

S-Pi-typning (alfa-1-Antitrypsin klassning av fenotyp)

Bakgrund

Pi-typning rekommenderas då man önskar ta reda på huruvida en patient bär på anlag som kan kopplas till antitrypsinbrist. Indikationer för analysen kan t ex vara kliniska symptom som inger misstanke om antitrypsinbrist (ex. lungsjukdom, leversjukdom, panniculit) eller sänkt antitrypsinhalt i plasma. En annan relativt vanlig indikation är som ett led i en släktutredning för antitrypsinbrist. En antitrypsinhalt inom referensområdet utesluter inte att patienten bär på anlag för antitrypsinbrist [1-4]. För de som vill läsa mer hänvisas i första hand till det nationella vårdprogrammet för alfa-1-anitrypsinbrist [5]. En sammanställning av de vanligaste Pi-typerna och deras koppling till sjukdom återfinns i Läkartidningen [6], och en sammanfattning med fokus på ärftlig antitrypsinbrist och leversjukdom kan läsas i "Utredning av patologiska leverprover, Bakgrundsdocumentation" sammanställt av Svensk Gastroenterologisk Förenings arbetsgrupp [7]. Önskar man ta del av publikationer som rör uppföljning av patienter med ärftlig antitrypsinbrist kan t.ex. "The Clinical profile of Subjects Included in the Swedish National Register on Individuals with Severe Alpha 1-Antitrypsin deficiency" [8], "Clinical course and prognosis of never-smokers with severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ) [9] och "The Swedish α 1-Antitrypsin Screening Study: Health Status and Lung and Liver Function at age 34" [10] vara av värde.

Pi-typning bör alltid ingå som ett led i en antitrypsinbristutredning. De vanliga allelerna M, S och Z identifieras på ett tillförlitligt sätt med Pi-typning. Ibland kan Pi-typningen vara inkonklusiv eller inge misstanke om en mer ovanlig antitrypsinvariant. I dessa fall är ofta en kompletterande DNA-analys av värde. Den kräver EDTA-helblod och utförs på DNA-laboratoriet. Läs [Alfa1-antitrypsinbrist-utredning](#) i Analysportalen.

Proteinasinhibitorn (Pi) α_1 -antitrypsin (AAT) uppvisar en uttalad mikroheterogenitet i laddning som förklaras av variationer i både peptid-

och oligosackariddelen. Mer än 75 kända genetiska varianter bidrar till heterogeniteten i peptiddelen. Genom separation enligt isoelektrisk punkt över ett mycket snävt pH-område kan genetiska varianter som ger upphov till förändrad laddning hos antitrypsin-molekylen detekteras.

De två vanligaste genetiska varianterna som är kopplade till sänkt halt av antitrypsin i plasma och den ärftliga sjukdomen antitrypsinbrist är Z-allelen respektive S-allelen. Båda har sitt ursprung i punktmutationer som ger upphov till ett aminosyraskifte men i olika delar av genen. Aminosyraskiftet i det uttryckta Z- respektive S-proteinet är båda påvisbara med Pi-typning.

Det finns flera alleler som anses som normala. De vanligast förekommande av dem uttrycker antitrypsin med en mobilitet som betecknas M och således betraktas Pi M som en normal fenotyp.

Det förekommer ovanliga alleler som är kopplade till antitrypsinbrist och som uttrycker ett protein med förändrade egenskaper där mobilitet vid den isoelektriska fokuseringen sammanfaller med det normala proteinets mobilitet (M).

Sänkt halt av AAT i serum predisponerar för lungemfysem bland annat p.g.a. bristande skydd mot leukocytelastas i alveolerna. Pi Z proteinet (och vissa andra sällsynta varianter) medför risk för leversjukdom, både hos nyfödda och hos vuxna, orsakad av en koncentration- och temperaturberoende polymerisering av proteinet.

Svar/Tolkning/Bedömning

Klassning av fenotyp utförs av behörig läkare baserat på gelplatta, antitrypsinhalt och tillgänglig remissinformation.

Metodik/mätprincip

Pi-typ ($\alpha 1$ -antitrypsin fenotyp) bestäms med hjälp av isoelektrisk fokusering av individens serum. Genom cysteinreduktion av $\alpha 1$ -antitrypsin ökas upplösningen av de katodala $\alpha 1$ -antitrypsinfraktionerna, vilket är nödvändigt för en säker typning, framför allt vad gäller MZ- och SZ-fenotyperna.

För separation av $\alpha 1$ -antitrypsinfraktionen finns två tillvägagångssätt, isoelektrofokusering i en polyakrylamidgel som köps färdig och klar att

använda eller isoelektrofokusering i en egengjuten 5 % polyakrylamidgel.

Den egengjutna polyakrylamidgelen framställs genom polymerisering av akrylamid i närvaro av N, N¹-metylen-bisakrylamid som tvärbindande komponent. Ammoniumpersulfat och N, N, N, N¹-tetrametyletylendiamin (TEMED) användes som katalysatorer. Två lösningar med individuella amfolyter inom pH-intervallet 4,2–4,9 och 3,0–10,0 tillsätts gelblandningen. Polyakrylamidgelen gjuts på plastfilm mellan glasplattor.

Den färdiggjutna gelen är pre-polymeriserad under optimerade förhållande för att producera en gel som lämpar sig för isoelektrisk fokusering. Precis som den egengjutna gelen är den en 5 % polyakrylamidgel. Katalysatorer och toxiska substanser har tvättats bort från gelens yta vilket resulterar i en icke-toxisk gel.

Gelen innehåller en amfolytcocktail med bäst möjlighet att uppnå en optimal pH-gradient (pH 4–5). Inga elektrodlösningar och elektrodremsor krävs och elektroderna placeras direkt på gelytan.

För den egengjutna gelen gäller att cysteinreducerat serum sätts på provappliceringspapper, som placerats på polyakrylamidgelen.

Den färdiggjutna gelen innehåller 24 förpolymeriserade provbrunnar för enkel applicering av upp till 25 µl proteinlösning.

De olika α1-antitrypsinfraktionerna fokuseras till ett läge, som motsvarar deras respektive isoelektriska punkter. Efter avslutad elektrofokusering fixeras proteinerna och färgas med Coomassie R 250. Överskottsfärgen tvättas bort, gelplattan får "torka" och täcks därefter med plastfilm.

Interferenser och felkällor

Inga kända.

Mätområde / Detektionsgräns

Saknas. Ingen kvantitativ analys.

Mätosäkerhet

Kan ej fastställas. Ingen kvantitativ analys.

Spårbarhet

Ej relevant.

Referenslitteratur

1. Nilsson-Ehle P, red. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin. Lund: Studentlitteratur 2003, 8:e upplagan sid 143-144..
2. Crystal, RG (ed). Alpha 1-antitrypsin Deficiency: Biology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Therapy. Lung Biology in Health and Disease Volume 88; New York, NY: Marcell Dekker, Inc. 1996.
3. Pierce JA, Jeppsson JO, Laurell CB. Alpha-1 Antitrypsin phenotypes determined by isoelectric focusing of the cysteine-antitrypsin mixed disulfide in serum. Anal Biochem. 1976; 74:227-241.
4. Jeppsson, JO and Franzén B, Typing of genetic variants of alpha 1-antitrypsin by electrofocusing. Clin Chem 1982; 28: 219–225.
5. Nationellt vårdprogram för alfa-1-antitrypsinbrist, SLMF 2022.
https://slmf.se/wp-content/uploads/2022/12/aat_riktlinjer_slmf_april2022.pdf
6. Janciauskiene et. al, Läkartidningen nr 48 (2007).
7. Utredning av patologiska leverprover, Bakgrundsdokumentation, 2024-02-21. https://svenskgastronterologi.se/wp-content/uploads/2023/01/patologiska_leverprover-bakgrundsdokumentation_2024.pdf
8. Piitulainen E and Tanash H. The Clinical profile of Subjects Included in the Swedish National Register on Individuals with Severe Alpha 1-Antitrypsin deficiency. COPD. 2015 May;12 Suppl 1:36-41.
9. Tanash HA et al. Clinical course and prognosis of never-smokers with severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ). Thorax. 2008 Dec;63(12):1091-5.
10. Tanash HA et al. The Swedish α 1-Antitrypsin Screening Study: Health Status and Lung and Liver Function at Age 34. Ann Am Thorac Soc. 2015 Jun;12(6):807-12.