



ASSOCIAZIONE ITALIANA DI NEUROPATHOLOGIA

REQUISITI STRUTTURALI, STRUMENTALI ED ORGANIZZATIVI PER L'ACCREDITAMENTO DEI LABORATORI DI NEUROPATHOLOGIA

Consiglio Direttivo AINP

Presidente

Giuseppe Vita (Messina)

Presidente eletto

Gian Luigi Mancardi (Genova)

Past President

Orso Bugiani (Milano)

Segretario

Antonio Migheli (Torino)

Consiglieri

Bruno Giometto (Padova)

Alessandro Mauro (Piancavallo)

Marina Melone (Napoli)

Elio Scarpini (Milano)

Gabriele Siciliano (Pisa)

L'Associazione Italiana di Neuropatologia ha ritenuto opportuno elaborare un documento sui requisiti strutturali, strumentali ed organizzativi, per tutte quelle realtà assistenziali che ricadono negli ambiti di competenza culturale della Associazione, con lo scopo di fornire uno strumento utile e aggiornato per l'accreditamento delle relative strutture sanitarie presso il Ministero della Salute o presso gli Assessorati Regionali alla Sanità. Questo documento ha inoltre l'ulteriore obiettivo di tutelare la realtà neuropatologica italiana, di primissimo livello, che si è sviluppata, nel corso degli anni, con soluzioni lievemente differenti nelle diverse sedi italiane, in rapporto a situazioni contingenti o a specifiche competenze locali.

Il documento si basa sulle conoscenze attuali e quindi è destinato ad essere modificato e integrato in rapporto ai continui avanzamenti della ricerca scientifica che comportano ricadute in campo assistenziale-diagnostico.

Ringrazio tutti i colleghi che hanno partecipato alla stesura di questo documento che ritengo sia una dimostrazione concreta della vitalità culturale e operativa della neuropatologia italiana.

Maggio 2002

*Il Presidente
Prof. Giuseppe Vita*

GRUPPI DI LAVORO

I – Laboratorio di Neuropatologia del SNC

Antonio Migheli, *Torino* (coordinatore)

Romano Ferracini, *Bologna*

Felice Giangaspero, *Bologna*

Alessandro Mauro, *Verbania*

Bianca Pollo, *Milano*

Alessandro Simonati, *Verona*

Fabrizio Tagliavini, *Milano*

II - Laboratorio di Neuropatologia del SNP

Elio Scarpini, *Milano* (coordinatore)

Giuseppe Moretto, *Belluno*

Angelo Schenone, *Genova*

III - Laboratorio di Patologia Muscolare

Maurizio Moggio, *Milano* (coordinatore)

Marina Melone, *Napoli*

Gabriele Siciliano, *Pisa*

IV - Laboratorio di Biochimica Muscolare

Antonio Toscano, *Messina* (coordinatore)

Giacomo P. Comi, *Milano*

V – Laboratorio di Neurogenetica

Antonio Federico, *Siena* (coordinatore)

Enrico Bertini, *Roma*

Massimo Zeviani, *Milano*

VI – Laboratorio di Neuroimmunologia

Bruno Giometto, *Padova* (coordinatore)

Renato Mantegazza, *Milano*

Eduardo Nobile-Orazio, *Milano*

Maria Trojano, *Bari*

GRUPPO DI LETTURA

Corrado Angelini, *Padova*

Orso Bugiani, *Milano*

Roberto Cotrufo, *Napoli*

Maria Teresa Giordana, *Torino*

Gian Luigi Mancardi, *Genova*

Maria Giovanna Marrosu, *Cagliari*

Nicola Rizzuto, *Verona*

Davide Schiffer, *Torino*

Franco Taroni, *Milano*

Le sezioni III e IV sono state redatte di concerto con l'Associazione Italiana di Miologia (AIM). La sezione VI è stata redatta di concerto con L'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI).

Si ringrazia la Dr.ssa Antonietta Citterio, responsabile dell'Ufficio Linee Guida della Società Italiana di Neurologia (SIN), per i consigli ed i suggerimenti.

Il documento è stato approvato dalla SIN nella riunione del C.D. tenutasi il 15 giugno 2002.

PREMESSA

Gruppi di lavoro ad hoc, utilizzando metodologie comuni, hanno elaborato i requisiti minimi ed opzionali per sei tipologie differenti di laboratorio neuropatologico. Il documento è stato poi valutato nel suo complesso dal Gruppo di lettura.

Ciascun tipo di laboratorio non va però considerato necessariamente una struttura singola ed autonoma, ma è auspicabile invece, soprattutto per quei laboratori con una base culturale comune (e in realtà ciò avviene già in molte sedi italiane), una organizzazione integrata di locali, apparecchiature e personale, con riduzione dei costi di gestione e maggiore efficienza diagnostica.

Si è scelto di non indicare nel documento i carichi di lavoro del personale, che sono in rapporto alla complessità e al livello tecnologico e professionale degli esami svolti, ma che sono influenzati dall'eventuale condivisione a più laboratori e dalla introduzione di nuovi esami in risposta al continuo avanzamento delle conoscenze.

La neurologia attuale è largamente dipendente da tecnologie diagnostiche "di alta specialità", tra le quali le procedure neuropatologiche occupano un ruolo importante. In termini di valore aggiunto, la consulenza del neuropatologo comporta una maggiore accuratezza diagnostica con ovvie ricadute terapeutiche, l'utilizzazione di DRG specifici, servizi in convenzione resi ad altre aziende sanitarie e, in ultima analisi, anche ricadute nell'ambito della ricerca scientifica; tutto ciò, a sua volta, è capace di innescare un circolo virtuoso che si traduce in una maggiore attrazione di utenti-pazienti.

Un laboratorio deve utilizzare un sistema che assicuri una corretta raccolta, identificazione, conservazione, trasporto, processamento dei campioni ed una successiva corretta registrazione dei risultati ottenuti, con gestione elettronica dei dati complessivi di ogni singolo paziente. I vari locali devono essere organizzati in modo da minimizzare le contaminazioni tra campioni ed assicurare agli operatori un ambiente libero da agenti nocivi. Il laboratorio deve usare metodologie, apparecchiature, reagenti, materiali che assicurino un'accurata ed attendibile esecuzione dei vari esami (a tal fine va rivolta particolare attenzione a: approvvigionamento dei materiali, preparazione e conservazione dei reattivi, manutenzione ordinaria degli strumenti, validazione dati analitici mediante controlli di qualità, lavaggio vetreria).

E' ovvio che tutti i locali devono possedere i requisiti previsti dalle leggi vigenti in materia di: protezione anti-sismica, protezione anti-incendio, protezione acustica, sicurezza elettrica e continuità elettrica, sicurezza anti-infortunistica, protezione dalle radiazioni ionizzanti, sanificazione degli ambienti e condizioni microclimatiche.

Non è inutile ricordare in questa sede che le richieste dei singoli esami di laboratorio devono prevedere l'utilizzazione di un modulo standardizzato (firmato in modo leggibile !), nel quale vanno indicati chiaramente i dati anagrafici e clinici, i risultati degli esami fino a quel momento eseguiti, eventuali terapie ed il sospetto diagnostico.

Infine, una tappa opportuna e probabilmente indispensabile nel prossimo futuro, per garantire la qualità delle prestazioni erogate, è la certificazione di qualità (norme ISO) da parte di Agenzie specifiche.

I - LABORATORIO DI NEUROPATOLOGIA DEL SNC

Indicazioni e limiti all'accreditamento di un laboratorio di neuropatologia generale

Indicazioni. L'esistenza di un laboratorio di neuropatologia generale, e più in generale della figura di un neuropatologo, è giustificata da: (a) la specificità e complessità del SNC e delle sue patologie; (b) la conseguente necessità di specifiche competenze da parte di medici, biologi e tecnici; (c) la necessità, ancor maggiore che in qualunque altro settore dell'anatomia patologica, di una profonda integrazione dei dati patologici con quelli clinico-radiologici e di una stretta collaborazione con i clinici; (d) la progressiva evoluzione e scorporamento della neuropatologia classica in vari settori, ciascuno ad elevato know-how indipendente, quali (1) patologia neurochirurgica ("surgical neuropathology"), a sua volta comprendente tumori cerebrali, lesioni vascolari e neuropatologia delle lesioni cerebrali epilettogene; (2) neuropatologia autoptica fetale e neonatale; (3) neuropatologia autoptica dell'adulto, con particolare riferimento alle malattie infettive ed alle malattie neurodegenerative.

Limiti. I limiti all'esistenza di un laboratorio autonomo di neuropatologia sono determinati dai costi crescenti, in particolare per lo studio delle autopsie e delle malattie neurodegenerative, e dalla conseguente necessità di razionalizzare ed economizzare i servizi, che in alcuni paesi (vedi USA) sta portando ad una progressiva perdita di autonomia dei laboratori di neuropatologia, con loro accorpamento nelle divisioni di anatomia patologica. Peraltro la specificità delle competenze universalmente riconosciute ai neuropatologi giustifica ampiamente l'esistenza di laboratori e servizi di neuropatologia autonomi nell'ambito di strutture ospedaliere o universitarie (IRCCS, Centri di Eccellenza ecc) di comprovato prestigio.

Requisiti generali di un laboratorio di neuropatologia del SNC

Un laboratorio di neuropatologia del SNC deve essere in grado di effettuare le seguenti tecniche procedurali su tessuto cerebrale ed altri tessuti biologici quali sangue e liquor :

1. tecniche istologiche e citologiche generali
2. tecniche speciali (immunocitochimica, istoenzimologia, morfometria, eventualmente FISH e citometria a flusso)
3. microscopia elettronica
4. criopreservazione
5. biologia molecolare
6. biochimica
7. colture tissutali (opzionale)

1. Requisiti strutturali

- Segreteria (per accettazione campioni, compilazione e spedizione referti, archiviazione dati)
- Locale archivio per preparati istologici ed inclusioni in paraffina
- Locale/i per banca di campioni biologici (biopsie cerebrali ed encefali autoptici non inclusi in paraffina, sangue, liquor, DNA estratto da tutti i precedenti)
- Locale/i per allestimento di preparazioni istologiche, immunoistochimiche ed ultrastrutturali
- Locale per svolgimento di tecniche di biochimica e biologia molecolare
- Locale/i per osservazione dei preparati mediante microscopia ottica, microscopia a fluorescenza e microscopia elettronica
- Locale con livello di sicurezza P3 (per i laboratori che processano materiale a rischio biologico, in particolare prioni)
- Locale per colture in vitro (opzionale)
- Servizi igienici con spogliatoio

2. Requisiti strumentali

- Frigoriferi a 0-4°, -20°, -80° C

- Contenitore per azoto liquido
- Criostato
- Microscopio ottico ed a fluorescenza con apparecchio fotografico
- Stereomicroscopio
- Bilance
- PHmetro
- Inclusore automatico per inclusioni in paraffina
- Stufe per essiccamento delle sezioni paraffinate ed incubazioni di reazioni immunoistochimiche
- Apparato a microonde per immunoistochimica
- Bagno termostato
- Microcentrifuga
- Cappa aspirante per tossici
- Microtomo
- Microtomo per macrosezioni
- Microtomo a slitta per sezioni congelate
- Ultramicrotomo
- Microscopio elettronico
- Cappa a flusso laminare
- Incubatore a CO₂
- Apparat per gel elettroforesi di proteine e DNA
- Armadio a norma di legge per la conservazione dei liquidi infiammabili e/o volatili
- Armadi per stoccaggio reagenti, coloranti, vetreria, ecc.
- Accessori vari: micropipette, pipettatore automatico, agitatori, piastra riscaldante, ecc.
- PC per accesso ai dati clinici e archiviazione dei risultati

3. Requisiti organizzativi: Personale

- personale laureato:
 - medici con idoneo curriculum neuropatologico (**il cui riconoscimento in Italia è peraltro ancora da definire**)
 - biologi con idoneo curriculum nell'ambito delle neuroscienze
- personale tecnico di laboratorio
- personale ausiliario
- personale di segreteria

4. Requisiti organizzativi: Prestazioni e Procedure

Le prestazioni fondamentali di un laboratorio di neuropatologia del SNC sono strettamente connesse alla diagnostica morfologica. Questa potrà eventualmente essere affiancata da tecniche avanzate a livello morfologico (p. es. FISH, TUNEL, ibridazione in situ) e non (p. es. tecniche biochimiche e di biologia molecolare)

Le prestazioni fondamentali comprendono:

1. Esame istologico di biopsia cerebrale
2. Esame estemporaneo intraoperatorio (striscio o congelatore)
3. Esame neuropatologico (encefalo in toto o frammenti di encefalo prelevati all'autopsia)
4. Esame ultrastrutturale

Le tecniche procedurali sono sottoindicate.

Le prestazioni opzionali includono:

1. Esame di biologia molecolare (analisi del DNA per ricerca di mutazioni specifiche, sia nel campo neurodegenerativo sia in quello neurooncologico)

2. Esame biochimico su liquor (p. es. ricerca della proteina 14.3.3) e su tessuto (p. es. ricerca della proteina prionica patologica)

4.1 - Esame istologico di biopsia cerebrale

La biopsia cerebrale viene effettuata dal neurochirurgo, per lo più per la diagnosi di tumore cerebrale, oppure, meno frequentemente, per lesioni (malformative) epilettogene o per sospette lesioni cerebrali infettive e/o infiammatorie.

Preparazione dei campioni e delle sezioni istologiche

I campioni istologici pervenuti dalla sala operatoria vengono processati dal tecnico a seconda delle necessità del caso (eventuale esame estemporaneo oppure immediata fissazione di tutto il pezzo operatorio in Carnoy o formalina tamponata). Dopo la fissazione, i pezzi vengono disidratati ed inclusi in paraffina. Eventuale materiale residuo dei campionamenti viene riposto in formalina ed archiviato. Sulle sezioni istologiche vengono effettuate di routine le colorazioni ematossilina-eosina e tricromica di Masson.

Esame al microscopio

Il medico esamina i vetrini e valuta se integrare l'analisi con le seguenti informazioni:

- comportamento biologico della malattia
- dati neuroradiologici
- relazione con eventuale esito di esami precedenti ed esito di esami particolari (per esempio, microscopia elettronica)
- utilizzo di tecniche aggiuntive o speciali mediante:

Richiesta di immunoistochimica

Richiesta di colorazioni speciali

Richiesta di inclusione di ulteriore materiale

4.2 - Esame estemporaneo intraoperatorio

L'esame estemporaneo può essere utile per fornire dati sulla natura o la presenza di una lesione, valutare il margine di resezione chirurgica e l'adeguatezza del tessuto prelevato.

Preparazione

Due sono le metodiche possibili:

1. congelamento con isopentano e azoto liquido, sezionamento al criostato, colorazione delle sezioni raccolte su vetrino. Le sezioni al criostato sono informative sui caratteri architetturali del tumore.
2. Preparato su striscio e colorazione con Giemsa o eosina di Morris. Tale procedura permette una maggiore definizione dei caratteri citonucleari.

Esame al microscopio e diagnosi

Obiettivo dell'esame estemporaneo è fornire una risposta indicativa della natura della lesione e, quando possibile, un orientamento diagnostico. In ogni caso, la diagnosi definitiva deve essere differita all'esame per inclusione in paraffina.

4.3 - Esame neuropatologico (encefalo in toto o frammenti di encefalo prelevati all'autopsia)

Preparazione dei campioni e delle sezioni istologiche

Il materiale viene fissato in formalina tamponata al 10%. Dopo che il materiale è rimasto almeno un mese in fissativo, il medico procede alla descrizione macroscopica, al taglio di sezioni di 1-1,5 cm di spessore sul piano frontale e all'effettuazione dei prelievi per gli esami istologici (oppure all'inclusione delle macrosezioni se il laboratorio dispone di un microtomo per macrosezioni).

Le sezioni selezionate per l'esame microscopico vengono riposte in appositi contenitori per la disidratazione e l'inclusione in paraffina. Il materiale residuo dei campionamenti viene riposto in formalina ed archiviato.

In alternativa (in particolare nel sospetto di encefalopatia prionica), al momento del prelievo autoptico, i due emisferi vengono processati separatamente. Un emisfero viene fissato in formalina. L'altro emisfero viene tagliato a fresco sul piano coronale in sezioni di circa 1,5 cm di spessore (1 cm per il tronco): le sezioni pari vengono fissate in Carnoy (che rende più semplice ed affidabile la successiva indagine immunoistochimica), mentre le sezioni dispari vengono raccolte in singole buste di plastica, congelate e conservate a -80°C. Questa procedura consente di fare indagini biochimiche e molecolari su aree mirate (microdissezione), selezionate in base all'istologia e immunoistochimica delle sezioni adiacenti.

Sulle sezioni istologiche vengono effettuate di routine le colorazioni ematossilina-eosina, PAS, Nissl e Heidenhain-Woelke (o Luxol Fast Blue) per la mielina.

Esame al microscopio

Il medico esamina i vetrini e valuta se integrare l'analisi con le seguenti informazioni:

- comportamento biologico della malattia
- dati neuroradiologici
- relazione con eventuale esito di esami precedenti ed esito di esami particolari (per esempio, microscopia elettronica)
- utilizzo di tecniche aggiuntive o speciali mediante:

Richiesta di immunoistochimica

Richiesta di colorazioni speciali

Richiesta di inclusione di ulteriore materiale

4.4 – Esame neuropatologico fetale (encefalo e midollo spinale)

Viene eseguito da un neuropatologo con competenze di embriologia del SNC. La valutazione del materiale deve essere preceduta dalle seguenti informazioni: epoca gestazionale; decorso della gravidanza; causa dell'aborto o della nascita prematura; dati fisici del feto (peso, misura della distanza podice-testa, etc.); esame descrittivo del feto; notizie dei riscontri ecografici (meglio se disponibili le immagini dell'ultimo esame eseguito).

Preparazione

Il materiale viene fissato in formalina tamponata al 10%; il fissativo viene cambiato quotidianamente nella prima settimana e successivamente con un cambio settimanale sino alla terza settimana. Il neuropatologo esegue l'esame macroscopico esterno, riconoscendo le diverse strutture e descrivendo lo stato evolutivo delle stesse e le eventuali anomalie strutturali o le lesioni secondarie. Vengono quindi eseguiti prelievi con sezioni coronali degli emisferi, sezioni trasverse del tronco (comprendenti il cervelletto nei casi più precoci) e sezioni sagittali del cervelletto. Queste vengono disidratate con una procedura manuale che prevede un prolungato soggiorno nelle soluzioni alcoliche. Le sezioni vengono poi incluse in paraffina a basso punto di fusione.

Le sezioni incluse vengono tagliate al microtomo a 4-6 µm di spessore e colorate con ematossilina-eosina e Nissl e nei casi più tardivi con colorazione Heidenhain-Woelcke.

Il materiale fissato ed incluso secondo la procedura sovradescritta può essere utilizzato per indagini immunoistochimiche. Il materiale fissato può anche essere in parte processato con metodiche specifiche di post-fissazione ed inclusione per studi anatomici ed ultrastrutturali (osmio per metodo di Golgi; glutaraldeide-osmio per l'inclusione in resina).

Esame al microscopio

Il medico esamina i vetrini e valuta se integrare l'analisi con l'utilizzo di tecniche aggiuntive o speciali mediante:

- richiesta di immunoistochimica
- richiesta di colorazioni speciali
- richiesta di inclusione di ulteriore materiale
- richiesta di inclusione in resina per studi ultrastrutturali

4.5 - Esame ultrastrutturale

Preparazione

Il materiale per la microscopia elettronica (pellet leucocitario, biopsia cerebrale, cute) deve essere processato al momento del prelievo, possibilmente da un tecnico o da un medico del laboratorio di neuropatologia. Il materiale viene messo in glutaraldeide tamponata al 2,5% per 2-3 ore e successivamente processato oppure temporaneamente conservato in glutaraldeide allo 0,6%. Dopo riduzione, il materiale viene osmicato, disidratato ed incluso in resina epossidica. Sezioni semifini di 1 µm vengono tagliate e colorate con blu di toluidina. Sezioni ultrafini dall'area di interesse vengono successivamente raccolte su retini di rame o nickel e colorate con acetato di uranile e citrato di piombo.

Esame al microscopio e diagnosi

La diagnosi andrà formulata dal medico sulle immagini rilevate al microscopio elettronico e stampate su carta fotografica. La descrizione microscopica viene fatta sempre in quanto utile per una migliore comprensione del caso da parte del clinico, al quale la diagnosi viene indirizzata. Nella descrizione microscopica il medico descrive l'aspetto architetturale e strutturale dei tessuti e delle cellule, descrive le caratteristiche morfologiche di eventuali immagini anomale (accumulo di materiale citoplasmatico, presenza di particelle simil-virali, alterazioni della normale morfologia del tessuto in esame etc).

II - LABORATORIO DI NEUROPATOLOGIA DEL SNP

INTRODUZIONE

La ricerca di un'eziologia suscettibile di trattamento costituisce la principale indicazione alla biopsia di nervo periferico. Nel 70% dei paz. con neuropatia periferica sottoposti a biopsia del nervo, la diagnosi sospettata trova conferma nell'esame istologico; nel 14% si svela una eziologia insospettata; nel 16% dei casi non viene fornito alcun contributo ai fini diagnostici (Gabriel e coll., 2000). Inoltre, nel 60% dei casi, il reperto biotico può servire ad orientare il trattamento (Argov e coll., 1989; Gabriel e coll., 2000).

Il fatto che la biopsia tronculare (prelievo dell'intero nervo) e quella fascicolare (prelievo di alcuni fascicoli del nervo) non differiscano per incidenza di complicanze, riduce l'indicazione della biopsia fascicolare ai casi in cui le alterazioni dovute alla neuropatia siano omogenee tra i fascicoli e risparmino l'epinevrio. Poiché tali alterazioni sono osservabili nelle neuropatie tossiche ed ereditarie, la biopsia fascicolare può trovare impiego nelle prime forme, per stabilire l'evoluzione delle lesioni ed escludere altre cause, e nelle seconde, quando la diagnosi genetica non sia conclusiva.

La principale indicazione alla biopsia nervosa è costituita dalla vasculite primaria del tipo osservato nella panarterite nodosa, che colpisce i vasi del calibro di quelli epinevriali. Altre indicazioni sono: 1) neuropatia da lebbra, 2) neuropatia amiloidosica, 3) neuropatia in corso di malattia d'accumulo, 4) neuropatie ereditarie in cui non sia disponibile una diagnosi genetica specifica.

Il nervo surale viene generalmente scelto per individuare lesioni a carico dei vasi epinevriali, anche se non è il principale nervo colpito in corso di vasculite e fornisce evidenza di tale patologia solo nel 20% dei casi (Hellmann e coll., 1988; Rappaport e coll., 1993). Uno studio multicentrico prospettico ha dimostrato che la biopsia del nervo peroneo superficiale, associata a quella del muscolo peroneo breve, migliora la possibilità di diagnosi di vasculite, poiché il nervo peroneo viene colpito più frequentemente del nervo surale e solitamente anche i vasi muscolari sono interessati dal processo vasculitico (Said e coll., 1988; Collins e coll., 2000). La biopsia nervosa è utile soprattutto nelle neuropatie focali e multifocali, che costituiscono il 75% dei casi di neuropatia vasculitica.

Il nervo surale ed i nervi peronei superficiali sono i più adatti alla biopsia in caso di neuropatia che interessi distalmente gli arti inferiori, mentre, in caso di interessamento prossimale, è più indicato il nervo cutaneo intermedio della coscia. In caso di neuropatia a prevalente espressione agli arti superiori, ad esempio la neuropatia lepromatosa senza lesioni cutanee, è più adatto il nervo radiale superficiale o una branca del nervo ulnare a livello del dorso della mano. In questi casi si tratterà, ovviamente, di biopsie fascicolari.

Accanto alle tecniche convenzionali di osservazione al microscopio ottico, lo studio delle singole fibre nervose isolate e postfissate in tetrossido di osmio dopo fissazione in glutaraldeide va eseguito routinariamente. Il "teasing" richiede molta esperienza da parte dell'operatore.

In alcuni casi, l'analisi immunoistochimica per l'individuazione di infiltrati cellulari può contribuire alla diagnosi, per quanto al momento abbia un'utilità prevalente a scopo di ricerca.

Gli studi sistematici morfometrici sulla distribuzione delle fibre mieliniche, sul calibro degli assoni e sullo spessore della mielina, così come la microscopia elettronica per lo studio delle fibre amieliniche, sono da ritenersi indicati solo in caso di specifici dubbi diagnostici (Gabriel e coll., 2000). Data la variabilità nella normale densità delle fibre amieliniche e la difficoltà nell'identificare anomalie in esse, gli studi quantitativi su tali fibre sono meno informativi di un'accurata valutazione clinica e neurofisiologica del dolore e delle funzioni vegetative.

In conclusione, è chiaro che la biopsia nervosa appare di limitata utilità nella diagnostica della maggioranza delle neuropatie periferiche e dovrebbe essere eseguita esclusivamente in casi accuratamente selezionati, presso centri altamente specializzati nello studio della patologia del nervo periferico.

da: Said G. *Value of nerve biopsy ? Lancet 357:1220-1221, 2001.*

1. Requisiti strutturali

- Segreteria (per accettazione campioni, compilazione e spedizione referti, archiviazione dati)
- Locale per banca di campioni biologici (nervo, sangue, liquor, DNA)
- Locale per allestimento di preparazioni istologiche, immunoistochimiche ed ultrastrutturali
- Locale per l'osservazione dei preparati mediante microscopia ottica, microscopia a fluorescenza e microscopia elettronica
- Locale per colture in vitro (opzionale)
- Servizi igienici con spogliatoio

2. Requisiti strumentali

- Frigoriferi a 0-4°, -20°, -80° C
- Contenitore per azoto liquido
- Criostato
- Microscopio ottico ed a fluorescenza con apparecchio fotografico
- Stereomicroscopio
- Bilance
- PHmetro
- Stufa
- Microcentrifuga
- Cappa aspirante per tossici
- Microtomo
- Ultramicrotomo
- Microscopio elettronico
- Armadio a norma di legge per la conservazione dei liquidi infiammabili e/o volatili
- Armadio per stoccaggio reagenti, coloranti, vetreria, ecc.
- Accessori vari: micropipette, agitatori magnetici, vortex, piastra riscaldante, ecc.
- PC per accesso ai dati clinici e archiviazione dei risultati

3. Requisiti organizzativi: Personale

- personale laureato:
 - medico con idoneo curriculum nell'interpretazione dei preparati biotici
 - biologo con idoneo curriculum nell'ambito delle neuroscienze
 - chirurgo (ortopedico, neurochirurgo) o neurologo con esperienza acquisita e competenza documentabile nella tecnica di esecuzione della biopsia nervosa
- personale tecnico di laboratorio con adeguata competenza
- personale ausiliario
- personale di segreteria

4. Requisiti organizzativi: Prestazioni

Procedura chirurgica per l'esecuzione della biopsia del nervo surale

Incisione longitudinale limitata di circa 7 cm tra 3° medio e 3° inferiore di gamba al di sopra del malleolo esterno, lungo il decorso delle vena safena esterna; la vena può essere localizzata mediante l'uso del doppler C.W. Gli intimi rapporti tra quest'ultima ed il nervo surale, le cui frequenti anomalie di decorso seguono quelle venose, permettono di isolare agevolmente un tratto di circa 5 cm di nervo individuato per trasparenza e mediante minima dissezione tissutale, sfruttando pienamente la lunghezza dell'incisione cutaneo-sottocutanea. La struttura nervosa deve essere manipolata il meno possibile e non deve essere fatta infiltrazione anestetica su di essa prima della sezione per non alterare le fibre. Con tale metodica, anche la recisione di piccoli vasi è ridotta al minimo e l'emostasi avviene velocemente dopo non oltre 3 minuti di compressione. L'intervento è concluso con la sola sutura cutanea, evitando quindi di lasciare in sede filo di sutura riassorbibile,

che può ritardare la guarigione di tessuti spesso sclero-atrofici per la malattia di base. Anche la regione di anestesia residua è ridotta al minimo (margine laterale del piede) e ben tollerata.

Trattamento del campione biptico di nervo

- congelamento rapido in isopentano raffreddato con azoto liquido
- fissazione in paraformaldeide (4% in tampone fosfato o tampone cacodilato) e successiva inclusione in paraffina;
- fissazione in glutaraldeide (2,5% in tampone fosfato o tampone cacodilato) e successivamente
 - a) inclusione in resina
 - b) isolamento di singole fibre nervose (teasing)

Metodiche isto-morfologiche

- Colorazioni istologiche convenzionali
 - a) tricromica di Gomori
 - b) ematossilina-eosina
 - c) rosso Congo o tioflavina (per la sostanza amiloide)
 - d) blu di toluidina (su sezioni semifini)
- Isolamento di singole fibre nervose (teasing), con conteggio di almeno 50 fibre
- Morfometria quantitativa su sezioni semifini
- Esame ultrastrutturale su sezioni ultrafini
- Immunoistochimica
 - a) su sezioni in paraffina o criostatiche: colorazioni per linfociti T e B e macrofagi
 - b) su sezioni criostatiche: colorazioni per immunoglobuline A,G,M, frazioni del complemento C1q, C3d, antigeni di istocompatibilità DR, MAC, fibrinogeno

III - LABORATORIO DI PATOLOGIA MUSCOLARE

INTRODUZIONE

La nosografia delle malattie neuromuscolari ha conosciuto in questi ultimi anni una continua evoluzione in gran parte dipendente dagli sviluppi di sofisticate metodiche di indagine morfologica, biochimica e genetica. Nel campo della miopatologia, tali metodiche, utilizzate dapprima a scopo scientifico, hanno avuto poi un immediato utilizzo in ambito assistenziale, facendo assumere alla biopsia muscolare un ruolo diagnostico sempre più rilevante.

Forse più che in altre branche della medicina, la diagnosi ed il trattamento delle malattie muscolari dipende in modo importante dalla stretta collaborazione tra lo specialista neurologo ed il patologo. Ed è per questo motivo infatti che, nella stragrande maggioranza dei casi, sia in Italia che all'estero, la miopatologia si è sviluppata come ambito culturale, diagnostico e scientifico all'interno di Centri Neuromuscolari, presso i quali neurologi hanno acquisito specifiche competenze patologiche, in grado di guidarli agevolmente ad un utilizzo ragionato di tutti gli strumenti diagnostici disponibili, tenuto conto degli iniziali dati clinici ed in una maniera "step by step".

D'altra parte, la specificità, l'elevato grado di raffinatezza tecnologica ed il costo relativamente elevato di tutte le procedure diagnostiche, considerate assieme quelle morfologiche, biochimiche e molecolari, portano a ritenere la biopsia muscolare come un esame da effettuare solo presso strutture altamente qualificate (Cumming WJK et al. Color Atlas of Muscle Pathology, Mosby-Wolfe 1994).

1. Requisiti strutturali

- Segreteria (per accettazione campioni, compilazione e spedizione referti, archiviazione dati)
- Locale stoccaggio campioni biologici (freezer -80° C e contenitori di azoto liquido)
- Locale/i per allestimento preparazioni istologiche, istochimiche, immunocitochimiche ed ultrastrutturali
- Locale/i per osservazioni in microscopia ottica e fluorescenza, possibilmente con sistema di visione comune e immagini digitalizzate per discussione casi
- Locale per colture cellulari (opzionale)
- Servizi igienici con spogliatoio

2. Requisiti strumentali

- Frigoriferi a $0-4^{\circ}$, -20° , -80° C
- Contenitori per azoto liquido
- Microtomo criostatico
- Microscopio ottico ed a fluorescenza con apparato fotografico
- Stereomicroscopio
- Bilance
- PHmetro
- Stufa 37° C per incubazione reazioni istochimiche
- Cappa aspirante per tossici
- Microscopio elettronico
- Centrifuga
- Armadio a norma di legge per la conservazione di liquidi infiammabili e/o volatili
- Armadio per stoccaggio reagenti, coloranti, vetreria, ecc.
- Accessori vari: micropipette, agitatori magnetici, vortex, piastra riscaldante, ecc.
- PC per accesso ai dati clinici e archiviazione dei risultati

3. Requisiti organizzativi: Personale

- personale laureato:

- medico con idoneo curriculum miopatologico
- biologi con idoneo curriculum nell'ambito delle indagini istologiche
- personale tecnico di laboratorio
- personale ausiliario
- personale di segreteria

4. Requisiti organizzativi: Prestazioni

Procedura chirurgica per l'esecuzione della biopsia muscolare

Il muscolo sede della biopsia deve essere accuratamente selezionato sulla base di una regola che vede l'esclusione di muscoli troppo compromessi o troppo poco compromessi clinicamente. Inoltre vanno escluse le zone sede di precedenti traumi, iniezioni o di esami elettromiografici. Il muscolo più comunemente utilizzato per la biopsia è il vasto laterale; altri muscoli possono essere scelti sulla base del fenotipo clinico (per es. deltoide, bicipite brachiale, tibiale anteriore, gastrocnemio).

L'atto chirurgico deve essere compiuto da un medico che ben conosce le problematiche istologiche ed istochimiche. Infatti è necessario che i frammenti, prelevati in modo che sia chiaro l'orientamento delle fibre muscolari, siano maneggiati con cura evitando traumatismi e quindi successivi artefatti. La biopsia a cielo aperto consente di ottenere frammenti muscolari adeguati per uno studio completo morfologico (istochimico ed ultrastrutturale) e, se necessario, biochimico e genetico. L'ago-biopsia invece, metodica meno invasiva, può essere preferibile nei bambini e nelle donne (cicatrice meno appariscente) e nel caso in cui sia opportuna una biopsia di controllo.

Trattamento del tessuto muscolare

- congelamento rapido in isopentano raffreddato con azoto liquido, per taglio trasversale
- fissazione in glutaraldeide (2,5% in tampone fosfato o tampone cacodilato) e successivamente inclusione in resina

Metodiche isto-morfologiche

- ematossilina ed eosina
- tricromica di Gomori modificata sec. Engel
- NADH-TR
- citocromo c ossidasi
- succinico deidrogenasi
- ATPasi a pH 9,4 – 4,3 – 4,6
- fosforilasi
- esterasi non specifica
- PAS
- sudan nero o oil red O
- violetto cristallo o rosso congo
- adenilato deaminasi, fosfatasi alcalina, fosfatasi acida, fosfofruttochinasi (opzionali)
- Morfometria quantitativa su sezioni criostatiche
- Immunoistochimica
 - a) proteine strutturali: spectrina, distrofina, sarcoglicani, merosina, disferlina, caveolina-3, emerina, collagene VI, desmina, plectina, etc.
 - b) markers infiammatori: tipizzazione degli infiltrati linfocitari, espressione di HLA e MAC
 - c) patologie mitocondriali: deplezione di mtDNA, deficit di particolari subunità del complesso IV della catena respiratoria
- Esame ultrastrutturale su sezioni ultrafini

IV - LABORATORIO DI BIOCHIMICA MUSCOLARE

INTRODUZIONE

La diagnostica biochimica delle malattie neuromuscolari è materia in continua evoluzione ed è quindi oggetto di continuo aggiornamento. Le metodiche, fino a qualche tempo fa prevalentemente utilizzate a scopo di ricerca, sono oggi entrate a pieno diritto nella pratica diagnostica corrente, anche se eseguite soprattutto presso laboratori ad elevata specificità.

Gli esami biochimici possono essere eseguiti su vari campioni biologici (sangue, muscolo, fibroblasti in coltura, etc) ma sicuramente il tessuto muscolare scheletrico è quello più utilizzato. In particolare è opportuno sottolineare che gli esami biochimici sono utili prevalentemente nelle distrofie muscolari nelle quali vi sia un deficit di una proteina o nelle miopatie metaboliche dove un deficit enzimatico è alla base della disfunzione bioenergetica della fibra muscolare.

E' inoltre doveroso premettere che lo studio biochimico deve essere assolutamente guidato dai dati clinici e dai risultati degli esami di laboratorio precedentemente eseguiti (dosaggio dell'acido lattico e dell'acido piruvico dopo test ischemico o test da sforzo, esame neurofisiologico, studio istochimico ed immunoistochimico della biopsia muscolare). In altre parole lo studio biochimico non è un esame di routine ma va eseguito in risposta ad una precisa ipotesi diagnostica.

1. Requisiti strutturali

- Segreteria (per accettazione campioni, compilazione e spedizione referti, archiviazione dati)
- Locale stoccaggio campioni biologici (freezer -80° C e contenitori di azoto liquido)
- Camera fredda (opzionale)
- Locale/i per dosaggio attività enzimatiche e metodiche elettroforetiche
- Locali per dosaggi radiometrici sec. la normativa vigente (vedi D.L. n° 230/95 modificato dal D.L. n° 241/00 e D.L. n° 187/00)
- Servizi igienici con spogliatoio

2. Requisiti strumentali

- Frigoriferi a 0-4°, -20°, -80° C
- Contenitori per azoto liquido
- Produttore di ghiaccio
- Omogenizzatore
- Centrifuga refrigerata
- Microcentrifuga
- Spettrofotometro
- Spettrofluorimetro
- Apparecchiature per elettroforesi ed elettroblotting
- Densitometro
- Contatore emissione beta
- Bilance
- PHmetro
- Bagno termostato
- Cappa aspirante per tossici
- Armadio a norma di legge per la conservazione di liquidi infiammabili e/o volatili
- Armadio per stoccaggio reagenti, vetreria, ecc.
- Accessori vari: micropipette, agitatori magnetici, vortex, piastra riscaldante, ecc.
- PC per accesso ai dati clinici e archiviazione dei risultati

3. Requisiti organizzativi: Personale

- personale laureato: medico e biologi con idoneo curriculum formativo

- personale tecnico di laboratorio con adeguata competenza
- personale ausiliario
- personale di segreteria

4. Requisiti organizzativi: Prestazioni

Analisi quantitativa e qualitativa di proteine muscolari tramite Western blot

- distrofina
- sarcoglicani
- merosina
- calpaina
- disferlina
- altre (opzionali)

Dosaggio di attività enzimatiche e di substrati

- metabolismo del glucosio e del glicogeno (glucosio-6-P-deidrogenasi, fosfoglucomutasi, fosfoglucoisomerasi, fosfofruttochinasi, aldolasi, gliceraldeide-3-P-deidrogenasi, fosfogliceratochinasi, fosfogliceratomutasi, enolasi, piruvato chinasi, lattico deidrogenasi, fosforilasi, fosforilasi-b-chinasi, enzima deramificante e ramificante, maltasi acida)
- metabolismo lipidico (enzimi della beta-ossidazione, carnicina libera e totale, CPT II, ecc.)
- catena respiratoria mitocondriale (NADH deidrogenasi, succinato deidrogenasi, NADH citocromo-c-reduttasi, succinato-citocromo c-reduttasi, citocromo-c-ossidasi, citrato sintetasi)
- metabolismo purifico (mioadenilato deaminasi)

V - LABORATORIO DI NEUROGENETICA

INTRODUZIONE

La diagnostica molecolare in Neurogenetica

I recenti progressi della genetica molecolare hanno enormemente ampliato le nostre conoscenze sulle basi molecolari di molte malattie neurologiche ereditarie. Il mappaggio cromosomico è stato completato per un gran numero di geni che, quando mutati, possono causare sindromi neurologiche; in molti casi, la localizzazione cromosomica è stata seguita dall'identificazione del gene responsabile e delle mutazioni associate alla malattia. Queste informazioni hanno permesso la ri-classificazione su basi scientifiche di molte sindromi cliniche, permesso lo sviluppo di tecniche diagnostiche estremamente specifiche, rapide e a basso costo, e consentito la caratterizzazione strutturale e funzionale dei prodotti dei geni patologici, per meglio comprendere la patogenesi dei diversi stati morbosi, e aprire la strada ad interventi razionali di terapia e prevenzione.

Nella pratica clinica, le potenzialità offerte dalla diagnosi molecolare dipendono dalla conoscenza delle basi genetiche delle diverse malattie, ma anche dalla complessità delle alterazioni genetiche responsabili. Alcune entità cliniche, come la malattia di Huntington, sono causate da specifiche mutazioni in un singolo gene, e in questo caso la diagnosi molecolare può essere offerta mediante un singolo, semplice test basato sull'uso della PCR (polymerase chain reaction, reazione di polimerizzazione a catena). In altri casi, al contrario, molte mutazioni diverse possono causare la stessa sindrome clinica (eterogeneità allelica), o, addirittura, mutazioni in geni diversi possono determinare quadri nosologici molto simili se non identici (eterogeneità genetica). In questi casi, la diagnosi genetica si complica, e i costi e i tempi di esecuzione aumentano man mano che si amplia il numero di test necessari per arrivare alla identificazione della mutazione responsabile.

Nonostante a tutt'oggi terapie efficaci siano disponibili solo per un limitato numero di malattie neurogenetiche, la diagnosi molecolare ha assunto un'importanza fondamentale, poiché consente agli individui affetti e alle famiglie di acquisire informazioni indispensabili per la pianificazione razionale dello stile di vita e delle scelte individuali e famigliari in rapporto alla malattia.

L'obiettivo primario della diagnosi molecolare è quello di aiutare l'individuo malato e/o la sua famiglia. La riduzione della prevalenza di malattie ereditarie in una determinata popolazione o nelle generazioni future può essere una conseguenza "secondaria" della diagnosi genetica, ma non deve mai condizionare la pratica del consiglio genetico.

Consiglio genetico

Deve essere sempre tenuto presente che la diagnosi genetico-molecolare di una malattia ereditaria coinvolge non solo il paziente, ma la sua famiglia. Perciò, il consiglio genetico costituisce una componente essenziale della procedura diagnostica delle malattie ereditarie. Il consiglio genetico, che deve coniugare il rispetto per il malato e la famiglia con l'informazione esauriente e rigorosa, è fondamentale per decidere la procedura diagnostica più opportuna. Nella maggior parte dei casi, l'effettuazione del test genetico è sconsigliabile in mancanza di un preventivo consiglio genetico. I pazienti debbono essere informati sia sulle caratteristiche e decorso clinico della malattia, sia sulle potenziali conseguenze sulla famiglia, prendendo in considerazione i parametri genetici più rilevanti, come la modalità di trasmissione e la penetranza. Se il neurologo non possiede l'esperienza adeguata in questo campo, è consigliabile che venga affiancato, nella consulenza genetica, da un esperto genetista medico.

Nel caso di test predittivi (v. sotto), la consulenza psicologica, effettuata da un esperto, è essenziale e obbligatoria, prima dell'effettuazione del test e della comunicazione dei risultati.

Consenso informato

Come per tutte le procedure diagnostiche, il prerequisito essenziale per la diagnosi molecolare è il consenso informato e volontario del paziente. Perciò, è essenziale che il neurologo si

accerti se il paziente (o un suo legittimo tutore) sia in grado di comprendere le informazioni essenziali ed effettuare scelte conseguenti e consapevoli. I test diagnostici molecolari non dovrebbero essere effettuati su richiesta di membri della famiglia del paziente o di altre terze parti (ad es. compagnie di assicurazione o datori di lavoro) senza l'esplicito consenso scritto del paziente.

Confidenzialità

E' evidente che risultati di test genetici che suggeriscono la presenza di mutazioni nel paziente o nei familiari che indichino o predicano una malattia neurologica o una suscettibilità ad alterazioni neurologiche hanno un forte impatto emozionale e possono mettere in difficoltà o costituire un pericolo per le relazioni sociali delle persone coinvolte. E' perciò necessaria l'adozione di rigorose misure per assicurare la confidenzialità e il segreto. Va da sé che i risultati non dovrebbero mai essere comunicati a terze parti senza l'esplicito consenso scritto del paziente o del legittimo tutore.

Diagnosi presintomatica

L'identificazione di geni malattia permette in molti casi la diagnosi presintomatica (predittiva). Le linee-guida per la diagnosi presintomatica sono state stabilite dalla International Huntington's Disease Society e dalla World Federation of Neurology for Huntington's disease. Queste linee-guida, che includono una serie di approfondite sedute di consulenza genetica e di supporto e la valutazione psicologica del probando sia prima che dopo l'esecuzione del test genetico, dovrebbero essere seguite in tutti i casi di diagnosi presintomatica. In generale, è raccomandabile che per tale diagnosi il neurologo si avvalga dell'esperienza del genetista medico. Inoltre, in caso di assenza di terapie o di misure preventive efficaci, la diagnosi presintomatica non dovrebbe essere effettuata su minori.

Principi di diagnosi molecolare

Diagnosi molecolare "diretta"

Se il gene responsabile di una malattia neurologica è noto, la diagnosi molecolare può essere effettuata direttamente mediante analisi mutazionale. In genere, si richiede per questo test il DNA del solo probando. Gli esoni noti per contenere mutazioni della specifica malattia vengono amplificati da DNA estratto da leucociti periferici mediante PCR. A seconda del tipo di mutazione, questa potrà essere identificata direttamente per elettroforesi su gel (come nel caso delle malattie da espansione di triplette ripetute), o mediante digestione con enzimi di restrizione, o per sequenza nucleotidica diretta. Se il gene è molto grande (geni con più di 30 esoni non sono rari nelle malattie neurologiche) e le mutazioni sono disperse lungo l'intero gene, l'analisi mutazionale diretta può diventare molto costosa e lunga. In questi casi, l'analisi di sequenza viene proposta di routine solo per porzioni limitate del gene, laddove le mutazioni sono maggiormente concentrate (ad es. nel CADASIL, dove il 70% delle mutazioni si trovano negli esoni 3 e 4 del gene Notch3).

Diagnosi molecolare "indiretta"

La conoscenza della posizione cromosomica (locus) di un gene-malattia permette spesso di effettuare la diagnosi genetica anche se il gene stesso non è noto. La diagnosi molecolare "indiretta" si limita ad attribuire il rischio genetico per un individuo appartenente ad una famiglia in cui la presenza di una malattia neurologica ereditaria è stata già diagnosticata clinicamente. Il metodo è basato sull'analisi di segregazione di marcatori polimorfici del DNA noti per essere strettamente legati (linked) alla malattia in questione. La determinazione degli alleli di questi marcatori in individui sani e malati della famiglia permette di definire l'aplotipo familiare specifico che segrega con la malattia. Bisogna sottolineare che la diagnosi clinica accurata in almeno un membro affetto della famiglia è un prerequisito assolutamente indispensabile per questo tipo di diagnosi molecolare e che nell'analisi di linkage vi è sempre un margine di errore, per quanto piccolo, legato a diversi fattori, come la possibilità di ricombinazioni inusuali, il malposizionamento dei marcatori, etc. Fino alla scoperta del gene responsabile nel 1993, l'applicazione più frequente di questa diagnosi molecolare indiretta mediante analisi di linkage ha riguardato la malattia di Huntington. Con

l'identificazione di un numero sempre maggiore di specifici geni malattia, l'analisi mutazionale ha soppiantato molte diagnosi "indirette".

Dal punto di vista pratico, si possono distinguere diversi "casi" in cui la diagnosi molecolare viene effettuata:

- a) Diagnosi di routine: il laboratorio di neurogenetica è in grado di erogare la diagnosi molecolare in genere entro quattro settimane. Questo caso si applica ad esempio a malattie dovute all'espansione di triplette ripetute, o ad altre patologie dovute a mutazioni specifiche.
- b) La diagnosi molecolare costituisce una procedura di routine ma è limitata dalla complessità della malattia o delle alterazioni molecolari da ricercare. Questo caso si applica a malattie che possono essere causate da molte diverse mutazioni di un dato gene, la cui analisi richiede il sequenziamento di più esoni. Questa procedura è costosa e può richiedere molto tempo. E' consigliabile che questa procedura sia intrapresa dopo un contatto personale con il medico curante e il paziente, per una programmazione razionale del test.
- c) Diagnosi molecolare all'interno di progetti di ricerca. In questi casi il contatto personale tra il richiedente e il laboratorio di neurogenetica che effettua il test è obbligatoria.

1. Requisiti strutturali

- Segreteria (per accettazione campioni, compilazione e spedizione referti, archiviazione dati)
- Locale per banca di campioni biologici
- Locale per PCR e corse elettroforetiche
- Locale per transilluminatore ed apparecchiatura fotografica
- Servizi igienici con spogliatoio

2. Requisiti strumentali

- Frigoriferi a 0-4°, -20°, -80° C
- Produttore di ghiaccio
- Maxi-centrifuga e mini-centrifuga da banco
- Spettrofotometro
- Apparecchiature per PCR
- Cappa per PCR
- Vaschette ed alimentatori per elettroforesi
- Apparecchiature per screening di mutazioni (SSCP, DGGE, etc.)
- Apparato per sequenziamento DNA
- Transilluminatore
- Apparecchio fotografico
- Densitometro
- Bagnomaria
- Forno a microonde
- Armadio a norma di legge per la conservazione di liquidi infiammabili e/o volatili
- Armadio per stoccaggio reagenti, vetreria, ecc.
- Accessori vari: micropipette, agitatori magnetici, vortex, ecc.
- PC per accesso ai dati clinici e archiviazione dei risultati

3. Requisiti organizzativi: Personale

- personale laureato: medico e biologi con idoneo curriculum formativo
- personale tecnico di laboratorio con adeguata competenza
- personale ausiliario
- personale di segreteria

4. Requisiti organizzativi: Prestazioni

L'esecuzione dei test diagnostici molecolari può essere suddivisa in tre fasi principali: pre-analitica, analitica e post-analitica. La fase pre-analitica comporta la raccolta dei campioni (che devono essere accompagnati dal consenso informato scritto del paziente e le informazioni cliniche essenziali, compresa la storia familiare e l'albero genealogico), la loro registrazione, la valutazione dell'idoneità dei campioni stessi, quindi il loro frazionamento, trattamento preliminare, conservazione e stoccaggio. In questa fase devono essere eseguite delle procedure che assicurino la corretta identificazione ed integrità di ogni campione, dal momento della raccolta del campione stesso fino all'esecuzione dei test ed alla registrazione dei risultati.

La fase analitica comprende un'ampia varietà di metodiche, che generalmente partono dall'estrazione di DNA da vari tessuti (sangue, muscolo, ecc.), per procedere con metodiche di analisi molecolare, che possono comprendere: PCR, RFLP, SSCP, DGGE, TGGE, Southern blotting, sequenziamento, ecc. Queste metodiche devono comprendere, ove possibile, l'inserimento di campioni di controllo positivi e negativi.

Nella fase post-analitica si ha la registrazione dei risultati sul sistema informatico, la stampa dei medesimi, verifica, firma, consegna e archiviazione del referto. In questa fase, particolare attenzione deve essere rivolta alla tutela della privacy del paziente.

Importanti informazioni sulla diagnosi molecolare di malattie ereditarie possono essere trovate presso i siti internet:

1. "GeneClinics", University of Washington, Seattle, <http://www.geneclinics.org/>, è una risorsa di informazioni cliniche che correla i test genetici alla diagnosi, trattamento, e consiglio genetico di diverse patologie.
2. Il catalogo online delle malattie mendeliane umane (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) <http://omim.nih.org>
3. Per le malattie mitocondriali: MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA. <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>

VI - LABORATORIO DI NEUROIMMUNOLOGIA

1) LABORATORIO DI DIAGNOSTICA LIQUORALE

INTRODUZIONE

Il laboratorio di diagnostica liquorale fa parte dei laboratori specializzati in cui si esplicano indagini monospecialistiche (malattie del Sistema Nervoso) richiedenti la disponibilità di tecnologie di livello superiore e di competenze professionali particolari ad elevato livello tecnologico e professionale.

L'attività di medicina di laboratorio del Liquor fornisce attraverso metodi chimici, fisici o biologici informazioni finalizzate alla diagnosi e al monitoraggio del decorso e/o della terapia delle malattie di interesse neurologico. Queste informazioni possono essere 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.

1. Requisiti strutturali

- Segreteria (per accettazione campioni, compilazione e spedizione referti, archiviazione dati)
- Locale per l'esecuzione delle indagini di routine
- Locale per i frigoriferi e per i congelatori (liquorteca)
- Locale deposito per il materiale di laboratorio
- Servizi igienici con spogliatoio

2. Requisiti strumentali

- Frigoriferi a 0-4°, -20°, -80° C
- Centrifuga, anche da banco, con velocità minima di 3000giri/min
- Microscopio ottico
- Camera di Fuchs-Rosenthal
- Vetrini precolorati commerciali per la conta differenziata dei globuli bianchi
- Attrezzatura per la colorazione manuale con il metodo May-Grunwald-Giemsa (conta e tipizzazione cellulare)
- Spettrofotometro con registrazione automatica e lunghezza d'onda da 600 a 400 nm con Cuvette al quarzo (dosaggio proteine totali e glucosio e xantocromia)
- Nefelometro Behring BNA (dosaggio albumina, , IgG, IgA, IgM)
- Camera per Isoelectric Focusing seguito da immunoblotting per IgG
- Alimentatore con capacità di 1200 V e 50 mA
- Centralina di raffreddamento (Isofocusing proteine liquorali e sieriche)
- Armadio a norma di legge per la conservazione di liquidi infiammabili e/o volatili
- Armadio per stoccaggio reagenti, vetreria, ecc.
- Accessori vari: micropipette, agitatori magnetici, vortex, ecc.
- PC per accesso ai dati clinici e archiviazione dei risultati

3. Requisiti organizzativi: Personale

- Personale laureato:
 - medico con idoneo curriculum nel coordinamento delle attività di laboratorio e nella interpretazione dei risultati
 - biologo con idoneo curriculum
- personale tecnico di laboratorio
- personale ausiliario

- personale di segreteria

4. Requisiti organizzativi: Prestazioni

- conta e tipizzazione delle cellule
- dosaggio delle proteine totali liquor/siero
- dosaggio del glucosio liquor/siero
- xantocromia spettroscopica
- dosaggio di albumina, IgG, IgA ed IgM liquor/siero
- isoelettrofocalizzazione delle proteine liquorali e sieriche seguita da immunoblotting per le IgG

2) LABORATORIO DI DIAGNOSTICA AUTOANTICORPALE

INTRODUZIONE

Il laboratorio di diagnostica autoanticorpale fornisce informazioni diagnostiche ad elevato contenuto specialistico che per la tipologia delle indagini eseguite richiede l'identificazione di centri di riferimento sulla base dell'esperienza scientifica e partecipazione a procedure di controllo della qualità. Tali laboratori vanno collocati preferibilmente all'interno di una struttura di neurologia clinica.

Le prestazioni diagnostiche vengono distinte a seconda della sede di patologia in:

- diagnostica autoanticorpale di malattie del sistema nervoso periferico
- diagnostica autoanticorpale di patologia della placca neuromuscolare
- diagnostica autoanticorpale di malattie del sistema nervoso centrale

1. Requisiti strutturali

- Segreteria (per accettazione campioni, compilazione e spedizione referti, archiviazione dati)
- Laboratorio diagnostica serologica
- Locale banca sieri e strumentazione
- Locale stoccaggio materiale da laboratorio (vetreria, plastica, etc.)
- Locali per dosaggi radiometrici sec. la normativa vigente (vedi D.L. n° 230/95 modificato dal D.L. n° 241/00 e D.L. n° 187/00)

2. Requisiti strumentali

- Frigoriferi a 0-4°, -20°, -80° C
- Criocontenitori con azoto liquido
- Centrifuga da banco refrigerata
- Cappa per utilizzo di solventi organici o di altre soluzioni/reagenti tossici
- Criostato
- Forno micro-onde (per trattamento e processazione sezioni paraffinate)
- Super, Ultracentrifuga e Liofilizzatore (per la preparazione di frazioni mieliniche e assonali da nervo periferico)
- Equipaggiamento per elettroforesi verticale di proteine completo di alimentatore
- Equipaggiamento per trasferimento di proteine mediante Western Blot
- Agitatore basculante per incubazioni
- Agitatore orbitale per incubazioni
- Lettore di piastre ELISA con filtri a differenti lunghezze d'onda
- Incubatore a 37° C
- camera per migrazioni cromatografiche
- spettrofotometro per il dosaggio proteico
- Microscopio ottico a luce trasmessa con fluorescenza

- Armadio a norma di legge per la conservazione di liquidi infiammabili e/o volatili
- Armadio per stoccaggio reagenti, vetreria, ecc.
- Accessori vari: micropipette, agitatori magnetici, vortex, ecc.
- PC per accesso ai dati clinici e archiviazione dei risultati

Locali per dosaggi radiometrici :

- Centrifuga da banco refrigerata per provette RIA
- Vortex o agitatore per provette
- Aspiratore per liquidi (collegato a beuta da vuoto per il recupero di liquido di lavaggio radioattivo)
- Frigorifero/Freezer
- Lettore gamma emettitori per provette RIA

3. Requisiti organizzativi: Personale

- 1 dirigente biologo o medico a tempo parziale
- 1 tecnico di laboratorio a tempo pieno

4. Requisiti organizzativi: Prestazioni

a) DIAGNOSTICA DI PATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

a) Screening da eseguire nel siero dei pazienti con sospetto di polineuropatia disimmune:

- 1) Dosaggio Anticorpi IgG anti-gangliosidi (GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b) (ELISA)
- 2) Dosaggio Anticorpi IgM anti-Glicoproteina associata alla mielina (MAG) (Ottimale mediante western blot)
- 3) Dosaggio Anticorpi IgM anti-gangliosidi (GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b) (ELISA)
- 4) Dosaggio Anticorpi IgM anti-solfatidi (ELISA)
- 5) Dosaggio anticorpi IgM anti-tubulina e neurofilamenti (Western Blot)

b) Ulteriori esami da eseguire nel siero di pazienti con forte sospetto di polineuropatia disimmune e negatività per gli esami sopraindicati (esami da effettuare in laboratori di ricerca):

- 1) Ricerca anticorpi anti-mielina/assoni mediante immunostochimica indiretta su sezioni di nervo (IIF o Immunoperossidasi)
- 2) Ricerca anticorpi anti-proteine/glicoproteine/mucopolisaccaridi di mielina/assoni di nervo mediante western blot su omogenati di nervo e di frazioni assonali e mieliniche
- 3) Ricerca anticorpi anti-glicolipidi di nervo immunostaining dopo cromatografia su strato sottile di frazioni lipidiche estratte da nervo

P.S. Tutti i suddetti esami sono effettuabili anche su liquor anche se mancano dati sull'eventuale valore diagnostico aggiuntivo di tale determinazione

b) DIAGNOSTICA DI PATOLOGIA DELLA PLACCA NEUROMUSCOLARE

- 1) Dosaggio Anticorpi anti Recettore dell'Acetilcolina
- 2) Dosaggio Anticorpi anti Recettore della Rianodina
- 3) Dosaggio Anticorpi anti Titina
- 4) Dosaggio Anticorpi anti Canale del Calcio voltaggio dipendente (VGCC)

c) DIAGNOSTICA DI PATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Diagnostica delle Sindromi Neurologiche Paraneoplastiche:

- 1) Dosaggio Anticorpi anti-nucleo neuronale (ANNA-1/ anti-Hu; ANNA-2/anti-Ri)
- 2) Dosaggio Anticorpi anti-citoplasma cellule di Purkinje (PCA-1/Yo)
- 3) Dosaggio Anticorpi anti-Amfifisina (Anti-128kD)
- 4) Dosaggio Anticorpi anti-Tr
- 5) Dosaggio Anticorpi anti-Ma1
- 6) Dosaggio Anticorpi anti-Ma2
- 7) Dosaggio Anticorpi anti-CV2/CRMP-5

Diagnostica delle encefalo-mielopatie autoimmuni:

- 1) Dosaggio Anticorpi anti-glutammico decarbossilasi -GAD
- 2) Dosaggio Anticorpi anti- Recettore tipo 3 acido glutammico -GluR3