

IL DEFICIT EREDITARIO DI PROTEINA B DEL SURFATTANTE

M. Somaschini, P. Carrera^o, B. E. Leone[§], D. Cella[#], A. Colombo[^]*

*U.O. Neonatologia e Patologia Neonatale
Ospedale “Bolognini” di Seriate (Bergamo)

^o Laboratorio di Biologia Molecolare Clinica
[§] Servizio di Anatomia Patologica

[#] Unità di Neonatologia e Patologia Neonatale
IRCCS H San Raffaele, Milano

[^] Divisione di Patologia Neonatale
Ospedali Riuniti di Bergamo

Parole chiave: Proteina B del surfattante, proteinosi, distress respiratorio

Key words: Surfactant protein B, proteinosis, respiratory distress

Rubrica a cui si intende destinare il lavoro: Articoli originali

Recapito cui inviare la corrispondenza e le bozze:

Dr. Marco Somaschini

U.O. Neonatologia e Patologia Neonatale

Ospedale Bolognini

Via Paderno 21

24068 Seriate (Bergamo)

tel 035 306300

fax 035 306554

e-mail: marco.somaschini@bolognini.bg.it

ABSTRACT

Hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency is an autosomal recessive disease in which affected infants are unable to produce normally functional surfactant, resulting in respiratory distress and death within the first year. A frameshift mutation, 121ins2, is the most common but not exclusive cause of the disease.

Two siblings presenting with respiratory distress in the first days, unresponsive to maximal ventilatory treatment and died within the first month are reported.

Immunostaining of lung tissue demonstrated absent staining for surfactant protein B (SP-B); DNA analysis revealed the 121ins2 mutation on one allele and a novel mutation, 122delC, on the other SP-B allele of both infants, confirming the diagnosis of SP-B deficiency. SP-B deficiency is a rare, newly diagnosable and probably under-recognized disease; it should be suspected in term newborn infants with unexplained respiratory failure and can be diagnosed from bronchoalveolar lavage specimens, DNA analysis from blood leucocytes and eventually immunostaining from lung tissue.

RIASSUNTO

Il deficit di proteina B del surfattante (SP-B) è una malattia autosomica recessiva che determina l'incapacità di produrre un surfattante normalmente funzionante, con conseguente insufficienza respiratoria e decesso entro il primo anno. La causa più comune di deficit di SP-B è una mutazione frameshift sull'esone 4 (121ins2) del gene dell'SP-B. Riportiamo il caso di due sorelle che nei primi giorni di vita hanno presentato distress respiratorio refrattario al trattamento con surfattante esogeno e supporto ventilatorio massimale e sono decedute entro i primi 2 mesi.

L'esame immunoistochimico del tessuto polmonare ha dimostrato assenza di SP-B. L'analisi del DNA ha evidenziato la mutazione 121ins2 su un allele e una nuova mutazione, denominata 122delC, sull'altro allele del gene per la SP-B. L'esame del DNA dei genitori ha evidenziato l'eterozigosi paterna per la mutazione 121ins2 e l'eterozigosi materna per la mutazione 122delC. La vicinanza della nuova mutazione alla mutazione 121ins2 rinforza l'ipotesi che questa regione dell'esone 4 possa essere una sede particolarmente suscettibile di mutazioni del gene della SP-B e conferma l'eterogeneità di meccanismi che possono portare al deficit di SP-B. Il deficit di SP-B è una malattia rara, di recente acquisizione e probabilmente sottostimata, che dovrebbe essere sospettata nei neonati a termine con insufficienza respiratoria grave e di non chiara eziologia.

INTRODUZIONE

Il deficit ereditario di SP-B è una malattia autosomica recessiva rara che causa insufficienza respiratoria grave e decesso entro il primo anno. La malattia è stata diagnosticata per la prima volta nel 1993 in una famiglia di 3 fratelli deceduti per insufficienza respiratoria associata al reperto di materiale proteinaceo negli alveoli polmonari, condizione conosciuta come proteinosi alveolare polmonare congenita (1). La base genetica della malattia era stata sospettata per la sua ricorrenza familiare e nel caso indicato veniva identificata una mutazione frameshift con inserzione di 2 basi nell'esone 4 del gene per la SP-B e conseguente segnale prematuro di arresto della traduzione (2). Tale mutazione è stata denominata 121ins2 e tutti i neonati omozigoti presentavano un fenotipo caratterizzato da insorgenza di distress respiratorio nei primi giorni di vita refrattario al trattamento rianimatorio massimale, comprese le terapie con surfattante esogeno, corticosteroidi ed ECMO (3,4,5,6). Recentemente è stata identificata in un neonato una mutazione frameshift sul codone 122, suggerendo che questa regione del gene SP-B può essere una "hot spot" per mutazioni di questo gene (7). Nel nostro primo caso una neonata ha presentato il tipico decorso clinico per deficit di SP-B e sono state evidenziate l'eterozigosi per la mutazione 121ins2 e per una nuova mutazione frameshift localizzata sul codone 122 dell'altro allele del gene della SP-B, denominata 122delC (8). Sono stati quindi esaminati i genitori della bambina che hanno confermato il loro stato di eterozigosi. In occasione di una seconda gravidanza i genitori hanno deciso di non sottoporsi alla diagnosi prenatale; la neonata ha presentato la malattia, con decorso clinico simile a quello della sorella.

CASO CLINICO 1

E.M., di sesso femminile, nasceva da taglio cesareo alla 40° settimana di età gestazionale, peso alla nascita 3050 g, punteggio di apgar a 1' e 5' di 9 e 9. La

gravidanza era decorsa normalmente e l'anamnesi familiare era negativa. A 12 ore la bambina presentava cianosi e tachipnea, che richiedevano la somministrazione di ossigeno a flusso libero. Dopo 3 giorni, per il persistere della cianosi, la piccola veniva sottoposta a intubazione e ventilazione meccanica con progressivo miglioramento delle condizioni generali. Tuttavia, il fabbisogno di ossigeno aumentava ed era necessaria una FiO₂ del 100% per mantenere un'adeguata ossigenazione. Il bilancio infettivo era negativo. La radiografia del torace mostrava un aspetto a vetro smerigliato diffuso, che nei giorni successivi aumentava e rendeva evidente il broncogramma aereo (figura 1). L'ecocardiografia evidenziava un quadro di moderata ipertensione polmonare. La terapia con desametasone (0,3 mg/Kg/die), prostaciclina (da 5 fino a 50 ng/Kg/die), ossido di azoto (NO) per via inalatoria (fino a 20 parti per milione) non miglioravano l'ossigenazione in modo significativo. Era necessaria l'infusione continua di dopamina e dobutamina per mantenere normali livelli di pressione arteriosa. La somministrazione di surfattante esogeno (Curosurf, 100 mg/Kg) consentiva un temporaneo incremento dell'ossigenazione. La ventilazione ad alta frequenza oscillatoria (HFOV) non era efficace nel migliorare il quadro respiratorio. La TAC polmonare evidenziava una ipoventilazione bilaterale diffusa, senza evidenti malformazioni. La somministrazione di quattro dosi addizionali di surfattante non migliorava lo stato respiratorio. Nonostante ventilazione meccanica con FiO₂ al 100%, picco inspiratorio di 40 cm/H₂O, frequenza respiratoria di 70 atti/min, pressione di fine espirazione di 4 cm/H₂O la bambina manifestava ipossia e acidosi respiratoria. A 25 giorni veniva eseguita una biopsia polmonare, due giorni dopo la bambina decedeva. L'esame istopatologico del tessuto bioptico mostrava un accumulo di materiale eosinofilo che riempiva gli spazi aerei distali, con presenza di macrofagi tra il materiale proteico. L'esame immunostochimico sul prelievo bioptico (9), eseguito presso l'ospedale Johns Hopkins di Baltimora, dimostrava l'assenza di colorazione per la SP-B, mentre erano presenti sia l'SP-A che l'SP-C.

L'analisi del DNA genomico amplificato con PCR dimostrava la presenza della mutazione 121ins2 su un allele e l'analisi di sequenza dell' esone 4 indicava una mutazione frameshift sull'altro allele, che si confermava come una delezione di una singola base in una sequenza di 5 citosine tra i codoni 120 e 122 del cDNA della SP-B e veniva denominata 122delC (10).

Abbiamo quindi organizzato nel nostro centro le tecniche diagnostiche per il deficit di SP-B ed esaminato il DNA dei genitori che evidenziava l'eterozigosi paterna per la mutazione 121ins2 e l'eterozigosi materna per la mutazione 122delC.

CASO CLINICO 2

In occasione di una seconda gravidanza venne proposta ai genitori, senza però essere accettata, la possibilità di eseguire la diagnosi prenatale di deficit di SP-B con analisi del DNA sui villi coriali. B.M. nasceva da taglio cesareo a 39 settimane di età gestazionale, con peso di 3195 g, punteggio di Apgar 9-10 a 1 e 5 minuti. Alla nascita veniva eseguito prelievo ematico per l'analisi delle eventuali mutazioni responsabili del deficit di SP-B. A poche ore di vita la bambina iniziava a presentare distress respiratorio che richiedeva prima la somministrazione di ossigeno a flusso libero, quindi applicazione di CPAP nasale ed in seconda giornata intubazione e ventilazione meccanica. Si eseguiva l'esame immunocitochimico sul broncoaspirato che evidenziava l'assenza di SP-B; poiché tale reperto eseguito alla nascita non è diagnostico, nell'attesa della conferma con l'esame genetico, di fronte al progressivo aggravamento clinico si somministravano 3 dosi di surfattante per via endotracheale con transitorio miglioramento dello stato respiratorio. Dopo 10 giorni l'analisi del DNA dimostrava l'eterozigosi composta come la sorella deceduta per le mutazioni parentali: 121ins2 e 122delC. Si decise, d'accordo con i genitori, di intraprendere un atteggiamento compassionevole limitandosi ad un'assistenza ventilatoria convenzionale, escludendo tecniche e terapie che avrebbero avuto il significato di un

accanimento terapeutico e dedicando particolare attenzione al supporto psicologico dei genitori. La bambina decedeva a 38 giorni.

MATERIALI E METODI

La diagnosi di deficit di SP-B del primo caso è stata effettuata presso l'ospedale Johns Hopkins di Baltimora. Vista la mancanza di istituti di riferimento sul territorio nazionale abbiamo messo a punto le tecniche diagnostiche nel nostro centro che sono state utilizzate nel secondo caso.

ESAME ISTOLOGICO E IMMUNOISTOCHEMICO

Campioni di tessuto polmonare autoptico delle pazienti sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10% e inclusi in paraffina. Sezioni da 5 μ di spessore sono state colorate con ematossilina-eosina e con metodica PAS-diaresi. Inoltre sono state eseguite colorazioni immunocistocimiche per proteina B e C del surfactante (SPB, SPC), utilizzando anticorpi policlonali ricavati da coniglio (Chemicon Internat. Inc., CA, USA), diluiti rispettivamente 1 : 100 e 1 : 200, secondo la metodica avidina-biotina-perossidasi (kit ABC, Vector Laboratories Inc. CA, USA), con l'impiego di diaminobenzidina (DAB) come cromogeno.

Sezioni di tessuto polmonare di un neonato deceduto per cause non correlate a deficit di SP-B sono state utilizzate come controllo di reazione.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Nel campione utilizzato come controllo negativo per deficit di SPB si è osservata reattività citoplasmatica degli pneumociti spesso intensa, di tipo granulare, sia per

SPB, sia per SPC; analoga reattività, generalmente di minore intensità, si riscontrava nei macrofagi intraalveolari (figura 2).

Nel campione della paziente affetta da deficit di SP-B non si riscontrava immunolocalizzazione per SP-B, mentre risultava sovrapponibile al caso di controllo la colorazione per SPC, senza evidente iperespressione della proteina (figura 3).

ANALISI MOLECOLARE: RICERCA DELLE MUTAZIONI NEL GENE SFTP3.

Il test molecolare per il deficit di proteina B del surfattante prevede l'analisi delle sequenze esoniche e delle giunzioni introne-esone del gene SFTP3. In prima istanza viene analizzata la regione corrispondente all'esone 4, vista la maggior frequenza di mutazioni descritta in questa porzione del gene. In caso di negatività, l'analisi di sequenza viene ampliata a tutti gli altri esoni del gene, ad eccezione dell'esone 11 che contiene regioni non tradotte.

Il test molecolare viene eseguito sul DNA genomico estratto da un campione di sangue intero raccolto in EDTA ed estratto con il metodo classico fenolo-cloroformio (11).

Analisi di sequenza. Gli esoni 1-10 del gene SFTP3 e le regioni introniche fiancheggianti sono amplificate con PCR utilizzando sia primers per l'esone 4 disegnati opportunamente sulla sequenza del gene depositata in banca dati (M24461) (primer 4F: gggattaggggtcagtct; primer 4R: caggcaggaggtgagcttg) sia primers derivati dalla letteratura per tutti gli altri esoni (12). Le reazioni di amplificazione vengono eseguite come precedentemente descritto (12). I frammenti di PCR ottenuti sono purificati da gel con il kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen) e sottoposti ad analisi di sequenza diretta mediante cycle-sequencing con Dye-terminators fluorescenti (DYEnamic TM ET Terminator – Amersham Biosciences) e quindi

separati su Sequenziatore Automatico 377-AB. L'allineamento e il confronto con la sequenza di riferimento viene eseguita con il software Navigator, versione 1.1.

Clonaggio. Nel Caso Clinico 2, l'analisi di sequenza dell'esone 4 è stata condotta sia direttamente sul prodotto di PCR sia dopo clonaggio in un vettore pGem, utilizzando il kit pGEM-T Easy (Promega). Il clonaggio è stato eseguito allo scopo di analizzare separatamente le due mutazioni che essendo "frame-shift" e interessando codoni adiacenti 121 e 122 risultano di difficile risoluzione su una sequenza diretta.

RISULTATO DELL'ANALISI MOLECOLARE

Come prima accennato, l'analisi molecolare ci ha permesso di stabilire lo stato di portatori sani nei genitori del Caso Clinico 1; in particolare, abbiamo stabilito l'origine paterna e materna delle due mutazioni.

In Figura 4 sono mostrate le mutazioni evidenziate nel Caso Clinico 2, confermando quindi la diagnosi di deficit di proteina B del surfattante.

DISCUSSIONE

Il surfattante polmonare è una miscela di fosfolipidi e proteine che ha la funzione di ridurre la tensione di superficie all'interfaccia aria-liquido degli alveoli polmonari e di prevenire l'atelettasia polmonare. Il deficit di surfattante si manifesta in modo primitivo nella immaturità polmonare del neonato pretermine con distress respiratorio, oppure come conseguenza del danno respiratorio in corso di insufficienza respiratoria acuta nel bambino e nell'adulto. Il deficit di SP-B è una malattia rara a trasmissione autosomica recessiva, in cui i neonati affetti sono incapaci di produrre surfattante normalmente funzionante. La SP-B è infatti una proteina essenziale per una normale funzione respiratoria, in quanto aumenta la

diffusione e la stabilità dei fosfolipidi del surfattante. Il deficit di SP-B causa inoltre anomalie del metabolismo del surfattante, produzione in eccesso di una forma aberrante di SP-C ed accumulo di materiale proteico negli alveoli polmonari che provoca una condizione conosciuta come proteinosi polmonare alveolare congenita (11). L'incidenza della malattia non è conosciuta, ma è sicuramente sottostimata per la variabilità fenotipica, la scarsa conoscenza della malattia, riconosciuta solo recentemente e la difficoltà a reperire i centri di riferimento per la diagnosi, in particolare per l'analisi molecolare.

Il difetto molecolare più frequente alla base del deficit di SP-B è la sostituzione di 3 basi (GAA) al posto del singolo nucleotide C nell'esone 4 del gene SP-B, con conseguente inserzione di 2 basi nel codone 121 del cDNA della SP-B che causa un frameshift e la conseguente introduzione di un segnale prematuro di arresto della traduzione; questa mutazione è stata denominata 121ins2 ed è presente nel 65% dei casi di SP-B fino ad ora diagnosticati (12).

Nei nostri due casi la mutazione 121ins2 era presente su un allele, mentre sull'altro allele è stata identificata una nuova mutazione che associata alla prima ha causato l'incapacità di produrre SP-B. Questa nuova mutazione consiste in una delezione di una singola citosina in una serie di 5 di tali basi. Per convenzione, questa delezione è stata denominata 122delC. La posizione e la natura di questa seconda mutazione supporta l'ipotesi che questa regione del gene dell'SP-B possa essere particolarmente suscettibile di mutazioni. È interessante sottolineare come questa mutazione (122delC) ha in comune con la 121ins2 la delezione di una C in questa serie di 5 basi. Infatti la mutazione 121ins2 è il risultato della delezione di una C seguito dall'inserimento di una tripletta GAA con un aumento netto di due basi, mentre nella 122delC ha luogo solo il passaggio della delezione.

Altre mutazioni possono essere associate al deficit di SP-B e ai differenti genotipi possono essere associati fenotipi diversi (tab. 1). Deficit parziali o transitori di SP-B sono stati riportati in associazione a mutazioni "missense" nel gene della SP-B. Si tratta di neonati a termine che hanno manifestato l'insorgenza del distress respiratorio

nelle prime ore o nei primi giorni di vita ed hanno presentato un'insufficienza respiratoria progressiva nonostante il ricorso alla ventilazione meccanica e l'uso di steroidi, surfattante esogeno, ventilazione ad alta frequenza ed ECMO (13). In caso di omozigosi per la mutazione 121ins2 il decesso si è verificato entro i primi mesi. Gli unici sopravvissuti sono stati sottoposti a trapianto polmonare (14). A seconda della mutazione specifica le anomalie ereditarie del gene della SP-B possono risultare in una assenza di SP-B totale o parziale. Il caso descritto da Klein, vivente ed ossigeno-dipendente all'età di 2 anni, indica che non tutti i casi di deficit di SP-B sono fatali e che certe mutazioni del gene possono causare deficit transitori o parziali di SP-B compatibili con la vita, anche se con complicanze polmonari croniche significative (15).

La diagnosi di deficit di SP-B può essere eseguita in modo non invasivo attraverso l'analisi delle proteine del surfattante nel liquido di lavaggio broncoalveolare o dell'aspirato tracheale e l'analisi del DNA sui leucociti del sangue per la ricerca delle mutazioni responsabili del deficit di SP-B. Se si dispone di tessuto polmonare l'analisi immunocitochimica confermerà la diagnosi (tabella 2).

Il deficit di SP-B dovrebbe essere sospettato nei neonati a termine che manifestano un distress respiratorio nelle prime ore o giorni di vita, con caratteristiche radiografiche indicative di deficit di surfattante e mancata risposta al trattamento rianimatorio ottimale. Il riscontro anamnestico di fratelli deceduti per insufficienza respiratoria di eziologia non chiara dovrebbe ulteriormente orientare verso la diagnosi (tabella 3). In uno studio nordamericano condotto in neonati a termine con insufficienza respiratoria grave senza diagnosi specifica il deficit di SP-B è stato diagnosticato in 14 casi su 50 (16). Una volta confermata la diagnosi, attualmente le possibilità terapeutiche sono molto scarse: finché non sarà disponibile la terapia genica, attualmente in fase sperimentale, l'unico trattamento che attualmente consente la sopravvivenza è il trapianto polmonare. Se questa opzione non è attuabile o accettata dai genitori ci si può limitare a un trattamento compassionevole, evitando il prolungarsi della terapia intensiva o il ricorso a tecniche invasive come l'ECMO.

Oltre che alle implicazioni terapeutiche, l'importanza della diagnosi è legata al consiglio genetico, con la possibilità di informare i genitori sul rischio di ricorrenza della malattia nelle gravidanze future e alla possibilità di effettuare la diagnosi prenatale (17).

Il primo dei due casi da noi osservati ha evidenziato le difficoltà e l'importanza di ottenere una diagnosi eziologica precisa, per la quale abbiamo dovuto ricorrere ad un centro estero.

Nel secondo caso la possibilità di eseguire la diagnosi nel nostro centro ci ha consentito di approfondire la conoscenza del caso precedente attraverso lo studio del DNA dei genitori e di proporre loro la diagnosi prenatale. Questa opzione non è stata accettata, tuttavia l'esame molecolare eseguito alla nascita ha comunque consentito la diagnosi della malattia molto precocemente con la possibilità, oltre che di assistere i genitori sotto il profilo psicologico, di evitare il ricorso a tecniche di assistenza sofisticate e inutili.

Lo studio di un maggior numero di casi ci consentirà di valutare se neonati con grave insufficienza respiratoria di non chiara eziologia siano affetti da deficit di SP-B ed eventualmente di stimare l'incidenza della malattia nella nostra popolazione.

Il deficit di SP-B è una patologia di particolare interesse nel campo della pneumologia pediatrica, poichè manifestazioni cliniche specifiche sono collegate a specifici difetti molecolari e cellulari. Questo ci consente di migliorare le nostre conoscenze sulla funzione del surfattante polmonare e sulla fisiologia della transizione, oltre che intravedere nuove possibilità di cura come la terapia genica. E' inoltre possibile che malattie respiratorie croniche non letali possano avere una base genetica determinabile, dovuta ad anomalie della regolazione genetica delle proteine del surfattante.

BIBLIOGRAFIA

1. Nogee LM, deMello DE, Dehner LP, Colten HR.
Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis.
N Engl J Med 1993; 328: 406.
2. Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR .
A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal disease in multiple kindreds.
J Clin Invest 1994; 93: 1860.
3. deMello DE, Nogee LM, Heyman S, Krous HF, Hussain M, Merritt A, Hsueh W, Haas JE, Heidelberger K,
Schumacher R, Colten HR.
Molecular and phenotypic variability in the congenital alveolar proteinosis syndrome associated with inherited
Surfactant protein B deficiency. J Pediatr 1994; 125: 43.
4. Hamvas A, Nogee LM, deMello DE, Cole, FS.
Pathophysiology and treatment of surfactant protein-B deficiency.
Biol Neonate 1995; 67 (suppl): 18
5. Chetcuti PAJ, Ball RJ.
Surfactant apoprotein B deficiency.
Arch Dis Child 1995; 73: F125.
6. Ballard PL.
Neonatal respiratory disease due to surfactant protein-B deficiency.
J Perinatol 1996; 16: S 28.
7. Lin Z, deMello DE, Wallot M, and Floros J.
An SP-B gene mutation responsible for SP-B deficiency in fatal congenital alveolar proteinosis: evidence for a
Mutation hotspot in exon 4.
Mol Genet and Metab 1998; 64: 25.
8. Somaschini M, Wert S, Mangili G, Colombo A, Nogee L.
Hereditary surfactant protein B deficiency resulting from a novel mutation
Intensive Care Med 2000; 26: 97-100
9. Williams GD, Christodoulou, J, Stack, J, Tobias, V, Wert, SE, Murrell, MJ, and Nogee LM.
Surfactant protein B deficiency: clinical, histological, and molecular evaluation.
J Paediatr Child Health 1999; 35: 214.

10. Antonarakis SE and the Nomenclature Working Group.
Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations.
Hum. Mutation 1998; 11:1.
11. Maniatis TM, Fritdch EF, Sambrook J, eds. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1990
12. Nogee LM, Wert SE, Proffitt SA, Hull WM, Whittsett JA.
Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency.
Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 973.
13. Whittsett JA, Nogee LM, Weaver TE, Horowitz AD.
Human Surfactant Protein B: structure, function, and genetic disease.
Physiol Rev 1995; 75:749.
14. Hamvas A, Nogee LM, Mallory GB, Spray TL, Huddleston CB, August A, Dehner LP, deMello DE, Moxley M, Nelson R, Cole S, Colten HR .
Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency.
J Pediatr 1997; 130: 231.
15. Klein JM, Thompson MW, Snyder JM, George TN, Whittsett JA, Bell EF, Mc Cray PB, Nogee LM.
Transient surfactant protein B deficiency in a term infant with severe respiratory failure.
J Pediatr 1998; 132: 244.
16. Nogee LM, Hull WM, Whittsett JA, Wert SE
Surfactant Protein (SP)B Deficiency in neonates with severe respiratory failure.
Pediatr Res 1996; 39: 343A.
17. Stuhmann M, Bohnhorst B, Peters V, Bohle RM, Poets CF, Schmidtke J.
Prenatal diagnosis of congenital alveolar proteinosis (surfactant protein B deficiency).
Prenat Diagn 1998; 18: 953

ANALISI DELLA PROTEINA B DEL SURFATTANTE

Dati del paziente: cognome e nome _____ data prelievo _____
ospedale di provenienza _____ medico di riferimento _____
anamnesi famigliare _____
data di nascita _____ età gestazionale _____ peso nascita _____ Apgar _____
steroidi antenatali _____ steroidi postnatali _____ data intubazione _____ giorni di
ventilazione meccanica _____ sedazione _____ analgesia _____ paralisi _____
dopamina _____ dobutamina _____ HFOV _____ surfattante (tipo e n° di
somministrazioni) _____ ossido nitrico (durata e
dose) _____ ECMO (durata) _____ altre terapie _____
_____ data estubazione _____
sopravvissuto/deceduto _____

A) STUDIO MOLECOLARE DELLE MUTAZIONI DEL GENE DELLA SP-B

1. prelievo del bambino di 2 ml di sangue in provetta con EDTA
2. “ dei genitori di 6 ml “ “ “ “ “
3. refrigerare e spedire a + 4°C

B) ESAME IMMUNOCITOCHIMICO DEL LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE

- Lavaggio broncoalveolare (BAL)

1. instillare 0,5 ml di soluzione fisiologica nel tubo tracheale
2. ventilare per 4-5 atti
3. aspirare le secrezioni broncoalveolari in una provetta
4. ripetere i punti 1-2-3 per 3-4 volte, per un periodo di circa 10 minuti
5. tutti gli aspirati devono essere raccolti in un'unica provetta
6. alla fine lavare il catetere di aspirazione con 1 cc di soluzione fisiologica
7. tutto questo rappresenta un solo campione
8. preparazione dei vetrini mediante citocentrifugazione e fissazione in alcool 95°

C) ESAME IMMUNOISTOCHEMICO DEL TESSUTO POLMONARE

- Biopsia polmonare

1. prelevare un campione di tessuto polmonare da biopsia o autopsia
2. Fissazione in formalina tamponata 10%
3. Inclusione in paraffina e taglio di sezioni standard.

Tabella 2.

Modulo per i centri inviati il materiale biologico da sottoporre ad analisi del deficit di SP-B, comprendente i dati anamnestici del paziente e le modalità di invio dei campioni di sangue, lavaggio broncoalveolare o aspirato tracheale ed eventualmente tessuto polmonare (biopsia o autopsia).

- anamnesi familiare suggestiva per deficit di SP-B (fratelli deceduti per insufficienza respiratoria senza diagnosi specifica o con diagnosi di proteinosi alveolare)
- neonato a termine con insufficienza respiratoria grave
- assenza di miglioramento dopo 7-10 giorni di terapia intensiva massimale (ventilazione meccanica convenzionale o ad alta frequenza, surfattante, inotropi, sedazione, analgesia, vasodilatatori polmonari)
- assenza di causa evidente del distress respiratorio (ad es. sepsi)
- Rx torace suggestiva per deficit di surfattante (aspetto a vetro smerigliato, broncogramma aereo, atelettasie)
- Inicazione all'ECMO senza diagnosi specifica

Tabella 3

Caratteristiche cliniche suggestive per deficit di SP-B

N	anno	autore	sexo	Trattamento, oltre alla ventilazione meccanica	Esito	Mutazione
1	1994	Nogee/De Mello	m	Surfattante, steroidi, ECMO	Decesso a 150 g	121ins2/121ins2
2	1994	Nogee/De Mello	f	Surfattante	Decesso a 30 g	121ins2/121ins2
3	1994	Nogee/De Mello	m	Surfattante, steroidi, ECMO	Decesso a 54 giorni	121ins2/121ins2
4	1994	Nogee/De Mello	m	ECMO	Decesso a 16 giorni	121ins2/121ins2
5	1994	Nogee/De Mello	f	ECMO	Decesso a 1 mese	121ins2/121ins2
6	1994	Nogee/De Mello	f	ECMO	Decesso a 51 g	121ins2/121ins2
7	1996	Ballard	f	Steroidi, ECMO	Decesso a 10 mesi	121ins2/R236C
8	1997	Hamvas	f	Trapianto polmonare	Vivente	121ins2/121ins2
9	1997	Hamvas	f	Trapianto polmonare	Vivente	121ins2/121ins2
10	1997	Hamvas	f	Trapianto polmonare	Vivente	121ins2/121ins2
11		Sleight	f	Surfattante, steroidi, HFOV, ECMO	Decesso a 47 g	Mutazione puntiforme codone 60 dell'esone 2
12	1997	Sleight	f	Surfattante	Decesso a 2 mesi	121ins2/121ins2
13	..	Stuhrman	f	(non specificato)	Decesso a 2 mesi	121ins2/121ins2
14	1999	Klein	m	HFOV	Vivente, ossigenodipendente	Etrozigosi G135S
15	1999	Wallot	f	Surfattante, steroidi, ECMO	Decesso a 49 giorni	122delT/122delT
16	1999	Somaschini	f	Steroidi, surfattante, PGI, HFOV, iNO	Decesso a 19 g	121ins2/122delC
17	2000	Somaschini	F	Surfattante	Decesso a 38 giorni	121ins2/122delC

Tabella 1

Dati clinici e genotipo di un gruppo di neonati con deficit di SP-B

Figura 1

Radiografia del torace del caso n° 1, indicante atelettasie diffuse e broncogramma aereo

Figura 2

Caso controllo: Gli pneumociti che rivestono gli alveoli e le cellule macrofagiche interne agli stessi mostrano intensa immunoreattività per SPB nel paziente utilizzato come controllo di reazione. Metodica ABC-perossidasi. Ingrandimento originale 200X.

Figura 3

Deficit di SP-B: Completa assenza di immunolocalizzazione per SPB nel paziente affetto da deficit della proteina. Il focale rilievo di pigmento brunastro nei citoplasmi di granulociti è dovuto alla presenza di perossidasi endogena. Metodica ABC-perossidasi. Ingrandimento originale 200X.

Figura 4

Analisi di sequenza della regione dell'esone 4 del gene SFTP3 nel caso clinico 2. A) Analisi di sequenza diretta sul prodotto di PCR. E' presente l'eterozigosi composta delle mutazioni 121ins2 e 122delC. Allo scopo di risolvere le singole mutazioni, i prodotti di PCR sono stati clonati e sequenziati; in B) è mostrata l'analisi di sequenza di un clone contenente la mutazione 121ins2 di origine paterna e in C) quella di un clone contenente la mutazione 122delC di origine materna.