

Programa de cribado para el déficit de α_1 -antitripsina en pacientes con EPOC mediante el uso de gota de sangre en papel secante

C. de la Roza^a, X. Costa^b, R. Vidal^c, S. Vilá^a, F. Rodríguez-Frías^b, R. Jardí^b y M. Miravittles^a

^aServicio de Neumología. Institut Clínic de Pneumologia i Cirurgia Toràtica (IDIBAPS). Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

^bServicio de Bioquímica. Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona. España.

^cServicio de Neumología. Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona. España.

El déficit de α_1 -antitripsina (AAT) es una enfermedad infradiagnosticada, por lo que se recomienda establecer programas de cribado en pacientes con EPOC. Presentamos los resultados de la fase piloto de un programa de cribado del déficit de AAT, con el objetivo de evaluar la técnica utilizada, los circuitos de envío de muestras y los resultados obtenidos.

Participaron en el estudio 5 centros, que recogieron durante el período de un mes muestras de todos los pacientes con EPOC en los que nunca se hubieran determinado las concentraciones plasmáticas de AAT o el fenotipo Pi. Se aplicaron gotas de sangre capilar sobre discos de papel secante, que posteriormente se enviaban por correo postal al laboratorio central del estudio. Las muestras se procesaron para la determinación cuantitativa de los valores de AAT mediante un método de inmunonefelometría y, para la determinación del genotipo de AAT, con un analizador de ADN del tipo LightCycler. Se analizaron muestras de 86 pacientes con EPOC (76 varones, 10 mujeres) con una edad media de 68,2 años. En 74 pacientes (86%) se descartó el déficit por presentar concentraciones de AAT por encima del punto de corte establecido, aunque uno de ellos fue heterocigoto MZ por genotipificación. De los 12 restantes (13,9%), sólo 2 individuos presentaban también un alelo Z. El resto correspondió a pacientes con concentraciones por debajo del umbral establecido y sin evidencia del alelo Z (10 pacientes; 11,6%). La frecuencia observada del alelo Z (3/172; 1,74%) es muy similar a la encontrada en la población general.

Los resultados de esta fase inicial permiten comprobar el correcto funcionamiento del circuito utilizado para la obtención y envío de las muestras. Es un método aplicable, cómodo y bien aceptado por los médicos participantes y permite la cuantificación de AAT, así como la detección del alelo deficitario Z en las muestras con una excelente correlación con las técnicas estándar que usan muestras de sangre total.

Palabras clave: Déficit de α_1 -antitripsina. Cribado. Prevalencia. EPOC.

Screening program for alpha-1 antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease, using dried blood spots on filter paper

Alpha-1 antitrypsin (AAT) deficiency is an under-diagnosed disease and screening programs have therefore been recommended for patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We present the results of the pilot phase of a screening program for AAT deficiency in order to evaluate the technique used, the procedures for transporting samples and the results obtained.

Over a period of one month, five centers collected samples from all COPD patients for whom plasma concentrations of AAT or Pi phenotype had not yet been determined. Capillary blood spots were dried on filter paper and then sent by surface mail to a central laboratory for study. An immunonephelometric assay was used to determine AAT and DNA phenotyping was done by use of a Light Cycler. Samples were analyzed from 86 COPD patients (76 men, 10 women) with a mean age of 68.2 years. AAT deficiency was ruled out for 74 patients (86%) who had concentrations above the cutoff established, although one of them was MZ heterozygote by genotype. Among the 12 remaining patients (13.9%), only two also had a Z allele. The rest were individuals with concentrations below the established threshold and no evidence of a Z allele (10 patients, 11.6%). The Z allele frequency observed (3/172; 1.74%) was very similar to that found in the general population.

The results of this pilot study allowed us to confirm that the method used to collect samples worked well. The sampling method is applicable, easy and well-accepted by participating physicians. It allowed AAT concentrations and Z allele deficiency to be determined. The method correlates well with standard techniques used for samples in whole blood.

Key words: Alpha-1 antitrypsin deficiency. Screening. Prevalence. COPD.

Sara Vilá ha recibido una beca "Becario SEPAR" 1998 y una beca de la Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP) 1999. El presente trabajo ha sido financiado en parte por una beca de la Alpha One Foundation (AOF, Miami, EE.UU.), una beca de la Fundació La Marató de TV3 y por Bayer AG.

Correspondencia: Dr. M. Miravittles.
 Servicio de Neumología (UVIR, esc. 2, planta 3). Hospital Clínic i Provincial.
 Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.
 Correo electrónico: marcm@separ.es

Recibido: el 22-2-2002; aceptado para su publicación el 17-7-2002.

Introducción

El déficit de α_1 -antitripsina (AAT) es una enfermedad hereditaria de expresión autosómica recesiva resultante de mutaciones en el gen de la AAT. Esta enfermedad se caracteriza por concentraciones anormalmente reducidas de AAT en el plasma, lo que conlleva en su forma homocigota un riesgo elevado de desarrollo de enfisema pul-

monar de aparición temprana, y en ocasiones de daño hepático¹.

La AAT es una proteína muy polimorfa. Se han identificado unas 70 variantes determinadas genéticamente (llamadas fenotipos Pi). La variante PiM es la más frecuente entre las consideradas normales. El fenotipo PiZ es el más importante de los asociados con concentraciones plasmáticas bajas de AAT y con un riesgo aumentado de enfermedad, fundamentalmente enfisema^{2,3}.

Estudios recientes efectuados en España han demostrado una frecuencia génica para el alelo Z del 1,5% en la población general⁴, de modo que para una población aproximada de 40 millones de personas podrían esperarse 8.000 pacientes con la forma deficitaria grave homocigota PiZZ. El Registro español de pacientes con déficit de AAT se constituyó en 1993⁵ y actualmente incluye a más de 300 pacientes de 15 de las 17 comunidades autónomas^{6,7}. La tasa de detección en España es baja, aunque es similar o incluso superior a la de otros países de nuestro entorno⁸.

Las técnicas más frecuentemente usadas para el diagnóstico de laboratorio del déficit de AAT incluyen la determinación de las concentraciones séricas de AAT y la identificación del fenotipo de la AAT por enfoque isoelectrico a un pH 4,2-4,9⁹. Aunque el diagnóstico del déficit es relativamente sencillo, los estudios poblacionales indican que el déficit de AAT es una enfermedad infradiagnosticada y que son muy comunes los retrasos en el diagnóstico¹⁰. Una comunicación reciente de la OMS recomienda establecer programas de cribado, especialmente en pacientes con EPOC y en adolescentes y adultos con asma. A los pacientes con resultados anómalos en el cribado se les debería realizar la determinación del fenotipo¹¹.

Las muestras de gota de sangre seca ya han sido empleadas para el cribado y el diagnóstico genético de varias enfermedades¹². En un estudio previo se describió y validó un método sencillo y específico de inmunonefelometría para la cuantificación de AAT en muestras de gota de sangre en papel secante¹³. La utilización de este método en el cribado podría facilitar la identificación de nuevos casos de déficit de AAT entre los pacientes con EPOC.

En este estudio presentamos los resultados de la fase piloto de un programa de cribado del déficit de AAT en pacientes con EPOC con el objetivo de evaluar la técnica utilizada, los circuitos de envío de muestras y los resultados obtenidos con la finalidad de extender su implantación en toda España.

Material y método

Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal de cribado del déficit de AAT en pacientes con EPOC. Según las recomendaciones de la OMS, todos los pacientes con el diagnóstico de EPOC cuyas concentraciones de AAT sean desconocidas son candidatos para el cribado.

La fase piloto inicial comprendió 5 centros cercanos al laboratorio central, que recogieron todos los pacientes con el diagnóstico clínico de EPOC, bronquitis crónica o enfisema según los criterios de la SEPAR¹⁴ atendidos por cualquier mo-

tivo durante el período de un mes.

Proceso del estudio

Los médicos participantes en el estudio fueron provistos con 20 equipos que incluían papel secante, una lanceta, un pequeño cuestionario para recoger información del paciente y un sobre.

La información recogida era confidencial y no contenía ningún dato que permitiera la identificación del paciente por nadie excepto por el médico responsable del mismo.

Se ofreció la prueba a los pacientes identificados con EPOC y en los que nunca se hubiera determinado la concentración plasmática de AAT o su fenotipo Pi. Una vez seleccionados los pacientes elegibles, se procedía a la obtención de una muestra de sangre capilar mediante una punción estéril del pulpejo del dedo pulgar con la lanceta estéril aportada. Las gotas de sangre capilar se aplicaban sobre 5 discos de papel (grado 903; Scheicher & Schuell). Los discos se dejaban secar a temperatura ambiente antes de enviarse por correo postal al laboratorio central del estudio. El impreso utilizado se presenta en la figura 1. Una vez obtenidos los resultados, se comunicaba al médico responsable del paciente la concentración de α_1 -antitripsina observada, junto con los valores esperados de la misma, por medio de una carta.

El objetivo de este estudio era identificar a los pacientes con un posible déficit de AAT. Para lograrlo, se realizó un estudio cuantitativo y se definió un valor de AAT por encima del cual se descartaba el déficit grave de AAT. Este valor se obtuvo al estudiar la correlación entre los distintos fenotipos y las concentraciones obtenidas en muestras de gota de sangre, y era el equivalente a una concentración sérica de 100 mg/dl¹³. Aquellos pacientes con concentraciones inferiores al valor establecido se consideraban candidatos a proseguir el estudio del déficit.

Procesado de las muestras

Las muestras se procesaron según los métodos publicados previamente para obtener las concentraciones de AAT, así como para detectar la variante alélica Z. Estos métodos se describen brevemente a continuación:

Determinación cuantitativa de los valores de AAT. La muestra de sangre contenida en uno de los discos se eluyó directamente en 200 μ l de diluyente (PBS pH 7,4) durante toda la noche a 4 °C. El producto obtenido se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 min y las concentraciones de AAT se determinaron mediante inmunonefelometría (Image Immuno Chemistry System, Beckmann, EE.UU.).

Determinación del genotipo de AAT. El ADN se extrajo a partir de las muestras de sangre seca, colocando uno de los discos de 3 mm² en 80 μ l de agua e incubando a 60 °C durante 8 h. Posteriormente se añadieron 50 μ l de agua y se incubó a 80 °C durante 30 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 30 min para eliminar los contaminantes y recuperar el ADN eluido.

La genotipificación de la AAT se realizó con el analizador LightCycler (Roche Diagnostic, Alemania), una combinación de termociclador y fluorímetro que permite una rápida amplificación de ADN mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la detección de los genotipos.

Para la detección del genotipo PiZ se ha desarrollado una técnica de PCR a tiempo real. La secuencia de los cebadores fueron los siguientes: PiZF 5'-GGTGTCCACGTGAGCC TTGC-3' y PiZR 5'-AAAAACATGGCCCCAGCAGCT-3'. Las sondas utilizadas fueron: 5'-GACCATCGAACGAGAA AGGG-3', marcada en el extremo 5' con fluorocromo LC-640 (diseñada para hibridar en la posición de la mutación), y 5'-CTCCAGGCCGTGCATAAGGCTGT-3' marcada con fluoresceína en el extremo 3'. La posición del polimorfismo

<p>Iniciales del paciente <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <small>Primer apellido Segundo apellido Nombre</small></p> <p>Año de nacimiento (sólo el año) <input type="text"/></p> <p>Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/></p>	<p>Nombre y dirección del médico:..... <input type="text"/></p> <p>Nombre:..... <input type="text"/></p> <p>Centro de trabajo:..... <input type="text"/></p> <p>Dirección:..... <input type="text"/></p> <p>Ciudad:..... <input type="text"/></p> <p>Fax:..... <input type="text"/></p> <p>Correo electrónico:..... <input type="text"/></p>																									
<p>Tabaquismo</p> <p>Fumador <input type="checkbox"/> No fumador <input type="checkbox"/> Ex fumador <input type="checkbox"/></p> <p>Síntomas:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">SÍ</td> <td style="text-align: center;">NO</td> </tr> <tr> <td>- Disnea de esfuerzo</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>- Disnea episódica</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>- Tos (> 3 meses/año más de dos años)</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>- Expectoración</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		SÍ	NO	- Disnea de esfuerzo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	- Disnea episódica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	- Tos (> 3 meses/año más de dos años)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	- Expectoración	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<p>Diagnóstico neumológico:</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Asma</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Bronquiectasias</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Bronquitis crónica</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>EPOC</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Enfisema</td> </tr> </table> <p>Familiares con déficit de α_1-antitripsina</p> <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No conocidos <input type="checkbox"/></p> <p>Fecha de la extracción sanguínea:..... <input type="text"/></p>	<input type="checkbox"/>	Asma	<input type="checkbox"/>	Bronquiectasias	<input type="checkbox"/>	Bronquitis crónica	<input type="checkbox"/>	EPOC	<input type="checkbox"/>	Enfisema
	SÍ	NO																								
- Disnea de esfuerzo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																								
- Disnea episódica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																								
- Tos (> 3 meses/año más de dos años)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																								
- Expectoración	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																								
<input type="checkbox"/>	Asma																									
<input type="checkbox"/>	Bronquiectasias																									
<input type="checkbox"/>	Bronquitis crónica																									
<input type="checkbox"/>	EPOC																									
<input type="checkbox"/>	Enfisema																									

Fig 1. Cuestionario de recogida de información de cada paciente junto a discos de papel secante.

PiZ está indicada en negrita y subrayado. Las condiciones de la PCR fueron: 3 mmol/l de MgCl₂, 4 pmol de cada sonda, 10 pmol de cada uno de los cebadores, 2 µl de la mezcla de reactivos (LightCycler Fast Start DNA Master Hybridisation; Roche Diagnostics) y 5 µl de la muestra de ADN, en un volumen total de 20 µl. El programa del termociclador fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C, 7 min, seguida por 55 ciclos compuestos de desnaturalización a 95 °C durante 2 s, hibridación de cebadores a 53 °C durante 12 s y extensión de las cadenas de ADN a 72 °C durante 15 s. Después del proceso de amplificación, la curva de fusión se generó por desnaturalización a 94 °C durante 15 s del producto de amplificación, incubación a 40 °C durante 20 s y un lento incremento de la temperatura hasta 85 °C.

La determinación cuantitativa de la AAT por inmunonefometría en muestras de gota de sangre en papel secante es un método específico y reproducible, como se demostró en la validación publicada recientemente, por la comparación con los resultados obtenidos sobre muestras de sangre total¹³. La validación de la técnica usada en la detección del alelo Z ha sido motivo de otra publicación¹⁵.

Resultados

En esta primera fase piloto han participado 5 centros que han remitido un total de 86 muestras de pacientes que cumplían los criterios de inclusión. Se trata de 76 varones y 10 mujeres con una edad media de 68,2 años (DE = 10,8; intervalo, 45-86 años).

Las características clínicas de los pacientes se expo-

nen en la tabla I.

Los síntomas que presentaban los pacientes registrados en el estudio eran, en orden de frecuencia, disnea de esfuerzo (77; 89,5%), tos crónica (72; 83,7%), expectoración (64; 74,4%) y disnea episódica (25; 29,1%).

No se perdió ninguna muestra en el proceso del envío por correo postal. En todos los casos se pudo extraer la suficiente cantidad de ADN para la determinación del genotipo. En 2 casos (2,3%) no se pudo determinar correctamente la concentración de AAT por no tener la muestra el tamaño mínimo requerido para poder realizarla.

En 74 pacientes (86%) se descartó el déficit grave

TABLA I
Características clínicas de los pacientes incluidos

Sexo, varones (%)	76 (88)
Edad, años (DE)	68,2 (10,8)
Diagnóstico*	
EPOC (%)	80,2
BC (%)	23,3
Enfisema (%)	14
Bronquiectasias (%)	9,3
Asma (%)	8,1
Síntomas predominantes*	
Disnea de esfuerzo (%)	89,5
Disnea episódica (%)	29,1
Tos crónica (%)	83,7
Expectoración (%)	74,4

*Los porcentajes suman más del 100% debido a que cada paciente podría tener más de un diagnóstico o síntoma predominante.

homocigoto por presentar concentraciones de AAT por encima del punto de corte establecido, aunque uno de ellos fue heterocigoto MZ por genotipificación. De los 12 restantes (13,9%), tan sólo 2 individuos presentaron también un alelo Z. El resto correspondió a individuos con concentraciones por debajo del umbral establecido (10 pacientes; 11,6%) pero sin evidencia de alelo Z. Por este motivo, se solicitaron muestras séricas para poder determinar el genotipo de estos pacientes. En esta población inicial de 86 pacientes con EPOC no se detectó ningún individuo ZZ.

En cuanto a la frecuencia alélica correspondiente al alelo Z, los valores observados (3/172; 1,74%) son muy similares a los encontrados en la población general, que son de 1,5%⁴.

Discusión

Los resultados obtenidos en esta fase piloto inicial de un programa de cribado del déficit de AAT en pacientes con EPOC permiten comprobar el correcto funcionamiento del circuito utilizado para la obtención y envío de las muestras al laboratorio central. Éste es un método aplicable, cómodo y bien aceptado por los médicos participantes, y permite cuantificar la concentración sérica de AAT y la detección del alelo Z en una muestra de sangre capilar sobre papel secante que es enviada por correo postal. La determinación de la concentración sérica de AAT no permite, por sí sola, la detección de individuos heterocigotos. Por este motivo, practicamos también la identificación del alelo Z mediante el análisis del ADN.

El método usado ha sido útil para detectar el alelo Z en 3 pacientes, lo que está de acuerdo con la frecuencia alélica investigada en nuestra área geográfica⁴.

Diversos estudios estiman que el déficit grave de AAT (fenotipo homocigoto PiZZ) es responsable del 1-2% de los casos de EPOC. Debido al bajo número de pacientes estudiado en esta fase inicial, no hemos detectado a ningún paciente con el fenotipo deficitario grave PiZZ.

En estudios previos se ha evaluado la eficacia de otros métodos en el cribado del déficit de AAT. En uno de ellos se evaluó el valor diagnóstico de la cuantificación de la banda α_1 del proteinograma y, según los resultados obtenidos, los pacientes con un déficit grave de AAT (fenotipo PiZZ) presentaron de forma constante unas concentraciones de α_1 -globulinas por debajo de los límites de la normalidad establecidos, su media fue de tan sólo 1,4% y el valor más alto fue de 2,1%. Sin embargo, debido a la escasa prevalencia del déficit de AAT y a las diversas causas que pueden provocar un descenso en las proteínas séricas, unas concentraciones bajas de la banda α_1 no siempre serán indicativas de un déficit de AAT. En estas circunstancias, será obligado confirmarlo o descartarlo cuantificando la AAT sérica por nefelometría y, en caso de obtenerse valores disminuidos, determinar el fenotipo Pi¹⁶. Aunque el diagnóstico del déficit de AAT es relativamente sencillo, los estudios poblacionales indican que el déficit de AAT es una enfermedad infradiagnosticada y que son muy comunes los retrasos en el diagnóstico¹⁰. De este modo, el criba-

do de esta enfermedad en pacientes con EPOC ha sido recomendado por las principales organizaciones internacionales de salud¹¹.

Estudios recientes en España han demostrado una frecuencia génica para el alelo Z de 1,5% en la población general, lo que indica que deben existir unos 8.000 pacientes PiZZ⁴. La tasa de detección en España es baja, aunque es similar o incluso superior a la de otros países de nuestro entorno.

Basándonos en las recomendaciones de la OMS, y con el propósito de determinar la frecuencia de pacientes con el déficit de AAT en nuestro país, se proyectó un programa de cribado a gran escala en colaboración con el Registro Español del Déficit de AAT del cual forma parte esta fase piloto inicial.

Las muestras de gotas de sangre seca en papel secante se han empleado ya para el cribado de otras enfermedades genéticas¹² y su uso en este estudio ha demostrado ser un método sencillo, rápido y barato para el cribado del déficit de AAT. La obtención de las muestras es mínimamente invasiva y éstas son muy cómodas y sencillas de almacenar y enviar. Esto favorece un fácil acceso al laboratorio central donde se realiza el estudio de las muestras de distintos centros de toda España distantes geográficamente. En un estudio previo se desarrolló y validó un método de inmunonefelometría para la determinación cuantitativa de AAT en muestras de gota de sangre en papel secante, con una excelente correlación con la técnica estándar que usa muestras séricas, lo que lo hace útil para el cribado de este déficit¹³. Además, la técnica de cribado rápido de los genotipos deficitarios PiS y PiZ que hemos utilizado en este trabajo se correlaciona perfectamente con el método validado con anterioridad de PCR y secuenciación del ADN que, aunque es un método eficaz, resulta muy laborioso y requiere mucho tiempo¹⁵.

En Italia se ha llevado a cabo un programa de cribado del déficit de AAT que también utiliza muestras de gota de sangre en papel secante, pero con la diferencia de que se ha aplicado para la fenotipificación con técnicas de isoelectroenfoque de individuos con sospecha clínica o en estudios familiares de déficit de AAT, y no a todos los pacientes con EPOC como hemos hecho en el presente trabajo. Se estudió un total de 1.841 pacientes y se identificaron 151 con el déficit grave de AAT (8,2%), de los cuales 118 fueron ZZ (78%)¹⁷.

En conclusión, se ha puesto a punto la técnica precisa para desarrollar la detección de nuevos casos de déficit de AAT. Un programa nacional de estas características es crucial para detectar nuevos casos en un país como España, donde la enfermedad tiene una baja prevalencia y, como consecuencia, existe un bajo índice de sospecha entre los médicos. Los resultados de esta fase inicial permiten comprobar el correcto funcionamiento del circuito utilizado para la obtención y envío de las muestras. Es un método aplicable, cómodo y bien aceptado por los médicos participantes y permite la cuantificación de AAT, así como la detección del alelo deficitario Z en las muestras, con una excelente correlación con las técnicas estándar que usan muestras de sangre total.

Agradecimiento

Los autores desean agradecer la colaboración de los doctores: A. Martos, J.A. López Muñoz, E. Drobnic, P. Lloberes y A. Páramón por su colaboración al enviar muestras de sus pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carrel RW, Lomas DA, Sidhar S, Foreman R. Alfa-1-antitripsin deficiency. A conformational disease. *Chest* 1996;110:S243-7.
2. Mastrangeli A, Crystal RG. Alpha-1-antitrypsin. An introduction. En: Crystal RG, editor. Alpha 1-antitrypsin deficiency, biology, pathogenesis, clinical manifestations, therapy. New York: Marcel Dekker Inc., 1996; p. 3-18.
3. Eriksson S. A 20 year perspective on α_1 -antitrypsin deficiency. *Chest* 1996;110:237-42.
4. Vidal R, Miravittles M, Jardí R, Torrella M, Rodríguez-Frías F, Moral P, et al. Estudio de la frecuencia de los diferentes fenotipos de la alfa-1-antitripsina en una población de Barcelona. *Med Clin (Barc)* 1996;107:211-4.
5. Vidal R, Miravittles M, y Grupo de Estudio del Déficit de alfa-1-antitripsina. Informe del Registro Español de Pacientes con Déficit de Alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol* 1995;31:299-302.
6. Miravittles M, Vidal R, Barros-Tizón JC, Bustamante A, España PP, Casas F, et al. Usefulness of a national Registry of alpha-1-antitrypsin deficiency. The Spanish experience. *Respir Med* 1998;92:1181-7.
7. Miravittles M, Vidal R, Barros-Tizón JC, Bustamante A, España PP, Casas F, et al. Estado actual del tratamiento sustitutivo en el enfisema congénito por déficit de alfa-1-antitripsina. Informe del Registro Nacional. *Arch Bronconeumol* 1999;35:446-54.
8. Hutchinson D. Alpha-1 antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med* 1998;92:367-77.
9. Blank CA, Brantly M. Clinical features and molecular characteristics of α_1 -antitrypsin deficiency. *Ann Allergy* 1994;72:105-11.
10. McElvaney NG, Stoller JK, Buist AS, Prakash UBS, Brantly ML, Schluchter MD, et al. Baseline characteristics of enrollees in the National Heart, Lung and Blood Institute Registry of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Chest* 1997;111:394-403.
11. Alpha 1 antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 1997;75:397-415.
12. Caggana M, Conroy JM, Pass KA. Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. *Hum Mutant* 1997;11:404-9.
13. Costa X, Jardí R, Rodríguez F, Miravittles M, Cotrina M, Pascual C, et al. Easy method for screening dried blood spot specimens on filter paper for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2000; 15:1111-5.
14. Barberà JA, Peces-Barba G, Agustí A, Izquierdo JL, Monsó E, Montemayor T, et al. Guía clínica para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol* 2001;37:297-316.
15. Rodríguez F, Jardí R, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Vidal R, et al. Rapid screening for alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease using dried blood spots. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:814-7.
16. Miravittles M, Jardí R, Rodríguez F, Torrella M, Pelegrí D, Vidal R. Utilidad de la cuantificación de la banda alfa-1 del proteinograma sérico en el cribado del déficit de AAT. *Arch Bronconeumol* 1998;34:536-40.
17. Luisetti M, Massi G, Massobrio M, Guarraci P, Menchicchi M. A national program for detection of alpha-1-antitrypsin deficiency in Italy. *Respir Med* 1999;93:169-1.