

- 121°C in autoclave a sostituzione di gravità³ per ≥30 minuti. Lavare accuratamente gli strumenti in acqua e sottoporli quindi alla sterilizzazione di routine.
2. Immergere gli strumenti in 1N NaOH o ipoclorito di sodio (20.000 ppm di cloro libero)⁴ per ≥1h; rimuovere i ferri dalla soluzione e trasferirli in acqua, autoclavarli immersi in acqua a 132°C per ≥ 1h in autoclave a sostituzione di gravità. Lavare gli strumenti e sottoporli alla sterilizzazione di routine.
 3. Immergere gli strumenti in 1N NaOH o ipoclorito di sodio per (20.000 ppm di cloro libero) ≥1h; rimuovere i ferri dalla soluzione e sciacquarli abbondantemente in acqua; autoclavare i ferri in autoclave ad immissione di vapore⁵ a 136°C per 18 minuti. Lavare gli strumenti e sottoporli alla sterilizzazione di routine.
 4. Immergere gli strumenti in 1N NaOH e bollire per 5 minuti a pressione atmosferica. Lavare accuratamente gli strumenti in acqua e sottoporli quindi alla sterilizzazione di routine.
 5. Immergere gli strumenti in una soluzione di ipoclorito di sodio (20.000 ppm di cloro libero) per ≥ 1h. Lavare accuratamente gli strumenti in acqua e sottoporli quindi alla sterilizzazione di routine.

E' bene assicurarsi che gli strumenti siano in grado di tollerare tali trattamenti consultando le indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Queste indicazioni non vanno applicate nei confronti di strumenti e materiale destinati ad eliminazione per incenerimento.

³ In queste autoclavi l'aria è sostituita dal vapore che proviene dalla base della camera. Queste autoclavi sono utilizzate per la decontaminazione e sterilizzazione di soluzioni e strumenti.

⁴ Ipoclorito di sodio (candeggina): l'efficienza dipende dalla concentrazione di cloro libero. In commercio sono usualmente disponibili soluzioni al 5,25% di candeggina che devono essere diluite 2,5 volte (una parte di candeggina più 1,5 parte di acqua). La candeggina si inattiva facilmente all'aria ed è pertanto importante preparare le soluzioni solo al momento dell'uso e a partire da confezioni nuove o ermeticamente chiuse. La candeggina va tenuta al riparo della luce. E' consigliabile condurre le procedure di decontaminazione in un locale ben ventilato e isolato, perchè la quantità di cloro che si libera durante l'inattivazione può costituire un rischio per la salute.

⁵ Queste autoclavi producono il vuoto prima dell'immissione del vapore. Non sono indicate per la sterilizzazione dei liquidi.

Decontaminazione delle superfici (tavolo operatorio, banconi di laboratorio, etc.).

Utilizzare soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 2 N (80 grammi per litro) per un'ora o, in alternativa, una soluzione di ipoclorito di sodio con cloro libero 20.000 p.p.m. per un'ora.

E' tuttavia sempre consigliabile evitare di contaminare le superfici utilizzando materiale assorbente e impermeabile.

Rifiuti ospedalieri

Tutti i residui solidi ed i rifiuti ospedalieri devono essere eliminati per incenerimento; i liquidi di lavaggio e i campioni di materiale biologico, p. es. liquor, devono essere decontaminati (con aggiunta di idrossido di sodio in polvere o autoclavati) prima di essere eliminati. Per un trasporto sicuro usare contenitori a tenuta ad es. a doppio imballaggio. Evitare la contaminazione esterna del contenitore.

Sorveglianza della Malattia di Creutzfeldt-Jakob e sindromi correlate

Forme morbose nuove o non comuni richiedono la messa in atto di speciali programmi di sorveglianza che utilizzano tecniche e metodi solo in parte comuni a quelle normalmente utilizzate per le malattie infettive. La sorveglianza di una malattia rara come la MCJ e sindromi correlate (circa 1 caso/milione di abitanti/anno) ha la finalità di definire le dimensioni del fenomeno e di cogliere tempestivamente la eventuale comparsa di varianti della malattia. La sorveglianza implica la messa in atto di un sistema di allarme basato su osservazioni sistematiche che siano in grado di determinare, quando necessario, l'attuazione di un intervento appropriato, nonché la raccolta, la registrazione e l'analisi dei dati, nonché la diffusione di questi a tutti coloro che ne siano interessati. In sostanza si tratta di mettere in atto un sistema di monitoraggio continuo dei casi sospetti che compaiono nella popolazione.

Obiettivi della sorveglianza:

- stimare l'incidenza della MCJ e delle sindromi correlate;
- identificare tempestivamente la eventuale comparsa di casi della nuova variante;

- garantire gli interventi diagnostici necessari per il corretto inquadramento dei casi sospetti, anche attraverso una rete di strutture di riferimento;
- contribuire ad identificare cambiamenti nei modelli di propagazione per sviluppare l'impiego di azioni preventive appropriate e la messa in atto di idonee misure di controllo;
- valutare l'efficacia delle misure di controllo adottate;
- raccogliere informazioni su eventuali fattori di rischio, inclusi quelli occupazionali;
- valutare la sicurezza degli operatori sanitari nei luoghi di lavoro in ottemperanza al DL 626/94.

Strumenti della sorveglianza

Un sistema di sorveglianza necessita di risorse supplementari, oltre all'impiego ottimale di quelle disponibili. Non è possibile prevedere una notifica obbligatoria utilizzando la normativa vigente per le malattie infettive, in quanto le conoscenze disponibili non consentono di classificare la MCJ e sindromi correlate come patologie infettive. Pertanto è importante che il sistema di sorveglianza sia reso cogente attraverso l'emanazione di un'apposita direttiva da parte del Ministero della Sanità che preveda anche lo stanziamento di fondi specifici. Le principali fonti di informazione del sistema di sorveglianza della MCJ e sindromi correlate sono:

1. la segnalazione dei casi clinici che dovrebbe essere basata sui seguenti criteri:
 - a pazienti con sospetto clinico di MCJ, GSS, FFI;
 - b pazienti con demenza progressiva in cui non sia possibile eseguire una diagnosi clinica che escluda la MCJ;
 - c pazienti (anche adolescenti) con sintomatologia neurologica caratterizzata da deterioramento intellettivo, atassia, segni cerebellari e disturbi visivi, con anamnesi positiva per uno dei seguenti fattori di rischio:
 - terapia con ormone della crescita di estrazione umana,
 - impianto di dura madre in corso di interventi neurochirurgici, odontoiatrici, otoiatrici, o ginecologici,
 - trapianto di cornea,
 - EEG stereotassico,

- familiarità per sindromi demenziali, esclusi i casi accertati di malattia di Alzheimer;
- d pazienti con sospetto clinico della nuova variante di MCJ (vedi paragrafo sulla nvMCJ).
- 2. la registrazione dei decessi per MCJ e sindromi correlate;
- 3. i dati degli accertamenti di laboratorio per la conferma del sospetto diagnostico;
- 4. le informazioni riguardanti la patologia animale.

La sorveglianza della MCJ e sindromi correlate è costituita da:

1. sorveglianza passiva, basata sulla raccolta di dati generati a livello locale in modo routinario da neurologi, infettivologi e patologi, che effettuano la segnalazione di caso sospetto mediante la scheda (allegato A) al Registro Nazionale della MCJ presso l'ISS ed all'Assessorato alla Sanità della Regione competente;
2. sorveglianza attiva, basata sulla messa in atto di indagini speciali condotte con l'obiettivo specifico di ottenere dati, e che include gli accertamenti sui casi e la verifica della diagnosi. Tali accertamenti vengono effettuati dal Registro Nazionale della MCJ presso l'ISS direttamente o attraverso le strutture di riferimento sovraregionali.

Il Registro Nazionale della MCJ presso l'ISS trasmetterà con cadenza annuale al Ministero della Sanità ed alle Regioni la descrizione del fenomeno con l'analisi per singola Regione. Al fine di ridurre al minimo gli svantaggi ed i possibili *bias* del sistema passivo di segnalazione che funge da sistema sentinella della sorveglianza della MCJ e sindromi correlate è indispensabile procedere a:

- sensibilizzazione delle figure professionali ai quali è demandata l'attivazione del sistema (neurologi, infettivologi e patologi) attraverso la trasmissione delle linee-guida come direttiva di sanità pubblica da parte delle Regioni, oltre alla pubblicazione delle linee-guida sugli organi delle società scientifiche e la loro presentazione nell'ambito di congressi nazionali;
- definizione delle caratteristiche del supporto fornito dal Registro Nazionale della MCJ presso l'ISS e/o dalle strutture di riferimento sovraregionali a neurologi, infettivologi e patologi, che effettuano la segnalazione di caso sospetto. A tal fine va precisato che:

1. al professionista che effettua le segnalazioni verranno fornite tutte le informazioni relative agli ulteriori accertamenti effettuati sul paziente e che nel caso di pubblicazione di singoli casi verrà riportato un nome per ogni centro clinico che ha fornito le informazioni;
2. la procedura di verifica dei casi non ha altra funzione della raccolta delle informazioni e dell'effettuazione degli accertamenti di laboratorio in maniera standardizzata al fine di aumentare la validità, riproducibilità ed accuratezza del sistema di sorveglianza.

“Bozza di documento malattia C.J.” (redatta prof. Bugiani)

(O:1024.doc) Commissione Ortona, Ministero della Sanità

ENCEFALOPATIE DA PRIONI, ASSISTENZA E RISCHII

Questo documento ha lo scopo di dare agli operatori sanitari un'informazione equilibrata sulle encefalopatie umane da prioni e sui meccanismi della loro presunta contagiosità, per far sì che l'assistenza dovuta agli ammalati non sia un rischio per chi la porge, e che gli ammalati non restino senza assistenza per paura del contagio.

1 - Nosografia, clinica, eziopatogenesi

Le encefalopatie da prioni sono malattie degenerative che si manifestano in forma subacuta o cronica, sporadica o familiare, e sono talvolta trasmissibili se il tessuto nervoso ammalato viene messo a contatto con quello sano. La forma sporadica più frequente è la malattia di Creutzfeldt-Jakob (1 caso per milione per anno). Le forme familiari, associate a mutazioni del DNA, comprendono quattro malattie diverse: Creutzfeldt-Jakob familiare, Insonnia fatale, malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker, e una rarissima angiopatia amiloide. Le forme trasmesse includono il kuru della Nuova Guinea (quasi scomparso da quando i cerimoniali funebri cui era legato sono stati proibiti) e i casi di trasmissione inumana accidentale imputabile a terapie ormonali con estratti di ipofisi umana, impianto di dura madre liofilizzata eseguito prima del 1994, e uso di ferri neurochirurgici sterilizzati in modo inadeguato. Alle forme trasmesse potrebbe appartenere la variante inglese di malattia di Creutzfeldt-Jakob, che si teme sia legata all'encefalopatia da prioni che ha colpito in forma epidemica i bovini da latte del Regno Unito (*scheda tecnica #1, #2*).

Clinicamente, le encefalopatie da prioni hanno in comune il deterioramento delle funzioni motorie e di quelle cognitive. Il controllo dei meccanismi posturali e la coordinazione dei movimenti sono di solito compromessi prima delle funzioni cognitive, cosicché l'evoluzione del quadro clinico è caratterizzata in quasi tutti i pazienti da disturbi dell'equilibrio sempre più gravi, che sono seguiti da confusione mentale, disturbi del ritmo sonno-veglia (particolarmente evidenti fin dall'esordio della sintomatologia nei pazienti con Insonnia fatale) e compromissione di memoria, linguaggio, prassie e gnosis. Col progredire della malattia, il paziente diventa demente e incapace di lasciare il letto, spesso reagendo con scosse miocloniche e epilessia a qualsiasi stimolo, anche il più delicato. Onde trifasiche pseudoperiodiche sono caratteristiche del tracciato elettroencefalografico dei pazienti con malattia di Creutzfeldt-Jakob. L'età d'esordio e la durata della malattia cambiano da una forma all'altra. La malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica si manifesta nell'adulto maturo e anziano e dura in media otto mesi, ma la sua variante inglese è più precoce perché colpisce anche gli adolescenti. Le forme iatrogene compaiono a qualsiasi età, qualche anno dopo l'evento che le ha determinate, e hanno la durata di pochi mesi. Più lungo è il decorso delle forme familiari. La malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker può durare anni.

L'evento centrale della patogenesi delle encefalopatie da prioni è costituito dalla modificazione della conformazione molecolare di una proteina endogena che è conosciuta col nome di proteina prione. Si tratta di una sialoglicoproteina di 28-35 kD ancorata alla membrana cellulare, la cui sintesi è codificata da un gene che si trova sul braccio corto del cromosoma 20. Caratteristici della proteina sono il polimorfismo metionina/valina nel codone 129 (che influisce sulla variabilità clinica e neuropatologica di queste malattie), una sequenza ripetuta più volte nella porzione N-terminale della molecola, tre catene α -elica e due β -sheet situate nella porzione globulare C-terminale. Nella conversione dalla forma normale (PrP^{C}) a quella patologica (PrP^{Sc}), la proteina perde una parte della struttura α -elica e acquista molto in β -sheet. Ciò comporta l'acquisizione di proprietà chimicofisiche e biologiche particolari. Infatti, PrP^{Sc} differisce da PrP^{C} perché è insolubile e parzialmente resistente alla digestione, formando aggregati e fibrille di amiloide. La presenza di PrP^{Sc} nel tessuto nervoso costituisce il reperto saliente di tutte le encefalopatie da prioni. All'accumulo di PrP^{Sc} nel tessuto nervoso si imputano le lesioni patognomiche (attivazione della microglia, ipertrofia e proliferazione degli astrociti, degenerazione spongiosa e rarefazione neuronale) e la trasmissibilità in condizioni sperimentali (iniezione intracerebrale o intraperitoneale di tessuto nervoso omogenato).

La conversione $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ può derivare da mutazioni specifiche del gene capaci di destabilizzare la struttura della proteina (sono state finora identificate 14 mutazioni associate alle encefalopatie da prioni familiari), ma può anche essere provocata dall'interazione diretta fra la proteina normale endogena e una PrP^{Sc} giunta dall'esterno (encefalopatie da prioni iatrogeni e trasmissibili), e da mutazioni somatiche o spontanee del gene (encefalopatie da prioni sporadiche). In ogni caso, una volta iniziato, il processo di conversione $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ sarebbe capace di mantenersi da solo producendo PrP^{Sc} in quantità sempre maggiore, perché ogni molecola PrP^{Sc} modificherebbe la proteina normale con cui viene a contatto inducendovi la propria conformazione patologica.

II - Contagiosità, finalità del ricovero e qualità dell'assistenza

La conversione $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ avviene nel tessuto nervoso, l'unico dove la proteina normale è espressa in abbondanza e dove si accumula la proteina patologica. Poiché gli organi a rischio per la trasmissione interumana accidentale della malattia sono cervello, midollo, meningi e occhio, particolari cautele devono essere adottate nell'eseguire la rachicentesi, la biopsia cerebrale o l'autopsia di pazienti affetti da encefalopatia da prioni onde evitare di entrare in contatto diretto coi tessuti a rischio e di disperderli nell'ambiente. Al contrario, il paziente non è fonte di alcun rischio e può essere ricoverato senza che nei suoi confronti debbano essere adottate precauzioni particolari oltre quelle generiche per la prevenzione dei rischi di infezione (*scheda tecnica* # 3). Piuttosto, questo paziente ha bisogno di attenzioni speciali, perché la malattia lo rende sofferente e sensibile a tutti gli stimoli e incapace di tenere sotto controllo l'ambiente in cui si trova. Per tali ragioni un ammalato così particolare reagisce a tutte le situazioni che lo disturbano con gesti improntati alla sorpresa, alla paura o all'eccesso di difesa. E' opportuno perciò che questo paziente sia ospitato da solo in una stanza silenziosa e in penombra, dove un familiare o un amico possano rassicurarlo e tranquillizzarlo con la loro presenza.

Il ricovero di un paziente sospetto per malattia di Creutzfeldt-Jakob o altra malattia da prioni ha due scopi principali: accertare la diagnosi e istruire i familiari ai bisogni dell'assistenza per quando il paziente sarà, se possibile, riportato a casa. L'encefalopatia da prioni va sospettata in un paziente di qualsiasi età che presenta disturbi motori e cognitivi insorti da poco e in rapida evoluzione, per i quali si può escludere un'ipotesi diagnostica alternativa soddisfacente. Il sospetto basato sull'anamnesi e sull'obiettività clinica va convalidato con un protocollo per cercare sistematicamente indizi suggestivi (complessi trifasici pseudoperiodici e mioclonie nel tracciato poligrafico, proteina 14-3-3 nel liquor, iperintensità del neostriato e del talamo nelle immagini di risonanza magnetica del cervello, estinzione dell'elettroretinogramma e dispersione dei potenziali evocati a media e lunga latenza) o prove certe (mutazioni specifiche del DNA, proteina patologica nel tessuto cerebrale) in casi particolari. L'osservazione clinica e strumentale può quindi consentire la diagnosi (malattia certa, probabile o possibile) o escluderla. La probabilità di considerare la malattia di Creutzfeldt-Jakob nella diagnosi differenziale e l'eventualità di modificare la diagnosi da possibile a probabile aumentano con la durata dell'osservazione, poiché i sintomi comunemente considerati molto suggestivi (mioclonie, alterazioni elettroencefalografiche, proteina 14-3-3 nel liquor) compaiono di solito nel decorso relativamente avanzato. Le maggiori difficoltà diagnostiche si incontrano all'esordio dei sintomi e nei casi in cui la malattia supera i 18-24 mesi di durata, e quando non produce segni patognomonicamente o si manifesta in età giovanile o molto avanzata. La variante inglese della malattia di Creutzfeldt-Jakob (che non è mai stata identificata in Italia) compare dall'adolescenza ai 40 anni con disturbi psichici, evolvendo verso la demenza senza presentare in un caso su due le onde elettroencefalografiche periodiche evocative per la diagnosi.

In mancanza di una mutazione specifica del DNA, nessun protocollo clinico dà in vita la certezza della diagnosi di encefalopatia da prioni e in particolare di malattia di Creutzfeldt-Jakob, e il peso dell'ipotesi diagnostica (malattia probabile o possibile) può cambiare in funzione del numero e del tipo di sintomi al momento dell'osservazione clinica o con la complessità del protocollo diagnostico (*scheda tecnica # 4, # 5*). In un caso senza mutazione, la diagnosi di certezza si basa sulla dimostrazione della proteina patologica nel tessuto cerebrale, perciò in vita è subordinata all'esecuzione di una biopsia cerebrale (*scheda tecnica # 6*) e, dopo la morte, al riscontro autoptico (*scheda tecnica # 7*). Questo, se le circostanze lo impongono, potrà essere limitato all'encefalo (*scheda tecnica # 8*).

La prospettiva di un riscontro diagnostico fornisce una giustificazione per prolungare il ricovero in ospedale. Altrimenti il paziente può essere dimesso, facendo sì che a domicilio (o dove sarà accolto) gli siano assicurate condizioni di assistenza e di igiene di qualità adeguata.

III - A chi fare riferimento in Italia

- 1- Istituto Superiore della Sanità, Roma, per la segnalazione a fini epidemiologici dei casi sospetti (tel, fax, e-mail ...). L'Istituto svolge al riguardo le seguenti attività: (dettagli, anche sui risultati del registro) ...
- 2- Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, per analisi liquor e DNA, studio neuropatologico e biochimico del tessuto, ricovero di pazienti sospetti, consulenza (tel, fax, e-mail ...) ...
- 3- XYZ
- 4- XYZ

IV - Schede tecniche

- 1 - Classificazione delle encefalopatie da prioni (manca)
- 2 - Encefalopatia spongiforme bovina e variante inglese (manca)
- 3 - Protocollo per l'assistenza dei pazienti con malattia di Creutzfeldt-Jakob
- 4 - Criteri per la diagnosi clinica
- 5 - Esami diagnostici
- 6 - Protocollo operatorio (manca)
- 7 - Protocollo per l'autopsia
- 8 - Campionatura del cervello

Scheda tecnica # 1 - Classificazione delle encefalopatie da prioni

Scheda tecnica # 2 - Encefalopatia spongiforme bovina e variante inglese di Creutzfeldt-Jakob

Scheda tecnica # 3 - Protocollo per l'assistenza dei pazienti con malattia di Creutzfeldt-Jakob

La malattia di Creutzfeldt-Jakob non si trasmette per contatto diretto dall'ammalato al sano. Ciononostante è prudente adottare coi malati anche sospetti le precauzioni d'uso per le malattie infettive.

- 1 - Indossare camici protettivi e usare biancheria monouso, da gettare coi rifiuti speciali da incenerire.
- 2 - La biancheria da riutilizzare deve essere lasciata per 1 ora a bagno in candeggina (ipoclorito di sodio 6%), oppure in una soluzione debole di soda (idrossido di sodio, 80 gr per litro d'acqua). Lo stesso risultato può essere ottenuto con la sterilizzazione per 1 ora in autoclave a 134°C (3 bar) (l'autoclave deve essere del tipo che produce il vuoto prima dell'immissione del vapore).
- 3 - Per tutte le manovre invasive (prelievi di sangue, rachicentesi, medicazioni, etc), indossare due paia di guanti e gettare gli strumenti monouso nei rifiuti speciali. Usare tappi a tenuta per i contenitori dei prelievi. Mettere in evidenza il rischio biologico dei prelievi contrassegnando opportunamente i campioni. Munirsi di occhiali protettivi nel manipolare campioni biologici.
- 4 - In caso di ferita accidentale, far sanguinare la ferita, lavarla abbondantemente con acqua corrente e disinfettarla con antisapril. L'incidente deve essere denunciato alla Direzione sanitaria. Lavarsi e disinfettarsi dopo essere venuti a contatto di sangue, urine, feci, secrezioni e liquor, anche se si è certi che la pelle sia integra.
- 5 - Gli strumenti di metallo e di acciaio inossidabile (ferri chirurgici, segmenti di apparecchiatura per analisi, etc.) da recuperare saranno sterilizzati con la soluzione debole di idrossido di sodio e autoclavati a 134°C.
- 6 - Adoperare candeggina per la pulizia degli ambienti (pavimento, pareti, sanitari fissi, infissi e suppellettili non deteriorabili) dove il paziente è ospitato. Adoperare la soluzione di soda per la pulizia delle suppellettili metalliche (letto, sedie).

Scheda tecnica # 5 - Esami diagnostici**A - Elettencefalogramma**

La registrazione deve durare da 30 a 40 minuti dal momento in cui il paziente si è adattato all'esame: 20 minuti per la registrazione in condizioni di tranquillità e riposo psicosensoriale; 10 minuti per la registrazione poligrafica (EEG, EMG); 10 minuti, nei pazienti che lo consentono, per la registrazione in corso di stimolazione sensoriale (tattile, verbale, visiva: SLI a bassa frequenza: 1 Hz per 20 sec., poi 2, 5, 10, 15 Hz) e durante l'esecuzione di ordini semplici (chiusura/apertura degli occhi etc).

Si usano elettrodi a tampone o a coppetta posizionati secondo il sistema 10-20 con 20 elettrodi EEG.

Si utilizzano montaggi longitudinali bipolari con una registrazione a 16 o 14 canali nei pazienti che possono stare seduti, a 10 o 8 in quelli barellati. Un unico montaggio longitudinale serve per tutta la registrazione. Se si dispone di un poligrafo con pochi canali, una parte della registrazione è eseguita con un montaggio longitudinale per le derivazioni paramediane, e una parte più breve con il montaggio circolare per le derivazioni temporali.

Montaggi**(a) Longitudinale bipolare 16 canali**

Fp2-F4	F4-C4	C4-P4	P4-O2	F8-T4	T4-T6	T6-O2
Fp1-F3	F3-C3	C3-P3	P3-O1	F7-T3	T3-T5	T5-O1
Fz-Cz	Cz-Pz					

(b) Longitudinale bipolare 14 canali

Come il precedente, meno

F8-T4	T4-T6	T6-O2
F7-T3	T3-T5	T5-O1

(c) Longitudinale bipolare 10 canali

Fp2-F8	F8-T4	T4-T6	T6-O2	O2-O1	O1-T5
T5-T3	T3-F7	F7-Fp			

(d) Circolare bipolare 10 canali

Fp2-F8	F8-T4	T4-T6	T6-O2	O2-O1	O1-T5
T5-T3	T3-F7	F7-Fp1			

Per la registrazione poligrafica si rinuncia ad alcuni canali EEG e si utilizza la derivazione EKG per registrare l'elettromiogramma da almeno una coppia di muscoli antagonisti distali (da scegliere in base all'osservazione clinica).

NB - L'esame deve essere ripetuto periodicamente fino a essere certi del risultato atteso.

B - Elettrocardiogramma

Due elettrodi sono posizionati nella regione infraorbitaria, uno a destra e uno a sinistra, e uno di riferimento sul canto esterno. Dopo adattamento al buio vengono

somministrate 50-60 serie di lampi color arancio bianchi (0,5 Hertz, 1 Joule). Vengono misurate le latenze e l'ampiezza da picco a picco delle onde *a* e *b*.

NB - L'esame deve essere ripetuto periodicamente fino a essere certi del risultato atteso.

C - Risonanza magnetica

Viene utilizzato un apparecchio a 1.5 Tesla eseguendo sequenze T1 dipendenti in Spin Echo (TR 508, TE 20) e sequenze T2 dipendenti in Spin Echo (Tr 2000, Te 30-90).

Le sequenze in T1 sono condotte nei piani sagittale e coronale con sezioni di 6 mm mirate sui nuclei della base e sul talamo. Le sequenze in T2 sono condotte nel piano assiale con sezioni di 6 mm e nel piano coronale con sezioni di 7 mm.

Il piano assiale viene esplorato anche con una sequenza FLAIR/TR 8000, TE 150, IR delay 1900, Turbo factor 15.

NB - L'esame deve essere ripetuto periodicamente fino a essere certi del risultato atteso.

D - Ricerca della proteina 14-3-3 nel liquido cefalo-rachidiano

Il liquor viene prelevato tramite rachicentesi e analizzato entro un'ora se tenuto a temperatura ambiente, 12 ore se conservato a 4°C, più ore se congelato a -20°C.

Quantità di liquor necessaria per l'esame: 1-2 ml.

La proteina 14-3-3 viene cercata con tecnica immunochimica utilizzando un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la proteina, un anticorpo secondario anti-immunoglobuline di coniglio coniugato a perossidasi, e un sistema di rivelazione tramite chemoluminescenza.

NB - L'esame deve essere ripetuto periodicamente fino a essere certi del risultato atteso.

E - Analisi del gene della proteina prione (PRNP) da DNA estratto da linfociti circolanti

Occorre sangue eparinato (15-20 ml) da conservare a temperatura ambiente (non oltre 12 ore) o a 4°C (24 ore). Si isolano i linfociti e si estrae il DNA secondo tecniche di routine.

Dopo amplificazione del PRNP, si procede a (i) determinare il polimorfismo del codone 129, (ii) cercare le mutazioni a penetranza incompleta più comuni in Italia (E200K, E210I, inserzioni o delezioni) anche in casi di malattia sporadica, (iii) sequenziare l'intero gene nei casi di malattia familiare.

Scheda tecnica # 6 - Protocollo operativo