

Pavia, 31 Ottobre 2022

Progetto NINA-Flow

Promotori

Network Italiano di Neurologia Autoimmune (NINA), gruppo di studio dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI), Rete IRCCS delle Neuroscienze e della Neuroriabilitazione (RIN).

Background

La diagnostica di laboratorio neuroimmunologica si è espansa negli ultimi anni principalmente grazie all'identificazione di diverse patologie del sistema nervoso centrale e periferico nelle quali gli autoanticorpi giocano un ruolo primario. Un'area di espansione è rappresentata da patologie demielinizzanti anticorpo-mediate, quali la neuromielite ottica associata ad anticorpi anti-Acquaporina 4 (AQP4) e le sindromi associate ad anticorpi anti-glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG), e dalla miastenia gravis.[1,2]

In queste patologie, i cosiddetti cell-based assays (CBA), basati su linee cellulari immortalizzate esprimenti in superficie proteine target in forma nativa, hanno permesso di potenziare la diagnostica neuroimmunologica.

I CBA sono utilizzati in laboratori di riferimento, eseguiti con metodiche home-made basate su cellule vive, e in laboratori periferici (generalisti), con kit commerciali di più facile utilizzo, basati su cellule fissate. Tuttavia, le performance analitiche e diagnostiche non sempre si equivalgono.

Per gli anticorpi anti-AQP4, l'accuratezza diagnostica di test commerciali e home-made sembra essere sovrapponibile, sebbene difficoltà interpretative dei test sfavoriscano laboratori con scarsa expertise.[3,4] Per gli anticorpi anti-MOG, invece, le performance dei kit commerciali sembrano essere inferiori rispetto a quelle dei CBA home-made.[1,5,6] Ancora differente è l'ambito della miastenia gravis. I test per gli anticorpi anti-recettore nicotinico dell'acetilcolina (AChR), sono principalmente basati su saggi di radioimmunoprecipitazione (RIA) commerciali molto accurati.[7,8] Tuttavia, diversi laboratori periferici, per ragioni di costi e smaltimento di rifiuti radioattivi, usano tecnica ELISA, nota per performance analitiche e diagnostiche peggiori rispetto ai RIA. Per gli anticorpi anti-chinasi muscolo specifica (MuSK), ugualmente rilevanti in miastenia gravis, il test diagnostico non è sempre disponibile in laboratori periferici.[7,9] In questo ambito, i CBA, sia a cellule vive sia a cellule fissate,

sembrano offrire ottima sensibilità diagnostica e buona specificità, con accuratezza lievemente maggiore per i CBA a cellule vive.[10]

L'AINI, di recente affiancata dalla RIN, lavora da anni nella standardizzazione di metodiche di laboratorio in neuroimmunologia, inclusa l'organizzazione di valutazioni esterne di qualità (VEQ) e attraverso interventi formativi e produzione di linee guida.

Al fine di rendere più efficiente questa diagnostica, abbiamo individuato un modello organizzativo che preveda due livelli, il primo coinvolgente laboratori periferici che eseguono test commerciali, e il secondo laboratori di riferimento in grado di effettuare anche test home-made. Il modello prevede un "flusso" sistematico di campioni "critici" da laboratori periferici (spoke) a laboratori di riferimento (hub), con la finalità ultima di migliorare l'accuratezza diagnostica a vantaggio del singolo paziente.

Razionale del progetto

I pazienti e i clinici dedicati alla loro gestione si trovano abbastanza frequentemente di fronte a risultati "critici". Il clinico, di solito, consiglia di ripetere il test in un laboratorio di riferimento. L'accesso diretto a questi laboratori spesso geograficamente lontani mette in oggettive difficoltà il paziente, oltre a esporlo a costi aggiuntivi, sino ad arrivare a casi di impraticabilità causa condizioni cliniche gravi. I pazienti si trovano pertanto a organizzare autonomamente improbabili spedizioni di campioni biologici, o a intraprendere lunghi viaggi. Questo quadro configura background e rationale del progetto, che ha come fine ultimo il fornire al paziente la massima accuratezza diagnostica.

Obiettivo del progetto

Con il progetto NINA-Flow, AINI, RIN e il gruppo NINA si propongono di fornire ai neurologi e ai pazienti un percorso ben definito per effettuare test anticorpali di "second opinion" presso laboratori di riferimento (hub), in grado di eseguire test all'avanguardia, non disponibili in laboratori periferici. Il progetto avrà un impatto diretto sulla gestione dei pazienti, permettendo un migliore inquadramento diagnostico e indirizzando il clinico verso la gestione terapeutica più adeguata.

Quali patologie sono incluse

In questa versione pilota, il progetto è focalizzato su sindromi demielinizzanti del sistema nervoso centrale e sulla miastenia gravis. Saranno pertanto inclusi i test per l'identificazione di anticorpi anti-AQP4, anti-MOG, anti-AChR e anti-MuSK. In futuro si valuterà l'estensione del modello NINA-Flow ad altri ambiti di diagnostica neuroimmunologica.

Chi partecipa

Laboratori hub

I laboratori hub individuati da AINI e RIN per il primo anno saranno:

- a) Per il dosaggio di anticorpi anti-AQP4 e anti-MOG
 - a. Laboratorio di Neuroimmunologia, IRCCS Fondazione C. Mondino, Pavia
 - b. Laboratorio di Neuropatologia, Università degli Studi di Verona, Verona
- b) Per il dosaggio di anticorpi anti-AChR e anti-MuSK

- a. Laboratorio di Neuroimmunologia, IRCCS Istituto C. Besta, Milano
- b. Laboratorio di Neuroimmunologia, Policlinico Gemelli, Roma

Una volta avviato il progetto si prevederà di includere altri centri hub sulla base di criteri da concordare con il Direttivo AINI.

Centri spoke

I centri spoke possono essere rappresentati da qualsiasi struttura neurologica del sistema sanitario nazionale. Ogni centro spoke può richiedere di partecipare al progetto attraverso il sito www.nina.aini.it. Il referente per il centro spoke dovrà essere un neurologo. Sarà tuttavia richiesto anche il nominativo di un referente di laboratorio.

Quali campioni inviare?

- Sarà possibile inviare ai laboratori hub campioni considerati “critici”, ovvero che rispecchino uno dei seguenti criteri:
- Risultato di laboratorio incerto, ovvero:
 - Campioni con risultato borderline
 - Difficoltà interpretative del risultato del test
- Risultato incongruo con il fenotipo clinico del paziente, ovvero:
 - Positività in pazienti con fenotipo clinico non suggestivo
 - Negatività in pazienti con fenotipo clinico suggestivo
- In aggiunta, saranno accettati anche campioni con indicazione clinica ad eseguire test inclusi nel progetto che non siano disponibili nel laboratorio periferico della struttura inviante, e difficoltà organizzative per l’invio (per esempio, paziente ambulatoriale). In nessun modo, tuttavia, questa modalità potrà sostituire il regolare invio di campioni di pazienti ricoverati, senza criteri di criticità, ai centri facenti parte del progetto.
- Potranno essere inviati campioni prelevati “a fresco”, o anche campioni retrospettivi congelati a -20°C o a -80°C

Sintesi del progetto

I centri spoke, dopo essersi registrati sulla piattaforma NINA-Flow, identificano campioni “critici” che richiedano una “second opinion” presso un laboratorio hub. Attraverso la piattaforma NINA-Flow potranno richiedere il test anticorpale e prenotare la spedizione del campione. Una volta spedito il campione, i risultati saranno consultabili direttamente sulla piattaforma.

Istruzioni operative

- 1) Richiesta di partecipazione dei centri spoke
 - a. Il neurologo di riferimento invia ad AINI la richiesta di partecipazione con la relativa documentazione collegandosi al sito www.nina.aini.it (<https://ninaflow.eemservices.com/login>). All’indirizzo indicato si trova la pagina di login per la piattaforma. I nuovi membri che desiderino aderire al progetto possono selezionare “registrati” per inoltrare la richiesta ad AINI

- b. Il neurologo seleziona un laboratorio hub. E' possibile selezionare più di un laboratorio hub, e modificare in seguito la richiesta. Sarà necessario firmare un contratto che coinvolge le Direzioni Sanitarie con ognuno degli hub selezionati.
 - c. Valutata la richiesta, AINI invia una email al referente del centro spoke con tutta la documentazione necessaria all'attivazione del centro
 - d. Una volta completata la fase di accordo, vengono fornite al referente del centro spoke le credenziali per l'accesso alla piattaforma NINA-Flow
 - e. AINI invia al centro spoke i kit per l'esecuzione dei prelievi, che conterranno tutto il materiale necessario
- 2) Identificazione di pazienti e campioni
- a. Il centro spoke identifica campioni "critici" in base ai criteri sopra riportati (vedi "quali campioni inviare")
 - b. Il centro spoke ottiene il consenso informato da parte del paziente alla partecipazione al progetto e alla conservazione dei campioni a scopo diagnostico (opzionale)
- 3) Prenotazione del trasporto attraverso la piattaforma NINA-Flow
- a. Individuato il campione "critico", i centri spoke possono prenotare, tramite il portale, la richiesta di test e di trasporto
 - b. Istruzioni dettagliate sull'utilizzo della piattaforma NINA-Flow possono essere trovate nel manuale operativo
 - c. Le richieste possono essere eseguite e salvate sulla piattaforma in qualsiasi momento. I campioni non sono spediti fino a quando non viene richiesta una spedizione
 - d. Non esiste un numero minimo di campioni previsti per spedizione. Raccomandiamo tuttavia di "compattare" il maggior numero possibile di campioni in una singola spedizione. Questo ci permette di contenere i costi e garantire un numero maggiore di test disponibili nel corso del progetto.
- 4) Raccolta del campione
- a. Nel giorno previsto per la spedizione, i campioni possono essere raccolti nel punto di raccolta selezionato sul portale
 - b. E' sufficiente inviare due provette da siero da 3.5 mL, come fornita nel kit. In caso di invio di liquor, si raccomanda l'invio di circa 1-2 mL. Invi di meno di 500 uL potrebbero non essere sufficienti a completare i test
 - c. I campioni vanno preferibilmente raccolti a fresco lo stesso giorno della spedizione, e centrifugati secondo la routine del laboratorio locale prima della spedizione.
 - d. Qualora non sia possibile centrifugare il campione questo può essere spedito non centrifugato, ma ciò va segnalato nella richiesta.
 - e. Qualora non sia possibile eseguire il prelievo a breve distanza dal prelievo, e sia necessario conservare il campione per >4 ore prima del ritiro da parte del corriere, consigliamo la conservazione in frigo o in ambiente refrigerato (non congelare!); ciò va segnalato nella richiesta

- f. E' possibile spedire campioni congelati di siero o di liquor. Se si prevede di dover conservare il campione per lunghi periodi prima della spedizione, consigliamo il congelamento a -20°C dopo aver opportunamente sierato il campione di sangue; ciò va segnalato se possibile nella richiesta. Il campione sarà in ogni caso spedito a 4°C.
 - g. E' possibile spedire campioni raccolti in provette diverse da quelle fornite con i kit del progetto
 - h. Tutti i campioni spediti dovranno essere etichettati con un codice univoco di 6 lettere. Tale codice viene prodotto automaticamente sul portale al momento della richiesta del test. In caso di spedizione di più di una provetta dello stesso materiale dello stesso paziente, va utilizzato lo stesso codice su tutte le provette. In caso di invio di provette di diverso materiale (per esempio, siero e liquor) dello stesso paziente, vanno utilizzati codici diversi
- 5) Invio del campione
- a. La presa e spedizione del campione da inviare avviene secondo le modalità concordate direttamente dalla piattaforma NINA-Flow
 - b. Il trasporto avverrà in contenitori a temperatura controllata (4°C)
- 6) Test anticorpale
- a. Il test richiesto viene effettuato presso il laboratorio hub selezionato secondo la pratica corrente. I seguenti test anticorpali sono sempre eseguiti:
 - i. AQP4: CBA a cellule fissate
 - ii. MOG: CBA a cellule vive e CBA a cellule fissate
 - iii. AChR: RIA e CBA a cellule fissate
 - iv. MuSK: RIA e CBA a cellule fissate
 - b. Eventuali test aggiuntivi andranno concordati con il laboratorio hub
- 7) Risultati
- a. I risultati saranno poi consultabili, una volta eseguito il test, direttamente sulla piattaforma NINA-Flow. Solo il referente del centro spoke può visualizzare i dati dei risultati per i pazienti inviati dal centro.

Costi

I costi del progetto NINA-Flow sono interamente a carico di EEM Association Management, e supportati dal finanziamento di Alexion. Nessun costo aggiuntivo per la partecipazione viene richiesto ai pazienti o alle strutture coinvolte.

Consenso informato, trattamento dei dati personali e privacy

Tutti i pazienti dovranno firmare un consenso informato per la partecipazione al progetto. Ulteriori dettagli riguardo al trattamento dei dati personali e della privacy possono essere trovati all'interno dei contratti tra centri hub e spoke.

Contatti

Per qualsiasi domanda riguardo al progetto scrivere ad aini@aini.it

Bibliografia

1. Marignier R, Hachohen Y, Cobo-Calvo A, Pröbstel AK, Aktas O, Alexopoulos H, et al. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. *Lancet Neurol*. 2021;20(9):762–772.
2. Gilhus NE, Tzartos S, Evoli A, Palace J, Burns TM, Verschuuren JJGM. Myasthenia gravis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1). doi:10.1038/s41572-019-0079-y.
3. Waters PJ, Pittock SJ, Bennett JL, Jarius S, Weinshenker BG, Wingerchuk DM. Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2014;5(3):290–303.
4. Waters P, Reindl M, Saiz A, Schanda K, Tuller F, Kral V, et al. Multicentre comparison of a diagnostic assay: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(9):1005–1015.
5. Reindl M, Schanda K, Woodhall M, Tea F, Ramanathan S, Sagen J, et al. An international multicenter examination of MOG antibody assays. *Neurol Neuroimmunol NeuroInflammation*.
6. Gastaldi M, Scaranzin S, Jarius S, Wildeman B, Zardini E, Mallucci G, et al. Cell-based assays for the detection of MOG antibodies: a comparative study. *J Neurol*. 2020;267(12):3555–3564.
7. Andretta F, Rinaldi E, Bartoccioni E, Riviera AP, Bazzigaluppi E, Fazio R, et al. Diagnostics of myasthenic syndromes: detection of anti-AChR and anti-MuSK antibodies. *Neurol Sci*. 2017;38(Suppl 2):253–257.
8. Gastaldi M, Scaranzin S, Businaro P, Mobilia E, Benedetti L, Pesce G, et al. Improving laboratory diagnostics in myasthenia gravis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021;21(6):579–590.
9. Cao M, Koneczny I, Vincent A. Myasthenia Gravis With Antibodies Against Muscle Specific Kinase: An Update on Clinical Features, Pathophysiology and Treatment. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2020;13. doi:10.3389/fnmol.2020.00159.
10. Damato V, Spagni G, Monte G, Woodhall M, Jacobson L, Falso S, et al. Clinical value of cell-based assays in the characterisation of seronegative myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022;93(9). doi:10.1136/JNNP-2022-329284.