



**Neuromielite ottica di Devic: contributo di una nuova
metodica di laboratorio al potenziamento della diagnostica
differenziale con altre malattie infiammatorie demielinizzanti
del Sistema Nervoso Centrale**

Piccolo L., Zardini E. , Romagnolo S., Franciotta D., Moglia A.

*Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Casimiro Mondino, Pavia, Italia*

INTRODUZIONE

La neuromielite ottica di Devic (NMO) è una malattia infiammatoria demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) a patogenesi autoimmune, caratterizzata da selettivo interessamento dei nervi ottici e del midollo spinale. Sino agli inizi degli anni '90 dello scorso secolo la NMO è stata considerata una malattia a prognosi infausta con decorso strettamente monofasico, caratterizzata da episodi di neurite ottica retrobulbare (NORB) perlopiù bilaterale, seguiti da episodi di mielite trasversa acuta che, nella maggior parte dei casi, esitavano in cecità e paraplegia. Con il susseguirsi di descrizioni di pazienti con quadri clinici meno gravi e con episodi di malattia talvolta occorrenti a distanza di mesi o di anni, si cominciò ad ammettere la possibilità di un decorso recidivante o recidivante-remittente

[1]. Ciò ha, per alcuni anni, indotto a ritenere la NMO una variante di sclerosi multipla (SM), in analogia con una variante remittente ottico-spinale di SM (OSSM) molto frequente nelle popolazioni asiatiche. Successive evidenze scientifiche hanno contribuito a smentire questa ipotesi. Infatti, nella maggior parte dei casi di NMO, vi è assenza di lesioni encefaliche all'esordio e l'entità dell'interessamento mielitico è particolarmente grave, con lesioni estese longitudinalmente per tre o più segmenti midollari contigui [2]. Inoltre, i più recenti studi anatomopatologici hanno evidenziato che il processo demielinizzante nella NMO è caratterizzato dalla presenza di necrosi e cavitazioni con infiltrazione di eosinofili e neutrofili, deposito di immunoglobuline e frazioni del complemento sulla parete dei vasi, suggestivi di un coinvolgimento dell'immunità umorale [3]. Infine, la scoperta di un anticorpo circolante specifico (NMO IgG) che si lega a strutture dei piccoli vasi cerebrali e alla pia madre in fettine di cervelletto di topo o di primate [4] e il riconoscimento dell'autoantigene, l'aquaporina 4 (AQP4), hanno definitivamente consentito di differenziare la NMO e alcune forme cliniche inquadrabili nel cosiddetto spettro della NMO [5] dalla SM (tabella 1). L'AQP4 è una proteina transmembrana di tipo III che rappresenta il più importante canale dell'acqua all'interno del SNC, situata a livello dei pedicelli degli astrociti in prossimità della barriera emato-encefalica. Le aree del SNC che presentano più alta concentrazione di AQP4 sono il midollo spinale, i nervi ottici, la neocorteccia, l'ippocampo, il cervelletto e molte strutture periventricolari. Lo sviluppo di metodiche di laboratorio in grado di individuare *markers* sierologici di NMO specifici e sensibili assume particolare rilevanza sul piano clinico in considerazione della riconosciuta

maggior gravità della prognosi [6-7] della NMO rispetto alla SM, sia per quanto riguarda gli esiti disabilitanti visivi che motori, ed implica un diverso un approccio terapeutico. In particolare, è necessario impiegare schemi di immunosoppressione più aggressivi e protratti rispetto a trattamenti di tipo immunomodulante, che non si sono dimostrati efficaci come nella NMO [8]. Nel 2004 nel laboratorio di Vanda Lennon è stata individuata per la prima volta un'immunoglobulina sierica di classe G, denominata NMO-IgG, tuttora considerata il *marker* sierologico della NMO con una sensibilità del 73% ed una specificità del 91% [4]. La successiva identificazione dell'AQP4 quale bersaglio antigenico specifico sia in pazienti con NMO che con forme rientranti nello spettro della NMO [9] ha spinto vari gruppi di ricerca ad ottimizzare metodiche per la determinazione di anticorpi anti-AQP4. Nei primi studi fu utilizzata l'intera proteina AQP4 umana come antigene, impiegando metodiche radioimmunologiche [10-12] o immunoenzimatiche [13], con un guadagno in sensibilità diagnostica per NMO che ha portato la stessa a valori intorno al 70-80%. Tuttavia, il loro impiego è limitato dalle difficoltà di produzione dell'antigene e dalla necessità d'impiego di radioattività. Recentemente è stato sviluppato un test per la determinazione di anticorpi anti-AQP4 con immunofluorescenza che utilizza una linea cellulare HEK293 geneticamente transfettata in modo che iper-esprima AQP4 sulla membrana cellulare esterna [14].

Nel presente studio riportiamo i risultati ottenuti con questa metodica in un gruppo di pazienti con NMO con *longitudinally extensive transverse myelitis* (LETM), malattia rientrante nello spettro della NMO.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 20 pazienti di cui 15 pazienti con NMO, diagnosticata sulla base dei criteri di Wingerchuk e collaboratori [15] (14 femmine e 1 maschio, età media 43 e *range* 25-64 anni) e 5 pazienti con LETM, diagnosticata sulla base dei criteri di Weinshenker e collaboratori [16] (5 maschi, età media 39 e *range* 36-48 anni). Sono stati utilizzati campioni di siero, prelevati a scopo diagnostico e conservati, dietro consenso dei pazienti, nella Banca Liquor-Siero dell'Istituto Neurologico Mondino. Tutti i sieri sono stati testati sia per NMO-IgG che per anticorpi anti-AQP4. Per la determinazione degli NMO-IgG, effettuata mediante immunofluorescenza indiretta, sono state utilizzate come substrato sezioni criostatiche di cervelletto di primate (Euroimmun, Lubecca Germania), seguendo le procedure previste nel metodo originale. In breve, il campione di siero, diluito 1:60 con tampone PBS-Tween 0.2% (PBST), è stato depositato su vetrino con adese le sezioni di cervelletto e incubato per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver risciacquato il vetrino con PBST e averlo lasciato in immersione in PBST per 5 minuti in agitazione, il vetrino è stato asciugato ai bordi e incubato con un anticorpo anti-IgG umane coniugato con fluorosceina per 30 minuti. Dopo un altro ciclo di lavaggio e asciugatura, il vetrino è stato incubato con PBS-DAPI (2 µg/mL) per 3 minuti, una soluzione che colora, permettendone l'identificazione, i nuclei cellulari. Dopo un altro ciclo di lavaggio e asciugatura, il vetrino è stato montato con glicerolo/PBS e letto al microscopio a fluorescenza.

Per la determinazione degli Anticorpi anti-AQP4, effettuata mediante immunofluorescenza indiretta, sono state utilizzate cellule HEK293 transfettate per AQP4 e adese su vetrino (Euroimmun, Lubecca Germania),

seguendo le procedure previste dal produttore. Come controllo di metodica negativo, sullo stesso vetrino sono presenti anche cellule HEK293 non transfettate. In breve, il campione di siero, diluito 1:10 con PBST, è stato depositato su vetrino con adese le cellule e incubato per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver risciacquato il vetrino con PBST e averlo lasciato in immersione in PBST per 5 minuti in agitazione, il vetrino è stato asciugato ai bordi e incubato con un anticorpo anti-IgG umane coniugato con fluoresceina per 30 minuti. Dopo un altro ciclo di lavaggio e asciugatura, il vetrino è stato montato con glicerolo/PBS e letto al microscopio a fluorescenza.

RISULTATI

I risultati sono riportati nella tabella 2. Utilizzando il test per NMO-IgG, 8 pazienti con NMO sui 15 inclusi nello studio risultavano positivi, con una sensibilità diagnostica del test del 53%, mentre con il test per anticorpi anti-AQP4 i pazienti positivi erano 11, con una sensibilità diagnostica del test del 73%. Il miglioramento della sensibilità diagnostica ottenuto con il test per anticorpi anti-AQP4 era confermato dai dati sui pazienti con LETM, dei quali 1 su 5 era positivo per NMO-IgG e 3 su 5 per anticorpi anti-AQP4, con rispettive sensibilità diagnostiche del 20% e del 60%. Considerando una sensibilità diagnostica cumulativa, con il nuovo test si passa da valori del 45% a valori del 70%. La specificità diagnostica, cioè l'indice statistico correlato alla positività di un test in pazienti che non hanno la malattia, era del 100% per entrambi i test (dati non mostrati; valori ottenuti testando controlli sani e pazienti con patologie in diagnosi differenziale con NMO e LETM, cioè pazienti con sclerosi multipla all'esordio o con encefalomieliti acute disseminate). La figura 1 mostra la reattività anticorpale di un paziente

risultato negativo al test per NMO-IgG (figura 1A) e positivo al test per anticorpi anti-AQP4 (figura 1B). Il siero di un solo paziente è risultato positivo al test per NMO-IgG e negativo al test per anticorpi anti-AQP4.

DISCUSSIONE

I criteri diagnostici più recenti consentono attualmente di definire la diagnosi di NMO nella maggior parte dei casi e di differenziarla da altre forme di malattia infiammatoria demielinizzante del SNC, in particolare dalla SM [4]. L'ampliarsi delle manifestazioni cliniche riconducibili al cosiddetto "spettro" della NMO [5] rende però sempre più pressante la necessità di affinare le metodiche di laboratorio con lo scopo di classificare correttamente anche casi con aspetti atipici. Infatti, va ribadito che la dimostrazione della presenza di NMO-IgG o di anticorpi anti-AQP4 nel siero di pazienti che esordiscono con neurite ottica, con mielite o con entrambe ha importanti ricadute diagnostiche, prognostiche e terapeutiche all'interno dell'ampio spettro delle malattie infiammatorie demielinizzanti del SNC e si traduce nella possibilità di attribuire allo spettro della NMO sia casi di mielite trasversa isolata, sia casi di neurite ottica isolata e sia, pur rari, i casi con manifestazioni cerebrali predominanti; inoltre permette di differenziare, nelle forme associate a malattie disimmuni sistemiche, le complicanze vasculitiche delle stesse dalla NMO. I test per la determinazione degli anticorpi anti-AQP4 fino a oggi segnalati in letteratura hanno mostrato in generale maggiore sensibilità [10-12] rispetto a quelle riportate per il test per le NMO-IgG [4, 17]. Questi test sono, però, basati su tecniche complesse che ne limitano la diffusione alla *routine* di laboratorio e ne restringono l'uso nel settore della ricerca. Queste limitazioni sono superate dalla disponibilità del test in immunofluorescenza presentato e validato in questo studio.

I nostri dati, sebbene riferiti a una casistica relativamente piccola, mostrano che il test per anticorpi anti-AQP4 impiegato è in grado di generare migliori *performance* diagnostiche se confrontato con quello che, almeno fino a oggi, è considerato il *gold standard* dei test da utilizzare nelle diagnostica dell'NMO e delle malattie rientranti nello spettro della NMO, cioè il test per le NMO-IgG. Le percentuali di positività per anticorpi anti-AQP4 ottenute sia nella casistica delle NMO, sia in quella delle LETM sono in buon accordo con quelle riportate nei lavori precedenti basati su tecniche più complesse [10-12], con percentuali di sensibilità diagnostica che si aggirano intorno al 70-80% nelle NMO e intorno al 40% nelle LETM. Complessivamente, tutti i test per anticorpi anti-AQP4, compreso quello presentato in questo studio, hanno mostrato un'ottima specificità, vicina al 100%. I motivi per i quali il test per anticorpi anti-AQP4 è più sensibile rispetto al test per NMO-IgG non sono facili da individuare. È ragionevole ritenere che l'aumentata sensibilità sia correlata all'esaltata espressione di antigeni dell'AQP4 nelle cellule transfettate rispetto a quanto accade fisiologicamente nel tessuto di cervelletto di primate utilizzato per le NMO-IgG; nel tessuto, inoltre, l'AQP4 è anche complessata con proteine che la ancorano alla membrana basale e quindi alcuni siti antigenici ne potrebbero risultare non accessibili. Si deve anche considerare che le cellule sono transfettate con AQP4 umana, mentre il tessuto presenta AQP4 di primate: nonostante l'elevato grado di omologia amminoacidica tra le AQP4 delle due specie, piccole differenze nella sequenza amminoacidica potrebbero, almeno teoricamente, modificare l'affinità degli anticorpi per alcuni siti antigenici. Tuttavia, i nostri risultati mostrano anche che, seppure in un unico caso, era presente positività per NMO-IgG e negatività per anticorpi

anti-AQP4. Da un punto di vista teorico, il dato suggerisce che in alcuni pazienti con NMO o LETM possano essere presenti anticorpi esclusivamente diretti contro epitopi non convenzionali dell'AQP4, per esempio contro leganti antigenici scaturiti dai complessi macromolecolari formati da AQP4 e proteine distrofino-associate. Da un punto di vista pratico, il dato si traduce in una raccomandazione a utilizzare sia il test per NMO-IgG sia il test per anticorpi anti-AQP4 nella diagnosi di queste malattie, per ottimizzare la sensibilità diagnostica complessiva.

In conclusione, il test per anticorpi anti-AQP4 ha mostrato performance diagnostiche tali da prospettare, in combinazione con il classico test per NMO-IgG, un utilizzo routinario nella diagnosi differenziale delle malattie infiammatorie demielinizzanti del SNC.

Neuromielite ottica
Forme limitate di neurite ottica
<ul style="list-style-type: none"> • Eventi idiopatici singoli o ricorrenti di mielite longitudinale estesa • (LETM) ovvero con lesione ≥ 3 segmenti vertebrali alla RM • Neurite ottica: episodi ricorrenti o bilaterali simultanei
Sclersi multipla ottico-spinale asiatica
Neurite ottica o mielite longitudinale estesa , associata a malattie autoimmuni sistemiche
Neurite ottica o mielite associata a lesioni encefaliche , suggestive per neuromielite ottica

Tabella 1. Spettro della neuromielite ottica (NMO) [11].

	NMO	LETM	totale
n. pazienti	15	5	20
maschi/femmine	14/1	5/0	19/1
età* (media, <i>range</i> in anni)	43, 25-64	39, 36-48	42, 25-64
NMO-IgG (positivi sul totale)	8	1	9
NMO-IgG (sensibilità del test)	53%	20%	45%
AQP4 Ab (positivi sul totale)	11	3	14
AQP4 Ab (sensibilità del test)	73%	60%	70%

Tabella 2. Caratteristiche clinico-demografiche e sierologiche dei pazienti con neuromielite ottica di Devic (NMO) e dei pazienti con mieliti trasverse estese longitudinalmente (LETM) (Abbreviazioni*=al momento del prelievo ematico; AQP4Ab=anticorpi anti-acquaporina-4; NMO=neuromielite ottica; LETM=mieliti trasverse estese longitudinalmente).

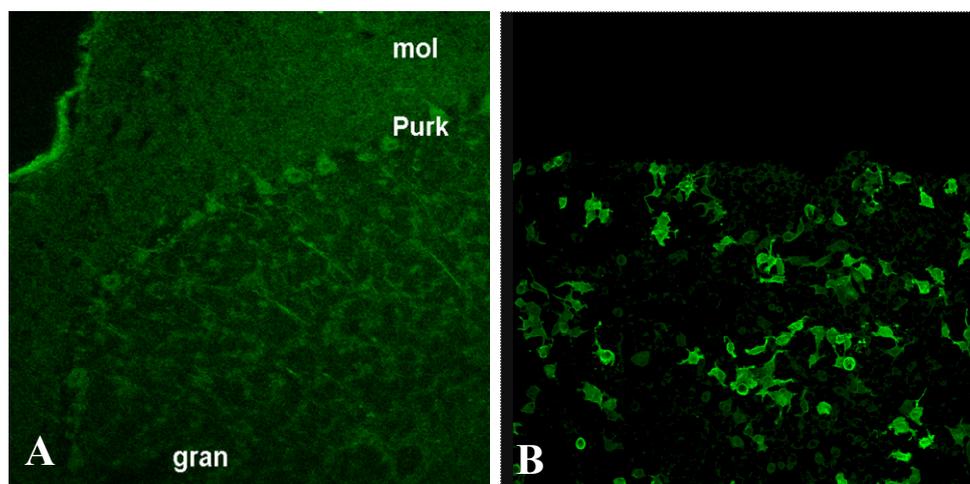


Figura 1. Reattività anticorpale del siero di un paziente con neuromielite ottica: assenza di legame specifico per NMO-IgG (A) (pattern in immunofluorescenza su tessuto cerebellare di primate, 200x) e presenza di legame specifico per la proteina acquaporina 4 (B) (pattern in immunofluorescenza su cellule transfettate, 200x) (Abbreviazioni: mol=strato molecolare; Purk=cellule del Purkinje; gran=strato granulare).

RIASSUNTO

La neuromielite ottica di Devic (NMO) è una grave malattia neurologica demielinizzante del Sistema Nervoso Centrale (SNC) a patogenesi autoimmune, che coinvolge il midollo spinale e il nervo ottico, con prognosi perlopiù sfavorevole. La recente identificazione di un anticorpo circolante altamente specifico, definito NMO-IgG, diretto contro l'acquaporina 4 (AQP4), il principale canale dell'acqua a livello del SNC, permette di differenziare la NMO e le forme ad essa correlate (il cosiddetto spettro della NMO) da altre malattie infiammatorie demielinizzanti del SNC. La rilevanza prognostica e terapeutica di tali scoperte ha indotto a sviluppare test sierologici per la ricerca di NMO-IgG e anti-AQP4 con elevata specificità e sensibilità e che al contempo fossero ampiamente disponibili. In questo studio riportiamo i risultati ottenuti in un gruppo selezionato di pazienti con NMO e mielite trasversa estesa longitudinalmente (LETM) utilizzando un nuovo metodo di laboratorio che utilizza l'immunofluorescenza indiretta per individuare anticorpi anti-AQP4, avvalendosi di cellule HEK293 transfettate per AQP4. Questo metodo ha mostrato una specificità vicina al 100% e ha portato la sensibilità cumulativa al 70% rispetto al 45% ottenuto precedentemente utilizzando metodi di ricerca degli NMO-IgG.

SUMMARY

Neuromyelitis optica (NMO) or Devic's disease is a severe, demyelinating, immune-mediated neurological disorder of the Central Nervous System (CNS) with poor prognosis involving optic nerve and spinal cord. A recently identified, highly specific circulating antibody (NMO-IgG) directed

to aquaporine 4 (AQP4), the main CNS water channel, allows differentiation of NMO and related disorders (so called “NMO disease spectrum”) from other inflammatory CNS diseases. The prognostic and therapeutic relevance of this finding has moved to develop more widely available serological tests. Here we report the results obtained in a selected group of NMO and NMO spectrum patients with a new indirect immunofluorescence-based laboratory method to detect anti-AQP4 antibodies using a genetically transfected HEK293 cell line expressing AQP4 on external cell membrane. This method has shown a nearly 100% specificity and has improved the cumulative sensibility to 70% with respect to 45% sensibility obtained with previously reported NMO IgG method detection.

BIBLIOGRAFIA

1. Mandler RN, Davis LE, Jeffery DR et al. Devic’s neuromyelitis optica: a clinicopathological study of 8 patients. *Ann Neurol* 1993;34:162-168
2. Ghezzi A, Bergamaschi R, Martinelli V et al. Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic’s neuromyelitis optica. *J Neurol* 2004;251:47-52
3. Wingerchuk DM. Evidence for humoral autoimmunity in neuromyelitis optica. *Neurol Res* 2006;28:348-353
4. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004;364:2106-2112
5. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF et al. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 2007;6:805-815
6. Ghezzi A, Bergamaschi R, Martinelli V et al. Clinical characteristics, course and prognosis of relapsing Devic’s neuromyelitis optica. *J Neurol* 2004;251:47-52
7. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 2003;60:848-853

8. Papeix C, Vidal JS, de Seze J et al. Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2007;13(2):256-259
9. Matiello M, Lennon VA, Jacob A et al. NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* 2008;70:2197-2200
10. Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I et al. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica. *Tohoku J Exp Med* 2006;210:307-313
11. Paul F, Jarius S, Aktas O et al. Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica. *PLoS Med* 2007;4:e133
12. Waters P, Jarius S, Littleton E et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Arch Neurol* 2008;65:913-919
13. Hayakawa S, Mori M, Okuta A et al. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neuroimmunol* 2008;196:181-187
14. Jarius S, Probst C, Borowski K et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen. *In press*
15. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66:1485-1489
16. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol* 2006;59:566-569
17. Jarius S, Franciotta D, Bergamaschi R et al. NMO-IgG in the diagnosis of neuromyelitis optica. *Neurology* 2007;68:1076-1077