

Esame del liquido cerebrospinale

1. COMPOSIZIONE DEI GRUPPI

1.1. Gruppi coordinatori (*responsabili e collaboratori*)

Foggia/Bari (Università Trojano,)	(C. Avolio, M. Falcone, R. Leante M.)
Firenze (Pol. Careggi, Università)	(F. Lolli, E. Galli, A. Chicchi)
Genova (Clinica Neurologica, Università Panarese)	(E. Capello, D. Giunti, C.)
Pavia (Mondino, Università Andreoni)	(D. Franciotta, E. Zardini, L.)

1.2. Gruppi partecipanti (*responsabili e collaboratori*)

Cagliari (Dipartimento di Neuroscienze, Università Murru, E. Cocco)	(M. Marrosu, G. Costa, M.R.)
Catania (U.O. Neurologia, Ospedale Garibaldi)	(D. Maimone, S. Cuccia)
Chieti (Osp. Colle dell'Ara, Università)	(A. Lugaresi, A. Pantalone)
Ferrara (Arcispedale S. Anna, Università Castellazzi)	(E. Paolino, M.)
Gallarate, VA (Centro Sclerosi Multipla)	(M. Zaffaroni, C. Villa)
Genova (UO Neurologia, Osp. S. Martino)	(G. Ribizzi)
Messina (Clinica Neurologica, Università Ciranni)	(G. Vita, M. Aguenouz, A.M.)
Milano (Besta, Università Ciusani)	(A. Salmaggi, G. Bernardi, E.)
Milano (San Raffaele, Università)	(G. Passerini)
Milano (Osp. Maggiore Policlinico, Università)	(M. Carpo, S. Allaria)
Modena (Clinica Neurologica, Università)	(E. Merelli, R. Bedin)
Orbassano, TO (CreSM e Neurobiol. Clin., Osp. S. Luigi Gonzaga)	(A. Bertolotto, A. Sala)
Padova (Clinica Neurologica, Università)	(P. Gallo)
Pisa (Lab. Neurobiol. Clin. e Neurochim., Università Meucci)	(G. Siciliano, A. Bacci, G.)
S. Giovanni Rot., FG (Osp. Casa Sollievo della Sofferenza)	(P. Simone, G.)
Desina, P. Di Viesti, F. Apollo)	
Sassari (Clinica Neurologica, Università)	(S. Sotgiu, G. Deiana)
Siena (Scienze Neurologiche, Università)	(P. Annunziata, A. Morucci)
Verona (Dipartimento di Neurologia, Università)	(B. Bonetti, D. Alberti)

2. INTRODUZIONE

2.1. Parte generale. I risultati dell'esame del liquor, sia in ambito di routine che di ricerca, hanno prodotto, e continueranno a produrre, una gran mole di dati senza che le procedure e le metodiche utilizzate per produrli siano state ottimizzate e standardizzate. Valga ad esempio l'associazione recentemente riportata tra il numero di bande oligoclonali liquorali e la prognosi di malattia nella sclerosi multipla [1]. Il dato ha valore puramente "locale" non essendo mai stato standardizzato alcun procedimento per la determinazione delle bande oligoclonali sulla base della valutazione numerica delle stesse. In letteratura, inoltre, c'è un unico lavoro che affronta il problema della riproducibilità integrata interlaboratorio (riproducibilità del metodo più accordo tra chi interpreta l'esame) per la determinazione delle bande

oligoclonali. Tale lavoro, senza addentrarsi nel problema della numerazione delle bande, segnala la necessità di individuare criteri interpretativi e procedurali ben definiti e, in ultima analisi, di standardizzazione [2]. Un programma di standardizzazione di metodiche in ambito liquorale deve mettere in preventivo una serie di punti di difficile approccio, con scarsi riscontri di letteratura. Il *consensus* europeo sull'analisi del liquido cefalorachidiano [3], incentrato sulla sclerosi multipla ma con indicazioni di carattere generale, è un documento rimasto disatteso per la maggioranza dei problemi trattati (ad esempio, è citato solo in circa un centinaio di pubblicazioni successive) e non affronta con sufficiente profondità il problema delle procedure e della standardizzazione delle metodiche. La mancanza di standardizzazione è tra i principali motivi per i quali nuovi marcatori liquorali non siano correntemente utilizzati a fini diagnostico-prognostici, sebbene singoli studi condotti su base retrospettiva e su piccole popolazioni di pazienti preselezionate ne suggeriscano l'opportunità [4]. Questi studi hanno comunque dei punti deboli, dato che i valori di *cutoff* e i parametri di normalità riportati per discriminare i pazienti dai controlli sono prima ottimizzati e poi applicati alla stessa o a identiche popolazioni, con un processo che incrementa artificialmente sensibilità e specificità dei test. La moltitudine dei test proposti, inoltre, è quasi sempre stata valutata singolarmente, esame per esame, in differenti popolazioni, senza perseguire l'applicazione di un insieme di test in una singola popolazione, per rendere possibile la valutazione della reale potenza diagnostica del singolo test.

2.2. Parte speciale. L'esame del liquor soffre per la concorrenza delle tecniche di imaging, negli anni sempre più sofisticate e in grado di fornire informazioni dettagliate sui processi patologici a carico del sistema nervoso centrale. Nell'ultimo decennio, l'analisi di base del liquor non è andata incontro a progressi degni di nota. Sul versante della qualità degli esami eseguiti, invece, si è passati da una condizione generale "quasi insufficiente" – testimoniata da un'indagine ad hoc promossa dalla Società Italiana di Biochimica Clinica [5] – a una condizione "più che buona", come risulta dall'analisi dei questionari inviati ai centri partecipanti al processo di standardizzazione di metodiche promosso dall'AINI nel 2003 e che è alla base di questo documento. Circa dieci anni fa, ad esempio, solo la metà dei laboratori intervistati utilizzava il rapporto tra le concentrazioni dell'albumina sierica e dell'albumina liquorale per valutare il danno della barriera emato-liquorale e, seppure in piccola percentuale, una parte di essi effettuava le determinazioni biochimico-immunologiche in modo separato e non contemporaneo su liquor e siero, con forti ripercussioni sulla precisione degli indici calcolati [5]. Oggi, invece, tutti i laboratori aderenti all'attuale processo di standardizzazione di metodiche (AINI 2003) fanno uso del quoziente albumina per il calcolo del danno di barriera ed eseguono contemporaneamente le determinazioni degli analiti sierici e liquorali. Sempre secondo il documento appena citato [5], i laboratori che per la ricerca delle bande oligoclonali utilizzavano l'isoelettrofocusing erano 8 su 33 (26%), mentre i restanti utilizzavano l'elettroforesi. L'isoelettrofocusing è la metodica di uso corrente in tutti i centri da noi intervistati nel 2003 e,

nella quasi totalità di essi, la detezione delle bande si avvale dell'immunodetezione delle IgG. Un recente studio comparativo dimostra formalmente che l'isoelettrofocusing è metodica più sensibile dell'elettroforesi nella ricerca delle bande oligoclonali, anche nei casi in cui in elettroforesi siano utilizzate metodiche di colorazione molto sensibili [6]. La valutazione delle performance diagnostiche degli esami effettuati sul liquor è complessa: la puntura lombare solitamente non viene ripetuta, i volumi liquorali estratti sono limitati, non è facile ottenere campioni liquorali da popolazioni di controllo di individui sani, e, soprattutto, non esistono test malattia-specifici. Sensibilità e specificità diagnostiche hanno un valore relativo nell'ambito della diagnostica liquorale e sono influenzate dalla prevalenza delle malattie neurologiche (teorema di Bayes). Il referto dell'esame liquorale deve quindi necessariamente essere interpretato alla luce del sospetto diagnostico.

Sebbene le indicazioni cliniche della puntura lombare esulino dal presente contesto e rientrino piuttosto nell'ambito di lineeguida a indirizzo clinico, sono riportate di seguito le principali condizioni patologiche nel sospetto delle quali oggi si tende a effettuare l'esame liquorale, al fine di comunicare informazioni anche alla comunità di "non-neurologi clinici" che legge questo documento:

- meningiti e meningoencefaliti
- sclerosi multipla e encefalomieliti demielinizzanti
- poliradicolonevriti disimmuni
- carcinomatosi meningeae
- interessamento neurologico in malattie infiammatorie/autoimmuni

sistemiche

- pseudotumor cerebri
- emorragia subaracnoidea non definibile mediante TC
- blocco del flusso liquorale
- oto/rinoliquorrea
- malattia di Creutzfeldt-Jacob
- malattia di Alzheimer (?)

Il sospetto di meningite/meningoencefalite è l'unico caso in cui è richiesto un esame liquorale basale con carattere di urgenza. L'esame basale comprende: conta cellulare; glucosio nel siero e nel liquor; albumina nel siero e nel liquor oppure proteine totali liquorali. Nella malattia di Alzheimer, evidenze sperimentali non ancora del tutto definitive indicano che la determinazione liquorale di proteina τ , proteina τ iperfosforilata e amiloide β_{1-42} sono utili nella diagnosi precoce della malattia [7].

Un ultimo aspetto è quello economico, anch'esso solo recentemente individuato [8]: la ricerca delle bande oligoclonali, il test più impegnativo dal punto di vista tecnico ed economico, non è cost-effective, anche se in grado di modificare significativamente gli aspetti gestionali e psicologici della malattia quando applicato nella sclerosi multipla.

3. PROCEDIMENTI PREANALITICI

- 3.1. La puntura lombare è di norma effettuata al mattino, con paziente a digiuno. L'effettuazione in orari diversi, per motivi di urgenza o di opportunità, è segnalata sul referto.
- 3.2. L'utilizzo del campione liquorale (tipologia degli esami richiesti, aliquote conseguenti, modalità di invio a centri esterni e di conservazione per utilizzi differiti etc.) andrebbe concordato preventivamente tra clinico e laboratorista.
- 3.3. Una sede di prelievo diversa dalla lombare (ventricolare, cistica) è segnalata sul referto.
- 3.4. Il liquor è raccolto in provette sterili in vetro siliconato o polipropilene, evitando quelle in vetro (i monociti vi aderiscono).
- 3.5. Sarebbe opportuno che il volume di liquor estratto fosse standardizzato (4-5 mL) e che le aliquote di liquor fossero effettuate da una provetta di raccolta unica:
 - i) Il gradiente di concentrazione causa differenze in contenuto proteico tra il primo millilitro di liquor prelevato e gli ultimi millilitri [9, 10]. La standardizzazione del volume del campione consente paragoni accurati per prelievi ripetuti nello stesso paziente e per confronti tra gruppi di pazienti omogenei per patologia.
 - ii) Aliquotare da un'unica provetta minimizza una possibile fonte di errore preanalitico e permette di raccogliere il massimo numero di cellule liquorali (centrifugazione e recupero del pellet da utilizzare per citocentrifuga o camera di sedimentazione) da destinare a scopi diagnostici o di ricerca. Per liquor destinati ad analisi infettivologiche, viene data priorità assoluta alla sterilità del campione, evitando manipolazioni e aliquote da provetta unica.
- 3.6. Un prelievo di sangue è sempre effettuato contestualmente alla puntura lombare.
- 3.7. I campioni appaiati di sangue e liquor sono da inviare al più presto in laboratorio. Gli ospedali o enti esterni al laboratorio dovrebbero organizzare l'invio dei campioni in tempi brevi, preferibilmente facendo in modo da recapitarli entro due ore dai prelievi, senza congelare.
- 3.8. I procedimenti per l'invio di campioni dal laboratorio presso strutture esterne (microbiologia, anatomia patologica etc.) sono da concordare con le strutture riceventi.
- 3.9. I campioni di sangue e liquor sono accompagnati da una scheda con i dati anagrafici del paziente, il sospetto diagnostico e il nome del medico di riferimento.
- 3.10. Il prelievo di sangue non deve essere fortemente emolizzato o lipemico.
- 3.11. Puntura lombare traumatica e sospetto di emorragia subaracnoidea:
 - i) Si raccomanda la raccolta del liquor in tre provette consecutive.
 - ii) Le determinazioni si effettuano sulla terza, la meno inquinata in caso di puntura traumatica.

- iii) Si può avere un'indicazione suggestiva di emorragia subaracnoidea se l'inquinamento nelle tre provette non cambia, ma ciò può accadere anche in caso di puntura traumatica.
- 3.12. Campione liquorale inquinato da sangue:
- i) Nell'impossibilità oggettiva di ottenerne un altro non inquinato, è comunque analizzato.
 - ii) La correzione del numero delle cellule liquorali e del danno di barriera in rapporto al numero di emazie inquinanti è grossolana. I risultati delle analisi, riportati con o senza correzioni, sono da interpretare caso per caso insieme al clinico (l'assenza di alterazioni depone per un campione sicuramente "normale", la presenza di alterazioni necessita un'interpretazione critica).
 - iii) Il campione deve essere escluso dai protocolli di ricerca.

4. PROCEDIMENTI ANALITICI

4.1. Valutazione visiva e analisi spettrofotometrica

- 4.1.1. Il campione liquorale deve essere valutato per aspetto e colore prima e dopo centrifugazione: 10 minuti a un numero moderato di giri (1500-3000 rpm, circa 500 g).
- 4.1.2. Per una raccolta ottimale del pellet cellulare, si raccomanda di centrifugare il liquor con centrifughe a bracci basculanti.
- 4.1.3. Si raccomanda di usare scale qualitative di valutazione per l'aspetto e per il colore (ad esempio, "limpido", "sublimpido", "torbido" per l'aspetto e "incolore", "xantocromico", "eritrocromico" per il colore).
- 4.1.4. Se il liquor è stato raccolto in tre provette, è da segnalare nel referto quella sulla quale è stata fatta l'analisi (ragionevolmente la terza).
- 4.1.5. La spettrofotometria andrebbe effettuata solo nel sospetto di emorragia subaracnoidea [11]. La TC è diagnostica nella maggior parte delle emorragie subaracnoidee, ma una TC normale in presenza di sintomatologia clinica suggestiva non esclude l'emorragia subaracnoidea. L'esame è anche utile per dimostrare un'emorragia subaracnoidea pregressa:
 - i) L'analisi spettrofotometrica deve essere effettuata dopo centrifugazione del campione liquorale (punto 4.1.1).
 - ii) I picchi tipici delle proteine (415 e 460 nm) sono indicativi di danno della barriera emato-liquorale.
 - iii) I picchi dei prodotti di degradazione dell'emoglobina (ossi- e meta-Hb: 415, 540 e 580 nm, metaboliti precoci che persistono per 4-8 giorni; bilirubina e composti bilirubinici: 350, 400 e 460 nm, metaboliti tardivi che persistono per 15-20 giorni) segnalano un'emorragia subaracnoidea recente o pregressa.
 - iv) Uno schema interpretativo applicabile è: la presenza di ossi-Hb e bilirubina è segnalata da a) OD > 0.04 a 415 e 450 nm se l'albumina liquorale ha valori fino a 150 mg/dL; b) OD > 0.08 a 415 e 450 nm se l'albumina liquorale ha valori > 150 mg/dL.

4.2. Cellule liquorali

- 4.2.1. La lettura delle cellule liquorali è da effettuare entro due ore dalla puntura lombare.
- 4.2.2. Utilizzare almeno 100 µL del campione liquorale per la conta cellulare, previa delicata agitazione della provetta contenente il campione.
- 4.2.3. Sono utilizzabili, come camere di lettura, indifferentemente la Fuchs-Rosenthal, la Bürker, la Nageotte o qualunque altra camera simile.
- 4.2.4. Il liquido di Turk può essere utilizzato (diluizione 1:1) per lisare le emazie e contrastare le cellule liquorali, permettendo un'agevole conta di queste ultime in camera di lettura.
- 4.2.5. L'arricchimento cellulare per l'identificazione di cellule liquorali si effettua utilizzando citocentrifughe o camere di sedimentazione dedicate a tale scopo.
- 4.2.6. Dal liquor centrifugato come al punto 4.1.1, si ottiene un pellet cellulare da destinare all'eventuale analisi mediante citocentrifuga o camera di sedimentazione.
- 4.2.7. Il pellet cellulare può essere processato al momento, oppure conservato risospingendolo in formaldeide 10% (50-100 µL).
- 4.2.8. L'analisi morfologica di base delle cellule liquorali è effettuata colorando con il May-Grünwald-Giemsa.
- 4.2.9. L'analisi morfologica delle cellule liquorali è obbligatoria nel sospetto di carcinomatosi meningeo. È inoltre effettuata quando sussista un'indicazione clinica. È facoltativo fornire la conta differenziale dei bianchi in liquor cellulari.
- 4.2.10. L'eventuale analisi immunocitochimica delle cellule liquorali, in casi particolari e quando non possa essere effettuata immediatamente, può prevedere che il vetrino sia fissato mediante breve immersione in acetone freddo, conservandolo a -20°C.
- 4.2.11. Contare e riportare il numero di emazie nel referto non ne aggiunge valore informativo in caso di puntura lombare traumatica.
- 4.2.12. Si segnala l'opportunità, nel sospetto di criptococcosi cerebrale, di effettuare una semplice colorazione (India ink) in grado di mettere in evidenza il criptococco.

4.3. Esame biochimico

- 4.3.1. L'esame biochimico si effettua su surnatante di liquor centrifugato (punto 4.1.1).
- 4.3.2. Le determinazioni, di norma, sono da effettuate su campioni appaiati di siero e liquor.
- 4.3.3. Analiti di base (glucosio, albumina, IgG).
 - 4.3.3.1. Il glucosio deve essere determinato in campioni appaiati di siero e liquor, esprimendone il rapporto percentuale ($\text{glucosio}_{\text{liquor}}/\text{glucosio}_{\text{siero}} \times 100$; valore di riferimento, > 45%).
 - 4.3.3.2. Il glucosio è determinato mediante test colorimetrici.

- 4.3.3.3. La determinazione dell'albumina nel siero e nel liquor è l'indice più accurato del grado di permeabilità della barriera emato-liquorale (danno di barriera) e deve sostituire il solo dosaggio delle proteine totali liquorali.
- 4.3.3.4. Il danno di barriera è esprimibile sia come rapporto tra albumina nel siero e albumina nel liquor ($\text{Alb}_{\text{siero}}/\text{Alb}_{\text{liquor}}$, valore di riferimento, > 130) o come quoziente albumina ($\text{Alb}_{\text{liquor}}/\text{Alb}_{\text{siero}}$) $\times 10^3$ (valore di riferimento, < 7.0), oppure $\times 10^2$ (valore di riferimento, < 0.7) [12].
- 4.3.3.5. Il valore di riferimento del danno di barriera può essere espresso (opzionale) anche in termini semi-quantitativi (secondo EJ Thompson, per % di trasferimento dell'albumina: fino a 0.7%, normale; fino a 2.0%, lieve; fino a 5.0%, moderato; oltre il 5.0%, grave) [13].
- 4.3.3.6. La determinazione delle proteine totali liquorali andrebbe ristretta ai casi nei quali l'esame biochimico deve essere effettuato in urgenza (sospetto di meningite/meningoencefalite), se non sia possibile determinare l'albumina.
- 4.3.3.7. Come al punto precedente, saggi come la Pandy e la Nonne-Appelt andrebbero riservate a casi urgenti ed effettuate al letto del malato.
- 4.3.3.8. È utile segnalare nel referto che i valori di riferimento per il danno di barriera non sono applicabili nella prima infanzia e che nella popolazione anziana la barriera diventa fisiologicamente più permeabile.
- 4.3.3.9. Per ridurre l'imprecisione analitica, albumina e IgG sieriche e liquorali sono da determinare con lo stesso metodo e nella stessa seduta analitica.
- 4.3.3.10. Un'ulteriore diminuzione dell'imprecisione analitica si ottiene determinando albumina e IgG su un'unica calibrazione – quella liquorale – sulla quale testare, oltre ai liquor, anche i sieri opportunamente diluiti (1:100/500).
- 4.3.3.11. L'espressione quantitativa della sintesi intratecale di IgG si ottiene utilizzando funzioni non-lineari, come le formule di Reiber [14] (valori di riferimento, vedi grafico [14], oppure, numericamente, Quoziente IgG $< Q_{\text{Lim}}\text{IgG}$ e $\text{IgG}_{\text{Loc}} < 0$), che correggono il dato anche in presenza di danno di barriera moderato/grave. L'uso di altre formule, come il più noto presso i clinici indice di Link [12] (valore di riferimento, < 0.70), è facoltativo.
- 4.3.3.12. Le metodiche ammesse per la determinazione di albumina e IgG sono: nefelometria, turbidimetria, immunodiffusione radiale.
- 4.3.4. Altri analiti.
- 4.3.4.1. La determinazione liquorale del lattato è opzionale (utile quando, nel sospetto di meningite/meningoencefalite settica, la terapia antibiotica effettuata prima della puntura lombare può aver

normalizzato la glicorrachia). La concentrazione del lattato liquorale è indipendente da quella sierica.

- 4.3.4.2. La determinazione liquorale della proteina basica mielinica è inutile (non ci sono centri che l'effettuano).
- 4.3.4.3. La determinazione liquorale di IgA e IgM può essere utile nella diagnosi di neurotubercolosi (IgA) e di neuroborreliosi (IgM), sebbene tali patologie possano essere diagnosticate con test più specifici. Far rientrare nella routine diagnostica la determinazione liquorale di IgA e IgM, come consigliato dalla scuola tedesca, è opzionale, sebbene se ne sconsigli l'effettuazione in routine per un'ottimizzazione delle risorse.
- 4.3.4.4. La determinazione liquorale di IgA e IgM nella diagnosi di sclerosi multipla, come quella di catene kappa e catene lambda e di proteina basica della mielina, erano state messe "sotto osservazione" nel consensus europeo ad hoc (test opzionali) [3]. A distanza di anni, non sono stati pubblicati studi che ne giustifichino l'introduzione in routine. Tali test rimangono pertanto opzionali, sebbene se ne sconsigli l'effettuazione in routine per un'ottimizzazione delle risorse.
- 4.3.4.5. La determinazione di anticorpi antigene-specifici nel siero e nel liquor nelle meningoencefaliti virali o in altre patologie infettive del sistema nervoso centrale si effettua valutandone il razionale: le tecniche di biologia molecolare garantiscono risposte rapide, sensibili e specifiche nelle prime fasi della malattia, mentre gli indici di sintesi intratecale di anticorpi specifici si positivizzano tardivamente rispetto all'esordio di malattia. In qualche caso (neuroborreliosi), le determinazioni anticorpali sono diagnostiche.
- 4.3.4.6. La determinazione di anticorpi anti-morbillo-rosolia-varicella nel siero e nel liquor nella sclerosi multipla, che rientrava tra gli "evolving optional tests" per l'elevata specificità diagnostica nel consensus report [3], andrebbe riservata a rari casi di incerto inquadramento diagnostico per un'ottimizzazione delle risorse.
- 4.3.4.7. Dato il prevedibile basso numero di determinazioni/anno (corollario dei punti 4.3.4.5 e 4.3.4.6), le determinazioni anticorpali antigene-specifiche andrebbero effettuate in laboratori specializzati (Malattie Infettive), con i quali concordare diluizioni e calcoli di indici di sintesi intratecale.
- 4.3.4.8. Altri esami di non stretta pertinenza neurologica, riguardanti anticorpi (infettivologici, autoimmunità) e molecole varie (D-dimeri, marker tumorali, ACE etc.), che non sono effettuati da tutti da tutti i centri e, per quelli effettuati, per la gran parte "subappaltati" ad altre strutture, esulano da competenze di standardizzazione proprie dell'AINI. È auspicabile che tali strutture utilizzino metodiche sufficientemente standardizzate.
- 4.3.4.9. Altri esami di più stretta pertinenza neurologica (ad esempio: proteina τ , proteina τ iperfosforilata, proteina 14.3.3, amiloide β_1 .

42, NSE, asialo-transferrina), che non sono effettuati da tutti i centri e che, almeno alcuni, hanno carattere di ricerca, necessitano di standardizzazione nel prossimo futuro.

4.3.5. Calcolo della sintesi intratecale di anticorpi antigene-specifici.

- 4.3.5.1. Il calcolo della sintesi intratecale di anticorpi antigene-specifici è utilizzabile per qualunque anticorpo specifico del quale possa esserne determinata la concentrazione o il titolo.
- 4.3.5.2. La differente affinità per l'antigene, che caratterizza gli anticorpi specifici tra siero e liquor e tra sieri o liquor dei pazienti e dei controlli, è tra le principali cause di imprecisione da tener conto nella definizione dei valori di riferimento.
- 4.3.5.3. Si riporta di seguito uno dei possibili approcci al problema, probabilmente il più semplice:
 - i) Determinare la concentrazione delle IgG totali nel siero e nel liquor.
 - ii) Diluire il siero in modo da pareggiare la concentrazione delle IgG liquorali.
 - iii) Testare il campione in ELISA, esprimendo i risultati in densità ottiche (OD).
 - iv) Se il rapporto $OD_{\text{liquor}}/OD_{\text{siero}} > 1.5-2.0$, è presente sintesi intratecale (in linea teorica, sarebbe sufficiente un rapporto $OD_{\text{liquor}}/OD_{\text{siero}} > 1$ per definire la sintesi intratecale: si preferisce incrementarlo per tener conto dell'imprecisione dovuta al dosaggio delle IgG totali e specifiche e alla diluizione).
- 4.3.5.4. Per l'impiego dell'Antibody Index, proposto da H. Reiber, si rimanda al protocollo originale [15].
- 4.3.5.5. Più indaginose metodiche di tipizzazione di bande oligoclonali antigene-specifiche (immuno-affinity mediated capillary blotting) [16] possono affiancare i calcoli numerici, con sensibilità diagnostica simile, quantomeno nell'encefalite erpetica [17]. Gli impedimenti maggiori alla fattibilità routinaria delle metodiche di affinity immunoblotting sono la non comune disponibilità degli antigeni e l'importante carico di lavoro della metodologia.

4.4. Determinazione delle bande oligoclonali

- 4.4.1. Le bande oligoclonali sono l'indice più sensibile di sintesi intratecale di immunoglobuline.
- 4.4.2. L'isoelettrofocusing è la metodica più sensibile per la determinazione delle bande oligoclonali [3], da usare "preferenzialmente" nell'iter diagnostico per la sclerosi multipla, in accordo con le linee guida di McDonald e Colleghi [18].
- 4.4.3. Gel di agarosio o poliacrilamide per isoelettrofocusing, *home made* o commerciali, sono ugualmente ammessi.
- 4.4.4. Esistono in commercio gel di dimensioni standard, gel di dimensioni intermedie (midi-gel) e gel di dimensioni molto ridotte (mini-gel). Questi ultimi consentono un risparmio di reattivi con un certo grado di

automazione, ma, pur in assenza di studi comparativi, in letteratura vi è un'indicazione a non usare mini-gel [19]. L'eventuale ammissibilità dei mini-gel è da valutare sulla base del controllo esterno di qualità.

- 4.4.5. Devono essere analizzate coppie di siero e liquor appaiati in corsie adiacenti.
- 4.4.6. Sono da seminare uguali quantità di IgG sieriche e liquorali: ciò consente una confrontabilità ottimale all'interno della coppia siero-liquor, tra coppie differenti e con i controlli positivo e negativo; consente inoltre un controllo ulteriore sulle determinazioni quantitative di IgG qualora, in isoelettrofocusing, l'intensità di colorazione non sia proporzionale al volume di liquor seminato (proporzionale, a sua volta, alla concentrazione di IgG).
- 4.4.7. Diluire opportunamente i sieri e, eventualmente, i liquor sulla base della sensibilità della colorazione impiegata.
- 4.4.8. Non è ammesso concentrare i liquor.
- 4.4.9. Devono essere utilizzate metodiche di sviluppo della colorazione che permettano l'immunodetezione delle IgG (perossidasi semplice, amplificazione con avidina-biotina, chemiluminescenza).
- 4.4.10. Per le metodiche di blotting e di sviluppo della colorazione, si raccomanda di far riferimento a protocolli pubblicati [20, 21].
- 4.4.11. L'utilizzo di un marker di pH per il monitoraggio della corsa è opzionale.
- 4.4.12. La standardizzazione di una corsa isoelettroforetica è praticamente impossibile per un concorso di fattori imponderabili (conduttività del gel, imbibizione degli elettrodi, qualità delle anfoline, entità dei fenomeni di elettroendosmosi, per citarne i principali). Sono raccomandati alti voltaggi e, di conseguenza, efficienti sistemi di raffreddamento della piastra della camera di migrazione. È buona norma decidere sul "fine corsa" valutando le modificazioni dei parametri elettrici (per esempio, un amperaggio che ha raggiunto livelli bassi e non si modifica per 10 minuti indica di concludere la corsa). Una corsa interrotta troppo precocemente causa la mancata o parziale focalizzazione delle bande, un prolungamento eccessivo della stessa causa un aspetto distorto delle bande. È fondamentale pertanto l'impiego, in ciascuna corsa, di un controllo positivo per bande oligoclonali.
- 4.4.13. Utilizzando gel di agarosio, si raccomanda di asciugare regolarmente l'acqua che si forma al catodo per elettroendosmosi.
- 4.4.14. Il supporto di nitrocellulosa (immunoblotting) o la lastrina (chemiluminescenza) utilizzati per la detezione delle bande oligoclonali costituiscono il formato di archiviazione finale dell'esame IEF.

4.5. Interpretazione dei tracciati in isoelettrofocusing

- 4.5.1. La lettura dei tracciati non prevede l'utilizzo di densitometri (l'occhio umano è più sensibile).

- 4.5.2. È preferibile che l'interpretazione del tracciato, ogni qualvolta sia possibile, sia effettuata da due persone esperte che mettano a confronto le rispettive interpretazioni.
- 4.5.3. Sono adottati i criteri interpretativi proposti schematicamente nel consensus europeo [3]:
- i) Tipo 1, normale distribuzione policlonale delle IgG (assenza di bande oligoclonali).
 - ii) Tipo 2, bande esclusivamente liquorali, come nei processi infiammatori cronici del sistema nervoso centrale (sclerosi multipla).
 - iii) Tipo 3, bande liquorali e, in aggiunta, bande uguali nel siero e nel liquor, come nei processi infiammatori acuti del sistema nervoso centrale (encefaliti), nei quali la risposta immunitaria mantiene un'importante componente sistemica.
 - iv) Tipo 4, bande uguali nel siero e nel liquor ("mirror pattern"), come nei processi infiammatori sistemici, con o senza compartecipazione clinicamente manifesta del sistema nervoso centrale: le bande sieriche diffondono passivamente nel compartimento liquorale.
 - v) Tipo 5, bande uguali nel siero e nel liquor, con spaziatura regolare tra le bande e intensità delle stesse decrescente dal catodo all'anodo, come nelle gammopatie monoclonali.
- 4.5.4. Solo i tipi 2 e 3 si associano a sintesi intratecale di IgG.
- 4.5.5. In aggiunta ai classici 5 pattern è da segnalare sul referto, quando riscontrata, la presenza di una singola banda liquorale, con o senza bande uguali nel siero e nel liquor. L'interpretazione della singola banda non è ancora codificata e, soprattutto, non è stabilito se sia o meno correlabile a sintesi intratecale di IgG. L'esame su un secondo campione liquorale, prelevato a distanza dal primo, può essere in grado di definire compiutamente la presenza/assenza di sintesi intratecale di IgG.
- 4.5.6. L'interpretazione della cosiddetta "banda tenue" non è standardizzabile. Si fa riferimento a "bande tenui" quando il riconoscimento è critico, quando cioè l'occhio umano distingue con incertezza la banda che emerge dal background policlonale. Il problema è accademico quando il criterio minimo per ammettere la presenza di bande oligoclonali sia ottemperato (presenza di almeno due bande ben distinte), più consistente quando il giudizio sulla positività per bande oligoclonali dipenda solo dalla presenza di bande tenui. Si raccomanda di ritestare il liquor aumentandone il volume seminato, sebbene tale procedura aumenti contemporaneamente anche il background delle IgG policlonali. L'analisi di un liquor prelevato a distanza di tempo è indicata, se il quesito diagnostico lo richieda.
- 4.5.7. Il danno di barriera, reale o artefattuale da puntura lombare traumatica, riduce la possibilità di mettere in evidenza bande oligoclonali liquorali per aumento del background di IgG policlonali di provenienza sierica.

L'eventualità andrebbe segnalata nel referto o comunque comunicata a chi lo riceve.

- 4.5.8. L'eventualità di bande uguali nel siero e nel liquor, ma più intense nel liquor rispetto al siero, a parità di quantità di IgG seminate, non è affrontata nel consensus europeo [3]. Teoricamente, è possibile che tali bande siano un segnale di sintesi intratecale di IgG. Tuttavia, sia la determinazione delle IgG sieriche e liquorali, sia i fattori di diluizione rendono approssimativa la procedura di pareggiamento delle IgG nei due liquidi biologici e, in ultimo, incerto il confronto tra differenti gradi di intensità delle singole bande. Si esclude che bande uguali nel siero e nel liquor, ma più intense nel liquor rispetto al siero, a parità di quantità di IgG seminate, siano indice di sintesi intratecale di IgG. Si propone, nei casi critici, di ritestare lo stesso campione e, se il dubbio persista, di consigliare la ripetizione dell'esame a distanza di tempo.
- 4.5.9. L'analisi di bande oligoclonali non-IgG – cioè IgA, IgM, catene kappa e catene lambda – si effettua utilizzando il silver staining.
- 4.5.10. La riproducibilità inter-laboratorio per il numero di bande oligoclonali è molto bassa, sebbene ci sia sufficiente concordanza per quanto riguarda l'interpretazione globale dell'esame (assenza/presenza di bande oligoclonali) [22]. Questo dato di letteratura è confermato da un Controllo Esterni di Qualità per bande oligoclonali promosso nel 2003 dall'AINI, al quale ha partecipato una parte dei centri aderenti al presente processo di standardizzazione di metodiche.

5. CONTROLLO DI QUALITÀ E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

5.1. Biochimica e proteine

- 5.1.1. In ogni seduta analitica si inserisce un controllo interno (pool di liquor aliquotato e conservato a -20°C , preferibilmente a -80°C).
- 5.1.2. I risultati dei controlli interni di qualità (liquor e sieri) sono da riportare su carta o su supporto informatico (esempio, carta di controllo di qualità secondo Shewhart-Levey-Jennings [23]).
- 5.1.3. Le deviazioni ammesse per il controllo di qualità sono del 25% per l'albumina nel siero e nel liquor, del 30% per le IgG nel siero e nel liquor e del 30% per i quozienti albumina e IgG.
- 5.1.4. Deve essere previsto un controllo esterno di qualità a cadenza almeno annuale.

5.2. Isoelettrofocusing

- 5.2.1. In ogni seduta analitica si inseriscono un controllo positivo e uno negativo per bande oligoclonali. Come controllo positivo può anche essere utilizzato un siero con gammopatia monoclonale opportunamente diluito.
- 5.2.2. Deve essere previsto un controllo esterno di qualità a cadenza almeno annuale.
- 5.3. È facoltativo aderire a controlli esterni di qualità non-AINI (esempio, INSTAND).
- 5.4. Altre determinazioni effettuate mediante kit: attenersi alle indicazioni del produttore. Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza.

- 5.5. I campioni di siero e liquor sono da conservare in aliquote a -20°C , preferibilmente a -80°C .
- 5.6. È opzionale conservare la parte cellulare del campione liquorale, e la corrispettiva ematica (Ficoll), in soluzioni come l'RNAfast per l'analisi dei trascritti, o in DMSO e azoto liquido preservando l'integrità cellulare.
- 5.7. La liquorteca dovrebbe essere accompagnata da un registro cartaceo o informatico che riporti anche i dati essenziali del paziente, compreso il sospetto diagnostico.

6. REFERTAIONE

- 6.1. Il referto deve riportare le seguenti indicazioni:
 - 6.1.1. Sede anatomica di provenienza del campione liquorale.
 - 6.1.2. Provetta sulla quale sono effettuate le analisi (unica, terza, etc.).
 - 6.1.3. Aspetto e colore prima e dopo centrifugazione.
 - 6.1.4. Metodiche utilizzate per le determinazioni biochimico-immunologiche (compreso l'isoelettrofocusing).
 - 6.1.5. Tipo di formula o formule utilizzate per il calcolo quantitativo della sintesi intratecale di IgG.
 - 6.1.6. Tipo di camera di lettura per le cellule liquorali.
 - 6.1.7. Valori di riferimento per ciascuna determinazione, calcolo e per la cellularità liquorale.
 - 6.1.8. Descrizione qualitativa dei risultati relativi alla citocentrifuga/camera di sedimentazione e all'isoelettrofocusing.
 - 6.1.9. Commento (facoltativo).
- 6.2. I valori di riferimento per i parametri liquorali dovrebbero essere individuati in gruppi di controllo per ciascun laboratorio, facendo ricorso eventualmente a altri dati pubblicati qualora il numero di controlli analizzabili non sia sufficiente. Se dipendenti dall'età i livelli di riferimento devono essere ottenuti da controlli di età simile a quella dei pazienti. In particolare, la permeabilità della barriera emato-liquorale dipende fisiologicamente, ma entro certi limiti, dall'età. Nei bambini, il grado di permeabilità è imprevedibile, motivo per il quale è oggettivamente difficile fare delle correlazioni clinico-laboratoristiche. Negli adulti con età > 60 anni, un danno di barriera lieve (percentuale di trasferimento siero-liquor dell'albumina fino al 2%) può anche da considerarsi nell'ambito della variabilità fisiologica.
- 6.3. Non esiste un consensus su come refertare la presenza di bande oligoclonali. Potrebbe essere utile allinearsi su criteri comuni al fine della confrontabilità dei risultati tra i vari centri. Si può esprimere la presenza di bande oligoclonali sulla base delle seguenti 5 condizioni:
 - i) Assenza di bande.
 - ii) Presenza di singola banda.
 - iii) Presenza di due bande.
 - iv) Presenza di alcune bande ($n = 3-6$).
 - v) Presenza di numerose bande ($n > 6$).

6.4. Il referto può contenere l'indicazione: "Il laboratorio esegue procedure e metodiche standardizzate a cura dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (revisione marzo 2004) e partecipa al controllo esterno di qualità promosso dalla medesima associazione".

7. BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2001;58:2044-2045.
2. Sellebjerg F, Christiansen M. Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:135-143.
3. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897-902.
4. Watson MA, Scott MG. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1995;41:343-360.
5. Nespolo A, Bernardi G. Lo studio delle proteine liquorali: aspetti fisiopatologici e nuove prospettive diagnostiche. *Corso CEFAR 1995: Le proteine dal laboratorio alla clinica.*
6. Verbeek MM, de Reus HP, Weykamp CW. Comparison of methods for the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: results of the Dutch Quality Control survey. *Clin Chem* 2002;48:1578-80.
7. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003;2:605-613.
8. Mushlin AI, Ruchlin HS, Callahan MA. Costeffectiveness of diagnostic tests. *Lancet* 2001;358:1353-1355.
9. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Langstrom G, Svennerholm L. Protein analyses in cerebrospinal fluid. *Eur Neurol* 1993;33:126-128.
10. Martino G, Grimaldi LME, Moiola L, Filippi M, Martinelli V, Comi G, Canal N. Discontinuous distribution of IgG oligoclonal bands in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 1990;30:129-134.
11. Cruickshank AM. CSF spectrophotometry in the diagnosis of subarachnoid haemorrhage. *J Clin Pathol* 2001;54:827-830.
12. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:385-390.
13. Thompson EJ. *The CSF proteins: a biochemical approach.* Elsevier, Amsterdam 1988.
14. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319-328.
15. Reiber H, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 1991;37:1153-1160.
16. Dorries R, Ter Meulen V. Detection and identification of virus-specific, oligoclonal IgG in unconcentrated cerebrospinal fluid by immunoblot technique. *J Neuroimmunol* 1984;7:77-789.
17. Monteyne P, Albert F, Weissbrich B, Zardini E, Ciardi M, Cleator GM, et al. The detection of intrathecal synthesis of anti-herpes simplex IgG antibodies: comparison between an antigen-mediated immunoblotting technique and antibody index

- calculations. European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *J Med Virol* 1997;53:324-331.
18. McDonald WI, Compston A, Edan G et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
 19. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry – survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF serum quotients. *Clin Chem* 1995;41:256-263.
 20. Olsson T, Kostulas V, Link H. Improved detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid by isoelectric focusing in agarose, double antibody peroxidase labelling, and avidin-biotin amplification. *Clin Chem* 1984;30:1246-1249.
 21. Keir G, Luxton RW, Thompson EJ. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Chem Biochem* 1990;27:436-443.
 22. Sellebjerg F, Christiansen M. Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:135-143.
 23. Levey S, Jennings ER. The use of control charts in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 1950;20:1059-1066.

8. APPENDICE (Revisione 2005) L'aggiornamento del documento segue il XV Congresso AINI (Praglia, 13-15 Ottobre 2005)

8.1. Costituzione di una Banca di Liquido Cerebrospinale (la banca dovrà avere una sede e un responsabile; il documento 8.1 è progettuale e utilizzabile per la richiesta di costituzione della banca ai comitati etici locali)

8.1.1. Background

Nel campo delle patologie neurologiche infiammatorie e degenerative, la disponibilità di terapie innovative, e la prospettiva di averne in futuro di nuove sempre più efficaci, rendono urgente l'identificazione di marcatori di malattia ad alta sensibilità e specificità diagnostica e prognostica. L'analisi di marcatori in un'ampia gamma di malattie neurologiche sia infiammatorie che degenerative ha un razionale legato al fatto che recenti acquisizioni permettono di superare una visione strettamente dualistica di queste patologie. Oggi sappiamo che le malattie degenerative hanno una componente infiammatoria e le malattie infiammatorie croniche, a loro volta, hanno una componente degenerativa.

Il liquido cerebrospinale (liquor) raccoglie tracce di eventi fisiopatogenetici che hanno luogo nel sistema nervoso centrale. Lo studio delle proteine presenti in questo fluido biologico nelle malattie neurologiche è quindi potenzialmente in grado di definire marcatori utili a fini diagnostici e prognostici.

L'istituzione di una banca di liquor e di siero e, in via accessoria, di sangue, permetterebbe la conservazione di campioni biologici preziosi, che potranno essere utilizzati

proprio per l'identificazione e la valutazione di quei marcatori diagnostici o di risposta alle terapie che saranno alla base della medicina del futuro.

Per quanto finora esposto, uno dei "principi chiave" del progetto legato alla banca è la possibilità che i campioni biologici conservati siano utilizzabili per determinazioni non necessariamente prevedibili al momento della raccolta. Le conoscenze nel campo della proteomica e della genomica sono in rapida evoluzione e richiedono flessibilità nella scelta e attuazione di alcune tipologie di determinazioni rispetto ad altre.

8.1.2. **Obiettivi**

L'obiettivo primario del progetto è la realizzazione di una banca di campioni di liquor, siero e sangue presso [*da completare*], finalizzata all'identificazione e alla valutazione di marcatori biologici, genetici e farmacologici di valore diagnostico e prognostico in pazienti affetti (o predisposti a sviluppare) malattie del sistema nervoso.

8.1.3. **Metodi**

Il progetto non comporta interferenza alcuna con le procedure diagnostiche e terapeutiche né alcuna procedura aggiuntiva a carico del paziente. La metodologia è limitata alla conservazione e al successivo utilizzo, in vitro, di residui di campioni biologici (liquor, siero e sangue) ottenuti nell'ambito della pratica clinica routinaria.

L'esame liquorale effettuato routinariamente per indicazioni diagnostiche prevede che sia raccolto un campione di liquor (4 mL), mediante puntura lombare, e un campione di sangue (8 mL in totale), mediante puntura venosa, dal quale ottenere del siero utilizzato per l'esame liquorale, e del sangue intero, utilizzato per le indagini preliminari alla puntura lombare (esame emocromocitometrico).

L'intera procedura permette di raccogliere e conservare residui di campioni di liquor, siero e sangue intero in anticoagulante EDTA, che possono essere utilizzati per le seguenti tipologie di determinazioni analitiche a scopo di ricerca:

- potenziali marcatori (soprattutto proteine) di significato diagnostico e prognostico nelle malattie del sistema nervoso;
- neurotrasmettitori e loro metaboliti;
- farmaci e loro metaboliti;
- profili genetici mirati all'identificazioni di strumenti diagnostici e prognostici (inclusa la risposta alla terapia farmacologica), limitatamente alle malattie del sistema nervoso.

I campioni di liquor, siero e sangue saranno conservati in aliquote di 0.5µL (cryovial) in freezer a -80°C. L'identificazione avverrà mediante numero progressivo e data di prelievo. E' prevista una doppia registrazione su supporto cartaceo e informatico, con una scheda di raccolta dati mirata alla

registrazione delle caratteristiche demografiche e cliniche (compresi i dati sulla diagnosi e terapia).

8.1.4. Protezione della privacy

Verranno attuate le procedure di salvaguardia della privacy previste dalla normativa vigente, procedure delle quali il paziente sarà puntualmente informato.

Per salvaguardare diritti di privacy particolarmente sensibili nel caso di test genetici, al paziente saranno date differenti opzioni: a) di limitare il consenso alla conservazione dei soli campioni di liquor e siero, b) di estendere il consenso alla conservazione del campione di sangue in forma anonima, c) di estendere il consenso alla conservazione del campione di sangue in forma nominativa. In quest'ultimo caso, il paziente avrà diritto, in qualunque momento, di essere informato dei risultati ottenuti da studi genetici coinvolgenti il suo campione. E' evidente infatti che, a differenza dei campioni di liquor e siero, i campioni dedicati agli studi di genomica possano fornire risultati in grado di dare possibili ricadute, in prospettiva futura, sullo stato di salute o di malattia del paziente donatore. Nel caso di donazione anonima, il campione di sangue è etichettato con la sola diagnosi di malattia, età e sesso del paziente. Se non fosse possibile, nell'immediatezza dei prelievi o a conclusione dell'iter diagnostico, raggiungere una diagnosi definitiva, il campione di sangue sarà eliminato. L'ottenimento del consenso libero e informato (allegato) prevede la possibilità di recedere dal consenso stesso. Le informazioni generali riguardanti la donazione saranno fornite al paziente dal neurologo curante, mentre le informazioni relative agli eventuali studi genetici saranno a carico del responsabile della banca. La copia del modulo di consenso informato da consegnare al paziente conterrà i riferimenti utili per tale contatto.

Nella divulgazione/pubblicizzazione di dati derivanti dall'utilizzo dei campioni sarà assicurata l'assoluta anonimità dei soggetti donatori.

8.1.5. Modalità di accesso

I campioni biologici saranno a disposizione dell'attività di ricerca dell'Istituto Neurologico IRCCS Fondazione C. Mondino, eventualmente anche in collaborazione con gruppi di ricerca esterni. L'utilizzo dei campioni è condizionato dall'approvazione dei singoli progetti di ricerca da parte del Comitato Etico dell'Istituto Neurologico IRCCS Fondazione C. Mondino. Non è prevista la possibilità che i campioni siano ceduti a terzi per qualsivoglia fine senza che l'Istituto Neurologico IRCCS Fondazione C. Mondino abbia un ruolo definito nel progetto. E' ammessa la possibilità che collaboratori operanti in altre strutture sanitarie contribuiscano alla raccolta dei campioni. In ogni caso, il contributo dei collaboratori interni

ed esterni sarà esplicitamente riconosciuto in eventuali pubblicazioni.

8.1.6. **Scheda Paziente.** Informazioni contenute: data e ora del prelievo; reparto e medico di trasferimento; cognome, nome e sesso del paziente; sospetto clinico; diagnosi accertata (se disponibile); indicazione all'esame del liquor; durata della malattia (se disponibile); patologie associate; precedente infettivo (se sì, data); terapia in atto (se sì, farmaci e dosi, e de eventualmente ora dell'ultima somministrazione); firma del medico; in calce, tipologia dei campioni richiesti (sangue intero, 5 mL, liquor, almeno 4 mL da puntura lombare non traumatica; sangue intero in anticoagulante EDTA, 3 mL).

8.1.7. **Consenso informato per paziente adulto**

FOGLIO INFORMATIVO: Informazioni per il paziente sulla raccolta e uso di campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue.

Compito dell'Ospedale/Istituto [...] è prendersi cura dei pazienti che vi afferriscono e, contemporaneamente, condurre ricerche che possano migliorare tali cure. Per poter svolgere questa importante fase di ricerca, facciamo affidamento sull'aiuto dei nostri pazienti. Questo breve testo spiega come sia possibile che Lei aiuti le nostre ricerche.

Donare un campione

Come parte delle indagini diagnostiche e delle cure alle quali Lei si è sottoposto, il medico che La segue ha prelevato o preleverà un campione di liquido cerebrospinale, mediante puntura lombare, e un campione di sangue, mediante prelievo venoso. Nel caso in cui residui un piccolo volume del prelievo, questi campioni sono solitamente eliminati dopo l'effettuazione degli esami. Tuttavia, al fine di aiutare la ricerca e nel caso in cui residui un piccolo volume di prelievo, il medico che La segue potrebbe richiederLe di donare tali campioni alla Banca di liquido cerebrospinale dell'Ospedale/Istituto [...]. Se dovesse decidere di donare i campioni, il medico che La segue Le spiegherà come saranno conservati e usati a scopi di ricerca. È importante che Lei sia consapevole del fatto che non deve obbligatoriamente donare i campioni. La decisione spetterà solo a Lei. L'assistenza sanitaria a Lei offerta sarà esattamente la stessa, che Lei doni o meno i campioni.

Cosa succede ai campioni da Lei donati?

Una volta ottenuto il Suo consenso scritto, i campioni di liquido cerebrospinale, siero (derivato dal campione di sangue) e sangue intero saranno conservati fino a quando saranno necessari a scopo di ricerca. Tale ricerca sarà mirata esclusivamente alla valutazione di fattori che possano facilitare la diagnosi, la valutazione delle cause e del decorso di malattie del sistema nervoso, oppure più in generale il trattamento di persone affette da malattie del sistema nervoso.

La confidenzialità sarà sempre protetta. I registri saranno conservati in luoghi sicuri e il Suo nome non comparirà negli eventuali prodotti di ricerca, se non in forma codificata.

Il campione di sangue potrebbe essere utilizzato per ricerche genetiche che potrebbero rilevare predisposizioni a sviluppare

malattie o risposte anormali a farmaci. Data la delicatezza delle informazioni derivanti, Le si offre la possibilità di non acconsentire alla conservazione del campione di sangue, oppure di aderire secondo due modalità: in forma anonima oppure in forma nominativa. Donando il campione in forma nominativa, avrà in futuro la possibilità, su Sua richiesta e rivolgendosi al Responsabile della Banca, di conoscere gli eventuali risultati derivanti da ricerche nelle quali sarà analizzato il Suo campione. In ogni caso, nessun risultato sarà inserito nel Suo referto medico senza il Suo permesso.

Cosa succederebbe se dovesse cambiare idea?

In futuro potrà chiedere di far eliminare i suoi campioni in qualsiasi momento, contattando l'Ospedale/Istituto [...] all'indirizzo sotto indicato.

Cos'altro ha bisogno di sapere?

La ricerca sul campione da Lei donato, condotta da ricercatori dell'Ospedale/Istituto [...], o da loro collaboratori, potrebbe portare alla creazione di cure, dispositivi, nuovi farmaci che potrebbero essere commercializzati e venduti. Nessun individuo che ha donato campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue alla Banca di liquido cerebrospinale dell'Ospedale/Istituto [...] riceverà un compenso per la donazione fatta, o per ogni prodotto realizzato per la vendita. Tutti i diritti rimarranno di proprietà dell'Ospedale/Istituto [...] e dei suoi collaboratori di ricerca.

Il foglio informativo contiene in calce il nome dell'Ospedale/Istituto e quello del Medico Responsabile della Banca, oltre allo spazio per la firma del paziente, per quella del medico informatore e per la data.

FOGLIO PER IL CONSENSO INFORMATO: Dichiarazione di consenso alla conservazione di campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue a fini di ricerca presso l'Ospedale/Istituto [...].

Il/La sottoscritto/a [...], N° cartella clinica [...] DICHIARA di essere stato/a esaurientemente informato/a con quanto esplicitato nell'allegato documento informativo sulle finalità della conservazione dei campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue, in accordo con quanto esplicitato in questo modulo di consenso; di aver compreso che qualsiasi decisione a riguardo non influirà sull'assistenza sanitaria.

Seguono 3 opzioni, ciascuna corredata di firma del paziente, firma del medico che ha raccolto il consenso e data: 1^a opzione, Acconsento al deposito dei campioni di liquido cerebrospinale e siero presso l'apposita Banca appartenente all'Ospedale/Istituto [...] secondo le regole espresse nell'allegato documento informativo; 2^a opzione, Acconsento al deposito del campione di sangue, in forma anonima, presso l'apposita Banca appartenente all'Ospedale/Istituto [...] secondo le regole espresse nell'allegato documento informativo; 3^a opzione, Acconsento al deposito del campione di sangue, in forma nominativa, presso l'apposita Banca appartenente all'Ospedale/Istituto [...], secondo le regole espresse nell'allegato documento informativo

8.1.8. Consenso informato per paziente pediatrico

FOGLIO INFORMATIVO: Informazioni per chi esercita la potestà genitoriale sulla raccolta e uso di campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue da pazienti in età pediatrica

Compito dell'Ospedale/Istituto [...] è prendersi cura dei pazienti che vi afferiscono e, contemporaneamente, condurre ricerche che possano migliorare tali cure. Per poter svolgere questa importante fase di ricerca, facciamo affidamento sull'aiuto dei nostri pazienti. Questo breve testo spiega come sia possibile che Lei, genitore di un paziente in età pediatrica, aiuti le nostre ricerche.

Donare un campione

Come parte delle indagini diagnostiche e delle cure alle quali Sua/o figlia/o è sottoposto, il medico che la/o segue ha prelevato o preleverà un campione di liquido cerebrospinale, mediante puntura lombare, e un campione di sangue, mediante prelievo venoso. Al fine di aiutare la ricerca e nel caso residui un piccolo volume del prelievo, il medico che segue Sua/o figlia/o potrebbe richiederLe di donare tali campioni alla Banca di liquido cerebrospinale dell'Ospedale/Istituto [...]. Se dovesse decidere di donare i campioni, il medico che cura Sua/o figlia/o Le spiegherà come saranno conservati e usati a scopi di ricerca. È importante che Lei sia consapevole del fatto che non deve obbligatoriamente autorizzare la donazione dei campioni. La decisione spetterà solo a Lei, in qualità di genitore del piccolo paziente. L'assistenza sanitaria offerta sarà esattamente la stessa, che Lei decida di donare o meno i campioni.

Cosa succede ai campioni da Lei donati?

Una volta ottenuto il Suo consenso scritto, i campioni di liquido cerebrospinale, siero (derivato dal campione di sangue) e sangue intero saranno conservati fino a quando saranno necessari a scopo di ricerca. Tale ricerca sarà mirata esclusivamente alla valutazione di fattori che possano facilitare la diagnosi, la valutazione delle cause e del decorso di malattie del sistema nervoso, oppure più in generale il trattamento di persone affette da malattie del sistema nervoso.

La confidenzialità sarà sempre protetta. I registri saranno conservati in luoghi sicuri e il suo nome non comparirà negli eventuali prodotti di ricerca, se non in forma codificata.

Il campione di sangue potrebbe essere utilizzato per ricerche genetiche che potrebbero rilevare predisposizioni a sviluppare malattie o risposte anormali a farmaci. Data la delicatezza delle informazioni derivanti, Le si offre la possibilità di non acconsentire alla conservazione del campione di sangue, oppure di aderire secondo due modalità: in forma anonima oppure in forma nominativa. Donando il campione in forma nominativa, sarà possibile, su richiesta Sua o di Suo figlio/a (nel caso questi avesse nel frattempo raggiunto la maggiore età), rivolgendosi al Responsabile della Banca, conoscere gli eventuali risultati derivanti da ricerche nelle quali sarà analizzato il suo campione. In ogni caso, nessun risultato sarà inserito nel referto medico senza il Suo permesso.

Cosa succederebbe se dovesse cambiare idea?

In futuro Lei o Suo figlio/a potrà chiedere di far eliminare i suoi campioni in qualsiasi momento, contattando l'Ospedale/Istituto [...] all'indirizzo sotto indicato.

Cos'altro ha bisogno di sapere?

La ricerca sul campione donato, condotta da ricercatori dell'Ospedale/Istituto [...], o da loro collaboratori, potrebbe portare alla creazione di cure, dispositivi, nuovi farmaci che potrebbero essere commercializzati e venduti. Nessun individuo che ha donato campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue alla Banca di liquido cerebrospinale dell'Ospedale/Istituto [...] riceverà un compenso per la donazione fatta, o per ogni prodotto realizzato per la vendita. Tutti i diritti rimarranno di proprietà dell'Ospedale/Istituto [...] e dei suoi collaboratori di ricerca.

Il foglio informativo contiene in calce il nome dell'Ospedale/Istituto e quello del Medico Responsabile della Banca, oltre allo spazio per la firma di chi esercita la potestà genitoriale, per quella del medico informatore e per la data.

FOGLIO PER IL CONSENSO INFORMATO: Dichiarazione di consenso alla conservazione di campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue a fini di ricerca presso l'Ospedale/Istituto [...] (da parte di chi esercita la potestà genitoriale).

Il/La sottoscritto/a [...], padre/madre/tutore di [...], N° cartella clinica [...] DICHIARA di essere stato/a esaurientemente informato/a con quanto esplicitato nell'allegato documento informativo sulle finalità della conservazione dei campioni di liquido cerebrospinale, siero e sangue, in accordo con quanto esplicitato in questo modulo di consenso; di aver compreso che qualsiasi decisione a riguardo non influirà sull'assistenza sanitaria.

Seguono 3 opzioni, ciascuna corredata di firma di chi esercita la potestà genitoriale, firma del medico che ha raccolto il consenso e data: 1^a opzione, Acconsento al deposito dei campioni di liquido cerebrospinale e siero presso l'apposita Banca appartenente all'Ospedale/Istituto [...] secondo le regole espresse nell'allegato documento informativo; 2^a opzione, Acconsento al deposito del campione di sangue, in forma anonima, presso l'apposita Banca appartenente all'Ospedale/Istituto [...] secondo le regole espresse nell'allegato documento informativo; 3^a opzione, Acconsento al deposito del campione di sangue, in forma nominativa, presso l'apposita Banca appartenente all'Ospedale/Istituto [...], secondo le regole espresse nell'allegato documento informativo

- 8.2. **Consensus sull'analisi liquorale nella sclerosi multipla** (Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. Arch Neurol 2005;62:865-70). E' ribadita la necessità di standardizzazione nel campo dell'analisi liquorale. Non sono emerse differenze sostanziali tra quanto raccomandato dal consensus citato e quanto contenuto nel presente documento .

- 8.3. **Sostituzione del termine “barriera emato-encefalica” con il termine “barriera emato-liquorale”**, perché più corretto in riferimento al quoziente albumina (Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. Arch Neurol 2005;62:865-70), ai punti 2.2, 4.1.5.ii, 4.3.3.3 e 6.2.
- 8.4. **Ricerca di bande oligoclonali reattive per catene leggere kappa libere.** La definizione precoce e certa di sclerosi multipla è centrale nella diagnostica della malattia (criteri di McDonald et al., Ann Neurol 2001;50:121). Goffette e colleghi segnalano che circa il 50% di pazienti con sclerosi multipla negativi per bande oligoclonali IgG nel liquor, sono positivi per bande oligoclonali composte esclusivamente da catene leggere kappa libere (Goffette S, Schlupe M, Henry H, Duprez T, Sindic CJ. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:308-10). Il dato, se confermato, potrebbe integrare i criteri di McDonald et al. Testare per bande oligoclonali composte da catene leggere è stato inoltre segnalato come metodo per mettere in evidenza bande oligoclonali tenui, dato che il background risulta minore rispetto a quello che si ottiene colorando per IgG (Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. Arch Neurol 2005;62:865-70). In questa fase, si segnala l'opportunità di testare per bande oligoclonali composte da catene leggere in casi selezionati di pazienti con sospetta sclerosi multipla negativi per bande liquorali IgG, e si auspicano studi collaborativi sull'argomento all'interno dell'associazione.
- 8.5. **Bande oligoclonali liquorali in pazienti pediatrici con sospetta sclerosi multipla.** Pohl e colleghi segnalano che le performance diagnostiche delle bande oligoclonali liquorali in pazienti con sospetta sclerosi multipla e età inferiore a 16 anni sono paragonabili a quelle descritte negli adulti (Pohl D, Rostasy K, Reiber H, Hanefeld F. CSF characteristics in early-onset multiple sclerosis. Neurology 2004;63:1966-7).
- 8.6. **Anticorpi anti-MOG.** Evidenze di letteratura (Lim ET, Berger T, Reindl M, Dalton CM, Fernando K, Keir G, et al. Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. Mult Scler 2005;11:492-4; O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA, et al. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. J Immunol 2005;175:1974-82) e un multicentrico europeo pro standardizzazione (unpublished) segnalano la scarsa utilità del testare per anticorpi anti-MOG in pazienti con sospetta sclerosi multipla.

Diagnostica delle Sindromi Neurologiche Paraneoplastiche

9. COMPOSIZIONE DEI GRUPPI

9.1. Gruppi coordinatori (*responsabili e collaboratori*)

Milano (Ospedale S. Raffaele, Università) (R. Fazio, M. Maianti)
Padova/Treviso (B. Giometto, M. Vianello)

9.2. Gruppi partecipanti (*responsabili e collaboratori*)

Messina (Università) (G. Vita)
Milano (Policlinico, Università) (M. Carpo)
Pavia (Mondino, Università) (D. Franciotta, E. Zardini, L. Andreoni)
Siena (Università) (P. Annunziata)
Torino (Molinette) (M. Vigliani)
Verona (Università) (B. Bonetti)

10. INTRODUZIONE

10.1. Parte generale. Il laboratorio di diagnostica neurologica autoanticorpale delle Sindromi Neurologiche Paraneoplastiche fa parte dei laboratori specializzati in cui si esplicano indagini monospecialistiche (malattie del Sistema Nervoso) richiedenti la disponibilità di competenze professionali particolari ad elevato livello tecnologico e professionale. Tali indagini forniscono informazioni finalizzate alla diagnosi e al monitoraggio del decorso e/o della terapia delle malattie paraneoplastiche di interesse neurologico. Le metodiche impiegate possono essere anche indirizzate a fini di ricerca scientifica in campo neurologico. La tipologia di indagini eseguibili e la dotazione di apparecchiature sono in rapporto alla rilevanza della struttura sanitaria di appartenenza e quindi alla tipologia dei quesiti diagnostici e osservazionali posti al laboratorio: lo spettro degli anticorpi descritti si è allargato negli ultimi anni, ma solo alcuni sono ben caratterizzati sotto il profilo diagnostico e di essi possiamo quindi riportare un riferimento di specificità e sensibilità. Per gli altri, l'esiguità del numero dei casi descritti in letteratura non consente una definizione del loro valore diagnostico.

10.2. Parte speciale. Possono essere identificati test ad alta specificità diagnostica e test a specificità diagnostica non ancora accertata.

a) test ad alta specificità diagnostica:

i) Dosaggio Anticorpi anti-nucleo neuronale (ANNA-1/ anti-Hu; ANNA-2/anti-Ri)

ANNA-1/anti-Hu nella Neuropatia Sensitiva Subacuta Paraneoplastica:

sensibilità 82%

specificità 99% [1]

ii) Dosaggio Anticorpi anti-citoplasma cellule di Purkinje (PCA-1/Yo)

PCA-1/anti-Yo nella Degenerazione Cerebellare Subacuta

Paraneoplastica

sensibilità 80%

specificità 99% [2]

b) test a specificità diagnostica non ancora accertata:

i) Dosaggio Anticorpi anti-Amfifisina (Anti-128kD).

ii) Dosaggio Anticorpi anti-Tr.

iii) Dosaggio Anticorpi anti-Ma2 (antiTa).

iv) Dosaggio Anticorpi anti-CV2.

Il test viene eseguito correntemente secondo metodiche concordate da specialisti a livello internazionale (meeting di Rotterdam, 1994) e pubblicate in un consensus report [3]. Tali metodiche comprendono **tecniche immunoistochimiche** e di **dot blot** con proteine neurali e una diluizione sierica >1:500 come limite di specificità. Tuttavia diversi laboratori sostengono tuttora che le metodiche immunoistochimiche possono essere sufficienti purché i risultati siano validati da ricercatori con comprovata esperienza sull'argomento [4]. Le tecniche immunoistochimiche sono, come da letteratura [3], "home made". Si segnala la presenza di preparati per immunoistochimica commerciali, che hanno fornito risultati accettabili in controlli esterni di qualità (INSTAND). Al contrario, per la parte relativa alla reattività verso singoli antigeni, sono correntemente utilizzati dot blot commerciali con antigeni ricombinanti che garantiscono un buon livello di standardizzazione. Il Western blot "home made" con omogenato di tessuto cerebellare è tendenzialmente utilizzato a scopo di ricerca. La disponibilità di dot blot commerciali ha indotto alcuni laboratori all'utilizzo di questi kit senza il preliminare screening immunoistochimico. Se le metodiche immunoistochimiche possono essere sufficienti per diagnosticare correttamente la presenza di autoanticorpi, la positività al solo dot blot commerciale non è sufficiente per emettere un referto in tal senso. Si ribadisce che le tecniche immunoistochimiche devono essere utilizzate come test di screening e il dot/Western blot come susseguente test di conferma. Le reattività anticorpali si definiscono tipiche (relative ai test sopradescritti ad alta specificità diagnostica e a specificità diagnostica non ancora accertata) e atipiche (relative a positività in Western blot per antigeni non ancora identificati o categorizzati).

11. PROCEDIMENTI PREANALITICI

- 11.1. Il prelievo ematico deve essere effettuato, a digiuno, in provetta con separatore, o comunque in provetta senza anticoagulante. Non sono necessarie restrizioni alimentari.
- 11.2. Il prelievo ematico è centrifugato, dopo la formazione del coagulo, appena possibile (3000 rpm per 10 minuti).
- 11.3. Il campione di siero è conservato a 2-8°C fino al momento dell'analisi per un massimo di un mese, oppure a -20°C per periodi più lunghi.
- 11.4. Il campione di siero congelato non è da sottoporre a scongelamenti/congelamenti ripetuti.
- 11.5. Il siero può essere scomplementato a 56°C per 30 minuti (facoltativo).
- 11.6. Il campione fortemente emolizzato o lipemico non deve essere utilizzato.

12. PROCEDIMENTI ANALITICI

- 12.1. **Immunoistochimica.** Si ribadisce che l'immunoistochimica (immunoperossidasi o immunofluorescenza) è metodica di screening e che solo quando un campione risulta positivo in immunoistochimica si passa al dot/Western blot su proteine neurali. Infatti: i) solo la corrispondenza tra quadro morfologico in immunoistochimica e dot/Western blot fornisce risultati certi e conclusivi; ii) sono descritti casi di positività al dot blot con immunoistochimica negativa (falsi positivi); iii) l'immunoistochimica permette di individuare antigeni neurali che non sono presenti in dot blot e che sono da studiare in Western blot.

12.1.1. Preparazione del tessuto

- 12.1.1.1. È correntemente utilizzato cervelletto di ratto (di scimmia nelle preparazioni commerciali). Nel sospetto di anticorpi anti-Ma2, il siero è da testare su corteccia cerebrale umana. Il procedimento ottimale prevede la perfusione del ratto Lewis, ma è ammesso l'utilizzo di cervelletto di ratto non perfuso. Oltre al ratto, è ammesso l'utilizzo di tessuto di uomo, scimmia e topo.
- 12.1.1.2. L'animale è perfuso con iniezione intracardiaca di paraformaldeide 4%. In alternativa, è ammessa la post-fissazione della sezione congelata di cervelletto/cervello con acetone/metanolo a 4°C per 5-10 minuti.
- 12.1.1.3. Tagliare fettine di tessuto di cervelletto dello spessore di 10 µm circa e lasciarle asciugare sul vetrino portaoggetti.
- 12.1.1.4. I vetrini possono essere utilizzati al momento, oppure possono essere conservati a -80°C.

12.1.2. Immunoperossidasi

- 12.1.2.1. Reagenti: Acetone, Acqua ossigenata 33%, Triton X-100, NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, diaminobenzidina (DAB), Antisiero di coniglio anti-IgG umane coniugate con

perossidasi, Siero normale di coniglio (deve sempre essere il siero di una specie dalla quale si ottiene l'antisiero anti-IgG umane utilizzato), Acqua distillata.

12.1.2.2. Preparazione dei reagenti (durata dei reagenti ai punti i-v: circa un mese):

- i) Siero di diluizione: 2mL di siero normale di coniglio; 0.36 mL di Triton 10%; 1 mL di Tampone fosfato 240 mM, pH 7.4; 1.350 mL di NaCl 4M; 1.290 mL di Acqua distillata; volume finale di 6 mL. Conservare in frigorifero a +2/+8°C.
- ii) Tampone fosfato (240 mM pH 7.4): Sciogliere 28.8 g di NaH_2PO_4 in 800 mL di acqua distillata e portare a volume finale di 1000 mL. Sciogliere 34.08 g di Na_2HPO_4 in 800 mL di acqua distillata e portare a volume finale di 1000 mL. Mettere in un becker 900 mL di Na_2HPO_4 e aggiungere NaH_2PO_4 fino ad arrivare ad un valore di pH 7.4. Conservare a temperatura ambiente.
- iii) Triton 10%: Sciogliere in un becker 10 mL di Triton X-100 in 90 mL di acqua distillata. Porre su agitatore magnetico per 15 minuti. Conservare a temperatura ambiente.
- iv) NaCl 4M: Sciogliere 233.6 g di NaCl in acqua distillata e portare a volume finale di 1000 mL.
- v) Soluzione di lavaggio: Porre in una bottiglia di vetro: 112.5 mL di NaCl 4M, 30 mL di Triton 10%, 83 mL di Tampone fosfato 240 mM, pH 7.4.
- vi) Substrato cromogeno: Si utilizza DAB liquida o in polvere, preparata al momento. Se liquida, unire una goccia di DAB liquida in 1 mL di tampone fosfato. Tenere al buio.
Attenzione! La DAB è una sostanza cancerogena da utilizzare sotto cappa con guanti e da eliminare in appositi contenitori aggiungendo candeggina.
- vii) Acqua distillata 774.5 mL.

12.1.2.3. Controlli e campioni:

- i) Diluire i campioni e i controlli positivo e negativo 1:501 con siero di diluizione precedentemente diluito 1:2 con acqua distillata. Se è analizzato liquor, il campione è diluito 1:10.
- ii) I controlli e i campioni da analizzare sono trattati nello stesso modo.

12.1.2.4. Procedimento:

- i) Preparare le provette necessarie alla diluizione dei campioni contrassegnandole con il numero progressivo attribuito al paziente dal laboratorio.
- ii) Se congelati, lasciar scongelare i vetrini conservati a -80°C .
- iii) Inibire la perossidasi endogena immergendo i vetrini in acetone e H_2O_2 allo 0.33% per 5 minuti. Lasciare asciugare all'aria.
- iv) Disporre i vetrini in camera umida e coprirli con siero di diluizione (siero bloccante), lasciandoli incubare 30 minuti.

- v) Togliere il siero di diluizione in eccesso e incubare con 100 μ L di siero del paziente (siero primario) diluito 1:500 in siero di diluizione lasciandolo per 1 ora in camera umida.
- vi) Lavare due volte i vetrini con tampone di lavaggio (5 minuti ciascuna) e rimuovere l'eccesso di tampone.
- vii) Incubare per 30 minuti con l'anticorpo anti-IgG coniugato con perossidasi diluito 1:50 in siero di diluizione.
- viii) Ripetere il punto vi.
- ix) Incubare i vetrini per 5-15 minuti con substrato cromogeno (DAB) in presenza di H_2O_2 allo 0.03%.
- x) Lavare due volte i vetrini con tampone di lavaggio 5 minuti ciascuna e rimuovere l'eccesso di tampone.
- xi) Porre il vetrino in acqua distillata per pochi minuti prima di montare in montante acquoso.

12.1.2.5. Procedimenti di rilevazione alternativi ammessi:

- i) Immunoperossidasi indiretta.
- ii) Immunoperossidasi con amplificazione avidina-biotina.

12.1.2.6. Titolazione:

- i) I campioni positivi devono essere titolati.

12.1.3.

Immunofluorescenza indiretta

12.1.3.1. Reagenti: PBS (tampone fosfato) 1x, Acetone, Triton X-100, Antisiero di capra anti-IgG umane fluorescinato, Siero normale di capra (deve sempre essere il siero di una specie dalla quale si ottiene l'antisiero anti-IgG umane utilizzato), bovine serum albumin (BSA) 1% in PBS.

12.1.3.2. Controlli e campioni:

- i) Come al punto 4.1.2.3.

12.1.3.3. Procedimento:

- i) Preparare le provette necessarie alla diluizione dei campioni contrassegnandole con il numero progressivo attribuito al paziente dal laboratorio.
- ii) Se congelati, lasciar scongelare i vetrini conservati a $-80^{\circ}C$.
- iii) Lavaggio dei vetrini in PBS per 5 minuti.
- iv) Immergere i vetrini in BSA 1% in PBS per 5 minuti.
- v) Porre i vetrini in camera umida e coprire le sezioni con Siero di capra 1:10 in PBS 1x + BSA 1% per almeno 30 minuti a temperatura ambiente.
- vi) Far sgocciolare e incubare vetrini con i sieri da analizzare diluiti 1:500 con BSA 1% in PBS per 1 ora a temperatura ambiente.
- vii) Lavare in BSA 1% in PBS per 5 minuti per 2 volte.
- viii) Far sgocciolare i vetrini e incubare con l'antisiero anti-IgG umane fluorescinato diluito 1:50/1:30 in PBS per 30 minuti.
- ix) Lavare i vetrini con PBS 1x per 5 minuti per 2 volte.
- x) Montare con montante acquoso tipo "Permafluor".

12.1.3.4. Titolazione:

i) I campioni positivi devono essere titolati.

12.2. **Dot blot.** In commercio è disponibile un kit (Anti-Onconeural Antigens, Milenia Biotech, Bad Nauheim, Germany) per lo studio di alcuni autoanticorpi presenti nelle sindromi neurologiche paraneoplastiche. Su strisce di nitrocellulosa, sono presenti proteine ricombinanti. Gli antigeni identificabili sono: CDR62 (Yo), Nova-1 (Ri), HuD (Hu) e Amfifisina. È presente anche un antigene di controllo (IgG umane). Gli antigeni neuronali, purificati per affinità e separati mediante SDS-PAGE, sono immobilizzati su membrana di nitrocellulosa. Gli anticorpi contro questi antigeni sono messi in evidenza mediante un test immunoenzimatico indiretto. Il dot blot commerciale è utilizzato nella diagnostica corrente.

12.2.1. Procedimento: Attenersi scrupolosamente alle istruzioni incluse nel kit. Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza.

12.3. **Western blot.** Il Western blot da omogenato di cervelletto o da cellule neuronali può essere utilizzato in diagnostica corrente al posto del dot blot, sebbene tale procedimento comporti oggettivi problemi di standardizzazione e di interpretazione [5]. Si preferisce quindi utilizzarlo nei casi in cui il campione risulti positivo in immunistochimica e negativo al dot blot, oppure a scopo di ricerca. È ammesso che la diagnostica corrente includa soltanto immunistochimica e dot blot.

12.3.1. Preparazione da omogenato di cervelletto. Numerose e non standardizzate sono le metodiche per la preparazione di Western blot da omogenato di tessuto cerebrale: se ne segnala una [6], con i classici riferimenti per l' SDS-PAGE [7] e il blotting [8].

12.3.2. Preparazione da cellule neuronali. I metodi di riferimento sono di Blomstrand e Hambeger [9] e Yanagihara and Hamburger [10], per la preparazione, rispettivamente, di omogenato di neuroni corticali e cellule di Purkinje. Eseguire i procedimenti a 4°C in camera fredda, con un ritardo massimo di 16 ore post mortem.

13. CONTROLLO DI QUALITÀ E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

13.1. Immunistochimica

13.1.1. In ogni seduta analitica si inseriscono un controllo interno positivo e un controllo interno negativo.

13.1.2. Se il controllo positivo non dà origine alla colorazione attesa, l'intera seduta analitica deve essere ripetuta. Nel caso di colorazione positiva del controllo negativo, è utile ripetere l'analisi.

13.1.3. Deve essere previsto un controllo esterno di qualità a cadenza almeno annuale.

13.2. Dot blot

13.2.1. Il kit prevede un controllo interno di metodica (anti-IgG umane).

- 13.2.2. In ogni seduta analitica si inseriscono un controllo interno positivo.
- 13.2.3. Deve essere previsto un controllo esterno di qualità a cadenza almeno annuale.
- 13.3. I campioni sono da conservare in aliquote a -20°C , preferibilmente a -80°C .
- 13.4. I campioni utilizzati come controlli positivi sono da stoccare a -80°C per garantire un livello costante di reattività.
- 13.5. Non conservare campioni di siero diluiti.

14. REFERTAZIONE

- 14.1. Il referto riporta la presenza o l'assenza di anticorpi nel campione biologico testato (siero oppure, coppia siero-liquor).
- 14.2. Il referto è differenziato per immunoistochimica, dot blot e, quando sia il caso, Western blot.
- 14.3. Il referto deve riportare le seguenti indicazioni:
- i) Animale dal quale è prelevato il tessuto.
 - ii) Metodica di preparazione del tessuto (animale perfuso oppure post-fissazione).
 - iii) Metodica di rilevazione degli anticorpi (perossidasi, fluorescenza o varianti).
 - iv) Diluizione del siero/liquor testato.
 - v) Nome della ditta che produce il dot blot utilizzato.
 - vi) Commento (facoltativo).
- 14.4. In caso di referto positivo in immunoistochimica, devono essere specificate le strutture cellulari nei confronti delle quali è presente reattività anticorpale e deve essere riportato il titolo anticorpale.
- 14.5. In caso di reattività immunoistochimica dubbia o di difficile interpretazione, è utile inviare il siero e/o la foto digitale a laboratori esperti per l'interpretazione corretta del risultato.
- 14.6. Il referto può contenere l'indicazione: "Il laboratorio esegue procedure e metodiche standardizzate a cura dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (revisione marzo 2004) e partecipa al controllo esterno di qualità promosso dalla medesima associazione".

15. BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- a. Molinuevo JL et al : Utility of anti-HU antibodies in the diagnosis of paraneoplastic sensory neuropathy *Ann Neurol* 1998 44(6): 976.
- b. Moll JW et al Diagnostic value of anti neural antibodies for paraneoplastic disorders of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990. 53(11) 940.
- c. Lennon V. Paraneoplastic antibodies: the case of a descriptive general nomenclature. *Neurology* 1994 44(12) 2236
- d. Moll JW et al Guidelines on the detection of paraneoplastic antineuronal specific antibodies: report from the Workshop to the fourth Meeting of the international society of neuroimmunology and paraneoplastic

- disease, held October 22-23, 1994; Rotterdam, The Netherlands Neurology 1995 45(10) 1937
- e. Sillevs-Smitt P et al Pitfalls in the diagnosis of autoantibodies associated with paraneoplastic neurologic disease. Neurology 1996 46(6) 1739.
 - f. Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. N Engl J Med 1990;322:1555-1566.
 - g. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
 - h. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4354.
 - i. Blomstrand et al J. Neurochem 1969 16, 1401.
 - j. Yanagihara et al Brain Res. 1973 59, 445.

16. APPENDICE (Revisione 2005) L'aggiornamento del documento segue il XV Congresso AINI (Praglia, 13-15 Ottobre 2005)

16.1. Ricerca di anticorpi anti-NMO (neuromielite ottica di Devic)

Le metodiche riportate nel presente documento per la ricerca degli anticorpi anti-antigeni del sistema nervoso centrale può essere utilizzata per la ricerca degli anticorpi anti-NMO. La determinazione sierica di tali anticorpi è stata segnalata come diagnostica per la malattia di Devic e utile nella diagnosi differenziale tra questa malattia e la sclerosi multipla (Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. Lancet 2004;364:2106-12). I primi dati generati da alcuni centri AINI indicano che la frequenza di positività per anticorpi anti-NMO nella malattia di Devic è più bassa (circa 30%) di quella riportata nel lavoro di Lancet (50%), e che almeno una parte dei casi positivi hanno lesioni asintomatiche nella sostanza bianca cerebrale. Tenute presenti queste limitazioni, si ritiene utile testare per anticorpi anti-NMO in casi clinici selezionati.

16.2. Nuovo dot blot del commercio

Si segnala la disponibilità di un kit del commercio (Ravo Diagnostika) per la determinazione mediante immuno dot blot degli anticorpi anti-CV2 (CRMP5) e anti-Ma2, in aggiunta ai classici anti-HuD, anti-Yo, anti-Ri e anti-amfifisina. Gli anticorpi anti-CV2 sono stati associati a sindromi neurologiche paraneoplastiche caratterizzate da neuropatia sensitiva e sensitivomotora, encefalomielite, atassia cerebellare, encefalite limbica, neuropatia autonoma e corea, gli anticorpi anti-Ma2 a encefalite limbica, encefalite del tronco e atassia cerebellare.

Diagnostica delle Neuropatie Periferiche Disimmuni

17. COMPOSIZIONE DEI GRUPPI

17.1. Gruppi coordinatori (*responsabili e collaboratori*)

Milano (Policlinico, Università)	(<i>M. Carpo, S. Allaria</i>)
Milano (Ospedale S. Raffaele, Università)	(<i>R. Fazio, M. Maianti</i>)
Firenze (Careggi, Università)	(<i>S. Matà, F. Lolli, E. Galli, S. Sorbi</i>)

17.2. Gruppi partecipanti (*responsabili e collaboratori*)

Bari	(<i>A. Amati, IL. Simone, M. Ruggeri, V. Lavolpe</i>)
Chieti	(<i>A. Uncini, C. Caporale</i>)
Genova (S. Martino)	(<i>GL. Mancardi, A. Schenone, L. Benedetti</i>)
Messina (Università)	(<i>G. Vita, M. Aguenouz, AM. Ciranni</i>)
Milano (Besta, Università)	(<i>F. Andreetta, O. Simoncini</i>)
Padova	(<i>C. Briani, E. Toffanin</i>)
Pavia (Mondino, Università)	(<i>D. Franciotta, E. Zardini, L. Andreoni</i>)
Siena (Università)	(<i>P. Annunziata, A. Morucci</i>)

18. INTRODUZIONE

18.1. **Parte generale.** Il laboratorio di Neuroimmunologia Clinica per la diagnostica delle Neuropatie Disimmuni appartiene alla categoria dei laboratori specializzati nei quali si eseguono indagini specialistiche richiedenti competenze di elevato livello professionale e tecnologico. La presenza degli anticorpi anti-glicolipidi (solfo-glucuronil-paragloboside e solfo-glucuronil-lactosaminil-paragloboside) fu descritta per la prima volta circa 20 anni fa nelle neuropatie paraproteinemiche di tipo IgM. Da allora autoanticorpi diretti contro più di 20 differenti glicolipidi sono stati descritti in un ampio spettro di neuropatie acute e croniche. Lo studio delle relazioni tra anticorpi anti-glicolipidi e neuropatie ha sviluppato un ambito di ricerca basato principalmente su osservazioni cliniche e sierologiche piuttosto che su studi sperimentali. L'identificazione di una relazione tra particolari fenotipi clinici e anticorpi anti-glicolipidi ha prodotto studi su un loro possibile ruolo patogenetico, fornendo un razionale per lo sviluppo della ricerca in questo ambito. In parallelo con gli studi clinici, vi è stato un grosso incremento nell'uso dei tests per la determinazione di anticorpi anti-

gangliosidi nel siero di pazienti con neuropatie disimmuni sia a scopi di ricerca clinica, sia diagnostici. I gangliosidi fanno parte di una ampia famiglia di glico(sfingo)lipidi che contengono acido sialico legato ad un core oligosaccaridico e sono ampiamente distribuiti su tutte le membrane bimolecolari lipidiche.

- 18.2. **Parte speciale.** La determinazione degli anticorpi anti-gangliosidi nel siero presenta difficoltà tecniche con numerose variabili legate all'estrazione dell'antigene e alla sua purificazione, ai dettagli tecnici legati alla metodica e alla definizione dei valori di riferimento. Il metodo di screening più usato è l'ELISA e molti di questi fattori ne influenzano i risultati, contribuendo quindi a innalzare la variabilità inter- e intra-laboratorio. Infatti, da più di 200 lavori pubblicati sulla associazione di anticorpi anti-gangliosidi e neuropatie disimmuni, coinvolgenti un'ampia serie di pazienti, emerge un'estrema variabilità della frequenza di associazione: per esempio, la reattività IgM diretta contro GM1 e altri glicolipidi contenenti l'epitopo Gal β 1-3 GalNAc è stata descritta nel 20-80% delle neuropatie motorie croniche. Al contrario, l'associazione tra reattività IgG anti-GM1 e pazienti con neuropatie acute è riportata, con buon accordo tra le serie, nel 20-30% dei casi. I fattori alla base della variabilità della frequenza di associazione degli anticorpi anti-GM1 IgM e neuropatie croniche è probabilmente legata all'uso di metodiche differenti per la determinazione degli autoanticorpi e all'applicazione dei test a casistiche comprendenti pazienti non sempre omogenei dal punto di vista clinico. Numerosi sono stati i tentativi di standardizzazione della metodica ELISA basati sul confronto: a) di ciascuna metodica locale verso metodiche precedentemente pubblicate [1-3]; b) tra ciascuna metodica locale in studi multicentrici [4-5]; c) di ciascuna metodica locale verso una metodica standard proposta dall'Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT), un consorzio europeo di centri neurologici dedicato allo studio di pazienti con neuropatie disimmuni [6]. La conclusione generale è che tutti i laboratori sono in grado di identificare i sieri chiaramente positivi e negativi, mentre i risultati discordanti riguardano sieri con titoli intermedi, ponendo quindi problemi clinico-diagnostici nell'identificazione dei veri positivi e dei veri negativi. Per ridurre le variazioni inter- e intra-laboratorio, lo studio INCAT ha raccomandato, quindi, l'uso di controlli standardizzati. Ciò potrebbe aiutare a ridurre la presenza di falsi positivi e falsi negativi e quindi, in ultima analisi, ad ottimizzare l'approccio clinico-diagnostico dei pazienti con titoli anticorpali borderline. Data la grande varietà di anticorpi anti-gangliosidi descritti in letteratura, si ritiene necessario restringere il campo della standardizzazione alle determinazioni anticorpali che più frequentemente si associano a quadri clinici definiti e che possano avere utilità nella diagnostica differenziale. A favore di questa scelta sono anche da considerare la fattibilità di tali indagini in strutture più periferiche, che hanno minore accesso a strumentazioni diagnostiche iperspecialistiche, e un'analisi dei costi/benefici, dato l'alto costo di tali esami. Partendo quindi da tutte queste

considerazioni, si è focalizzata l'attenzione sul dosaggio degli **anticorpi anti-GM1 IgM e IgG** e degli **anticorpi anti-GQ1b IgG**. La determinazione degli anticorpi anti-GM1 IgM è utile nella diagnostica differenziale delle neuropatie/neuronopatie motorie croniche/malattia del motoneurone e quindi nell'individuazione di pazienti trattabili rispetto ai non trattabili. A tal fine, il traguardo analitico dell'accuratezza delle determinazioni è di primaria importanza. Gli anticorpi anti-GM1 IgG e anti-GQ1b IgG, oltre a presentare minori problemi analitici, si associano a quadri clinici definiti di neuropatie acute (Sindrome di Guillain-Barré) e varianti (sindrome di Miller Fisher), motivo per il quale la diagnostica differenziale è meno critica rispetto all'associazione tra anticorpi anti-GM1 IgM e neuropatie croniche. Da una meta-analisi riguardante i lavori pubblicati fino al 1994 sul dosaggio degli anticorpi anti-GM1 IgM nella malattia del motoneurone e nelle neuropatie, è emersa una sensibilità del test molto variabile, probabilmente in relazione alle differenti metodiche ELISA usate. Poiché il dosaggio degli anti-GM1 IgM serve per confermare il sospetto clinico di neuropatia motoria multifocale (forma trattabile) più che per escluderlo, è molto più importante che il test abbia una buona specificità, anche a scapito della sensibilità. Il dosaggio degli anti-GM1 IgM ha una specificità del 100% e una sensibilità del 38% per la neuropatia motoria multifocale vs la malattia del secondo motoneurone [7], e una specificità del 100% e una sensibilità del 50% nelle neuropatie motorie [8]. In questo documento è presentata una metodica "home made" per la determinazione degli anticorpi anti-GM1 IgM e IgG e degli anticorpi anti-GQ1b IgG, che è correntemente utilizzata in Italia e all'estero. In mancanza di studi comparati con metodiche commerciali, queste ultime sono ammesse pro tempore, in attesa di indicazioni che scaturiranno dai controlli esterni di qualità. Tra i centri partecipanti al processo di standardizzazione, 9 su 11 utilizzano la metodica "home made", 2 su 11 le metodiche commerciali.

19. PROCEDIMENTI PREANALITICI

- 19.1. Il prelievo ematico deve essere effettuato, non a digiuno, in provetta con separatore, o comunque in provetta senza anticoagulante. Non sono necessarie restrizioni alimentari.
- 19.2. Il prelievo ematico è centrifugato, dopo la formazione del coagulo, appena possibile (3500 rpm per 10 minuti).
- 19.3. Il campione di siero è utilizzato dopo la centrifugazione, oppure congelato a -20°C fino al momento dell'analisi.
- 19.4. Per periodi lunghi, il campione di siero è da conservare a -80°C .
- 19.5. Il campione di siero congelato non è da sottoporre a scongelamenti/congelamenti ripetuti.
- 19.6. Il campione fortemente emolizzato o lipemico non deve essere utilizzato.

20. PROCEDIMENTI ANALITICI

20.1. **Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) per anticorpi anti-GM1 IgG/IgM e anti-GQ1b IgG.**

20.1.1. Materiale e reagenti

20.1.1.1. Micropiastre per ELISA.

20.1.1.2. Antigeni per il coating delle micropiastre:

Monosialoganglioside GM1 (Sigma) e Tetrasialoganglioside GQ1b (Calbiochem).

20.1.1.3. Tamponi e antisieri: Albumina Bovina (BSA), NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, H₂O₂ al 3%, Acido citrico, o-phenylendiamine (OPD) in pastiglie monouso da 10 mg, H₂SO₄, H₂O distillata, Anti-IgG/IgM umane da coniglio coniugato alla perossidasi (anticorpo secondario) (Dako), Metanolo, Etanolo assoluto.

20.1.2. Preparazione dei reagenti

20.1.2.1. Antigeni per il coating delle micropiastre. Ricostituire i liofilizzati in metanolo: il GM1 alla concentrazione di 1mg/mL e il GQ1b alla concentrazione di 0.1 mg/mL. Gli antigeni ricostituiti possono essere conservati a -20°C per 6 mesi.

20.1.2.2. Soluzione saturante i siti aspecifici. Per 200 mL di soluzione, sciogliere in H₂O distillata: gr 4 di BSA, gr 1.2 di NaH₂PO₄, 2.4 gr di NaCl. Portare a pH 7.4.

20.1.2.3. Soluzione di lavaggio. Per 500 mL di soluzione, sciogliere in H₂O distillata: gr 1.0 di BSA, gr 3.0 di NaH₂PO₄, 6.0 gr di NaCl. Portare a pH 7.4.

20.1.2.4. Soluzioni stock. Na₂HPO₄ 0.2M: sciogliere 2.85g di Na₂HPO₄ in 100ml di H₂O (scaldare blandamente per favorire lo scioglimento del sale). Acido Citrico 0.1M: sciogliere 2.1g di Acido Citrico in 100 ml di H₂O. Soluzioni stabili per 1 mese a 4°C.

20.1.2.5. Soluzione colorante. Utilizzare le soluzioni stock. Per 25 mL di soluzione colorante, mescolare: 6.4 mL di Na₂HPO₄ 0.2M, 12.5 mL di H₂O, 6.1 mL di Acido Citrico 0.1M. Portare a pH 5.0. Aggiungere la pastiglia di OPD 10 minuti prima dell'uso e tenere al buio. *Attenzione!* L'OPD è una sostanza cancerogena da utilizzare sotto cappa con guanti e da eliminare in appositi contenitori aggiungendo candeggina. Aggiungere 100 µL di H₂O₂ al 3% immediatamente prima di pipettare la soluzione.

20.1.2.6. Soluzione bloccante la colorazione. Utilizzare H₂SO₄ 0.1M: diluire 556 µL di H₂SO₄ 18M in 100 mL di H₂O.

20.1.3. Controlli e campioni

20.1.3.1. Diluire i campioni e i controlli positivo e negativo 1/640 (per anti-GM1) o 1/1280 (per anti-GQ1b) con soluzione saturante.

20.1.3.2. I controlli e i campioni da analizzare sono trattati nello stesso modo.

20.1.4.

Procedimento

20.1.4.1. Seminare l'antigene alla concentrazione di $1\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ in etanolo, per pozzetto e in metà piastra (48 pozzetti) e lasciare senza antigene i pozzetti dell'altra metà.

20.1.4.2. Mantenere le micropiastre a 4°C per una notte, o fino alla completa evaporazione dell'etanolo.

20.1.4.3. Pipettare $200\mu\text{L}$ di soluzione saturante per pozzetto e incubare a 4°C per 4 ore.

20.1.4.4. Rimuovere la soluzione saturante per aspirazione.

20.1.4.5. Pipettare $100\mu\text{L}$ dei sieri di controllo e dei campioni per pozzetto, in quadruplicato, in doppio nei pozzetti con antigene e in doppio in pozzetti senza antigene, e incubare a 4°C overnight.

20.1.4.6. Lasciare due pozzetti, tra quelli con antigene, senza sieri, per l'azzeramento delle letture fotometriche.

20.1.4.7. Ripetere il punto 4.1.4.4.

20.1.4.8. Lavare i pozzetti pipettando $200\mu\text{L}$ di soluzione di lavaggio per pozzetto (5 cicli).

20.1.4.9. Ripetere il punto 4.1.4.4.

20.1.4.10. Pipettare $100\mu\text{L}$ per pozzetto di anticorpo secondario (anti-IgG o anti IgM) diluito 1/500 in soluzione saturante e incubare a 4°C per 1 ora.

20.1.4.11. Ripetere il punto 4.1.4.4.

20.1.4.12. Lavare come al punto 4.1.4.8.

20.1.4.13. Ripetere il punto 4.1.4.4.

20.1.4.14. Pipettare $100\mu\text{L}$ per pozzetto di soluzione colorante e incubare a temperatura ambiente per 1 ora.

20.1.4.15. Bloccare la colorazione pipettando $50\mu\text{L}$ soluzione bloccante.

20.1.4.16. Leggere immediatamente in spettrofotometria a 492 nm , azzerando contro i due pozzetti processati senza anticorpo primario.

20.1.5. Letture e interpretazione dei risultati: a ciascun pozzetto corrisponde un valore di densità ottica (OD), espressione dell'assorbanza. Il risultato per ciascun controllo e per ciascun paziente viene espresso come sottrazione dell'OD media dei due corrispettivi pozzetti con antigene meno la media dei due senza antigene. Con $\text{OD} < 0.05$, il campione è negativo per la presenza dell'anticorpo testato; con OD compresa tra 0.05 e 0.10, il campione è positivo con titolo corrispondente alla diluizione usata; il campione con $\text{OD} > 0.10$, è positivo e deve essere titolato.

20.2. **Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) per anticorpi anti-GM1 IgG/IgM e anti-GQ1b IgG.** Sono disponibili in commercio kit per la determinazione di anticorpi nelle neuropatie periferiche disimmuni

(Bühlmann, Allschwill, Switzerland; Grifols-SeraQuest). Le micropiastre sono pronte all'uso (non è necessario effettuare il coating degli antigeni) e i pannelli di anticorpi disponibili sono più ampi di quanto proposto per la standardizzazione in questo documento. È ammesso che questi kit siano utilizzati per la routine diagnostica.

20.2.1. Procedimento: Attenersi scrupolosamente alle istruzioni incluse in ciascun kit. I kit non devono essere utilizzati oltre la data di scadenza.

21. CONTROLLO DI QUALITÀ E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

21.1. Controllo di qualità

21.1.1. In ogni seduta analitica si inseriscono un controllo interno positivo e un controllo interno negativo.

21.1.2. Deve essere previsto un controllo esterno di qualità a cadenza almeno annuale.

21.2. I campioni sono da conservare in aliquote a -20°C , preferibilmente a -80°C .

21.3. I campioni utilizzati come controlli positivi sono da stoccare a -80°C per garantire un livello costante di reattività.

21.4. Non conservare campioni di siero diluiti.

22. REFERTAZIONE

22.1. Il referto riporta la presenza o l'assenza di anticorpi nel campione biologico testato.

22.2. In caso di positività, deve essere riportato il titolo (viene segnalata l'ultima diluizione positiva prima di quella negativa).

22.3. Sieri con OD compresa tra 0.05 e 0.10 sono da considerare positivi a "titolo intermedio".

22.4. Il referto deve contenere le seguenti informazioni generali:

vii) Tipo di metodica utilizzata (ELISA, con indicazione sulla provenienza dell'antigene, oppure sulla ditta produttrice del kit).

viii) I valori di riferimento: sono riportate le diluizioni alle quali sono testati i sieri: $< 1/640$ (per anti-GM1) oppure $< 1/1280$ (per anti-GQ1b).

ix) Commento (facoltativo).

22.5. Il referto può contenere l'indicazione: "Il laboratorio esegue procedure e metodiche standardizzate a cura dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (revisione marzo 2004) e partecipa al controllo esterno di qualità promosso dalla medesima associazione".

23. BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- a. Ben Younes-Chennoufi A et al. Antiganglioside antibodies in motor-neuron diseases and peripheral neuropathies: study by ELISA

- technique and immunodetection on thin-layer chromatography. *Neurochem Int* 1992;20:353-357.
- b. Bansal AS et al. IgM ganglioside GM1 antibodies in patients with autoimmune disease or neuropathy, and controls *J Clin Pathol* 1994;47:300-302.
 - c. Bech E et al. ELISA-type titertray assay of IgM anti-GM1 autoantibodies. *Clin Chem* 1994;40:1331-1334.
 - D. Marcus DM et al. Measurement and significance of antibodies against GM1 ganglioside. Report of a workshop, 18 April 1989, Chicago (USA). *J Neuroimmunol* 1989;25(2-3):255-259.
 - e. Zielasek J et al. A comparative trial of anti-glycoconjugate antibody assays: IgM antibodies to GM1. *J Neurol* 1994;241:474-480.
 - f. Willison HJ et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Eur J Neurol* 1999;6:71-77.
 - g. van Schaik IN et al. Diagnostic value of GM1 antibodies in motor neuron disorder and neuropathies: a meta-analysis. *Neurology* 1995;45:1570-1577.
 - h. Taylor BV et al. The sensitivity and specificity of anti-GM1 antibody testing. *Neurology* 1996;47:951-955.

24. APPENDICE (Revisione 2005) L'aggiornamento del documento segue il XV Congresso AINI (Praglia, 13-15 Ottobre 2005)

24.1. Impiego di antigene di derivazione umana per la determinazione degli anticorpi anti-GQ1b IgG e IgM

La produzione dell'antigene glicolipidico GQ1b di derivazione bovina è stata interrotta dall'introduzione negli Stati Uniti di norme per la prevenzione delle malattie da prioni. E' disponibile in commercio un antigene di origine umana (HyTest Ltd). In ambito AINI (Policlinico, Università di Milano, dr.ssa M. Carpo), è stato condotto uno studio di comparazione tra le performance diagnostiche dell'antigene di derivazione bovina e l'analogo di derivazione umana. I risultati dello studio, presentati a Praglia, mostrano che le performance diagnostiche dell'antigene di origine umana e quelle dell'antigene di origine bovina sono equivalenti, e pertanto si ammette l'uso dell'antigene GQ1b umano per la determinazione degli anticorpi anti-GQ1b IgG e IgM.

Diagnostica della Miastenia Grave

25. COMPOSIZIONE DEI GRUPPI

25.1. Gruppi coordinatori (*responsabili e collaboratori*)

Milano (Ist. Naz. Neurologico "C. Besta")	(F. Andreetta, O. Simoncini)
Verona (Policlinico G.B. Rossi)	(AP. Riviera, N. Brutti)
Roma (Università Cattolica S. Cuore)	(E. Bartoccioni, F. Scuderi)

25.2. Gruppi partecipanti (*responsabili e collaboratori*)

Bari (Policlinico di Bari)	(A. Amati)
Bologna (Ospedale Maggiore)	(E. Ruffilli)
Ferrara (Azienda Ospedaliera Universitaria)	(E. Paolino, F. Rigolin)
Milano (Ospedale San Raffaele)	(R. Fazio, M. Maianti)
Palermo (Ospedale Civico)	(C. Grisaffi)
Sassari (Clinica Neurologica Universitaria)	(G. Deiana)
Siena (Az. Ospedaliera Senese)	(A. Pini)

26. INTRODUZIONE

26.1. **Parte generale.** Questo documento fornisce indicazioni relative alla diagnostica di laboratorio e al monitoraggio della miastenia grave e, in dettaglio, tratta della standardizzazione del dosaggio degli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina. La miastenia grave rientra nel capitolo delle sindromi miasteniformi, comprendenti diverse patologie neurologiche caratterizzate da debolezza muscolare e affaticabilità. Le sindromi miasteniformi sono diagnosticate con l'ausilio di indagini sierologiche altamente specifiche, quali il dosaggio degli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina e degli anticorpi anti-MuSK per la miastenia grave e il dosaggio degli anticorpi anti-canali del calcio voltaggio dipendenti per la sindrome miasteniforme di Lambert-Eaton. Poiché tali test sono tecnicamente complessi e richiedono competenze professionali particolari è consigliabile che, al fine di garantire un'accurata efficienza diagnostica, siano eseguiti in laboratori ad elevato livello tecnologico e professionale. La miastenia grave è una malattia autoimmune caratterizzata dalla presenza di anticorpi diretti contro il recettore dell'acetilcolina, localizzato sulla membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare. Anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina sono presenti nel siero dell'80-90% dei pazienti con miastenia grave generalizzata e del 40-70% dei pazienti con miastenia grave oculare. La reattività anticorpale verso la molecola del recettore dell'acetilcolina è notevolmente eterogenea: nel siero dei pazienti sono stati riscontrati anticorpi diretti contro ciascuna subunità del recettore, tuttavia è

stata evidenziata una netta predominanza (50%) di anticorpi diretti verso una regione extracellulare della subunità α detta "Main Immunogenic Region". Sono stati, inoltre, evidenziati anticorpi diretti contro la subunità γ dell'isoforma fetale del recettore dell'acetilcolina (1-3). Il titolo degli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina non è indicativo della gravità della malattia; tuttavia, misurazioni seriali hanno dimostrato nei singoli pazienti una discreta correlazione tra livello anticorpale e gravità della sintomatologia (4). Nel 10-15% dei pazienti con miastenia grave non sono rilevabili anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina. Nel 40-70% di questi pazienti è stata recentemente evidenziata la presenza di anticorpi diretti contro il recettore della tirosinchinasi muscolo specifica (MuSK), un recettore essenziale nello sviluppo della giunzione neuromuscolare (5-7).

26.2. **Parte speciale.** Il dosaggio degli anticorpi anti-AchR costituisce un supporto laboratoristico fondamentale per la conferma diagnostica e il follow-up della miastenia (8). Il test di laboratorio che fornisce la migliore efficienza diagnostica è quello radiimmunologico (RIA) eseguito con metodi "home-made" o con kit del commercio. Il metodo di elezione per il dosaggio degli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina è un RIA che utilizza come antigene recettore dell'acetilcolina marcato con ^{125}I - α -bungarotossina. E' raccomandabile che il recettore dell'acetilcolina utilizzato come fonte di antigene derivi da muscolo umano o da linee cellulari di origine umana che lo esprimono (cellule TE671) (9-11). Il RIA, eseguito impiegando metodiche "home-made" o utilizzando kit commerciali, si articola in due fasi fondamentali: una prima fase di incubazione dell'antigene (^{125}I - α -bungarotossina + recettore dell'acetilcolina) con il siero del paziente, durante la quale gli anticorpi, se presenti, si legano all'antigene formando un complesso antigene-anticorpo stabile; una seconda fase nella quale gli immunocomplessi vengono precipitati mediante aggiunta di un antisiero anti-IgG umane. La quantità di radioattività presente nell'immunoprecipitato è proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel siero. Per il dosaggio degli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina sono state proposte anche metodiche di ELISA e di immunofluorescenza che hanno fornito un'efficienza diagnostica inferiore a quella del RIA.

Il dosaggio degli anticorpi anti-MuSK rappresenta un promettente supporto laboratoristico per confermare la diagnosi di miastenia grave in pazienti sieronegativi per anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina. A causa del numero ancora esiguo di casistiche riportate in letteratura e dei metodi di dosaggio "home-made" piuttosto complessi, appare ancora prematuro indicare il dosaggio degli anticorpi anti-MuSK come test da eseguire routinariamente.

27. PROCEDIMENTI PREANALITICI

- 27.1. È consigliabile che il prelievo ematico sia effettuato a digiuno, in provetta con gel separatore o comunque senza anticoagulante.
- 27.2. Il prelievo ematico è centrifugato, dopo la formazione del coagulo, appena possibile (2000 g per 10 minuti).
- 27.3. Il campione di siero è conservato a 2-8°C fino al momento dell'analisi per un massimo di 3 giorni, oppure a -20°C fino all'esecuzione del test.
- 27.4. Il campione di siero congelato non è da sottoporre a scongelamenti/congelamenti ripetuti.
- 27.5. Prima dell'esecuzione del dosaggio è consigliabile centrifugare i sieri per eliminare eventuali elementi particolati presenti nel campione.
- 27.6. Il dosaggio degli anticorpi può essere effettuato, in mancanza di siero, anche su campioni di plasma.
- 27.7. Il campione fortemente emolizzato o lipemico non deve essere utilizzato.

28. PROCEDIMENTI ANALITICI

28.1. **Raccomandazioni per gli operatori.** L'utilizzazione di materiale radioattivo richiede che il personale si attenga alle norme di radioprotezione adottate da ciascun laboratorio. Tutti i campioni di siero devono essere trattati come potenzialmente infetti, di conseguenza devono essere manipolati secondo quanto previsto dalle norme di sicurezza adottate nei singoli laboratori.

28.1.1. RIA con metodica "home made". Tale metodica richiede, oltre a competenze professionali specifiche, la disponibilità di un laboratorio ad elevato livello tecnologico. E' quindi raccomandabile che sia effettuata solo in centri altamente specializzati.

28.1.1.1. Reagenti principali: Muscolo umano (reperimento difficoltoso), ^{125}I - α -bungarotossina, antisiero anti-IgG umane.

28.1.1.2. Strumentazione e materiali richiesti: Ultracentrifuga, centrifuga refrigerata, omogenizzatore, congelatore a -80°C, pipette di precisione complete di puntali, agitatore Vortex, sistema sotto vuoto per aspirazione di liquidi, sistema per la raccolta di scarti radioattivi, gamma counter, provette in polistirene da 3 ml.

28.1.1.3. Estrazione del recettore dell'acetilcolina da muscolo umano: Il protocollo più seguito per l'estrazione del recettore dell'acetilcolina da muscolo umano è quello proposto da Lindstrom (12). In breve, il muscolo, prelevato da pezzi chirurgici e conservato a -80°C fino al momento dell'uso, è omogenato in tampone fosfato (0.01 M, pH 7.4). L'omogenato è centrifugato a 100.000 g per 30 min ed il pellet risultante, risospeso con tampone fosfato contenente

2% Triton X-100, è incubato in agitazione per 1 ora, allo scopo di solubilizzare il recettore. Il preparato è quindi centrifugato a 100.000 g per 1 ora e al termine è recuperato il surnatante contenente il recettore dell'acetilcolina.

28.1.1.4. Marcatura del recettore dell'acetilcolina con ^{125}I - α -bungarotossina: Il recettore dell'acetilcolina è incubato con la ^{125}I - α -bungarotossina per consentire la formazione del complesso recettore dell'acetilcolina + ^{125}I - α -bungarotossina da utilizzare come antigene.

28.1.1.5. Uso del complesso recettore dell'acetilcolina + ^{125}I - α -bungarotossina come antigene: Il dosaggio degli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina è riconducibile al metodo originale di immunoprecipitazione proposto da Lindstrom (12). In breve, il siero del paziente/controllo (5 μl), in duplicato o in triplicato, è incubato (overnight a 4°C) con una quantità nota del complesso recettore dell'acetilcolina + ^{125}I - α -bungarotossina (0.1 pmol). I complessi antigene-anticorpo sono immunoprecipitati mediante aggiunta ai campioni di un'opportuna quantità di antisiero anti-IgG umane (incubazione variabile da 4h a overnight). L'immunoprecipitato è lavato per 3 volte con tampone fosfato. La radioattività è contata in un γ -counter e i risultati sono espressi come pmoli di complesso recettore dell'acetilcolina + ^{125}I - α -bungarotossina precipitate per volume di siero (pmol/ml).

28.1.2. RIA con metodiche commerciali. Sono disponibili in commercio differenti kit (IBL, Hamburg, Germany ; DLD, Hamburg, Germany; RSR, Cardiff, UK) che utilizzano come antigene recettore dell'acetilcolina estratto da muscolo umano, da linee cellulari umane (cellule TE671) che esprimono il recettore nell'isoforma dell'adulto o da linee cellulari che esprimono il recettore nell'isoforma fetale e in quella dell'adulto (cellule TE671 γ/ϵ).

28.1.2.1. Reagenti contenuti nei kit: Antigene: recettore dell'acetilcolina marcato con ^{125}I - α -bungarotossina (liofilizzato), Controllo positivo: un siero con quantità nota di anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina oppure una serie di sieri a concentrazione nota di anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina (curva di calibrazione), Controllo negativo: pool di sieri normali/Controllo Cut Off, Siero normale per la diluizione dei campioni, Tampone di lavaggio, Tampone per ricostituire il recettore marcato, Anticorpo secondario anti-human IgG. Tutti i reagenti devono essere conservati a 2-8°C.

- 28.1.2.2. Strumentazione e materiali non forniti dai kit: Provette di polistirene da 5 ml, Pipette di precisione complete di puntali, Centrifuga refrigerata, Agitatore Vortex, Sistema sotto vuoto per aspirazione di liquidi, Sistema per la raccolta di scarti radioattivi, Gamma counter.
- 28.1.2.3. Procedimento (si raccomanda di seguire attentamente le istruzioni fornite dal kit commerciale utilizzato): In breve, ricostituire il recettore marcato. Incubare i sieri e i controlli, in duplicato o in triplicato, con il recettore marcato per 2 ore a temperatura ambiente. Il massimo di sensibilità del kit si ottiene utilizzando 5 µl di siero intero o 20 µl di siero diluito (a seconda del kit utilizzato). Aggiungere a ciascun campione l'anticorpo secondario anti-IgG umane e incubare alla temperatura e per il periodo indicato dalle istruzioni del kit utilizzato. Lavare aggiungendo 1 ml di tampone di lavaggio centrifugando a 1500 g a 2-8 °C per 20 min. Aspirare con un sistema a vuoto il surnatante senza disturbare il pellet e ripetere il lavaggio risospesando completamente il pellet con un vortex prima della centrifugazione. Aspirare nuovamente il surnatante e contare la radioattività del pellet in un contatore gamma. Si consiglia di utilizzare un controllo positivo interno, oltre a quello fornito dal kit, per monitorare l'andamento dei dosaggi nel tempo.
- 28.1.2.4. Calcolo dei risultati: La radioattività del pellet rappresenta la quantità di complesso recettore-tossina marcata legato dagli anticorpi anti-recettore. Questa quantità viene espressa in pmoli di complesso ^{125}I - α -bungarotossina + recettore dell'acetilcolina precipitate/ml di siero. Le modalità per il calcolo dei valori corrispondenti ai singoli campioni sono riportate nel foglietto illustrativo di ciascun kit. Ogni kit fornisce un range di normalità indicativo, è quindi necessario che ciascun laboratorio stabilisca il proprio limite di normalità dosando un congruo numero di sieri di soggetti non affetti da miastenia grave. Per validare della seduta analitica è necessario che il valore del controllo positivo fornito dal kit rientri nel range di validità stabilito dal produttore per il lotto in uso. Per validare la seduta analitica è inoltre necessario che il valore del controllo positivo interno rientri nel range di valori stabiliti utilizzando una carta di controllo di qualità secondo Shewhart-Levey-Jennings (tali valori vanno conservati su supporto cartaceo o informatico). La correlazione fra la concentrazione degli anticorpi presenti nel siero e i cpm legati è lineare entro il limite del controllo positivo del kit. Se il campione in esame fornisce valori uguali o superiori al controllo è necessario

ripetere il dosaggio diluendo opportunamente il siero del paziente con siero normale.

29. CONTROLLO DI QUALITÀ E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- 29.1. Inserire almeno un siero di controllo negativo per anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina.
- 29.2. Inserire almeno 4 sieri di controllo positivi per anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina, provenienti dalla seroteca del laboratorio.
- 29.3. Se il laboratorio partecipa a controlli di qualità esterni, è utile impiegare come controllo interno anche i sieri inviati dal controllo di qualità esterno (dopo la valutazione dei risultati da parte dell'organismo accreditato).
- 29.4. Per il controllo esterno di qualità esistono tre organizzazioni, due internazionali e una nazionale (è vivamente consigliabile che ogni laboratorio partecipi ad almeno uno dei tre controlli esterni di qualità).
 - 29.4.1. EQAS (European Quality Assessment Trial): Euro EQAS for acetylcholine Receptor antibody che prevede 4 invii annui di 3 campioni ognuno. La partecipazione è a pagamento. Per informazioni consultare il sito www.immqas.org.uk.
 - 29.4.2. IBL Quality Assessment Trial che prevede 3 invii annui di 4 campioni ognuno. La partecipazione è gratuita. Per informazioni consultare il sito www.IBL.hamburg.com.
 - 29.4.3. Controllo di Qualità Dosaggio Anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina coordinato da AINI che prevede 3 invii annui di 4 campioni. La partecipazione è gratuita. Per informazioni consultare il sito www.aini.it essere previsto un controllo esterno di qualità a cadenza almeno annuale.

30. REFERTAZIONE

- 30.1. Il referto deve riportare le seguenti indicazioni:
 - x) I dati anagrafici completi del paziente.
 - xi) Metodica utilizzata per il dosaggio degli anticorpi.
 - xii) Risultato del dosaggio (in pmoli/ml o nmoli/l)
 - xiii) Range di normalità.
 - xiv) Interpretazione del risultato.
 - xv) Commento (facoltativo).

31. BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Drachman DB. Myasthenia Gravis. N.Engl.J.Med. 1994;330:1797-1810.
2. Gardenova M et al. The fetal/adult acetylcholine receptor antibody ratio in mothers with Myasthenia gravis as a marker for transfer of the disease to newborn. Neurology 1997;48:50-54.

3. Vincent A. Arthrogyposis multiplex congenita with maternal autoantibodies specific for a fetal antigen. *Lancet*, 1995, 346: 24-25.
4. Oosterhuis HJGH et al. Anti-AchR antibodies in miastenia Gravis. Part 2. Clinical and serological follow-up of individual patients. *J.Neurol.Sci* 1983;58:371-385.
5. Hoch W et al. Autoantibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with Miasthenia Gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001;7:365-368.
6. Sanders DB et al. Clinical aspects of MUSK antibody positive sieronegative MG. *Neurology* 2003;60:1978-80.
7. Evoli A. et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in sieronegative Miasthenia Gravis. *Brain* 2003;126:2304-2311.
8. Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 1967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg and Psych* 1985;48:1246-1252.
9. Kennel PF et al. Myasthenia Gravis: comparative autoantibody assay using human muscle, TE671 and glucocorticoid-treated TE671 cells as source as antigen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;72:293-296.
10. Voltz r et al. Myasthenia Gravis: measurement of anti-AchR autoantibodies using cell line TE671. *Neurology* 1991 ;41:1836-1838.
11. Beeson D et al. A transfected human muscle cell line expressing the adult subtype of the human muscle acetylcholine receptor for diagnostic assays in myasthenia gravis. *Neurology* 1996;47:1552-1555.
12. Lindstrom J: An assay for antibodies to Acetylcholine Receptor in serum from patients with Myasthenia Gravis. *Clin Immunol Immunopathol* 1977;7:36-43.

32. APPENDICE (Revisione 2005). L'aggiornamento del documento segue il XV Congresso AINI (Praglia, 13-15 Ottobre 2005)

32.1. Impiego di un test del commercio per la determinazione degli anticorpi anti-MuSK

Il gruppo coordinatore dell'Università Cattolica di Roma ha presentato dati sulle performance diagnostiche di un kit del commercio per la determinazione degli anticorpi anti-MuSK e sul razionale del loro impiego nella diagnostica clinica (Bartoccioni E, Scuderi F, Minicuci G, Marino M, Ciaraffa F, Evoli A. Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis: correlation with disease severity. XV Congresso AINI, Praglia (PD), 13-15 Ottobre 2005. Abstract book, p.30; vedi anche: Evoli A, Tonali PA, Padua L, Monaco ML, Scuderi F, Batocchi AP, Marino M, Bartoccioni E. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* 2003;126:2304-11). Il RIPA del commercio, che utilizza MuSK ricombinante marcato con ¹²⁵I (RSR Limited, Cardiff, UK), può essere usato per la determinazione sierica degli anticorpi anti-MuSK. Tali anticorpi sono generalmente associati a forme severe di miastenia grave, a prevalente interessamento bulbare. Nel lavoro presentato a Praglia, i titoli

anticorpali degli anti-MuSK correlavano con la severità di malattia, sia nei casi singoli che nella popolazione generale dei pazienti studiati.