

Accuratezza diagnostica dei metodi per la determinazione di anticorpi antineurone nelle sindromi neurologiche paraneoplastiche

M. Tampoia^{a,h}, A. Antico^{b,h}, C. Bonaguri^{c,h}, M.G. Alessio^{d,h}, A. Zucano^a, A. Radice^{e,h}, S. Platzgummer^{f,h}, N. Bizzaro^{g,h}

^aLaboratorio Patologia Clinica I, Azienda Policlinico di Bari

^bLaboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale di Cittadella (PD)

^cLaboratorio Analisi Emato-Cliniche, Ospedale di Parma

^dLaboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Ospedali Riuniti di Bergamo

^eLaboratorio di Nefrologia, Ospedale San Carlo Borromeo di Milano

^fLaboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale di Merano (BZ)

^gLaboratorio Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo (UD)

^hGruppo di Studio in Autoimmunologia SIMeL

Riassunto

Premesse. La presenza di anticorpi anti-neurone specifici nel siero e nel liquido cefalorachidiano viene utilizzata come criterio diagnostico e classificativo di Sindrome Neurologica Paraneoplastica (SNP). Sebbene l'associazione clinica e la specificità di malattia di questi anticorpi sia ancora controversa, è sempre necessario ricercare o confermare le specificità anticorpali con metodologie analitiche affidabili. Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'accuratezza diagnostica dei metodi per la ricerca di anticorpi anti-neurone paraneoplastici.

Pazienti e metodi. Sono stati valutati 94 pazienti con malattie neurologiche: 28 affetti da SNP diagnosticata secondo i criteri clinici internazionali; 44 affetti da patologie neurologiche non paraneoplastiche; 22 affetti da sindrome neurologica in corso di patologia autoimmune. Come gruppo controllo sono stati valutati 20 soggetti sani e 18 soggetti affetti da neoplasia senza sindrome neurologica. La ricerca di anticorpi anti-neurone paraneoplastici è stata eseguita con tre metodi: immunofluorescenza indiretta (IFI) su cervelletto di primate, Western-blot (WB) e line-blot (LB). I sieri sono stati valutati anche per la ricerca di an-

ticorpi rivolti contro antigeni nucleari (ANA) con metodo IFI su cellule HEp-2.

Risultati. I tre metodi valutati hanno dimostrato differenti livelli di sensibilità e specificità: 17.8% e 97.8%, 17.8% e 91.4%, 21.4% e 96.8%, rispettivamente per IFI, WB, LB. Il fattore di diluizione e la ricerca contemporanea di anticorpi anti-nucleo ha migliorato la specificità diagnostica del metodo IFI. Il metodo LB da solo ha mostrato, rispetto agli altri una maggiore sensibilità. L'associazione di IFI e LB può migliorare ulteriormente la sensibilità al 25% ma penalizza la specificità rispetto ai singoli metodi.

Conclusioni. I nostri dati hanno dimostrato che i metodi per la ricerca degli anticorpi anti-neurone paraneoplastici presentano buona specificità. Il metodo IFI su cervelletto di primate da solo non consente di identificare tutte le specificità anticorpali e presenta problemi legati alla interferenza di anticorpi non neurone specifici. Il metodo LB, da solo permette la caratterizzazione di alcuni anticorpi anti-neurone paraneoplastici e presenta migliore sensibilità diagnostica, caratteristiche che lo propongono come il metodo complessivamente più accurato nella ricerca di anticorpi anti-neurone nelle SNP.

Summary

Diagnostic accuracy of methods for the detection of antineuronal antibodies in paraneoplastic neurological syndromes

Background. The presence in serum and cerebrospinal

fluid (CSF) of antineuronal antibodies supports the diagnosis of paraneoplastic neurological syndromes (PNSSs). We evaluated the diagnostic accuracy of three different methods used in clinical laboratories.

Methods. 94 sera of patients with neurological diseases

were studied; 28 from patients with PNS, 44 from patients with other neurological disease, 22 from patients with systemic autoimmune diseases and neurological disorders. The control group consisted of 20 healthy subjects and 18 subjects with tumour without neurological disorders. Antineuronal antibodies were tested by indirect immunofluorescence (IIF) on cerebellum of primate, Western-blot (WB) and line-blot (LB) methods. Antinuclear antibodies (ANA) were tested by the IIF method on HEp-2 cells.

Results. Sensitivity and specificity of the IIF, WB and LB methods were 17.8% and 97.8%, 17.8% and 91.4%, 21.4% and 96.8%, respectively. The dilution factor and the detection of ANA increased the specificity of the

IIF method. When IIF and LB were assayed together, sensitivity was 25% and specificity 95.7%.

Conclusions. The data show that all methods for the detection of antineuronal antibodies have good specificity. The IIF test on cerebellum of primate does not allow the identification of fine antibody specificities. The LB test allows the identification of some antibodies and shows higher sensitivity than the other methods. These diagnostic properties propose LB as the most accurate method for the detection of antineuronal antibodies.

Key words. Paraneoplastic Neurological Syndromes (PNS), antineuronal antibodies, cerebellum of primate.

Introduzione

Le Sindromi Neurologiche Paraneoplastiche (SNP) sono effetti a distanza di neoplasia, che per definizione, non sono causate da invasione neoplastica o da metastasi, da processi infettivi o ischemici, da deficit metabolici e nutrizionali e tantomeno da interventi chirurgici o dal trattamento del tumore¹.

L'ipotesi di un legame tra disturbi neurologici e neoplasia è nota da oltre 50 anni²; l'evidenza che alcune SNP fossero associate alla presenza di anticorpi diretti contro antigeni neuronali espressi dalle cellule tumorali (anticorpi onconeuronali) risale agli anni ottanta. Dapprima Greenlee descrisse la presenza di un anticorpo che reagiva in modo specifico contro antigeni localizzati nel citoplasma delle cellule del Purkinje di pazienti affetti da degenerazione cerebellare paraneoplastica e tumori ginecologici³; successivamente Graus descrisse la presenza di un anticorpo nel siero di pazienti affetti da encefalomielineurite paraneoplastica e microcitoma polmonare, che reagiva con una proteina localizzata nei nuclei delle cellule neuronali⁴.

Il numero di anticorpi descritti è poi aumentato nel tempo, tanto che nel 1995 sono state pubblicate le prime linee guida per la ricerca e la classificazione degli anticorpi anti-neurone nelle SNP⁵.

Anche il numero di sindromi neurologiche in cui sono presenti anticorpi anti-neurone è aumentato e si sono resi necessari criteri per la loro definizione diagnostica⁶ e per il trattamento⁷.

Nonostante tali sindromi siano rare, comparando in meno dell'1% dei pazienti con neoplasia e nonostante la mancanza di un modello sperimentale che procuri l'evidenza di un ruolo patogenetico degli anticorpi onconeuronali, i neurologi ritengono che la specificità della loro presenza rappresenti un inestimabile strumento diagnostico⁸.

Nel momento in cui compaiono i sintomi neurologici, la maggior parte dei pazienti non ha ancora dia-

gnosi di neoplasia e la determinazione di anticorpi anti-neurone può essere utile non solo nel diagnosticare la sindrome ma anche nell'indirizzare il clinico verso una neoplasia non ancora documentata⁸⁻¹⁰. In pazienti con diagnosi accertata di neoplasia, la presenza di una SNP può preannunciare la recrudescenza del tumore o la comparsa di una seconda neoplasia⁸⁻¹⁰.

Nella Tabella I vengono riportati gli anticorpi, le sindromi neurologiche paraneoplastiche e i tumori ad essi associati¹¹.

La maggior parte degli anticorpi anti-neurone attualmente ritenuti associati alle SNP possono essere ricercati con il metodo di immunofluorescenza indiretta (IFI) su sezioni criostatiche di cervelletto di scimmia¹². L'IFI è il metodo morfologico descrittivo, che si è diffuso nei laboratori di base, sostituendo di fatto il metodo immunoistochimico, che pure ha permesso negli anni l'identificazione della sede intracellulare degli antigeni target degli anticorpi anti-neurone. Il pattern fluoroscopico tuttavia, può risultare di difficile interpretazione, in particolare se vi è una associazione tra anticorpi neurone specifici e anticorpi sistemici e richiedere l'ausilio di altre metodiche, come il metodo di western blot (WB) o i metodi che utilizzano proteine ricombinanti^{13,14} per la conferma e la caratterizzazione anticorpale.

Scopo del presente studio è stato valutare l'accuratezza diagnostica dei metodi analitici per la ricerca di anticorpi paraneoplastici.

Pazienti e metodi

Pazienti

Sono stati valutati 94 pazienti neurologici consecutivi, reclutati in un periodo di 7 mesi (gennaio-luglio 2007), così suddivisi:

28 pazienti affetti da SNP, diagnosticata secondo i criteri clinici internazionali^{6,7}, così suddivisi: 4 affetti da encefalite limbica paraneoplastica (PLE), 10 da dege-

Tabella I. Anticorpi paraneoplastici, sindromi cliniche neurologiche e neoplasie associate.

Anticorpi	Sindromi cliniche	Tumori associati
Anticorpi paraneoplastici ben caratterizzati		
Anti-Hu (ANNA-1)	Encefalomyelite, encefalite limbica, neuropatia sensoriale, degenerazione cerebellare subacuta, neuropatia autonoma	Microcitoma, neuroblastoma, prostata
Anti-Yo (PCA-1)	Degenerazione cerebellare subacuta	Ovaio, mammella
Anti-CV2 (CRMP5)	Encefalomyelite, corea, encefalite limbica, neuropatia sensoriale, neuropatia sensori-motoria, neurite ottica, degenerazione cerebellare subacuta, neuropatia autonoma	Microcitoma, timoma
Anti-Ri (ANNA-2)	Opsoclonio mioclonico, encefalite cerebrale	Mammella, microcitoma
Anti-Ma2 (Ta)	Encefalite limbica, diencefalica, cerebrale, degenerazione cerebellare subacuta	Testicolo, polmone
Anti-amfifisina	Sindrome di Stiff-person, encefalomyelite, neuropatia sensoriale subacuta	Mammella, microcitoma
Anti-recoverina	Retinopatia cancro associata	Microcitoma
Anticorpi paraneoplastici parzialmente caratterizzati		
Anti-Tr	Degenerazione cerebellare subacuta	Hodgkin
ANNA-3	Encefalomyelite, neuropatia sensoriale subacuta	Microcitoma
PCA-2	Encefalomyelite, degenerazione cerebellare subacuta	Microcitoma
Anti-Zic4	Degenerazione cerebellare subacuta	Microcitoma
Anti-mGluR1	Degenerazione cerebellare subacuta	Hodgkin
Anticorpi presenti con o senza neoplasia		
Anti-VGCC	Sindrome miastenica di Lambert-Eaton, degenerazione cerebellare subacuta	Microcitoma
Anti-AchrR	Miastenia gravis	Timoma
Anti-nAchrR	Neuropatia subacuta autonoma	Microcitoma
Anti-VGKC	Encefalite limbica, neuronotonia	Timoma, microcitoma

nerazione cerebellare (DC), 14 da sindrome sensoriale neurologica (SSN). Di 2 pazienti è stato possibile valutare anche il liquido cefalorachidiano.

44 pazienti affetti da patologie neurologiche non paraneoplastiche così suddivisi: 20 sclerosi multipla, 4 neurite ottica retrobulbare (NOR), 3 morbo di Parkinson, 4 emicrania primaria, 2 morbo di Alzheimer, 3 encefaliti post-infettive, 3 malattie dismetaboliche (ipertensione, diabete mellito), 1 mielite, 1 sindrome di Guillain Barré, 1 depressione, 1 fibromialgia, 1 spasmofilia. Di 25 pazienti è stato possibile valutare anche il liquido cefalorachidiano.

22 pazienti affetti da sindrome neurologica in corso di patologia autoimmune: 7 lupus eritematoso sistemico (LES), 2 vasculiti sistemiche, 10 connettiviti indifferenziate, 1 artrite reumatoide, 1 dermatopolimiosite, 1 sclerodermia.

Come gruppo controllo sono stati valutati 20 soggetti sani e 18 soggetti affetti da neoplasia senza sindrome neurologica (3 carcinoma testis, 4 linfomi, 2 carcinoma mammario, 3 carcinoma polmonare, 5 carcinoma ovarico, 1 tumore cerebrale).

Metodi

Su tutti i campioni di siero e di liquido cefalorachi-

diano è stata eseguita la ricerca di anticorpi anti-neuro-ne-specifici paraneoplastici con tre metodi: immunofluorescenza indiretta (IFI), Western-blot (WB), line-blot (LB) (Euroimmun Italia, Padova). I sieri sono stati valutati anche per la ricerca di anticorpi rivolti contro antigeni nucleari (ANA) con metodo IFI su cellule HEP-2 (Euroimmun Italia, Padova).

Immunofluorescenza indiretta (IFI)

L'IFI è stata eseguita su sezioni di cervelletto di scimmia. Il substrato è stato incubato con tutti i sieri alle diluizioni di 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 e con i liquor indulti. Successivamente al lavaggio è stato aggiunto un coniugato costituito da immunoglobuline anti-IgG umane legate alla fluoresceina. Su questi preparati è stato possibile evidenziare i seguenti pattern di fluorescenza e le possibili specificità anticorpali:

1. fluorescenza granulare dei nuclei dei neuroni, anticorpi anti nuclei dei neuroni (ANNA):
 - Anti-Hu (ANNA-1): anticorpi diretti contro proteine basiche legate all'RNA dei nuclei dei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico.
 - Anti-Ri (ANNA-2): anticorpi diretti contro i nuclei dei neuroni del sistema nervoso centrale.

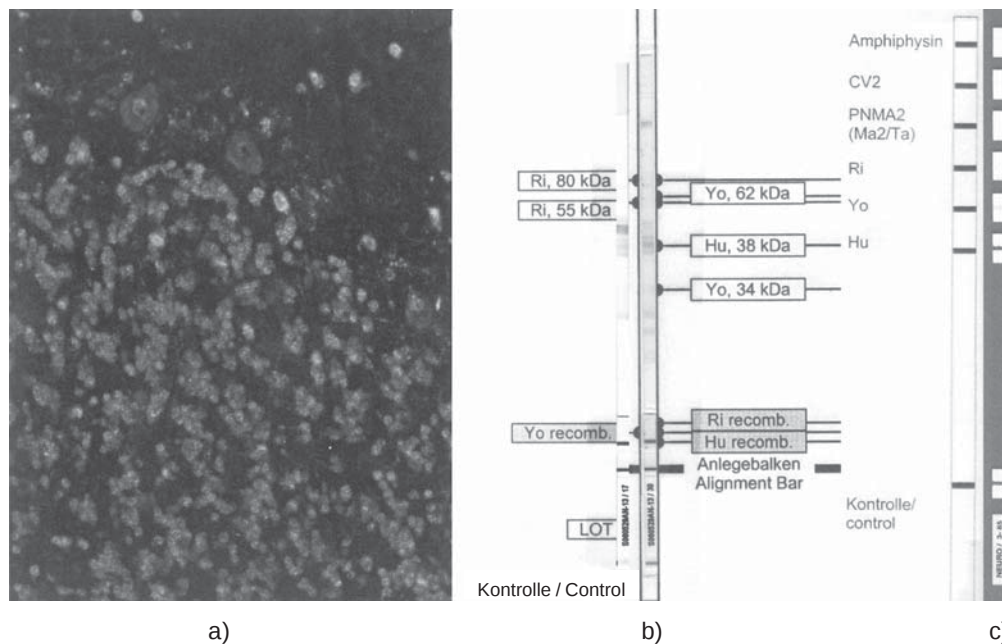


Figura 1. a) cervelletto di scimmia: pattern di fluorescenza positivo per anticorpi anti-Hu; b) reazione di positività con il metodo WB; c) reazione di positività con il metodo LB in un paziente con SNP e carcinoma polmonare.

2. fluorescenza citoplasmatica delle cellule del Purkinje, anticorpi anti citoplasma delle cellule del Purkinje (PCA):
 - anti-Yo (PCA-1): anticorpi diretti contro antigeni localizzati nel citoplasma (reticolo endoplasmatico rugoso, apparato del Golgi, membrana citoplasmatica) delle cellule cerebellari del Purkinje.
3. fluorescenza dei nucleoli delle cellule neuronali
 - anti-Ma (Ma 1, Ma2/Ta): anticorpi diretti contro proteine localizzate nei nucleoli dei nuclei delle cellule neuronali.
4. fluorescenza del citoplasma degli oligo-dendrociti nella lamina alba del cervelletto
 - anti-CV2/CRMP5: anticorpi diretti contro una proteina di 66 kDa localizzata nel citoplasma degli oligo-dendrociti.
5. fluorescenza delle terminazioni nervose presinaptiche
 - anti-amfifisina: anticorpi diretti contro una proteina sinaptica di 128 kDa.
6. fluorescenza fine del citoplasma delle cellule del Purkinje
 - anti-Tr: anticorpi diretti contro una proteina del citoplasma delle cellule cerebellari del Purkinje.

Western-blot (WB)

Il metodo permette la determinazione di autoanticorpi diretti contro gli antigeni neuronali Hu, Yo e Ri. Le strip di reazione comprendono sia i tre antigeni in forma nativa (estratti dal cervelletto di primate e separati tramite elettroforesi), sia in forma ricombinante. Le strip vengono incubate con il siero del paziente diluito (diluizione 1:51 con buffer plus universale) o con

il liquor. Per rilevare gli anticorpi legati si procede ad una seconda incubazione con un enzima-marcato anti-IgG umane capace di promuovere una reazione colorimetrica. Un risultato positivo per l'anticorpo anti-Hu è dato da una reazione della banda corrispondente ad una proteina di 38 kDa e della banda corrispondente all'antigene Hu ricombinante. Un risultato positivo per l'anticorpo Yo è dato da una reazione della banda corrispondente ad un antigene di 62 kDa e della banda corrispondente all'Yo ricombinante. In alcuni casi può essere visualizzata una seconda banda di 34 kDa. Un risultato positivo per l'anticorpo Ri è dato da una reazione a livello delle bande corrispondenti agli antigeni di 80 kDa e 55 kDa: è necessario avere la positività di entrambe le bande. In aggiunta, deve essere rilevata una banda corrispondente all'antigene Ri ricombinante.

Line-blot (LB)

Il metodo permette di evidenziare anticorpi di classe IgG diretti contro sei differenti antigeni neuronali: amfifisina, CV2/CRMP5, PNMA2 (Ma2/Ta), Ri, Yo, Hu. Sulle strip sono coattati in linee parallele antigeni altamente purificati; i cDNA umani corrispondenti a tutte le proteine ricombinanti sono stati espressi in *E. coli*. I campioni diluiti (1:101 con buffer plus universale) sono incubati con le strip. Per rilevare gli anticorpi legati si utilizza nella seconda incubazione un enzima-marcato anti-IgG umane capace di promuovere una reazione colorimetrica.

Nel caso di campioni positivi, gli anticorpi specifici si legano all'antigene corrispondente. Le specifiche reazioni anticorpali sono identificate da bande riconosci-

Tabella II. Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da sindrome neurologica paraneoplastica (SNP) risultati positivi alla ricerca di autoanticorpi anti-neurone. Quattro pazienti hanno mostrato concordanza fra metodi del 100%. (DC, degenerazione cerebellare; SSN, sindrome sensoriale neurologica; PLE, encefalite limbica paraneoplastica).

pazienti SNP	sesto	età	diagnosi	neoplasia	IFI (1:100)	pattern	Western blot	Line-blot
Paziente 1 *	F	63	DC	assente §	POS	Anti-Ri	Anti-Ri (55)(80)	Anti-Ri
Paziente 2	F	63	DC	cr mammario	NEG	-	NEG	Anti-Yo
Paziente 3	F	65	SSN	cr mammario	NEG	-	Anti-Hu	NEG
Paziente 4	M	70	SSN	assente §	POS	Anti-Hu	Anti-Hu	Anti-Hu
Paziente 5	M	80	PLE	cr prostatica linfoma	NEG	-	NEG	Ma2
Paziente 6	F	72	SSN	cr polmonare	POS	Anti-Hu	Anti-Hu	Anti-Hu/CV2
Paziente 7	F	66	DC	assente §	POS	Anti-Hu	NEG	NEG
Paziente 8 *	F	69	DC	cr ovarico emammario	POS	Anti-Yo	Anti-Yo	Anti-Yo

* positività presente anche nel liquor.

§ diagnosi di neoplasia associata eseguita nel follow-up.

bili sulle strip di blot e confrontabili con le bande identificate su una strip marker.

Risultati

Sensibilità analitica dei metodi

Otto pazienti (28.5%) dei 28 affetti da SNP clinicamente definita, sono risultati positivi con almeno uno dei tre metodi utilizzati per la ricerca degli anticorpi anti-neurone.

In quattro casi i campioni sono risultati positivi con tutti e tre i metodi: due per anticorpi anti-Hu in pazienti con SSN, uno affetto da microcitoma polmonare e l'altro senza diagnosi di neoplasia al momento del prelievo (Fig. 1); uno per anticorpi anti-Ri, in un paziente affetto da DC ma assenza di neoplasia diagnosticata; uno per anticorpi anti-Yo, in una paziente con DC e carcinoma ovarico e mammario (Tab. II).

Gli altri quattro pazienti sono risultati positivi con uno solo dei tre metodi: uno con il metodo IFI per anticorpi anti-Hu a titolo: in un paziente con DC e assenza di neoplasia; uno con il metodo WB per una proteina anti-Hu di 38 kDa in una paziente affetta da SSN e carcinoma mammario; due con il metodo LB: uno per anticorpi anti-Yo in una donna affetta da DC e carcinoma mammario e uno per anticorpi anti-Ma2 in un uomo affetto da PLE e carcinoma prostatico e linfoma (Tab. II).

Un paziente affetto da SSN e carcinoma polmonare ha mostrato doppia positività per anticorpi anti-Hu e anti-CV2, evidenziata con il metodo LB.

Nel follow-up a sei mesi, in tre pazienti affetti da SNP è stata fatta diagnosi di neoplasia associata: due erano positivi agli anticorpi anti-Hu e uno per anti-Ri.

Specificità analitica dei metodi

Nessuno dei pazienti affetti da altre patologie neurologiche è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-neurone con tutti e tre i metodi di determi-

nazione.

Una sola paziente (sclerosi multipla) dei 44 affetti da patologia neurologica non paraneoplastica è risultata positiva con due metodi di ricerca. La paziente mostrava positività al metodo IFI su cervelletto di primate, con pattern fluoroscopico ANNA "atipico" a titolo uguale o superiore a 1:500 e positività al metodo LB per autoanticorpi anti-Ma2. Altri otto (18%) pazienti, affetti da patologia neurologica non paraneoplastica, sono risultati positivi con uno solo dei metodi: uno al metodo IFI, con quadro fluoroscopico ANNA "atipico" e titolo uguale o superiore 1:500, uno al metodo LB, con positività anti-Yo e sei al solo metodo WB, 3 positività anti-Hu (38 kDa) e 3 anti-Yo (62 kDa).

Nel follow-up a sei mesi nessuno dei pazienti risultati positivi alla ricerca degli anticorpi ha ricevuto diagnosi di neoplasia.

Due pazienti su 22 (9.1%), affette da patologia neurologica in corso di malattia autoimmune, sono risultate positive con due metodi di ricerca. Entrambe mostravano positività al metodo IFI, con pattern fluoroscopico ANNA "atipico", titolo uguale o superiore a 1:500 e positività al metodo WB per anticorpi anti-Hu (38 kDa). Una era affetta da disturbi neurologici in corso di connettivite mista, l'altra era affetta da psicosi lupica ed entrambe mostravano positività alla ricerca di anticorpi anti-nucleo su HEp-2 a titolo superiore a 1:640. Altri undici (50%) pazienti, affetti da neuropatia in corso di patologie autoimmune, sono risultati positivi al solo metodo IFI con pattern fluoroscopico ANNA "atipico" e/o PCA "atipico" e titolo uguale o superiore a 1:500. Il 91% di questi pazienti era positivo al test ANA a titolo superiore a 1:320.

Solo un paziente affetto da neoplasia è risultato positivo al test LB per anti-Ma2.

Immunofluorescenza indiretta: il fattore di diluizione

La ricerca degli anticorpi anti-neurone con metodo

Tabella III. Dati di accuratezza diagnostica dei metodi per la ricerca degli autoanticorpi anti-neurone, utilizzati singolarmente o in associazione.

	IFI 1:500	WB	LB	IFI e LB	IFI o LB	IFI e WB	IFI o WB
Sensibilità (%)	17.8	17.8	21.4	14.2	25	14.2	21.4
Specificità (%)	97.8	91.4	96.8	98.9	95.7	96.8	90.4
Valore predittivo positivo (%)	71.4	38.4	66.6	80.0	63.6	57.1	40.0
Valore predittivo negativo (%)	80.0	78.8	80.5	79.4	81.0	79.1	79.4
Efficienza (%)	79.5	74.5	79.5	79.5	79.5	77.8	74.5
Probabilità pre-test (prevalenza) (%)	22.9	22.9	22.9	22.9	22.9	22.9	22.9
Probabilità post-test (%)	71.4	38.5	66.7	80.0	63.6	57.1	40.0

IFI su cervelletto è stata eseguita utilizzando differenti diluizioni (range da 1:10 a 1:500). Hanno confermato positività al test fino alla massima diluizione (1:500) 5 dei 5 (100%) pazienti affetti da SNP, 2 degli 8 (25%) pazienti affetti da patologia neurologica, 13 dei 17 (76.5%) pazienti affetti da patologia neurologica in corso di malattia autoimmune, nessuno dei pazienti affetti da neoplasia isolata. La diluizione del campione 1:500 ha mostrato le migliori performance analitiche, in quanto pur mantenendo invariato il valore di sensibilità diagnostica (17.8%) ha registrato il più alto valore di specificità (86.1%).

Positività ANA su HEP-2

La ricerca degli ANA ha dimostrato positività in 5 (11.3%) pazienti affetti da patologia neurologica non paraneoplastica e 16 (72.7%) pazienti affetti da patologia neurologica in corso di malattia autoimmune con titolo superiore a 1:160. In 11 pazienti, con positività ANA a titolo superiore a 1:320, è stato possibile identificare anticorpi specifici: 6 positività per anticorpi anti-P-ribosoma, 2 positività per anti-dsDNA, 3 positività per anti-ENA. La presenza di tali anticorpi è stata ritenuta responsabile dei pattern di fluorescenza nucleare e citoplasmatico "atipico" identificato con il metodo IFI sul cervelletto di primate ed ha determinato un incremento del valore di specificità del metodo (97.8%).

Anche 6 (21.4%) pazienti affetti da SNP presentavano positività al test ANA. Nessuno di questi presentava un titolo superiore a 1:320 e tre sono risultati positivi agli anticorpi anti-neurone specifici ricercati con gli altri metodi.

I valori di sensibilità e specificità, valore predittivo ed efficacia dei metodi usati per la diagnosi di SNP sono illustrate nella Tabella III.

Discussione

A causa delle difficoltà nella definizione diagnostica delle SNP, un gruppo internazionale di neurologi ha stabilito i criteri per classificare i pazienti in sindrome "definita" e "probabile"¹¹. Questi criteri sono basati sulla presenza o assenza di neoplasia, sulla presenza di anticorpi paraneoplastici e sul tipo di sindrome clinica neu-

rologica.

I pazienti con *SNP definita* sono quelli con:

- sindrome neurologica classica, encefalomielite, encefalite limbica, degenerazione cerebellare subacuta, opsoclono-mioclono, neuronopatia sensoriale subacuta e neoplasia, che si verifichi entro 5 anni dalla diagnosi di disordine neurologico, indipendentemente dalla presenza di anticorpi paraneoplastici;
- sindrome neurologica non classica, che migliora o si risolve dopo trattamento della neoplasia;
- sindrome neurologica non classica in presenza di anticorpi paraneoplastici (ben caratterizzati e non) e neoplasia entro 5 anni dalla diagnosi del disordine neurologico;
- sindrome neurologica, classica e non, in presenza di anticorpi paraneoplastici ben caratterizzati (anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, anti-amfifisina, anti-CV2, anti-Ma2).

I pazienti con *SNP possibile* sono quelli con:

- sindrome classica in assenza di anticorpi paraneoplastici e in assenza di neoplasia, con elevato rischio di sviluppare un tumore (abitudine al fumo);
- sindrome neurologica, classica e non, in assenza di neoplasia, con anticorpi paraneoplastici parzialmente caratterizzati;
- sindrome neurologica non classica e neoplasia entro due anni dalla diagnosi di disordine neurologico in assenza di anticorpi paraneoplastici.

Gli anticorpi anti-neurone paraneoplastici pertanto sono considerati criterio classificativo di SNP ma è necessaria una loro caratterizzazione antigenica attraverso l'uso di metodologie accurate.

In letteratura sono pochi i dati relativi alle performance analitiche dei metodi utilizzati per la ricerca di anticorpi anti-neurone: manca un consenso sulla standardizzazione delle procedure relative all'esecuzione delle singole metodologie e mancano proposte di algoritmi diagnostici, definiti in base alle caratteristiche di sensibilità, specificità ed efficacia clinica dei singoli metodi.

Il nostro studio ha valutato le performance analitiche di tre metodi utilizzati per la ricerca degli anticorpi

paraneoplastici, evidenziando che la loro prevalenza in una casistica selezionata è del 28.5%, se la ricerca viene eseguita con tre metodi di indagine. Presi singolarmente o a due a due associati i metodi mostrano performance analitiche differenti che potrebbero suggerire una loro differente associazione e/o successione nell'esecuzione della diagnostica delle sindromi paraneoplastiche.

Il metodo IFI da solo non presenta elevata sensibilità, paragonabile cioè a quella che raggiunge nella ricerca di altri autoanticorpi. La scarsa sensibilità del metodo può essere legata a differenti fattori: bassa prevalenza di anticorpi e bassa sensibilità analitica. Entrambi questi limiti andrebbero meglio analizzati attraverso l'utilizzo di substrati tessuto specifici alternativi o in associazione al cervelletto.

Il metodo presenta anche limiti di specificità analitica in parte superabili attraverso il fattore di diluizione del campione e la ricerca contemporanea di anticorpi non neurone specifici. L'esecuzione di differenti diluizioni ha permesso di dimostrare che il migliore compromesso tra sensibilità e specificità si verifica alla diluizione di 1:500. Questa diluizione, infatti, oltre ad assicurare una discreta sensibilità (quando presenti, gli autoanticorpi paraneoplastici sono ad elevato titolo), offre il vantaggio di annullare il background di fluorescenza prodotto sui preparati dalla possibile presenza di autoanticorpi non neurone-specifici. Nonostante l'elevata diluizione del campione, il metodo non sempre consente di discriminare agevolmente pattern di fluorescenza "tipici" e "atipici"¹⁴. Tale difficoltà interpretativa è attribuibile in alcuni casi, alla coesistenza di anticorpi neurone-specifici e altri anticorpi, anche in pazienti affetti da SNP; in altri casi, alla presenza di anticorpi non neurone specifici, in soggetti affetti da patologie autoimmuni che presentano disturbi neurologici, che possono mimare, per manifestazioni cliniche, le SNP. L'esecuzione del test ANA su HEp-2 ha permesso di identificare positività anticorpali ad alto titolo, poi attribuiti ad anticorpi sistemici specifici, che sono stati ritenuti responsabili dei pattern atipici sul cervelletto di primate e che hanno portato ad un incremento della specificità diagnostica del metodo IFI.

Alla luce di questi dati, il metodo IFI potrebbe presentare maggiori potenzialità diagnostiche nel riconoscere nuovi pattern neurone-specifici e/o la coesistenza di altri autoanticorpi, contribuendo a definire ulteriori profili anticorpali in questo gruppo di patologie. Infatti l'efficacia analitica addizionale che il metodo IFI possiede rispetto ad altri metodi è data dalla possibilità di individuare la contestuale presenza di anticorpi anche diversi da quelli attualmente noti.

Il metodo IFI, in ogni caso, non è in grado di caratterizzare tutte le specificità anticorpali descritte nei criteri classificativi e questo aspetto sembra piuttosto rilevante dal momento che i dati di letteratura indicano l'esistenza di una correlazione tra la specificità anticorpale, tipo di tumore associato e sindrome paraneopla-

stica, con importanti riflessi non solo diagnostici ma anche prognostici.

Il metodo di WB, proposto come metodo più specifico, ha confermato le positività riscontrate in IFI nei pazienti affetti da SNP e ha riportato positività anche nel liquor cefalorachidiano. Tuttavia, in 2 casi non ha rilevato autoanticorpi evidenziati dal solo metodo LB e presenti in percentuale statisticamente significativa nelle SNP associate ai carcinomi diagnosticati. La minor sensibilità del metodo di WB rispetto al LB può essere imputata al fatto che alcuni epitopi vengono alterati o perduti per denaturazione degli antigeni durante le fasi di allestimento dei blot.

È pure possibile che pazienti affetti da neuropatia in corso di connettivite mista e risultino positivi al metodo di WB e non al metodo LB che impiega antigeni ricombinanti. Infatti, autoanticorpi presenti in pazienti affetti da malattie autoimmuni sistemiche possono riconoscere l'antigene Hu su estratti neuronali di WB, perché questo antigene presenta peso molecolare e conformazione simile ad alcuni antigeni specifici di patologia autoimmune¹⁵.

Il metodo di WB, pertanto, pur essendo utile nella caratterizzazione delle positività autoanticorpali verso antigeni onconeuronali, presenta tuttavia scarsa specificità analitica oltre che problemi di standardizzazione metodologica.

L'utilizzo di antigeni ricombinanti, solo recentemente disponibili, ha determinato una svolta nella diagnostica di laboratorio nelle sindromi neurologiche paraneoplastiche. I risultati da noi ottenuti mostrano che il metodo LB da solo presenta buone performance diagnostiche rispetto al metodo IFI e WB. Seppure ogni giorno vengano descritti nuovi anticorpi associati alle SNP, solo alcuni di questi vengono considerati paraneoplastici "ben caratterizzati" e/o "parzialmente caratterizzati", quindi clinicamente utili all'inquadramento diagnostico¹¹. Il profilo antigenico proposto dal metodo LB ne contempla alcuni ma non tutti e ne permette la caratterizzazione. In futuro è prevedibile un ulteriore ampliamento del profilo antigenico.

La nostra esperienza ha dimostrato che il metodo LB da solo è in grado di offrire una buona accuratezza diagnostica nella ricerca degli anticorpi paraneoplastici. L'associazione con il metodo IFI, pur migliorando la sensibilità diagnostica dei due metodi presi singolarmente, ne penalizza la specificità e non sembrerebbe vantaggiosa se non per la possibilità di evidenziare altre specificità neurone specifici e non specifici, che comunque necessiterebbero di ulteriori verifiche.

La diagnostica autoanticorpale delle SNP ha subito negli ultimi decenni un importante impulso, ma la sua collocazione nei laboratori di routine appare ancora piuttosto problematica a causa della bassa frequenza di sindromi paraneoplastiche (<1 caso per 200.000 all'anno)¹⁵, della bassa prevalenza di autoanticorpi identificabili nel siero di pazienti^{1,16}, della difficile selezione clinica dei pazienti da sottoporre alle indagini anticor-

pali e, non ultimo, delle differenti caratteristiche analitiche dei metodi per la determinazione degli anticorpi¹⁷. Alcuni autori sostengono che i laboratori specialistici con più elevato turnover diagnostico siano meglio deputati alla diagnostica delle sindromi paraneoplastiche¹⁴. Tuttavia se questo poteva trovare giustificazione quando la ricerca degli anticorpi veniva eseguita con metodologie indaginose come l'immunoistochimica, oggi l'avvento di metodi di immunoblotting e l'utilizzo di antigeni ricombinanti ne rende più facile la esecuzione, interpretazione e standardizzazione.

Il laboratorio dispone oggi di più metodi per la ricerca degli anticorpi e sempre nuovi anticorpi vengono descritti nella diagnosi delle SNP ma anche un'accurata preselezione del paziente con le informazioni cliniche fornite può contribuire ad incrementarne l'efficacia diagnostica.

Ringraziamenti

Si ringrazia la signora Maria Carmela Petrelli, tecnico responsabile della sezione di Autoimmunità del Laboratorio di Patologia Clinica I, Azienda Policlinico di Bari, per la preziosa collaborazione nell'esecuzione dei metodi. Si ringrazia inoltre Euroimmun Italia, Padova, per la collaborazione e la fornitura dei kit diagnostici.

Bibliografia

1. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 2003; 349: 1543-54.
2. Wilkinson PC, Zeromski J. Immunofluorescent detection of antibodies against neurons in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain* 1965; 88:529-38.
3. Greenlee JE, Brashear HR. Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol* 1983; 14:609-13.
4. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology* 1985; 35:538-43.
5. Moll JW, Antoine JC, Brashear HR, Delattre J, Drlicek M, Dropcho EJ, et al. Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies: report from the Workshop to the Fourth Meeting of the International Society of Neuro-Immunology on paraneoplastic neurological disease, held October 22-23, 1994, in Rotterdam, The Netherlands *Neurology* 1995; 45:1937-41.
6. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75:1135-40.
7. Vedeler CA, Antoine JC, Giometto B, Graus F, Grisold W, Hart IK, et al. Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork. Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol* 2006; 13:682-90.
8. Sillevs Smitt P. Paraneoplastic neurological syndromes. *Lancet Neurol* 2002; 1:408.
9. Shams'ili S, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, Hooijkaas H, van der Holt B, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain* 2003; 126:1409-18.
10. Rojas I, Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Delattre JY, Ramon JM, et al. Long-term clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *Neurology* 2000; 55:713-5.
11. De Beukelaar JW, Sillevs Smitt PA. Managing paraneoplastic neurological disorders. *The Oncologist* 2006; 11:292-305.
12. Giometto B, Taraloto B, Graus F. Autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes. *Brain Pathol* 1999; 9:261-73.
13. Vianello M, Vitaliani R, Pezzani R, Nicolao P, Betterle C, Keir G, et al. The spectrum of antineuronal autoantibodies in a series of neurological patients. *J Neurol Sci* 2004; 220:29-36.
14. Karim AR, Hughes RG, Winer JB, Williams AC, Bradwell AR. Paraneoplastic neurological antibodies: a laboratory experience. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050:274-85.
15. Benyahia B, Amoura Z, Rousseau A, Le Clanche C, Carpentier A, Piette JC, et al. Paraneoplastic antineuronal antibodies in patients with systemic autoimmune diseases. *J Neurooncol* 2003; 62:349-51.
16. Grant R. What neurologist needs to know about the paraneoplastic syndromes. *Practical Neurol* 2002; 2:318-27.
17. Rees JH. Paraneoplastic syndromes: when to suspect, how to confirm, and how to manage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75 (Suppl 2):43-50.