



**Pavia, marzo 2025**

## 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 forme demielinizzanti anticorpo mediate, quali la neuromielite ottica associata ad anticorpi anti aquaporina 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 che esprimono in superficie proteine target in forma nativa, hanno permesso di identificare autoanticorpi con significato diagnostico.

I CBA sono utilizzati in laboratori di riferimento, eseguiti con metodiche "home-made" basate su cellule vive. Sono anche disponibili CBA commerciali di più facile utilizzo, basati su cellule fissate e largamente impiegati in laboratori periferici, ma le performance diagnostiche non sempre si equivalgono.

Per gli anticorpi anti-AQP4, l'accuratezza diagnostica di test commerciali e home-made sembra essere sovrapponibile, sebbene risulti inficiata da difficoltà interpretative dei test.[3,4] Per gli anticorpi anti-MOG, invece, la performance dei kit commerciali sembra essere inferiore ai test 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 altamente accurati.[7,8] Tuttavia, diversi laboratori periferici, per ragioni di costi e smaltimento di rifiuti radioattivi, hanno iniziato a impiegare metodi ELISA con performance inferiori. Per gli anticorpi anti-



chinasi muscolo specifica (MuSK), ugualmente rilevanti in Miastenia Gravis, il test non è frequentemente disponibile in laboratori generalisti.[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 controlli esterni di qualità e attraverso interventi formativi e produzione di linee guida.

Al fine di rendere più efficiente la diagnostica anticorpale, sembra essere molto efficiente un modello organizzativo che preveda due livelli, il primo svolto da laboratori periferici che eseguono test commerciali, e il secondo da laboratori di riferimento in grado di effettuare anche test home-made. Il sistema garantirebbe il flusso sistematico di campioni "critici" da laboratori periferici (spoke) a laboratori di riferimento (hub) con la finalità ultima di migliorare l'accuratezza diagnostica.

### Razionale del progetto

I pazienti e i clinici dedicati alla loro gestione si trovano abbastanza frequentemente di fronte a risultati "critici" prodotti da laboratori periferici. Il clinico, per dirimere il problema, consiglia di ripetere il test in un laboratorio di riferimento. L'accesso diretto dei pazienti a questi laboratori spesso geograficamente lontani è difficile, oltre che oneroso e talora impraticabile per le condizioni del paziente. I pazienti si trovano pertanto a organizzare autonomamente improbabili spedizioni di campioni, o addirittura a intraprendere lunghi viaggi.

### 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 i test attualmente considerati "gold-standard". 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 del progetto ci siamo concentrati sull'ambito delle 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 sistema NINA-Flow ad altri ambiti diagnostici.

### Chi partecipa

#### Laboratori hub

I laboratori hub selezionati da AINI e RIN per quest'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](http://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?

- Attraverso il progetto sarà possibile inviare presso i laboratori hub campioni considerati “critici”, ovvero che rispecchino uno dei seguenti criteri:
  - a) Risultato di laboratorio incerto, ovvero:
    - a. Campioni con risultato borderline
    - b. Difficoltà interpretative del risultato del test
  - b) Risultato incongruo con il fenotipo clinico del paziente, ovvero:
    - a. Positività in pazienti con fenotipo clinico non suggestivo
    - b. Negatività in pazienti con fenotipo clinico suggestivo
- In aggiunta, sarà accettato anche l’invio di campioni con indicazione clinica ad eseguire uno dei test inclusi nel progetto che non risulti disponibile nel laboratorio periferico, e il cui invio comporti difficoltà organizzative (per esempio: paziente ambulatoriale che necessita di un test anticorpale non disponibile).
- 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 un test di “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 NINA-Flow.

#### Istruzioni operative

- 1) Richiesta di partecipazione dei centri spoke
  - a. Il neurologo di riferimento invia la richiesta di partecipazione con la relativa documentazione collegandosi al sito [www.nina.aini.it](http://www.nina.aini.it).
  - b. Il neurologo seleziona un laboratorio hub. La selezione potrà essere modificata in seguito

- c. Valutata la richiesta, la segreteria invia al centro spoke il contratto da firmare tra il laboratorio Hub e la direzione sanitaria del centro spoke, essenziale per l'attivazione del progetto
  - d. Firmato il contratto, vengono fornite al referente del centro spoke le credenziali per l'accesso alla piattaforma NINA-Flow
  - e. Il centro spoke può richiedere kit per i prelievi, che comprenderanno tutto il materiale necessario alla raccolta dei campioni, incluse provette con codice univoco
- 2) Identificazione di pazienti e campioni
- a. Il centro spoke identifica campioni "critici" in base ai criteri riportati sopra.
  - b. Il centro spoke ottiene il consenso informato da parte del paziente
- 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
- 4) Raccolta del campione
- a. Il campione di sangue può essere raccolto "a fresco" tramite i kit precedentemente richiesti e acquisiti, o può essere un campione di siero congelato conservato presso il laboratorio del centro spoke.
  - b. Nel caso di un campione raccolto "a fresco", va inserito nel portale il codice univoco della provetta che si trova sulla provetta contenuta nel kit. Se si tratta di un campione congelato o raccolto in altra provetta, è necessario contrassegnare la provetta con un codice univoco che può essere generato direttamente dalla piattaforma NINA-Flow
  - c. Il campione di sangue raccolto in provetta da siero con attivatore della coagulazione deve essere centrifugato prima dell'invio. L'invio di campioni non centrifugati è altamente sconsigliato, e deve comunque essere segnalato nelle note di invio.
- 5) Invio del campione
- a. La presa e spedizione del campione da inviare avviene secondo le modalità concordate direttamente dalla piattaforma NINA-Flow. Non è necessario preparare alcun materiale aggiuntivo per la spedizione.
  - 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 sua pratica corrente. I seguenti test 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, 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 a [ninaflow@aini.it](mailto:ninaflow@aini.it)

## Bibliografia

1. Marignier R, Hachon 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. Andreetta 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.