

Utilità dei marcatori proteici liquorali nella diagnosi di malattia di Creutzfeldt-Jakob

Ilaria Giovanelli¹, Lucia Belloni¹, Romana Rizzi², Sally Maramotti¹, Catia Ferrari¹, Eleonora Calò¹, Erika Dalcò¹, Massimo Bondavalli², Alessandro Zerbini¹

¹S.S.D. Autoimmunità, Allergologia e Biotecnologie Innovative, Dipartimento di Diagnostica per Immagini e Medicina di Laboratorio, Arcispedale S. Maria Nuova - AUSL IRCCS di Reggio Emilia

²S.O.C. Neurologia, Dipartimento Neuromotorio e Riabilitativo Arcispedale S. Maria Nuova - AUSL IRCCS di Reggio Emilia

ABSTRACT

Usefulness of cerebrospinal fluid protein markers for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease

Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease is based on typical neuropsychiatric symptoms, imaging studies (magnetic resonance imaging, electroencephalogram) and detection of 14-3-3 or prion protein PrP^{Sc} by amplification techniques [Real Time Quaking-Induced Conversion Assay for Prion (Prion-RT-Quic)]. More recently, effective and more widely used biomarkers have been proposed: Tau protein, the ratio of total Tau protein (t-Tau) to its phosphorylated form [p-Tau(181)], the ratio of β amyloid (1-42) to p-Tau(181), and t-Tau/p-Tau(181) multiplied by β amyloid(1-42). Determination of the levels and calculation of specific ratios of the different markers mentioned above are part of the routine diagnostics of the autoimmunity laboratory and allows to confirm the clinical suspicion of sporadic prion disease especially in young patients, anticipating the result of the 14-3-3 protein search and RT-Prion Quic test, usually performed in reference centers.

Parole chiave: malattia da prioni, proteina Tau, proteina prionica

CASO CLINICO

Riportiamo un caso clinico di un paziente di 50 anni con un primo accesso nel reparto di neurologia dell'AUSL IRCCS di Reggio Emilia ad inizio Febbraio 2023 per capogiri, disequilibrio e ipostenia agli arti inferiori, comparsi in seguito di una sindrome simil-influenzale. Il paziente è stato inizialmente sottoposto a tomografia assiale computerizzata a raggi X (TAC) e risonanza magnetica (RM) dell'encefalo risultate nei limiti della norma ed eco-colordoppler dei tronchi sovraortici (EcoTSA) con riscontro di lieve ateromasia senza stenosi significative. In seguito al riferito peggioramento della sintomatologia atassica agli arti inferiori e all'insorgenza di difficoltà di parola il paziente veniva ricoverato a Marzo e sottoposto al prelievo lombare di liquido cefalo-

rachidiano (CSF) oltre ai prelievi ematici per emocromo con formula leucocitaria, elettroforesi delle sieroproteine, ricerca di marcatori tumorali, transaminasi, creatinina, velocità di eritrosedimentazione (VES), profilo lipidico, esami di coagulazione di base ed esame chimico-fisico urine. Gli esami routinari, non hanno evidenziato alterazioni rilevanti, tranne un lieve aumento del colesterolo LDL e della Gamma-Glutamil Transpeptidasi. L'elettroencefalogramma (EEG) ha permesso di evidenziare onde lente diffuse con anomalie a tipo onda trifasica ad andamento pseudoperiodico, mentre con la RM encefalo è stata riscontrata una sfumata iperintensità nelle sequenze a tempo di ripetizione lungo (TR >2000 msec), simmetrica e bilaterale, del putamen, dei nuclei caudati e della corteccia cerebrale prevalentemente a livello delle regioni frontale destra, parietale posteriore

Corrispondenza a: Ilaria Giovanelli, S.S.D. Autoimmunità, Allergologia e Biotecnologie Innovative, Dipartimento di Diagnostica per Immagini e Medicina di Laboratorio, Arcispedale S. Maria Nuova - AUSL IRCCS di Reggio Emilia email: ilaria.giovanelli@gmail.com

Ricevuto: 16.10.2023

Revisionato: 08.11.2023

Accettato: 25.11.2023

Publicato on-line: 15.12.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.091

omolaterale, parietale superiore para-saggitale bilaterale e dei lobi occipitali d'ambo i lati. I reperti strumentali osservati erano compatibili con un'encefalopatia infettiva, di possibile eziologia virale. In considerazione del coinvolgimento simmetrico e bilaterale dei nuclei della base e dell'esteso coinvolgimento corticale, il neurologo ipotizzava una possibile malattia da prioni. Risultava invece fisiologica la conduzione lungo la via sensitiva centrale all'elettroencefalografia dei potenziali evocati somato-sensoriali agli arti inferiori. L'esame chimico-fisico del CSF, incolore e limpido, ha fornito riscontro di rare emazie al citologico e lieve protidorrachia (83 mg/dL; i.r. 15-45) e non sono state rilevate bande oligoclonali all'isoelettrofocusing. La ricerca colturale su CSF per batteri aerobi, anaerobi e miceti e la biologia molecolare per micobatteri, virus erpetici quali *Herpes simplex virus 1* (HSV1), *Herpes simplex virus 2* (HSV2), *Human herpesvirus 6* (HHV6), *Varicella zoster virus* (VZV), *Citomegalovirus* (CMV) e *Epstein Barr Virus* (EBV) è risultata negativa. È risultata pure negativa la ricerca degli anticorpi per la diagnosi delle sindromi neurologiche paraneoplastiche: [anti-Young (Yo), anti-Neuronal nuclear antibody type 1 (ANNA-1/Hu), anti-Neuronal nuclear antibody type 2 (ANNA 2/Ri), anti-Delta and notch-like epidermal growth factor related (Tr/DNER), anti-Glutammic decarbossilase (GAD65), anti-Zinc finger protein 4 (ZIC4), anti-Titin, anti-Glial nuclear (AGNA/Sox1), anti-Recoverin,

anti-Paraneoplastic antigen Ma2 (PNMA2/Ma2/Ta), anti-Collapsing response mediator protein 5 (CRMP5/CV2), anti-Amphiphysin] eseguita con EUROLINE Paraneoplastic neurological syndromes (PNS) che consente la ricerca dei 12 antigeni (Euroimmun, Germania). Esito negativo ha dato anche la ricerca degli autoanticorpi diretti contro antigeni neuronali di superficie riscontrabili in pazienti con encefalopatie autoimmuni: anti- N-methyl-D-aspartate receptor (rNMDA), anti-Glutamate Receptor 1 and 2 (rAMPA1 e rAMPA2), anti-Gamma-aminobutyric acid receptor (rGABA), anti-Contactin-associated protein-like 2(CASPR2), anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 (LG1), anti-Dipeptidyl-peptidase-like protein (DPPX), (Cell based assay, Euroimmun). Unica eccezione una debole reattività degli anticorpi anti-Yo, riscontrata anche su siero in immunoblot, ma non confermata in immunofluorescenza indiretta su sezioni tissutali di cervelletto di primate (Euroimmun) e pertanto ritenuta aspecifica come suggerito da dati di letteratura (1). I risultati sono riassunti in Tabella 1. I risultati della quantificazione della proteina Tau totale (t-Tau) e della sua forma fosforilata (p-Tau181), della β amiloide (1-42) e (1-40) (ELISA Euroimmun) ed il calcolo di alcuni rapporti che hanno permesso di confermare il sospetto diagnostico di malattia da prioni anticipatamente rispetto ai test di conferma dal centro regionale di riferimento, sono riportate in Tabella 2 che include anche i valori decisionali di questi parametri per CJD.

Tabella 1*Esami eseguiti su matrice liquido cefalorachidiano e siero*

Esami	Risultato	Intervalli di riferimento
Chimico-Fisico (CSF)		
Aspetto	Limpido	
Colore	Incolore	
Proteine totali, mg/dL	83,4	15,0-45,0
Glucosio, mg/dL	58,0	45,0-75,0
Lattato, mg/dL	10,2	10,8-18,9
Leucociti, / μ L	1	0,0-5,0
Eritrociti, / μ L	0	
Indici proteici e Ricerca bande oligoclonali		
Albumina (siero), mg/dL	4250	3500-5200
Albumina (CSF), mg/dL	56,1	0,0-35,0
IgG (siero), mg/dL	920	650-1600
IgG (CSF), mg/dL	5,66	<4,00
IgG Index di Link	0,47	<0,70
Danno barriera emato-liquorale	1,3	0,70-2,0 lieve 2,0-5,0 moderato >5,0 grave
Ricerca bande oligoclonali	Assenza di bande oligoclonali Normale distribuzione delle IgG policlonali	

Tabella 1
continua

Esami	Risultato
Colturale	
Aerobi, Anaerobi e Miceti	Negativo
Micobatteri	Negativo
Biologia Molecolare	
<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	Negativo
HSV1 DNA	Negativo
HSV2 DNA	Negativo
VZV DNA	Negativo
HHV6 DNA	Negativo
CMV DNA	Negativo
EBV DNA	Negativo
Autoimmunità, CSF e siero	
Anticorpi anti-Yo	Debolmente positivo
Anticorpi anti-Hu	Negativo
Anticorpi anti-Ri	Negativo
Anticorpi anti-Tr/DNER	Negativo
Anticorpi anti-GAD65	Negativo
Anticorpi anti-ZIC ₄	Negativo
Anticorpi anti-Titina	Negativo
Anticorpi anti-SOX ₁	Negativo
Anticorpi anti-Recoverina	Negativo
Anticorpi anti-PNMA ₂ (Ma2/Ta)	Negativo
Anticorpi anti-CV ₂	Negativo
Anticorpi anti-Amfifisina	Negativo
Anticorpi anti-NMDAR	Negativo
Anticorpi anti-AMPA ₁	Negativo
Anticorpi anti-AMPA ₂	Negativo
Anticorpi anti-GABA	Negativo
Anticorpi anti-CASPR ₂	Negativo
Anticorpi anti-LG ₁	Negativo

CSF, liquido cerebro-spinale

Tabella 2

Marcatori proteici nel liquido cefalorachidiano del soggetto, e relativi calcoli accompagnati dai rispettivi valori di riferimento e dai valori decisionali per la diagnosi di CJD e CJD atipica (dai riferimenti 4 e 9)

	Valore ottenuto	Valore decisionale per CJD	Valore decisionale per CJD atipica	i.r.
Marcatori				
t-Tau (pg/mL)	3 751	>1200	>1200	<466
p-Tau(181) pg/mL	34	< 54	< 54	<61
β amiloide(1-42) pg/mL	490			>550
β amiloide(1-40) pg/mL	2 712			
Indici				
β amiloide(1-42)/(1-40)	0,18			>0,1
β amiloide 1-42/p-Tau(181)	14,4	>5,11	>4,70	
t-Tau/p-Tau(181)	110,3	>16,4	>16,3	
Aβ42 × t-Tau/p-Tau	54,058	>6677	>6550	

CJD, malattia di Creutzfeldt–Jakob

DISCUSSIONE

La malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), malattia neurodegenerativa letale a rapida progressione, è caratterizzata dalla conversione della proteina prionica cellulare (PrPC) in una forma aberrante (PrPSc) che è in grado di aggregarsi diventando resistente alle proteasi e di conseguenza potenzialmente neurotossica. L'etiologia della patologia riconosce forme idiopatiche sporadiche, genetiche ed acquisite, con una prevalenza della forma sporadica nel 90% dei casi ed una incidenza di 1,5-2 milioni di persone per anno (2). La diagnosi di "probabile" CJD si basa sulla presenza di almeno due segni clinici di declino cognitivo rapido progressivo in concomitanza alla positività ad una indagine strumentale di imaging (MRI, EEG) e/o alla rilevazione della proteina 14-3-3 nel CSF (3) il cui aumento è direttamente proporzionale all'entità di morte neuronale risultando pertanto alterata anche in corso di *status epilepticus*, tumori e stroke (4). L'introduzione di metodiche di amplificazione di seconda generazione (Prion RT-Quic) che rilevano direttamente il misfolding proteico della proteina prionica PrPSc attraverso un segnale fluorescente rilevato in real time (5) hanno determinato la revisione dei criteri diagnostici europei nel 2017 (3) introducendo la positività al Prion-RT Quic unitamente ad un segno clinico di sindrome neurologica progressiva, nella diagnosi di CJD probabile (3). Recentemente inoltre sono stati suggeriti come validi biomarcatori alternativi e di più comune disponibilità nei laboratori clinici, la proteina Tau con valori di sensibilità pari al 78% e specificità 80% (3,4,6), il rapporto tra t-Tau e p-Tau(181) (7,8), il rapporto della β amiloide(1-42) e della p-Tau(181), e del rapporto t-Tau/p-Tau(181) moltiplicato per β amiloide(1-42) (9). Questi marcatori si sono rivelati utili anche nella diagnosi differenziale della CJD con la malattia di Alzheimer (AD) ed altre demenze, soprattutto nelle forme di CJD atipiche o sovrapposte. Per i valori decisionali di Tabella 2 relativamente alla diagnosi differenziale tra AD e CJD, sono state indicate

le seguenti sensibilità (4,9):

- t-Tau, 77,8%;
- p-Tau(181), 66,7%;
- β amiloide1-42/p-Tau (181), 84,1%;
- t-Tau/p-Tau(181), 96,3%;
- Aβ42 moltiplicato per t-Tau/p-Tau(181), 94,4% e specificità (4,9):
- β amiloide1-42/p-Tau(181), 83%;
- t-Tau/p-Tau(181), 95,5%;
- Aβ42 moltiplicato per t-Tau/p-Tau(181), 94,3%.

I valori ottenuti in Laboratorio hanno così permesso di anticipare la diagnosi eziologica successivamente confermata dalla positività della ricerca della proteina 14-3-3 su CSF (ELISA - CircuLex 14-3-3 Gamma, MBL International) e del Prion RT-Quic eseguiti dal laboratorio di riferimento regionale (Programma Neuropatologia delle Malattie Neurodegenerative).

Il caso descritto sottolinea l'importanza della disponibilità di esami di Laboratorio validati e standardizzati, con intervalli di misura ampi ed accurati laddove quantitativi, refertati in tempi congrui alla necessità di inquadramento clinico, soprattutto nella definizione di forme neurodegenerative progressive atipiche o in sovrapposizione. Nei laboratori che si occupano di queste diagnostiche, esami con queste caratteristiche permettono di ottimizzare il ricorso a indagini di secondo livello che sono spesso esternalizzate a centri di riferimento, talvolta non completamente standardizzate e con tempistiche di refertazione variabili. Questo caso clinico testimonia come saggi quali t-Tau, p-Tau(181), β amiloide (1-42), β amiloide (1-40), anticorpi paraneoplastici ed anticorpi che si riscontrano in corso di encefalite limbica, disponibili nel nostro laboratorio, abbiano contribuito al corretto inquadramento del paziente con sintomatologia sfumata e aspecifica all'esordio, confermando il quesito diagnostico di CJD suggerito da indagini strumentali e comprovato dall'avvento della sintomatologia clinica manifesta e successivamente confermata dalla positività degli esami

di secondo livello. Di grande interesse risulta inoltre come il rapporto fra i marcatori permetta di aumentarne la significatività in termini di sensibilità e specificità; considerando infatti il valore di sensibilità della sola t-Tau al 77,8% o della sola p-Tau(181) al 66,7%, il rapporto fra le due raggiunge livelli più elevati di sensibilità (96,3%) e specificità (95,5%). Una recente analisi retrospettiva scozzese su dati raccolti nel decennio 2011-2021 (10), sottolinea l'importanza di un approccio multimodale per il corretto inquadramento diagnostico dei pazienti con CJD sporadica ad esordio giovanile (≤ 50 anni), nei quali sono riportate manifestazioni cliniche atipiche e sensibilità variabili delle metodiche di imaging e di rilevazione dei marcatori proteici liquorali quali Prion RT-Quic. Questo caso clinico ha fatto emergere l'esigenza di valutare gli indici precedentemente discussi per la diagnosi di CJD in accordo con il sospetto clinico, ponendo particolare attenzione alla valutazione dei valori decisionali proposti in letteratura, oltre che considerare l'implementazione di biomarcatori emergenti per la diagnosi di CJD quali la determinazione dei neurofilamenti.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Déchelotte B, Muñoz-Castrillo S, Joubert B, Vogrig A, Picard G, Rogemond V et al. Diagnostic yield of commercial immunodots to diagnose paraneoplastic neurologic syndromes. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2020;7:e701.
2. Hermann P, Appleby B, Brandel JP, Caughey B, Collins S, Geschwind MD, et al. Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol* 2021;20:235-46. Erratum in: *Lancet Neurol* 2021;20:e3.
3. Mastrangelo A, Mammana A, Baiardi S, Tiple D, Colaizzo E, Rossi M et al. Evaluation of the impact of CSF prion RT-QuIC and amended criteria on the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: a 10-year study in Italy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2023;94:121-9.
4. Fayolle M, Lehmann S, Delaby C. Comparison of cerebrospinal fluid tau, ptau(181), synuclein, and 14-3-3 for the detection of Creutzfeldt-Jakob disease in clinical practice. *J Neural Transm (Vienna)* 2022;129:133-9.
5. Green AJE. RT-QuIC: a new test for sporadic CJD. *Pract Neurol* 2019;19:49-55.
6. Lattanzio F, Abu-Rumeileh S, Franceschini A, Kai H, Amore G, Poggiolini I, et al. Prion-specific and surrogate CSF biomarkers in Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic accuracy in relation to molecular subtypes and analysis of neuropathological correlates of p-tau and A β 42 levels. *Acta Neuropathol* 2017;133:559-78.
7. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P et al. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:192-7.
8. Llorens F, Villar-Piqué A, Hermann P, Schmitz M, Goebel S, Waniek K et al. Cerebrospinal fluid non-phosphorylated tau in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: a comparative prospective study with 14-3-3. *J Neurol* 2020;267:543-50.
9. Abu Rumeileh S, Lattanzio F, Stanzani Maserati M, Rizzi R, Capellari S, Parchi P. Diagnostic accuracy of a combined analysis of cerebrospinal fluid t-PrP, t-tau, p-tau, and A β 42 in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease from Alzheimer's disease with emphasis on atypical disease variants. *J Alzheimers Dis* 2017;55:1471-80.
10. Tam J, Centola J, Kurudzhu H, Watson N, MacKenzie J, Leitch M et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the young (50 and below): 10-year review of United Kingdom surveillance. *J Neurol* 2023;270:1036-46.