Screening della Malattia di Fabry nei Pazienti in Terapia Renale Sostitutiva nella Provincia di Modena

Articoli originali

Gaetano Alfano, Nicola Ganda, Caterina Cerami, Giacomo Mori, Francesco Fontana, Gianni Cappelli

Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, AOU Policlinico di Modena, Modena, Italia

Gaetano Alfano

Corrispondenza a:
Dr. Gaetano Alfano
AOU Policlinico di Modena
Unità di Nefrologia e Dialisi
via del Pozzo, 71
41124 Modena (MO)
e-mail: alfano.gaetano@policlinico.mo.it

ABSTRACT
Introduzione
La malattia di Fabry è una rara malattia genetica legata al cromosoma X caratterizzata dall'accumulo sistemico di globotriaosilceramidi, causata dal deficit dell'enzima α-galattosidasi A. Poichè la prevalenza della malattia di Fabry non è nota sul territorio regionale, abbiamo condotto uno studio per determinare la prevalenza di questa patologia nella città di Modena.
Materiali e Metodi
E' stato condotto uno screening della malattia di Fabry nei pazienti in terapia sostitutiva renale che afferiscono al Policlinico di Modena. Nei maschi è stata testata l'attività dell'α-galattosidasi A e, se positiva, l'analisi genetica e l'analisi del Lyso-Gb3. Nelle femmine è stata eseguita l'analisi genetica; in caso di mutazioni geniche veniva effettuato il dosaggio della globotriaosilsfingosina (Lyso-Gb3).
Risultati
Il test è stato eseguito su 388 pazienti di cui 166 trapiantati, 41 in dialisi peritoneale e 181 emodializzati, sia maschi che femmine. Oltre il 35% dei pazienti studiati non presentava una diagnosi etiologica della nefropatia di base. In fase di screening, il Lyso-Gb3 si è dimostrato più specifico del test dell'α-galattosidasi A (100% vs. 82.5%). Sono state identificate due varianti genetiche: c.13 A>G p.(Asn5Asp), variante probabilmente benigna, e c.937 G>T p.(Asp313Tyr), di significato incerto. Entrambe le pazienti non presentavano né sintomi né storia anamnestica compatibili con la malattia di Fabry.
Conclusioni
L'identificazione di varianti di significato incerto come la c.937G>Tp.(Asp313Tyr) evidenzia i limiti dell'analisi genetica nell'identificazione di un disordine genetico. Ulteriori studi sono necessari per definire la prevalenza della malattia e valutare l'utilità del Lyso-Gb3 in fase di screening.

PAROLE CHIAVE: Malattia di Fabry; Screening; Lyso-Gb3; c.13 A>G p. Asn5Asp; c.937 G>T p.(Asp313Tyr); D313Y; α-galattosidasi A.

ABSTRACT
Fabry disease is a rare genetic lysosomal storage disease, inherited in an X-linked manner, characterized by lysosomal deposition of globotriaosylceramide due to deficient activity of the enzyme α-galactosidase A. Because the prevalence of this genetic disorder is unknown in the Emilia Romagna region, we conducted a screening study to assess the prevalence of Fabry disease in the city of Modena, Italy.
Material and Methods
A screening study has been conducted in patients on renal replacement therapy at University Hospital of Modena. Screening tests have been performed using dried blood spot method. Alpha-galactosidase A activity and Lyso-Gb3 levels were evaluated in peripheral blood of all men. In women test based on genetic analysis; Lyso-Gb3 was measured only in patients with mutation of gene GLA.
Results
Screening tests have been performed on 388 subjects: 181 maintenance hemodialysis patients, 166 kidney transplant recipients and 41 peritoneal dialysis patients. About 40% of the patients did not had etiological diagnosis of renal disease. Lyso-Gb3 was more specific test than α- galactosidase A (100% vs. 82.5%) to diagnose Fabry disease. We found two different mutations: c.13 A>G p.(Asn5Asp), a variant likely benign and c.937 G>T p.(Asp313Tyr) a variant of uncertain significance. Both the patients carrying these genetic mutations had no symptoms or medical history compatible with Fabry disease.
Conclusion
Identification of variant of uncertain significance such as c.937G>Tp.(Asp313Tyr) showed the limits of genetic analysis to diagnose an inherit disease. Further studies are need to assess the diagnostic value of Lyso-Gb3 for screening for Fabry disease.

KEYWORDS: Fabry Disease, Screening; Lyso-Gb3; c.13 A>G p. Asn5Asp; c.937 G>T p.(Asp313Tyr); D313Y; α-galactosidase A

Introduzione

La Malattia di Anderson Fabry è una malattia genetica legata al cromosoma X dovuta al deficit enzimatico dell'α-galattosidasi A per mutazioni del gene GLA (1). L'α-galattosidasi A è un enzima lisosomiale responsabile del metabolismo degli glicosfingolipidi. La sua carenza determina l'accumulo di globotriaosilceramidi (GL-3, Gb 3, CTH) nei lisosomi e di globotriaosilsfingosine (Lyso-GL-3, Lyso-Gb3) nel circolo ematico (2).

Il mancato metabolismo di glicosfingolipidi provoca un effetto tossico sulle cellule endoteliali dei piccoli vasi e potenzialmente di tutte le cellule del corpo umano, tale da determinare lo sviluppo di un disordine sistemico. La malattia presenta un diverso fenotipo in relazione all'attività residua dell'enzima α-galattosidasi A e al sesso del paziente. Il fenotipo classico della malattia si manifesta nei maschi, che presentano una attività residua dell'enzima molto bassa o assente, con angiocheratomi, acroparestesie, dolori gastrointestinali, ipoidrosi e opacità corneali fin dall'infanzia ed in età più avanzata con insufficienza renale, patologie cardiache e cerebrali. Nelle femmine, la malattia può presentarsi con un ampio spettro di fenotipi a causa dell' inattivazione casuale del cromosoma X (1). Recentemente sono state identificate delle varianti della malattia di Fabry cosiddette *later-onset Fabry disease* (malattia di Fabry a esordio tardivo) le quali si caratterizzano per il coinvolgimento di un solo organo (cuore, rene, encefalo), la comparsa in un'età più tardiva e l'assenza delle manifestazioni precoci della forma classica (3–5).

Negli ultimi anni, un incremento dei programmi di screening ha aumentato la prevalenza della malattia di Fabry. Attualmente, la prevalenza nei neonati è all'incirca 1:3000 sia in Italia (6) che in Europa (2). Negli studi di screening estesi alle popolazioni a rischio, la prevalenza è risultata compresa tra 0,11% e 0,17% nei pazienti in trattamento dialitico (7–10) e pari a 0.38% nei pazienti di sesso maschile con trapianto di rene (11).

Nei maschi la diagnosi si basa sul riscontro di un'assente o ridotta attività dell'α-galattosidasi A nei leucociti del sangue periferico. Nelle donne invece, l'inattivazione casuale del cromosoma X, rende il test dell'α-galattosidasi A non dirimente e pertanto la diagnosi presuppone il sequenziamento del gene GLA. L'analisi genetica è peraltro prevista come conferma diagnostica anche nei maschi con un'attività patologica dell'α-galattosidasi A (2).

In ambito nefrologico il processo patologico è progressivo e irreversibile e determina, nel tempo, il fallimento funzionale dell'organo convolto. Nella forma classica la sintomatologia renale si manifesta tra la 1° e la 2° decade di vita con microalbuminuria o proteinuria (2) e più raramente con iperfiltrazione renale (12). Successivamente, si verifica un aumento della proteinuria con livelli anche superiori ad 1 g/24h, un incremento dei valori di creatinina sierica e una progressiva riduzione della velocità di filtrazione. La perdita di funzionalità renale è progressiva e può condurre allo stadio di *end stage renal disease* (ESRD) con la necessità di iniziare la terapia sostitutiva renale generalmente dopo i trent'anni di età (2, 13, 14). Nelle varianti *later-onset*, con coinvolgimento renale, la comparsa di proteinuria e l'insufficienza renale sono più tardivi e avvengono, all'incirca, tra la 5° e 6° decade (2, 6).

Data l' aspecificità delle manifestazioni renali, la malattia di Fabry può passare misconosciuta soprattutto nel paziente adulto con malattia avanzata e nelle forme *late-onset* con coinvolgimento renale. A tal proposito, facendo riferimento ai dati del Registro Regionale per la "Prevenzione dell'Insufficienza Renale Progressiva" (PIRP) dell'Emilia Romagna (report 2010) è noto che quasi il 45% dei pazienti in follow-up nefrologico inseriti nel registro non ha una precisa identificazione della malattia di base e che solo il 7.4% dei pazienti (inclusi quelli affetti da rene policistico autosomico dominante dell'adulto) è affetto da una nefropatia su base genetica (15). La bassa prevalenza delle malattie genetiche ad interessamento renale rispetto ad altre casistiche potrebbe far sospettare una sotto-diagnosi di queste patologie, tra cui la Malattia di Fabry, sul territorio

regionale.

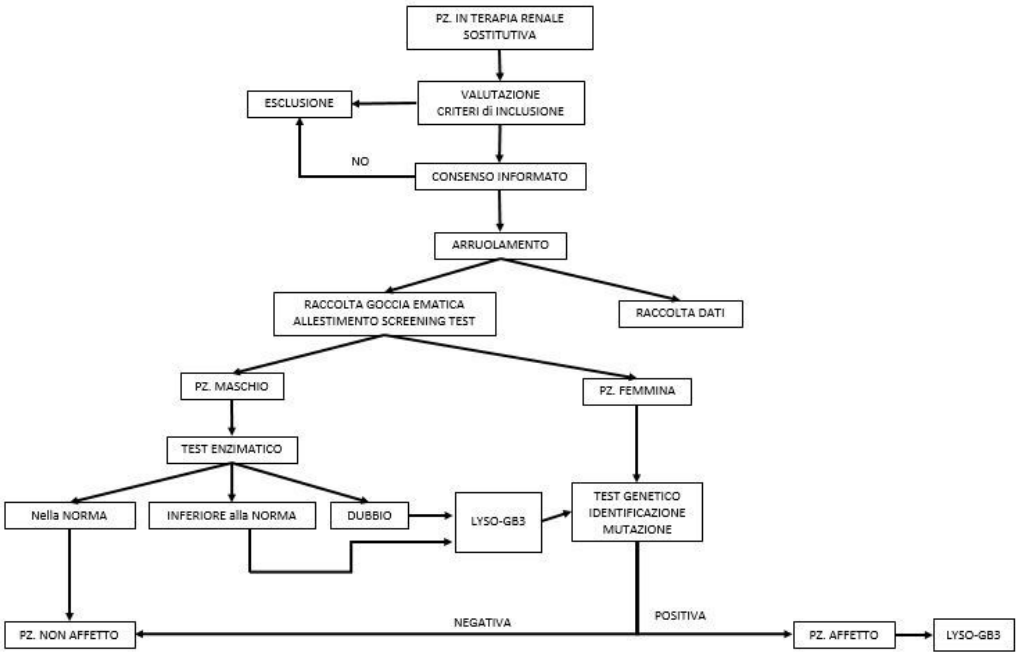
Lo scopo del nostro studio è determinare la prevalenza della malattia di Fabry nei pazienti in terapia renale sostitutiva afferenti al Policlinico di Modena, considerando, che fino ad ora, la prevalenza di questo disordine non è stata mai determinata. Inoltre, l'identificazione di alcuni casi di malattia di Fabry potrebbe avere un risvolto clinico importante per la prognosi del paziente data la presenza di una terapia sostitutiva che potrebbe prevenire potenzialmente le principali manifestazioni non-renali della malattia o addirittura rallentare la progressione della malattia renale cronica nei pazienti con trapianto renale.

Materiali e Metodi

Popolazione

Il disegno dello studio è di tipo prospettivo, monocentrico. La figura 1 riassume la *flowchart* dello studio. Lo screening per la malattia di Fabry è stato effettuato sulla popolazione di pazienti in terapia renale sostitutiva, quali i pazienti con trapianto di rene, i pazienti emodializzati cronici e i pazienti in trattamento peritoneale afferente al Policlinico di Modena. Nei pazienti emodializzati lo screening è stato esteso ai centri dialitici provinciali di Sassuolo, Pavullo nel Frignano, Pievepelago e Castelfranco Emilia. Il test di screening non è stato effettuato nei distretti dell'area Modena nord che comprende Carpi e Mirandola.

Figura 1



Flow chart dello screening di malattia di Fabry nei pazienti nefropatici.

Ogni paziente arruolato ha fornito il suo consenso a partecipare allo studio e al trattamento del materiale genetico dopo essere stato adeguatamente informato. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che avevano una diagnosi di malattia Fabry, i minori di 18 anni e i pazienti incapaci. Lo studio è stato effettuato secondo i principi della *good clinical practice* e in linea con la Dichiarazione di Helsinki relativa agli studi clinici. Lo studio è stato inoltre approvato dal Comitato Etico Provinciale (CE 112/16) e autorizzato dalla Direzione Sanitaria della AOU Policlinico di Modena.

Test di screening

Il test di screening è stato eseguito su prelievo di sangue venoso. Nei pazienti con trapianto renale e in trattamento dialitico peritoneale, il prelievo è stato effettuato durante i consueti esami ematochimici di controllo; nei pazienti emodializzati è stato effettuato prima dell'inizio del trattamento emodialitico. Il sangue prelevato è stato poi trasferito su della carta assorbente, o *filtercard,* ed il campione è stato lasciato ad asciugare per due ore a temperatura ambiente, come da protocollo. I campioni così ottenuti sono stati poi inviati presso il laboratorio di immunogenetica (Centogene®) sito a Rostock in Germania che utilizza tecniche di analisi su "gocce di sangue secco" (dried blood spot).

Data la variabilità dell'attività enzimatica dell'α-galattosidasi A nei pazienti di sesso maschile e femminile, lo screening per la malattia di Fabry è stato effettuato come segue:

Negli uomini è stata dapprima valutata l'attività dell'enzima α-galattosidasi A tramite metodica fluorimetrica su gocce di sangue secco. In caso di attività enzimatica inferiore al 25% del valore medio della popolazione normale, si procedeva all'esecuzione del sequenziamento genetico del gene GLA con metodica *next generation sequencing* (NGS-Illumina®) e alla determinazione del Lyso-Gb3 mediante spettrometria di massa.

Nelle donne è stata direttamente eseguita l'analisi molecolare genetica del gene GLA con metodica *next generation sequencing* (NGS-Illumina®). La determinazione dei livelli plasmatici di Lyso-Gb3 tramite spettrometria di massa è stata eseguita nei pazienti con mutazioni del gene GLA.

Di ciascun paziente arruolato nello studio, abbiamo ricercato la diagnosi della malattia renale causa dell'insufficienza renale, l'anno d'insorgenza dell'insufficienza renale e la presenza di eventuali comorbidità cardiache e neurologiche.
L'archiviazione e l'elaborazione dei dati è stata ottenuta tramite l'utilizzo del software Microsoft Excel 2013®. Per l'analisi dei dati continui è stata utilizzata la media, la deviazione standard (± SD), l'intervallo di confidenza al 95% (95% CI) e la percentuale. E' stata misurata la specificità per l'α-galattosidasi A e il Lyso-Gb3.

Risultati

Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione studiata sono descritte nella Tabella 1.

Tabella 1

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	
Età	
Media (± SD) — anni	60±15
Sesso	
Maschi n. (%)	261 (67,2)
Femmine n. (%)	127 (32,7)
Terapia sostitutiva	
Trapianto di rene n. (%)	166 (42,7)
Dialisi peritoneale n. (%)	41 (10,5)
Emodialisi n. (%)	181 (46,6)
Policlinico Modena n. (%)	131 (72,3)
Sassuolo n. (%)	27 (14,9)
Castelfranco n. (%)	16 (8,8)
Pavullo n. (%)	4 (2,2)
Pievepelago n. (%)	3 (1,6)
Anni in IRC (I-V stadio)	
Media (± SD) —anni	23±10
Biopsia renale	
Eseguita n. (%)	135 (34,7)
Non eseguita n. (%)	253 (65,2)
Comorbidità	
Cardiache n. (%)	102 (26,2)
Neurologiche n. (%)	36 (9,27)

SD, deviazione standard; IRC, insufficienza renale cronica.

Abbiamo eseguito lo screening su un totale di 388 pazienti in trattamento renale sostitutivo che afferiscono al Policlinico di Modena. I soggetti arruolati erano così divisi: 181 in trattamento emodialitico (46,7%), 166 con trapianto di rene (42.7%) e 41 in dialisi peritoneale (10,6%). La media dell'età dei pazienti era di 60 anni (± 15 anni). I maschi sottoposti allo screening sono stati 261, circa il 67,3% dei pazienti arruolati.

I risultati dei test eseguiti come screening sono visibili nella Tabella 2.

Tabella 2

RISULTATI SCREENING	
α-Galattosidasi A n. (%)	261 (67,3)
Patologica	36 (13,8)
Fallimento pre-analitico	17 (6,5)
Normale	208 (79,7)
Valore medio (± SD) (µmol/L/h)	21,3±8,1
Lyso-Gb3 n. (%)	55 (14,2)
Patologico	0 (0)
Normale	55 (100)
Valore medio (± SD) (ng/ml)	1,3±0,2
Sequenziamento genico n. (%)	180 (46,4)
Nessuna mutazione	178 (98,9)
Mutazione	2 (1,1)
Mutazioni identificate	c.13A>G p.(Asn5Asp); c.937G>T p.(Asp313Tyr)

Lyso-Gb3, globotriaosilsfingosina; SD, deviazione standard.

Il test di determinazione fluorimetrica dell'attività dell'enzima α-galattosidasi A è stato eseguito in tutti i pazienti maschi. La media dell'attività enzimatica è stata pari a 21,3 µmol/l/h (SD±8,1 µmol/l/h) (valore normale ≥ 15,3 µmol/l/h). L'attività enzimatica è risultata nei range di normalità in 208 pazienti mentre è risultata patologica in 53 di essi. Nei soggetti con un deficit enzimatico dell'α-galattosidasi A, 36 avevano un'attività ridotta (12,3±2,0 µmol/l/h) e in 17 è stato identificato un fallimento pre-analitico del test probabilmente dovuto a fattori quali il calore, l'umidità e l'inadeguata asciugatura della filtercard. Ciononostante, nei 17 campioni in cui non è stato possibile misurare l'attività enzimatica, si è riusciti ad eseguire le restanti analisi di spettrometria di massa per il Lyso-Gb3 e di sequenziamento genico per il gene GLA.

L'analisi della concentrazione del Lyso-Gb3 con spettrometria di massa nel plasma dei pazienti è stata effettuata su 55 campioni comprendenti: 36 pazienti maschi la cui attività enzimatica alla fluorimetria è risultata ridotta rispetto al range di normalità, 17 pazienti maschi il cui risultato del test fluorimetrico è risultato in un fallimento pre-analitico e 2 pazienti femmine nelle quali si sono rilevate delle mutazioni del gene GLA. La media delle concentrazioni di Lyso-Gb3 plasmatiche sono risultate nella norma (1,3±0,2 ng/ml), al di sotto della soglia di normalità di 1,8 ng/ml oltre la quale sarebbero state ritenute patologiche.

Il test genetico di sequenziamento del gene GLA è stato eseguito su 180 soggetti (46.3% della popolazione totale) rappresentati da tutti i pazienti di sesso femminile che hanno partecipato allo studio (n=127) e da tutti i pazienti di sesso maschile su cui è stata eseguita l'analisi del Lyso-Gb3 (n=53). Il test è risultato positivo per due differenti mutazioni del gene GLA, cioè nel 1,1% dei pazienti sottoposti al test di sequenziamento genico.

Non è stato possibile calcolare la sensibilità del test fluorimetrico per la quantificazione dell'attività enzimatica dell'α-galattosidasi A in quanto non sono stati riscontrati soggetti affetti da malattia di Fabry. Invece la specificità di tale metodica, escludendo i 17 campioni con fallimento pre-analitico

del test è risultata essere del 85,2% (95% CI, 80,1% – 89,4%).

La mancata diagnosi di casi con malattia di Fabry ha precluso il calcolo della sensibilità diagnostica del Lyso-Gb3, invece la specificità del test è risultata del 100% (95%CI, 93,51% – 100%), tuttavia, il numero limitato di pazienti sui quali questo test è stato eseguito ne limita il suo potere diagnostico.

L'analisi genetica ha identificato due differenti mutazioni del gene GLA in due pazienti con trapianto renale. Le caratteristiche cliniche nefrologiche delle due pazienti portatrici delle varianti del gene GLA sono mostrate nella Tabella 3.

Tabella 3

CARATTERISTICHE CLINICHE	Paziente 1	Paziente 2
Mutazioni	c.937G>T p.(Asp313Tyr)	c.13A>G p.(Asn5Asp)
Eziologia insufficienza renale	Nefropatia multifattoriale (pielonefrite cronica, nefrolitiasi)	GN a depositi di IgA
Anamnesi famigliare	Non dirimente	Non dirimente
Eventi neurologici	No	No
Eventi cardiovascolari	No	No
Caratteristiche mutazione	Incerta	Benigna
Terapia renale sostitutiva	Trapianto di rene	Trapianto di rene
Donatore	Vivente	Vivente
Follow-up trapiantologico (mesi)	59	35
Creatinina plasmatica ultimo controllo (mg/dl)	1,24	1,89
eGFR (ml/min)	53	28
Episodi di rigetto	No	No
Biopsia graft	No	Nefropatia da virus BK

BK, polyoma virus BK; GFR, filtrato glomerulare renale; GN, glomerulonefrite; SD, deviazione standard.

Il primo paziente è una donna di 59 anni trapiantata di rene che presenta una variante eterozigote **c.13A>G p.(Asn5Asp)**, una mutazione puntiforme nell'esone 1 del gene GLA, che determina la sostituzione di un aminoacido di asparagina con uno di acido aspartico in posizione 5 nella proteina. Questa mutazione è definita "conservativa", cioè determina uno scambio tra amminoacidi con simili caratteristiche fisico-chimiche senza alterare l'attività dell'enzima. Le analisi precedentemente eseguite con programmi bioinformatici di predizione di patogenicità quali Polyphen-2, SIFT, MutationTaster ed Align-GVGD prevedono che questa variante sia probabilmente benigna. Tale mutazione è stata identificata in una donna di 59 anni trapiantata renale la cui malattia di base è una glomerulonefrite a depositi IgA associata a positività per anticorpi anti-fosfolipidi senza comorbilità cardiache e neurologiche. Il Lyso-Gb3 è risultato nella norma, con una concentrazione di 1,3 ng/ml.

Il secondo paziente è una donna di 48 anni trapiantata di rene che presenta una variante eterozigote **c.937G>T p.(Asp313Tyr)**, una mutazione puntiforme nell'esone 6 del gene GLA una mutazione puntiforme nell'esone 1 del gene GLA, che porta alla sostituzione di un aminoacido di asparagina con una tirosina in posizione 5 nella proteina. Tale mutazione è nota in letteratura come variante D313Y e la sua patogenicità è molto dibattuta. Viene classificata come variante genetica di significato incerto (GVUS). La concentrazione di Lyso-Gb3 è risultata nel range di normalità, non mostrando segni di accumulo. La paziente non è mai stata sottoposta a biopsia renale e l'etiologia della malattia renale è verosimilmente secondaria alla pielonefrite cronica e alla calcolosi renale. L'anamnesi famigliare della paziente è muta così come non sono state rilevate comorbidità riferibili alla malattia di Fabry. In particolare, la paziente, nell'ambito degli esami richiesti per il follow-up trapiantologico, si sottopone annualmente all'esecuzione di esami cardiologici che non hanno evidenziato, finora, patologie cardiache intercorrenti.

Dall'analisi dei dati riguardanti le malattie di base dei pazienti sottoposti allo screening emerge che dei 388 pazienti arruolati solo in 135 (34,8% dei pazienti studiati) è stata eseguita una biopsia renale, di cui 12 pazienti (8,8%) avevano una diagnosi non definita e 16 (11,8%) presentavano una diagnosi nefroangiosclerosi. Dei 253 pazienti (65,2%) non sottoposti a biopsia circa 96 (37.9%) non aveva una diagnosi della malattia di base (Tabella 4).

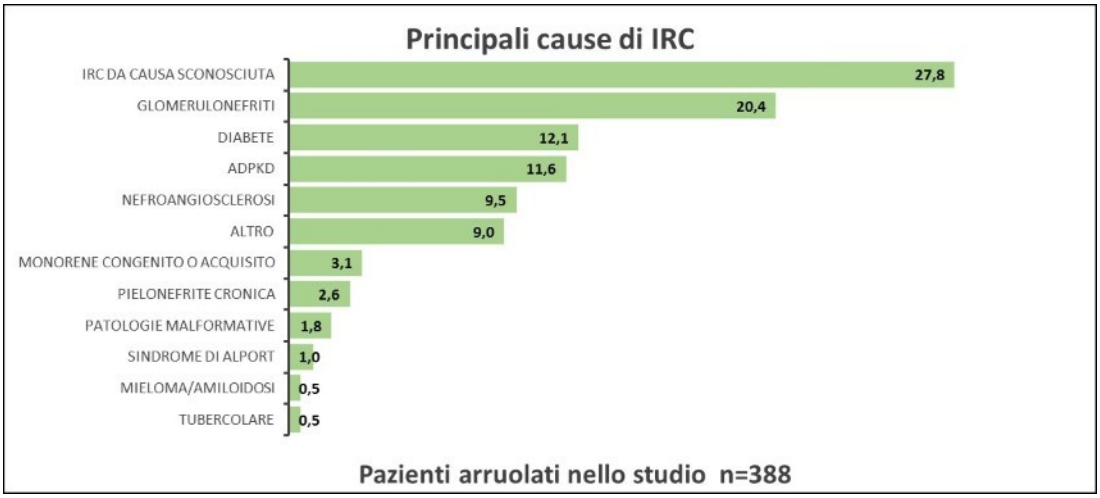
Tabella 4

MALATTIE RENALI	
Biopsia n. (%)	**135 (34,7)**
IgA n. (%)	26 (19,2)
GNMP n. (%)	21 (15,5)
Nefroangiosclerosi n. (%)	16 (11,8)
Diabete n. (%)	12 (8,8)
Glomerulosclerosi focale segmentaria n. (%)	10 (7,4)
Vasculite n. (%)	6 (4,4)
GN membranosa n. (%)	6 (4,4)
Sindrome di Alport n. (%)	4 (2,9)
GN lupica n. (%)	3 (2,2)
Mieloma/amiloidosi	2 (1,4)
GN cronica ND n. (%)	12 (8,8)
Altro n. (%)	17 (12,5)
No biopsia n. (%)	**253 (65,2)**
GN cronica ND n. (%)	96 (37.9)
ADPKD n. (%)	45 (17,7)
Diabete n. (%)	35 (13.8)
Nefroangiosclerosi n. (%)	21 (8,3)
Rene congenito o acquisito n. (%)	12 (4,7)
Pielonefrite cronica n. (%)	10 (3,9)
Altro n. (%)	27 (10,6)

ADPKD, rene policistico autosomico dominante; GN, glomerulonefrite; GNMP, glomerulonefrite membranoproliferativa; IgAN, nefropatia a depositi mesangiali di IgA; ND, non determinata.

Tra le cause più frequenti di IRC identifichiamo le glomerulonefriti (20.4%), la nefropatia diabetica (12,1%), rene policistico autosomico dominante (11,6%) e la nefroangiosclerosi (9,5%) (Figura 2).

Figura 2



Principali cause di IRC nei pazienti sottoposti allo screening. Circa il 40% dei pazienti non ha una causa precisa di IRC (la percentuale è data dalla somma della frequenza di "IRC da causa sconosciuta" e di "nefroangiosclerosi"). IRC, insufficienza renale cronica; ADPKD, rene policistico autosomico dominante.

Infine la valutazione delle eventuali comorbidità ha evidenziato che 102 pazienti (26,3%) presentano comorbidità cardiache, tra cui 37 avevano avuto un precedente episodio di infarto del miocardio e 27 presentavano una diagnosi di cardiopatia ipertrofica.

Trentasei pazienti (9,3%) invece presentano una storia clinica di malattia neurologica, di cui 20 avevano una diagnosi di ictus ischemico e 12 erano affetti da una polineuropatia periferica (Tabella 5).

Tabella 5

Comorbidità cardiache n. (%)	102 (26,3)
Aritmie n. (%)	16 (15,7)
Valvulopatie n. (%)	5 (4,9)
Altro (angina stabile, instabile, etc) n. (%)	10 (9,8)
Cardiopatia dilatativa n. (%)	7 (6,9)
Cardiopatia ipertrofica n. (%)	27 (26,5)
Cardiopatia ischemica n. (%)	37 (36,3)
IMA n. (%)	34 (91,9)
NSTEMI n. (%)	3 (8,1)
Comorbidità neurologiche n. (%)	36 (9,3)
Polineuropatia n. (%)	12 (33,3)
Eventi cerebrovascolari n. (%)	24 (66,7)
Emorragici n. (%)	4 (16,7)
Ischemici n. (%)	20 (83,3)
TIA n. (%)	6 (30)
Ictus n. (%)	14 (70)
Ictus lacunare n. (%)	1 (7,1)
Ictus talamico n. (%)	1 (7,1)
Ictus corticale n. (%)	12 (85,8)

IMA, infarto miocardico acuto; NSTEMI, infarto del miocardio senza elevazione del tratto ST; TIA, attacco ischemico transitorio.

Discussione

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi di screening per stabilire un'esatta prevalenza

della malattia di Fabry. Data la rarità della malattia nella popolazione generale, la maggior parte dei progetti sono stati condotti su popolazioni a rischio come per esempio nei pazienti con cardiomiopatia ipertrofica (16, 17), ictus criptogenetico (18, 19) e malattia renale cronica (9–11), dove la probabilità di trovare casi di Fabry è sicuramente più elevata rispetto alla popolazione generale. Se da un lato questi programmi di screening hanno fornito delle stime più realistiche della prevalenza della malattia di Fabry in relazione alla popolazione analizzata, d' altro canto, alcuni studi hanno mostrato importanti limiti metodologici riconducibili a metodi di screening non sempre uniformi e alla mancata correlazione genotipo-fenotipo delle mutazioni riscontrate. Quindi sussiste, almeno potenzialmente, il rischio che alcune casistiche sovrastimino la reale prevalenza della malattia di Fabry in quanto considerano come patologiche alcune mutazioni che in realtà sono di significato incerto o addirittura benigne.

Con l'obiettivo di valutare la presenza della malattia di Fabry sul territorio della Provincia di Modena abbiamo condotto uno screening in una popolazione ad alto rischio per la mattia di Fabry, quali i pazienti in trattamento renale sostitutivo. Il nostro progetto fonda le sue basi sul presupposto che, sul territorio regionale, la prevalenza di nefropatie ad etiologia genetica è verosimilmente sottostimata e che esiste una quota di pazienti con insufficienza renale cronica che non ha una precisa diagnosi nefrologica, per cui è probabile che tra questi pazienti si possono celare alcuni casi misconosciuti di malattia di Fabry.

Dall'analisi dei dati clinici dei pazienti sottoposti a screening emerge un quadro che rispecchia quanto evidenziato analizzando il registro regionale PIRP (15). Quasi il 40% dei nostri pazienti partecipanti allo studio non aveva una diagnosi istologica della malattia renale e che solo il 12% circa della popolazione ha una diagnosi di malattia renale su base genetica, una prevalenza nettamente inferiore rispetto a quanto documentato in letteratura, dove si stima una frequenza del 20% circa (20, 21). E' da sottolineare che percentuali così elevate di una mancata diagnosi della malattia renale rispecchiano problematiche attuali in ambito nefrologico che trovano spesso il loro fondamento in un'impossibilità nell'approfondire nefropatie che si presentano in uno stadio avanzato e in una minor propensione ad eseguire biopsie renali in pazienti che hanno una nefropatia ad etiologia verosimilmente "nefroangiosclerotica".

L'analisi dei nostri dati ha documentato che la misurazione dei livelli di Lyso-Gb3, è un test diagnostico più specifico rispetto alla determinazione dell'attività dell'α-galattosidasi A, infatti ha mostrato una specificità del 100% (95%CI, 93,51% a 100%) contro una specificità dell'85,2% dell'α-galattosidasi A (95% CI, 80,16% a 89,45%). Essendo la determinazione del Lyso-Gb3 una metodica di recente introduzione, ancora poco è noto sulla sua reale sensibilità e specificità in fase diagnostica. Dagli studi più recenti sembra che questo metabolita tenda ad accumularsi nel plasma e nelle cellule dei pazienti affetti da malattia di Fabry (22) e che i livelli di Lyso-Gb3 correlino con la sintomatologia manifestata dal paziente (23). Infatti, pazienti con malattia di Fabry conclamata e quelli con interessamento renale e cardiaco sembrano avere livelli elevati di Lyso-Gb3 mentre pazienti con malattia agli stadi iniziali o pazienti asintomatici sembrano avere livelli più bassi di Lyso-Gb3, se non addirittura normali. Quindi, questo nuovo biomarker potrebbe essere d'ausilio nella diagnosi della malattia in quanto può contribuire al miglioramento della certezza diagnostica oltre che contribuire al monitoraggio dell'avanzamento della malattia e della risposta alla terapia sostitutiva con l' enzima ricombinante (2, 23). Dall'altra parte, come affermato precedentemente, il ruolo del Lyso-Gb3 come biomarker della malattia di Fabry continua a non essere del tutto chiaro in quanto in diversi individui presentanti la stessa mutazione (per esempio la mutazione D313Y) (24) sono stati ritrovati livelli differenti di Lyso-Gb3, in alcuni patologici mentre in altri nella norma. Inoltre, sottolineiamo che la maggior specificità del Lyso-Gb3 rispetto all'α-galattosidasi A, identificata nel nostro studio, è limitata dalla grande differenza numerica dei campioni su cui i due test sono stati eseguiti (55 pazienti per il Lyso-Gb3 contro i 261 pazienti per il test fluorimetrico),

pertanto la sua utilità in fase di screening va considerata prudentemente.

L'analisi genetica dei pazienti maschi con un livello patologico di α-galattosidasi A e di tutte le femmine partecipanti allo studio ha identificato due diverse mutazioni.
La prima è la mutazione **c.13A>G p.(Asn5Asp)** è stata identificata in una donna di 59 anni trapiantata renale la cui malattia di base è una glomerulonefrite a depositi di IgA. Questa mutazione si trova in un nucleotide debolmente conservato nel gene GLA ed è considerata probabilmente benigna. Questa variante è riportata nel database Exome Aggregation Consortium (database EXAC) con una frequenza di 0.000011, cioè di 1 su 87357 alleli. Essendo la frequenza nettamente minore dell'1%, non può essere considerata un polimorfismo pur essendo situata in una regione debolmente conservata del gene. Non avendo la paziente un'anamnesi famigliare positiva per malattia di Fabry, non presentando altri sintomi o segni possibilmente ascrivibili alla malattia di Fabry e non avendo mostrato concentrazioni elevate di Lyso-Gb3, la paziente non è stata ritenuta affetta da malattia di Fabry.

La seconda mutazione, la variante **c.937G>T p.(Asp313Tyr),** è stata identificata in una paziente di 48 anni anch'essa trapiantata di rene la cui malattia di base è verosimilmente multifattoriale (pielonefrite cronica e calcolosi renale). In letteratura, la patogenicità di questa mutazione, nota come D313Y, è un tema molto dibattuto. Mentre, negli anni addietro, questa mutazione veniva considerata a tutti gli effetti una variante patologica (25, 26), oggi la sua connotazione è meno chiara; addirittura alcuni autori suggeriscono che tale mutazione sia da considerarsi un polimorfismo, cioè una variante neutra (27). Niemann et al (28) sostengono che la mutazione D313Y non sia clinicamente rilevante, in quanto i pazienti portatori di tale mutazione non presentavo sintomi clinici patognomonici di malattia di Fabry e la misurazioni dell'α-galattosidasi A e del Lyso-Gb3 non risultano patologiche. Nel 2003 Yasuda et al (29) hanno dimostrato che l'α-galattosidasi A con mutazione D313Y riesce svolgere la propria funzione enzimatica all'interno dei lisosomi nonostante sia stata ritrovata un'attività pseudo-ridotta a livello citoplasmatico. Questa differenza è dovuta ad un'attività pH dipendente dell'alfa-galattosidasi A con mutazione D313Y, infatti, la proteina mutata mostra un'attività enzimatica normale nel pH acido dei lisosomi mentre risulta ridotta nel pH neutro del citoplasma cellulare (29). Probabilmente la sostituzione amminoacidica in posizione 313, che è situata a una certa distanza dal sito attivo della proteina, altera l'organizzazione strutturale della proteine senza inficiarne significativamente l'attività enzimatica (30). Yasuda et al (29), infine, concludono che la sostituzione amminoacidica in posizione 313 con la tirosina può essere tollerata senza provocare un importante deficit enzimatico della proteina; inoltre, le piccole quantità di Gb3 e di Lyso-Gb3 che si depositano rispettivamente nella cellula e nel plasma sono insignificanti e non sono in grado di determinare tossicità cellulare e pertanto avvalorano la tesi della non patogenicità della variante D313Y. Tuttavia, recentemente due studi hanno descritto una associazione tra la mutazione D313Y e pazienti con lesioni multifocali della sostanza bianca (31, 32). Anche Du Moulin et al (24), nel loro studio, sostengono l'esistenza di un' associazione tra la mutazione D313Y e varie manifestazioni d'organo correlate alla malattia di Fabry. In particolare le manifestazioni ricorrenti nei pazienti, verosimilmente affetti da malattia di Fabry, erano il dolore neuropatico, le alterazioni oculari (cornea verticillata e tortuosità vascolari sia congiuntivali che retiniche) e l'ictus in età giovanile (<55 anni). Lo studio è però gravato da una serie di limiti. Oltre ad essere uno studio retrospettivo, gli autori non considerano l'effetto confondente di comorbidità diffuse nella popolazione come diabete o ipertensione che sono, ad oggi, le principali cause delle varie manifestazioni presentate. Infine dei 10 pazienti considerati affetti da Fabry, solo due presentavano concentrazioni elevate di Lyso-Gb3, solo un paziente maschio aveva un' attività ridotta dell'α-galattosidasi A e in nessun paziente è stato identificato un coinvolgimento cardiaco, renale o dermatologico tipico della malattia.

In conclusione la patogenicità di questa mutazione ad oggi non è stata ancora chiarita, pertanto

ulteriori studi sono necessari per stabilire la sua correlazione con le manifestazioni cliniche tipiche del Fabry. Per quanto riguarda il nostro caso, dato che la paziente non mostrava una sintomatologia tipicamente ascrivibile alla malattia di Fabry, la concentrazione di Lyso-Gb3 non era patologica e l'anamnesi famigliare risultava muta per malattia renale e/o cardiovascolare, non è stata posta diagnosi di Fabry, bensì si è convenuto per un stretto monitoraggio clinico-strumentale.

Il principale limite di questo studio, strettamente correlato alla non identificazione dei casi di malattia di Fabry, è stata l'incapacità di valutare la sensibilità e il potere predittivo della α-galattosidasi A e del Lyso-Gb3 nella diagnosi della malattia di Fabry nei pazienti in terapia sostitutiva renale.

Inoltre, siccome l'esiguo numero di pazienti ha ridotto le probabilità di indentificare pazienti con la mutazione del gene GLA, si auspica che futuri studi multicentrici, disponendo di una casistica più ampia, possano stimare una prevalenza più realistica di questa malattia nei pazienti nefropatici.

Conclusioni

Con lo scopo di indagare la prevalenza della malattia di Fabry abbiamo realizzato questo studio prendendo in esame una popolazione ad alto rischio per la malattia di Fabry quali i pazienti in trattamento renale sostitutivo renale.

L'analisi genetica condotta su 180 dei 388 pazienti studiati ha identificato le mutazioni **c.13A>G p.(Asn5Asp)** e **c.937G>T p.(Asp313Tyr)** del gene GLA che sono considerate rispettivamente di significato benigno e incerto. L'assenza di mutazioni patologiche non ha permesso di stimare la prevalenza della malattia di Fabry tra i pazienti studiati. Un aspetto interessate del nostro studio è stato il riscontro di un'aumentata specificità del Lyso-Gb3 rispetto all'α-galattosidasi A che come ipotizzato da recenti evidenze scientifiche potrebbe rappresentare un nuovo biomarker per la diagnosi della malattia di Fabry oltre che un indicatore di risposta alla terapia.

Infine il nostro studio mette in luce alcuni aspetti critici degli studi di screening di questa patologia. Innanzitutto la necessità di studi multicentrici per studiare l'esatta prevalenza della patologia su una popolazione molto ampia. In secondo luogo vi è la necessità di identificare la patogenicità di alcune mutazioni del gene GLA in modo da fornite il miglior supporto assistenziale ai pazienti che presentano tali mutazioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Germain DP. Fabry disease. Orphanet J Rare Dis. 2010;5:30. doi:10.1186/1750-1172-5-30.
2. Schiffmann R, Hughes DA, Linthorst GE, et al. Screening, diagnosis, and management of patients with Fabry disease: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. Kidney Int. 2017;91(2):284-293. doi:10.1016/j.kint.2016.10.004.
3. von Scheidt W, Eng CM, Fitzmaurice TF, et al. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. N Engl J Med. 1991;324(6):395-399. doi:10.1056/NEJM199102073240607.
4. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. N Engl J Med. 1995;333(5):288-293. doi:10.1056/NEJM199508033330504.
5. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. Kidney Int. 2003;64(3):801-807. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00160.x.
6. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet. 2006;79(1):31-40. doi:10.1086/504601.
7. Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, et al. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. J Am Soc Nephrol JASN. 2004;15(5):1323-1329.
8. Nishino T, Obata Y, Furusu A, et al. Identification of a novel mutation and prevalence study for fabry disease in Japanese dialysis patients. Ren Fail. 2012;34(5):566-570. doi:10.3109/0886022X.2012.669300.
9. Okur I, Ezgu F, Biberoglu G, et al. Screening for Fabry disease in patients undergoing dialysis for chronic renal failure in Turkey: identification of new case with novel mutation. Gene. 2013;527(1):42-47. doi:10.1016/j.gene.2013.05.050.
10. Merta M, Reiterova J, Ledvinova J, et al. A nationwide blood spot screening study for Fabry disease in the Czech Republic haemodialysis patient population. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc – Eur Ren Assoc. 2007;22(1):179-186. doi:10.1093/ndt/gfl528.
11. Kleinert J, Kotanko P, Spada M, et al. Anderson-Fabry disease: a case-finding study among male kidney transplant recipients in Austria. Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant. 2009;22(3):287-292. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00791.x.
12. Tøndel C, Bostad L, Hirth A, Svarstad E. Renal biopsy findings in children and adolescents with Fabry disease and minimal albuminuria. Am J Kidney Dis 2008;51(5):767-776. doi:10.1053/j.ajkd.2007.12.032.
13. Warnock DG, Daina E, Remuzzi G, West M. Enzyme replacement therapy and Fabry nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol CJASN. 2010;5(2):371-378. doi:10.2215/CJN.06900909.
14. Schiffmann R, Warnock DG, Banikazemi M, et al. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc – Eur Ren Assoc. 2009;24(7):2102-2111. doi:10.1093/ndt/gfp031.
15. Rapporto annuale del Registro regionale Emiliano-Romagnolo di dialisi e trapianto (report 2010). http://salute.regione.emilia-romagna.it/news/regione/pubblicato-il-rapporto-annuale-del-registro-regionale-di-dialisi-e-trapianto. Accessed December 3, 2017.
16. Terryn W, Deschoenmakere G, De Keyser J, et al. Prevalence of Fabry disease in a predominantly hypertensive population with left ventricular hypertrophy. Int J Cardiol. 2013;167(6):2555-2560. doi:10.1016/j.ijcard.2012.06.069.
17. Kubo T, Ochi Y, Baba Y, et al. Prevalence and clinical features of Fabry disease in Japanese male patients with diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. J Cardiol. 2017;69(1):302-307. doi:10.1016/j.jjcc.2016.05.014.
18. Rolfs A, Fazekas F, Grittner U, et al. Acute cerebrovascular disease in the young: the Stroke in Young Fabry Patients study. Stroke. 2013;44(2):340-349. doi:10.1161/STROKEAHA.112.663708.
19. Rolfs A, Böttcher T, Zschiesche M, et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. Lancet Lond Engl. 2005;366(9499):1794-1796. doi:10.1016/S0140-6736(05)67635-0.
20. Vivante A, Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2016;12(3):133-146. doi:10.1038/nrneph.2015.205.
21. Mallett A, Patel C, Salisbury A, Wang Z, Healy H, Hoy W. The prevalence and epidemiology of genetic renal disease amongst adults with chronic kidney disease in Australia. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:98. doi:10.1186/1750-1172-9-98.
22. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(8):2812-2817. doi:10.1073/pnas.0712309105.
23. Togawa T, Kodama T, Suzuki T, et al. Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. Mol Genet Metab. 2010;100(3):257-261. doi:10.1016/j.ymgme.2010.03.020.
24. du Moulin M, Koehn AF, Golsari A, et al. The mutation p.D313Y is associated with organ manifestation in Fabry disease. Clin Genet. 2017;92(5):528-533. doi:10.1111/cge.13007.
25. Eng CM, Ashley GA, Burgert TS, Enriquez AL, D'Souza M, Desnick RJ. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. Mol Med Camb Mass. 1997;3(3):174-182.

26. Eng CM, Ashley GA, Burgert TS, Enriquez AL, D'Souza M, Desnick RJ. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. Mol Med Camb Mass. 1997;3(3):174-182.
27. van der Tol L, Smid BE, Poorthuis BJHM, et al. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. J Med Genet. 2014;51(1):1-9. doi:10.1136/jmedgenet-2013-10185
28. Niemann M, Rolfs A, Giese A, et al. Lyso-Gb3 Indicates that the Alpha-Galactosidase A Mutation D313Y is not Clinically Relevant for Fabry Disease. JIMD Rep. 2013;7:99-102. doi:10.1007/8904_2012_154.
29. Yasuda M, Shabbeer J, Benson SD, Maire I, Burnett RM, Desnick RJ. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. Hum Mutat. 2003;22(6):486-492. doi:10.1002/humu.10275.
30. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. Mol Genet Metab. 2003;80(3):307-314. doi:10.1016/S1096-7192(03)00136-7.
31. Lenders M, Duning T, Schelleckes M, et al. Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the α-galactosidase A gene. PloS One. 2013;8(2):e55565. doi:10.1371/journal.pone.0055565.
32. Becker J, Rolfs A, Karabul N, Berlit P, Kraemer M. D313Y mutation in the differential diagnosis of white matter lesions: Experiences from a multiple sclerosis outpatient clinic. Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl. 2016;22(11):1502-1505. doi:10.1177/1352458516638747.