, Charrow J, Germain DP, Nicholls K, Banikazemi M. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inherit Metab Dis*. 2007. Apr;30(2):184-92.
20. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Fabry Registry. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*. 2008 Feb;93(2):112-28a.
21. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, Murray GJ, Quirk JM, Altarescu G. et al. Natural history of Fabry renal disease: influence of  $\alpha$ -galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:122–38.

22. West M, Nicholls K, Mehta A, et al. Agalsidase alfa and kidney dysfunction in Fabry disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009 May; 20(5):1132-9.
23. Ries M, Ramaswami U, Parini R, Lindblad B, Whybra C, Willers I, et al. The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *Eur J Pediatr.* 2003;162:767-72.
24. Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, et al. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Investig Med.* 2000 Jul; 48(4):227-35

**Corrispondenza a:**

Piergiorgio Bolasco, M.D.

*Unit of Nephrology and Dialysis, ASSL di Cagliari*

Member of Italian Society of Nephrology

mail: pg.bolasco@tin.it