



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

RACCOMANDAZIONE PER LE AMILOIDOSI PRIMITIVE E FAMILIARI

(codice esenzione RCG130)



**REGIONE
PIEMONTE**

Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	3
DEFINIZIONE.....	3
CENNI EPIDEMIOLOGICI.....	3
CLASSIFICAZIONE.....	3
2. RACCOMANDAZIONI DIAGNOSTICO TERAPEUTICHE.....	6
CRITERI DI ACCESSO AL PERCORSO E INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO.....	6
Criteri di accesso al percorso diagnostico.....	6
Inquadramento diagnostico.....	7
VALUTAZIONE DEL GRADO DI ESTENSIONE DI MALATTIA: RICERCA DEL DANNO D'ORGANO E SUA QUANTIFICAZIONE CLINICA, LABORATORISTICA E STRUMENTALE.....	9
AMILOIDOSI FAMILIARI: INDAGINI GENETICHE E TRATTAMENTO.....	11
AMILOIDOSI AA: IDENTIFICAZIONE E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA DI BASE.....	17
AMILOIDOSI SISTEMICA SENILE.....	20
APPROCCIO TERAPEUTICO.....	22
Terapia patogenetica delle amiloidosi AL.....	22
TERAPIA DI SUPPORTO E ASPETTI ASSISTENZIALI.....	27
ACCESSO AL TRAPIANTO D'ORGANO.....	28
3 BIBLIOGRAFIA.....	30
4 REDAZIONE DEL DOCUMENTO.....	31
Coordinatori:.....	31
Estensori delle sezioni del documento:.....	31
Partecipanti al gruppo tecnico:.....	31
5 AGGIORNAMENTI.....	33
6 ALLEGATI.....	34
ALLEGATO 1 - LE ASSOCIAZIONI DEI PAZIENTI.....	34
ALLEGATO 2 - COLORAZIONE ROSSO CONGO SECONDO WESTERMARK.....	34



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

1. INTRODUZIONE

DEFINIZIONE

Con il termine di amiloidosi si definisce un eterogeneo gruppo di malattie caratterizzate da deposizione di proteine o peptidi mal conformati, cioè transitati dallo stato globulare solubile a quello fibrillare insolubile. I depositi di sostanza amiloide si formano a livello extracellulare in uno o più distretti dell'organismo inducendo una progressiva disfunzione degli organi e degli apparati coinvolti. Le proteine amiloidogeniche possono prodursi in seguito a proliferazione di cloni plasma o linfocellulari (forme AL), a patologie infiammatorie croniche (forme AA) oppure per mutazioni genetiche (forme familiari).

Se, in teoria, la caratteristica di poter colpire svariati organi e apparati dovrebbe convogliare sulle amiloidosi l'interesse di molte specialità mediche, nella realtà pratica, la bassa prevalenza di malattia non facilita la nascita di sicuri riferimenti per la presa in carico globale del paziente: il presente documento, redatto e condiviso dai Medici afferenti al Consorzio Interregionale Piemonte e Valle d'Aosta per le amiloidosi, appartenenti a molteplici differenti discipline, ha quindi lo scopo di porre in risalto le tappe fondamentali per la diagnosi e la cura di queste affezioni e di promuovere lo sviluppo di Centri Esperti in cui sussistano le condizioni per garantire al paziente un approccio completo e multidisciplinare.

Va infine ricordato che, sebbene il presente documento sia applicabile a tutti i tipi di amiloidosi sistemica a seguito elencati, l'attuale normativa nazionale consente il rilascio dell'esenzione per Malattia Rara con il codice RCG 130 soltanto ai pazienti che risultino affetti da forme primitive o familiari e non a quelli affetti da forme reattive.

CENNI EPIDEMIOLOGICI

Le amiloidosi hanno un'incidenza complessiva stimata attorno ai 14 nuovi casi per milione di abitanti per anno e una prevalenza inferiore ai 5 casi ogni 10.000 abitanti, che le pone a pieno titolo tra le malattie rare; le forme primitive (AL) sono le più frequenti, costituendo l'80-85% dell'intera casistica, seguite dalle forme ereditarie che ne rappresentano il 10-15% e da quelle reattive (AA), conseguenti a neoplasie, malattie infiammatorie o infezioni croniche, che si sono progressivamente ridotte nel corso degli ultimi decenni fino a rappresentare meno del 5% dei casi.

I dati di segnalazione sono presenti sul sito della rete interregionale per le malattie rare del Piemonte e della Valle d'Aosta (<http://www.malattierarepiemonte.it>).

Dal 2010 al 2016 la maggior parte delle segnalazioni presenti nel registro Interregionale delle Malattie Rare del Piemonte e della Valle d'Aosta sono state effettuate dai seguenti Centri:

- Azienda Sanitaria Locale Città di Torino – Hub Ospedale S. Giovanni Bosco
- AOU Città della Salute e della Scienza di Torino
- AO S. Croce e Carle – Cuneo
- AOU Ospedale Maggiore della Carità - Novara
- AO Ospedale S. Antonio e Biagio/Arrigo – Alessandria

CLASSIFICAZIONE

Sono stati finora identificati almeno 30 differenti tipi di proteine in grado di originare fibrille di amiloide; poiché la terapia volta a sopprimere la loro produzione varia significativamente a seconda del tipo di amiloide in causa, è indispensabile che, subito dopo il rilievo istologico di amiloidosi, si eseguano indagini idonee a individuare con certezza la sostanza proteica amiloideogenica dalla quale esse hanno tratto origine: le maggiori probabilità di successo del trattamento sono infatti legate non solo alla precocità della diagnosi, ma soprattutto all'accuratezza della tipizzazione, fondamentale per l'avvio di una terapia eziopatogenetica mirata.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Il corretto approccio diagnostico-terapeutico alle amiloidosi (figura 1) si basa pertanto sul seguente ordine di provvedimenti:

- massima attenzione ai dati anamnestici, clinici e laboratoristici che devono indurre il sospetto di malattia;
- perseguimento della diagnosi istologica;
- individuazione del tipo di amiloide in causa;
- definizione dell'estensione di malattia (tipologia e numero di organi/apparati coinvolti; quantificazione dell'entità del danno d'organo sulla base di indicatori predefiniti);
- instaurazione della necessaria terapia di supporto;
- avvio della terapia patogenetica (laddove esistano più opzioni terapeutiche, occorre preventivamente stratificare i pazienti in classi di rischio al fine di orientare ogni singola scelta verso il trattamento dotato del miglior rapporto efficacia/tossicità).

Si raccomanda in modo particolare di **non avviare alcuna chemioterapia prima che non sia stato identificato con certezza il tipo di amiloidosi** in causa e che non siano stati ottenuti sia i parametri necessari per la valutazione del rischio, sia i parametri basali di riferimento per la successiva valutazione della risposta e quindi dell'efficacia del trattamento impostato.

TABELLA 1: elenco delle forme di amiloidosi finora individuate (da Sipe JD et al, Amyloid 2012 - modificata)

PROTEINA	PRECURSORE	SISTEMICA	SINDROME	ORGANI o TESSUTI COINVOLTI
AMILOIDE		o LOCALIZZATA		
1. AL	Cat. leggere Ig	S,L	Primaria o associata a discrasie plasmacellulari	Rene, cuore, fegato, SNA, SNP
2. AH	Cat. pesanti Ig	S,L	Primaria o associata a discrasie plasmacellulari	Rene, cuore, fegato, SNA, SNP
3. AA	ApoAA sierica	S	Reattiva a flogosi cronica	Rene, fegato, SNA
4. Aβ2M	β2microglobulina, wild type β2microglobulina variante	S S	Acquisita (dializzato cronico) Familiare	Sistema muscolo-scheletrico SNA
5. ALect2	Fatt. chemiot. leucocitario 2	S	Acquisita sporadica	Rene
6. ATTR	Transtiretina wild type Transtiretina variante	S,L S	Acquisita senile Familiare	Cuore, distretti tenosinoviali SNP, cuore, SNA, occhio, leptomeninge
7. AApoA-I	Apolipoprot A-I	S	Familiare	Fegato, rene, cuore, testicoli, SNP, laringe
8. AApoA-II	Apolipoprot A-II	S	Familiare	Rene, cuore
9. AApoA-IV	Apolipoprot A-IV	S	Sporadica senile	Rene, cuore
10. AGel	Gelsolina	S	Familiare (finnica)	SNP, nervi cranici, cute, cornea
11. ALys	Lisozima	S	Familiare	Rene, fegato, milza, coagulazione
12. AFib	Catena alfa fibrinogeno	S	Familiare	Rene
13. ACys	Cistatina C	S	Familiare	SNP, cute
14. ABri	ABriPP	S	Demenza familiare	SNC
15. ADan	ADanPP	L	Demenza familiare	SNC
16. Aβ	AβPP wild type AβPP variante	L L	Malattia di Alzheimer Familiare	SNC SNC
17. AprP	Proteina prionica wild type Proteina prionica variante	L L	Encef. spongiforme acquisita Encef. spongiforme familiare	SNC SNC
18. ACal	Procalcitonina	L	Tumori tiroidei a cellule C	Tiroide
19. AIAPP	Islet amyloid polypeptide	L	I. di Langherans; insulinomi	Pancreas
20. AANF	Fatt. natriuretico atriale	L	Atri cardiaci	Cuore
21. APro	Prolattina	L	Invecch. ipofisi; prolattinoma	Ipo-fisi
22. AIns	Insulina	L	Iatrogena	Sedi di iniezione
23. ASPC	Proteina surfactante polmone	L	Acquisita	Polmone



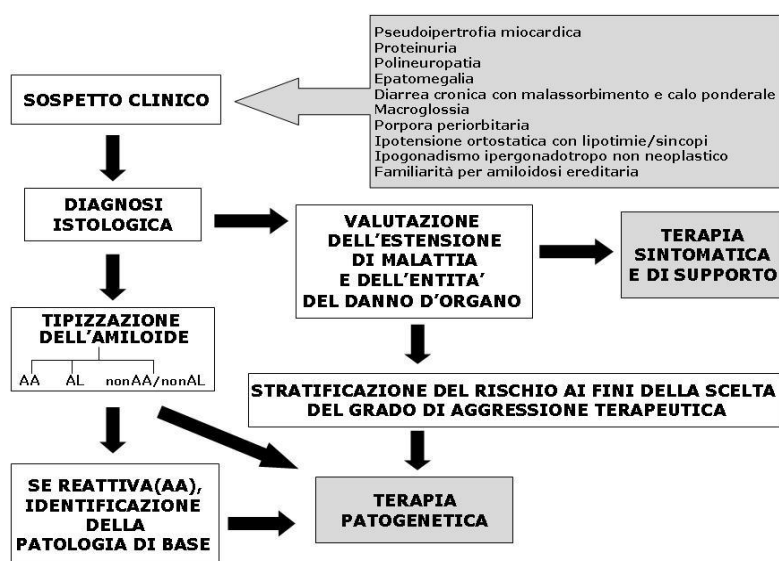
Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

24. AGal7	Galectina 7	L	Acquisita	Cute
25. ACor	Corneodesmina	L	Acquisita	Epitelio corneale, follicoli piliferi
26. AMed	Lactaderina	L	Senile	Aorta (media)
27. AKer	Cherato-epitelina	L	Familiare	Cornea
28. ALac	Lattoferrina	L	Familiare	Cornea
29. AOaap	Odont.amelablast ass.prot	L	T. odontogeni di Pindborg	Mascella, mandibola
30. ASem1	Semenogelina 1	L	Senile	Vescicole seminali

La [tabella 1](#) riporta l'elenco delle 30 proteine sinora identificate come responsabili della formazione di fibrille di sostanza amiloide, la rispettiva sigla identificativa ed i principali quadri clinici da esse derivanti. Si evidenzia così l'esistenza di forme sistemiche (quando almeno due siti del corpo sono coinvolti) e di forme localizzate, ma anche di forme familiari e di forme acquisite; tra queste ultime si distinguono poi forme primitive, forme reattive e forme senili.

2. RACCOMANDAZIONI DIAGNOSTICO TERAPEUTICHE

FIGURA 1: algoritmo diagnostico-terapeutico per le amiloidosi



CRITERI DI ACCESSO AL PERCORSO E INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO

Criteri di accesso al percorso diagnostico

Il sospetto diagnostico di amiloidosi deve essere posto in presenza di uno o più tra i segni clinico-laboratoristici a seguito elencati:

1. ipertrofia ventricolare a distribuzione uniforme (anche a carico della parete libera del ventricolo destro) all'esame ecocardiografico, in assenza di significativa ipertensione, valvulopatia, cardiopatia congenita, anamnesi di attività fisica/sportiva intensa, anamnesi di cardiomiopatia ipertrofica o altre cause; la presenza di disfunzione diastolica con pattern restrittivo rafforza il sospetto diagnostico; "late enhancement" alla RMN con gadolinio (la presenza di aumentata ecoriflettenza miocardica e/o di bassi voltaggi periferici all'ECG rafforza il sospetto diagnostico);
2. proteinuria glomerulare, con o senza insufficienza renale (la presenza di iperecogenicità parenchimale con aumentata volumetria renale rafforza il sospetto);
3. neuropatia periferica assonale, prevalentemente sensitiva (specie termica e dolorifica, anche con ENG negativa), associata a sintomi disautonomici, rapidamente ingravescente;
4. epatomegalia senza lesioni focali, con incremento degli indici di colestasi;
5. diarrea cronica con malassorbimento e calo ponderale;
6. macroglossia;
7. porpora periorbitaria e/o alla base del collo;
8. ipotensione ortostatica con episodi lipotimici e/o sincopali;
9. ipogonadismo ipergonadotropo con ingrossamento testicolare (dopo esclusione di patologia proliferativa);
10. familiarità positiva per amiloidosi ereditaria.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

I successivi accertamenti, necessari a confermare o escludere l'ipotesi diagnostica di amiloidosi, possono essere prescritti, nelle regioni Piemonte e Valle d'Aosta, dopo il rilascio di un'esenzione temporanea, della durata massima di un anno, con il codice RCG130. Tutti gli accertamenti citati nel presente documento possono essere eseguiti in regime di esenzione ticket; tutte le terapie citate, salvo quelle somministrate in regime ospedaliero e quelle previste per le forme AA non associate a malattie autoinfiammatorie, sono riportabili nel piano terapeutico per malattia rara.

Altri indizi clinici, non indispensabili ai fini della motivazione dell'avvio di indagini di approfondimento, ma che, associati a uno dei suddetti criteri, rafforzano il sospetto diagnostico, sono rappresentati da:

- età adulta;
- presenza di astenia e/o calo ponderale e/o disgeusia e/o impotenza;
- presenza di una componente monoclonale sierica e/o urinaria all'immunofissazione e/o di un alterato rapporto κ/λ alla determinazione delle catene leggere libere (FLC) nel siero, con o senza diagnosi di mieloma;
- presenza di patologie croniche associate a segni di flogosi persistente;
- presenza di familiarità per cardiomiopatia o nefropatia o neuropatia periferica.

Inquadramento diagnostico

La diagnosi di amiloidosi è istologica e si fonda sull'identificazione dei depositi tissutali di amiloide all'indagine in microscopia ottica e/o ultrastrutturale. Gli accertamenti istologici idonei al perfezionamento della suddetta diagnosi sono, in ordine di invasività:

- agoaspirato o prelievo chirurgico del grasso periombelicale;
- biopsie tissutali (agobiopsia delle ghiandole salivari minori labiali; biopsia rettale);
- biopsie degli organi che mostrano segni clinici e/o laboratoristici di probabile coinvolgimento.

Poiché la sensibilità diagnostica di quelli ai primi due punti non raggiunge il 100% e varia secondo il tipo di amiloidosi (sistemica o isolata d'organo), in caso di loro negatività, con persistenza di indizi clinici suggestivi per amiloidosi (compresi tra quelli elencati nel precedente paragrafo), è necessario perseverare nella ricerca ricorrendo alla biopsia dell'organo coinvolto, peraltro non prima di aver considerato e quantificato l'eventuale rischio emorragico della manovra. In particolare, in caso di sospetto interessamento renale, la biopsia di quest'organo è caldamente raccomandata.

Inoltre le forme familiari di amiloidosi richiedono spesso una biopsia di organi parenchimatosi o della sottomucosa poiché la sensibilità dell'aspirato e della biopsia chirurgica del grasso periombelicale risulta inadeguata (in alcuni casi persino inferiore al 60% [7]).

Diagnosi istologica

- **Microscopia ottica:** la diagnosi si basa sull'identificazione di materiale amorfo positivo alle colorazioni specifiche per l'amiloide. La colorazione attualmente più in uso è quella con il Rosso Congo che all'osservazione in luce polarizzata mostra in corrispondenza dei depositi una caratteristica birifrangenza verde mela. L'utilizzo della colorazione con Thioflavina T (da valutare al microscopio a fluorescenza) è utilizzata nei casi di dubbia positività alla colorazione con il Rosso Congo. Vista la variabilità dei risultati talora ottenuti, e l'importanza di avere una corretta diagnosi istologica, sono auspicabili la standardizzazione delle metodiche e il raggiungimento di un'uniformità regionale nell'allestimento e nella lettura dei preparati colorati con il Rosso Congo da ottenersi mediante l'organizzazione di specifici corsi di aggiornamento teorico-pratici e di periodiche verifiche esterne di qualità a carattere regionale e interregionale.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

- **Microscopia elettronica:** la diagnosi si basa sul riconoscimento della caratteristica struttura fibrillare della sostanza amiloide (fibrille variamente intrecciate del diametro di 8-10 nm). L'indagine ultrastrutturale è riservata ai casi in cui permane un dubbio diagnostico sulla base delle precedenti valutazioni.

Tipizzazione dell'amiloide

Una volta istologicamente diagnosticata la malattia, è indispensabile l'esatta identificazione della proteina amiloideogenica che ne è alla base, poiché da ciò dipende la corretta scelta del trattamento.

Tale identificazione deve basarsi sulla caratterizzazione diretta dei depositi, poiché il rischio di errore nella definizione della natura della malattia non è trascurabile qualora si decida di affidarsi solo alla coesistenza di indizi anamnestici e/o sierologici: accade infatti con una certa frequenza che, in uno stesso paziente, concomitano segni fuorvianti ascrivibili a più potenziali cause di amiloidosi (ad esempio la presenza di una gammopatia monoclonale in corso di patologie infiammatorie croniche o in corso di mutazioni della transtiretina o di altre proteine potenzialmente amiloidogeniche).

La caratterizzazione dei depositi può essere effettuata con tecniche immunoistochimiche con anticorpi anti componenti P e A della sostanza amiloide, anti catene leggere kappa e lambda e anti- transtiretina (non sono attualmente disponibili anticorpi contro le altre proteine che possono rappresentare il precursore delle altre forme di amiloidosi familiari ed acquisite).

Sebbene per alcuni anticorpi (anti-componente A e anti-transtiretina) l'indagine possa essere effettuata anche sul materiale incluso per l'indagine in microscopia ottica (con tecniche di immunoperoxidasi) la migliore specificità e sensibilità si ottiene se effettuata su materiale congelato con tecniche di immunofluorescenza.

In definitiva, la tipizzazione può essere considerata corretta quando ricorra una delle seguenti eventualità:

- riscontro di positività per la componente P (componente comune a tutti i tipi di amilode) e per la componente A → amiloidosi AA;
- riscontro di positività per la componente P (componente comune a tutti i tipi di amilode) e per le catene leggere kappa o lambda → amiloidosi AL;
- riscontro di positività per la componente P (componente comune a tutti i tipi di amilode) e per transtiretina, in presenza di mutazioni del gene per la transtiretina → amiloidosi familiare da transtiretina mutata;
- riscontro di positività per la componente P (componente comune a tutti i tipi di amilode) e per transtiretina in assenza di mutazioni del gene per la transtiretina → amiloidosi senile da transtiretina "wild type";
- riscontro di positività per la componente P (componente comune a tutti i tipi di amilode) e negatività per la componente A, le catene leggere e la transtiretina → amiloide da altro precursore proteico.

In quest'ultimo caso l'identificazione della proteina amiloidogenica potrebbe essere effettuata:

- mediante microdissezione laser dei depositi e successiva analisi proteomica basata sulla spettrometria di massa. La richiesta di effettuazione dell'analisi proteomica dovrà essere effettuata dall'anatomo patologo e dal clinico. Il Centro di Coordinamento della Rete per le Malattie Rare del Piemonte e della Valle d'Aosta fornirà tutte le informazioni necessari per la preparazione e l'invio del campione.
- mediante valutazione genetica delle mutazioni

Rimane dubbia l'affidabilità del pre-trattamento dei preparati Rosso Congo-positivi con permanganato di potassio al fine di discriminare le forme AA e familiari che perdono la suddetta positività al Rosso Congo (cosiddette permanganato-sensibili) da quelle AL che la mantengono (cosiddette permanganato-resistenti).



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Modalità di trattamento dei campioni per la diagnosi e la tipizzazione dell'amiloide

Per una ottimale valutazione i campioni tissutali dovrebbero essere inviati al laboratorio di Anatomia Patologica in soluzione fisiologica o PBS (soluzione di tampone fosfato 0,1 M ph=7,3) dove saranno suddivisi secondo le seguenti modalità

- agoaspirato del grasso periombelicale
 - una parte fissata per la microscopia ottica
 - una parte fissata per la microscopia elettronica
- prelievo chirurgico del grasso periombelicale
 - una parte fissata per la microscopia ottica
 - una parte fissata per la microscopia elettronica
 - una parte congelata
- biopsie tissutali (agobiopsia delle ghiandole salivari minori labiali; biopsia rettale);
 - una parte fissata per la microscopia ottica
 - una parte fissata per la microscopia elettronica
 - una parte congelata
- biopsie degli organi che mostrano segni clinici e/o laboratoristici di probabile coinvolgimento
 - una parte fissata per la microscopia ottica
 - una parte fissata per la microscopia elettronica
 - una parte congelata

VALUTAZIONE DEL GRADO DI ESTENSIONE DI MALATTIA: RICERCA DEL DANNO D'ORGANO E SUA QUANTIFICAZIONE CLINICA, LABORATORISTICA E STRUMENTALE

Come già detto, la valutazione basale del grado di estensione di malattia e dell'entità del danno d'organo è essenziale ai fini di una successiva corretta formulazione del giudizio sulla validità della risposta e sull'efficacia del trattamento impostato. Nella tabella 2 sono riassunti i principali parametri clinici, laboratoristici e strumentali necessari per la quantificazione del danno negli organi ed apparati più frequentemente coinvolti.

TABELLA 2: parametri utili per l'identificazione e la quantificazione del danno d'organo nell'amiloidosi sistemica

ORGANO/APPARATO	SINTOMI CLINICI	PARAMETRI LABORATORISTICI	ESAMI STRUMENTALI
Aspetti ematologici (AL)		QPE siero e urine, sFLC con ratio κ/λ	aspirato midollare
Aspetti sierologici (AA) (A β 2M)	legati a malattia di base s. del tunnel carpale artrite - cisti ossee	SAA, PCR β 2microglobulina	Rx, TC, RM
Rene	edemi	creatinina, GFR, proteinuria 24h	ecografia
Cuore	astenia - affaticamento dispnea - edemi	BNP/NTproBNP, troponine	ECG, ECG holter, ecocardio, cardioRM, Tc99DPD-scinti
Sistema nervoso periferico e autonomo	parestesie arti inferiori ipotensione ortostatica disfunzione erettile gastroparesi - diarrea		EMG Prove disautonomiche (Tilt Table Test / RR-index)
Fegato	epatomegalia	ALT, AST, ALP	ecografia
Apparato digerente	macroglossia - nausea vomito - calo ponderale		
Apparato riproduttivo maschile	sterilità	testosterone, SHBG, FSH, LH	



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Crasi ematica e coagulazione

astenia, emorragie

emocromo con formula, PT, PTT,
fattore X

Aspetti ematologici relativi all'amiloidosi AL

Il *quadro proteico elettroforetico (QPE) con immunofissazione* consente l'identificazione e la quantificazione di eventuali componenti monoclonali sieriche e urinarie.

La determinazione su siero delle *catene leggere libere circolanti* (sFLC) consente, oltre che la quantificazione dei loro livelli, la valutazione della *ratio kappa/lambda* e il *calcolo della differenza tra FLC amiloidogenetica e FLC non amiloidogenetica* (kappa - lambda oppure lambda - kappa).

Esistono due produttori di reagenti per la determinazione delle sFLC: The Binding Site (Birmingham, Regno Unito) e Siemens Healthcare (Marburg, Germania); entrambi i metodi immunometrici, utilizzando anticorpi contro epitopi nascosti dell'immunoglobulina intera, consentono di misurare la catene leggera libera, ma, poiché gli anticorpi impiegati nel primo caso sono policlonali e quelli impiegati nel secondo caso sono monoclonali, i loro valori di riferimento sono differenti:

- **Binding Site** catene κ 3.3-19.4 mg/L, catene λ 5.7-26.3 mg/L, ratio κ/λ 0.26-1.65.
- **Siemens** catene κ 6.7-22.4 mg/L, catene λ 8.3-27.0 mg/L, ratio κ/λ 0.31-1.56.

Data la particolare delicatezza del dosaggio si raccomanda il riferimento a Laboratori certificati che si sottopongano periodicamente ad esercizi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) anche per questi dosaggi. Si raccomanda inoltre, una volta iniziato il dosaggio presso un Laboratorio, che il confronto fra livelli di sFLC pre e post trattamento avvenga tra dosaggi eseguiti sempre con lo stesso metodo e nella stessa struttura.

L'*aspirato midollare*, infine, consente la quantificazione dell'infiltrato plasmacellulare (valore di riferimento < 5%) potendo così fornire anche utili elementi ai fini dell'eventuale distinzione tra amiloidosi AL primitiva e amiloidosi AL in corso di mieloma multiplo.

Aspetti sierologici relativi all'amiloidosi AA

In questa forma di amiloidosi è indicata la quantificazione della PCR, ma soprattutto dei livelli di *siero amiloide A*, che è il precursore amiloidogenetico, che vanno mantenuti al di sotto dei 10 mg/L (vedasi oltre nel paragrafo sull'amiloidosi AA). Anche in questo caso è consigliabile che il follow-up di malattia si avvalga di un confronto tra dosaggi provenienti sempre dal medesimo Laboratorio.

Danno d'organo (relativo a qualunque forma di amiloidosi)

Gli organi più frequentemente coinvolti in corso di amiloidosi sistemica sono, nell'ordine, rene e cuore; seguono sistema nervoso periferico ed autonomo, fegato, milza, apparato gastroenterico e apparato riproduttivo, che hanno percentuali di coinvolgimento inferiori, e comunque variabili in funzione delle diverse tipologie di amiloidosi. Altri organi talora coinvolti, anche se con frequenza nettamente inferiore, sono: *cute*, *articolazioni*, *tiroide*, *linfonodi*, *polmone*, *sistema nervoso centrale* e *tessuti molli* (sindrome del tunnel carpale; ecchimosi periorbitarie da rottura spontanea delle pareti dei piccoli vasi, resi più fragili dalla presenza di depositi di amiloide: fenomeno infrequente, ma patognomico).

- Il *coinvolgimento renale* è presente nella maggior parte delle forme di amiloidosi sistemica, consegue alla deposizione di sostanza amiloide in sede glomerulare e consiste nello sviluppo di una proteinuria che raggiunge e supera progressivamente la soglia del range nefrosico, con o senza edemi, associandosi a successiva comparsa di insufficienza renale; il quadro ecografico è caratterizzato da iperecogenicità parenchimale tipicamente associata ad aumento della volumetria renale. Fa eccezione il coinvolgimento renale in corso di amiloidosi Apo-AI, senza proteinuria, e con insufficienza renale lenta e tardiva, che consegue invece a deposizione di amiloide in sede tubulo-interstiziale (midollare) con glomeruli indenni.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

- Il coinvolgimento cardiaco, si osserva, in ordine decrescente di frequenza, nella forma AL, in alcune forme familiari (ATTR, AApoA1), nella forma senile da transtiretina wild type e più raramente anche nella forma AA. Esso si associa ad aumentati livelli di NT-proBNP o di BNP e ad aumento della troponina; poiché, anche in questo caso, vi sono differenze sui valori di riferimento a seconda del tipo di macchina con la quale il dosaggio è stato eseguito, si consiglia di rivolgersi sempre al medesimo Laboratorio tenendo in considerazione i valori soglia da esso suggeriti. Il coinvolgimento cardiaco si estrinseca inoltre con ispessimento delle pareti, del setto IV (>12mm) e della parete libera del ventricolo dx (>5mm), con iperriflettenza ed aspetto "granuloso" del miocardio, con comparsa, in risonanza magnetica, del cosiddetto fenomeno del "late enhancement" e, nelle fasi avanzate, con una cardiomiopatia ipertrofica tipicamente associata a bassi voltaggi elettrocardiografici. L'ECG-holter può inoltre rilevare blocchi atrio-ventricolari di vario grado, fibrillazione atriale e aritmie ventricolari complesse e ripetitive. Di particolare rilievo diagnostico la positività della scintigrafia cardiaca con Tc99-difosfonato che interviene in modo esclusivo nella forma senile di amiloidosi cardiaca.
- Il coinvolgimento del sistema nervoso periferico ed autonomo è il sintomo predominante in alcune forme familiari ove è caratterizzato da quattro differenti presentazioni cliniche: la FAP tipo I (ATTR) che si caratterizza per una polineuropatia sensitivo-motoria ed autonoma ad esordio sensitivo o/e disautonomico, cioè con disturbi della sensibilità distali agli arti inferiori, ipotensione ortostatica, disturbi della motilità intestinale (gastroparesi e diarrea) e disfunzione erettile; FAP tipo II (ATTR) che esordisce con sindrome del tunnel carpale e si complica dopo 4-5 anni con una polineuropatia sensitivo-motoria generalmente più severa agli arti superiori; FAP tipo III (da ApoAI) in cui la polineuropatia sensitivo-motoria ed autonoma si accompagna ad un precoce e più severo coinvolgimento cardiaco e renale; FAP tipo IV (AGel) che si caratterizza per un precoce e prevalente interessamento dei nervi cranici con sintomi quali diplegia facciale, atrofia linguale, ipotrofia dei muscoli trapezio e sternocleidomastoideo.
- Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale è raro e caratterizzato da emorragie cerebrali spontanee ricorrenti. È tipo delle forme da Aβeta e ACys, mentre è raro nelle forme da ATTR e AGel.
- Il coinvolgimento epatico e splenico consiste in organomegalia ecograficamente ben documentabile, con movimento enzimatico correlato ad epatopatia colestatica.
- Il coinvolgimento dell'apparato digerente, meno frequente, è caratterizzato da macroglossia, nausea e vomito.
- Il coinvolgimento dell'apparato riproduttivo maschile, caratteristico della forma da ApoA-I, si estrinseca con sterilità e va indagato mediante studio del profilo andrologico e della spermatogenesi.
- A causa dell'attitudine dei depositi tissutali di amiloide ad adsorbire il fattore X, è possibile lo sviluppo di deficit coagulativi: nel paziente con sospetta amiloidosi, soprattutto prima di procedere a qualunque biopsia d'organo, è pertanto fortemente raccomandato che si provveda ad un attento studio della coagulazione.

AMILOIDOSI FAMILIARI: INDAGINI GENETICHE E TRATTAMENTO

Le forme familiari rappresentano il 10-15% di tutte le amiloidosi. Esse derivano da varianti geneticamente trasmesse di alcune proteine e sono tutte autosomiche dominanti.

Hanno decorso meno aggressivo e sviluppo più lento (età adulta) rispetto alle amiloidosi AL, con sopravvivenza media più lunga.

La diagnosi di amiloidosi familiare si fonda, in aggiunta all'eventuale dato anamnestico familiare positivo, sulla caratterizzazione dei depositi di amiloide e sulla dimostrazione di una mutazione patologica in uno dei geni che codificano per transtiretina, fibrinogeno, apolipoproteina A-I, apolipoproteina A-II, lisozima, gelsolina o cistatina C.

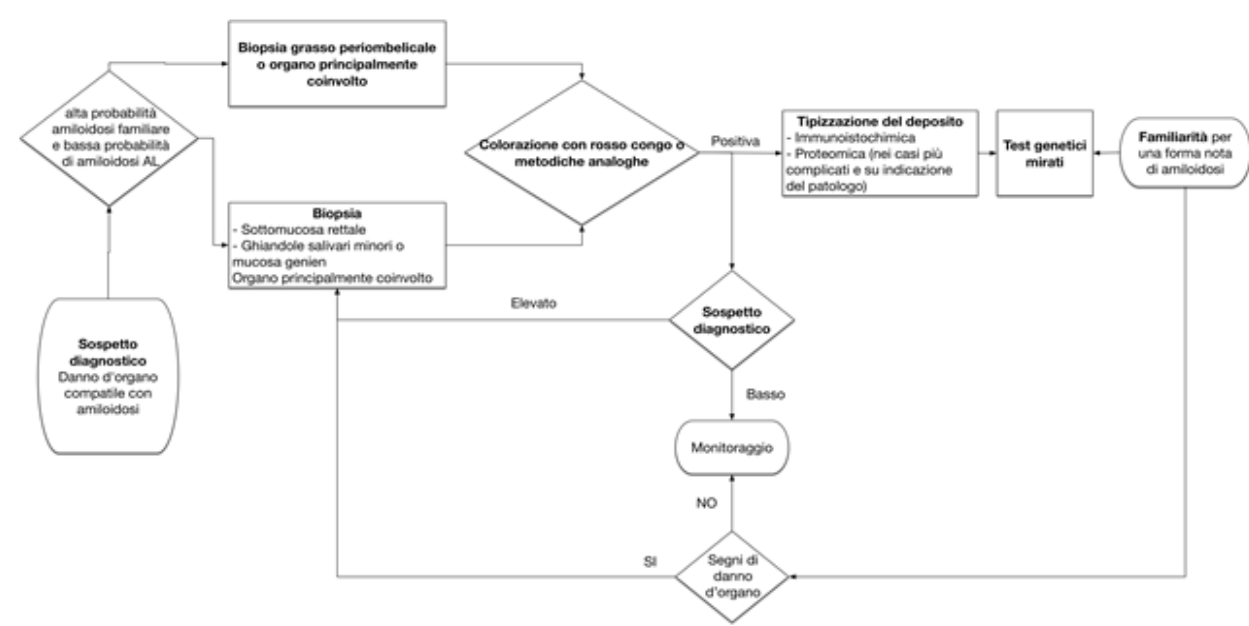
La clinica, nonché la tipologia di organi e apparati coinvolti sono di aiuto per orientare le ricerche nella giusta direzione, senza che si renda necessario cercare la mutazione contemporaneamente in tutti i geni elencati: ad esempio l'esordio con neuropatia periferica depone più per ATTR, la presenza di cardiopatia per ATTR o AApoAI, la presenza di proteinuria per AFib, quella di epatopatia colestatica per AApoAI.

Le sedi ove in Piemonte è possibile effettuare i suddetti test genetici sono rispettivamente: AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (per ATTR e AApoA1), AOU Maggiore della Carità di Novara (per AApoA2, ALys e AFib), Istituto Auxologico di Piancavallo (per ATTR, ACys e AGel).

Le indagini genetiche supportano anche la diagnosi delle forme di amiloidosi reattiva (AA) secondarie a sindromi autoinfiammatorie croniche ereditarie caratterizzate da febbri ricorrenti.

Per la prescrizione del test genetico, l'informazione e acquisizione del consenso al trattamento dei dati genetici e del campione biologico, si rimanda al modulo allegato. Il modulo dovrà essere inviato al laboratorio insieme al prelievo in EDTA (tre provette tappo viola, EDTA, conservate a 4-8°C), e a una breve descrizione clinica del probando.

Figura 2: Flowchart diagnostica nel sospetto di amiloidosi familiare [8]



Un corretto approccio alla diagnosi di amiloidosi familiare richiede:

- l'accertamento della presenza di depositi amiloidi
- la corretta tipizzazione dei depositi amiloidi con l'uso di metodiche immunoistochimiche, di immunogold e, se necessario, proteomiche (cfr. paragrafo "La tipizzazione dell'amiloide")
- la richiesta di test genetici va effettuata in maniera mirata basandosi o sulla presenza di familiari in cui è già nota la presenza di una specifica mutazione o sull'attenta analisi di tutti i dati clinici, di laboratorio e istologici. I test genetici risultano infatti costosi e, se effettuati su soggetti in cui la probabilità a priori di una specifica forma di amiloidosi risulta bassa possono fornire dei risultati fuorvianti (falsi positivi, presenza di polimorfismi non necessariamente associati allo sviluppo di amiloidosi)
- l'approfondita valutazione familiare, anche mediante counseling genetico, per l'eventuale effettuazione di valutazioni prenatali o preconcezionali e per la diagnosi di forme presintomatiche nei familiari. Una diagnosi dei portatori presintomatici è particolarmente



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

importante nelle forme, tipo l'amiloidosi ATTR, in cui sono possibili dei trattamenti in grado di rallentare o impedire la formazione di depositi amiloidi.

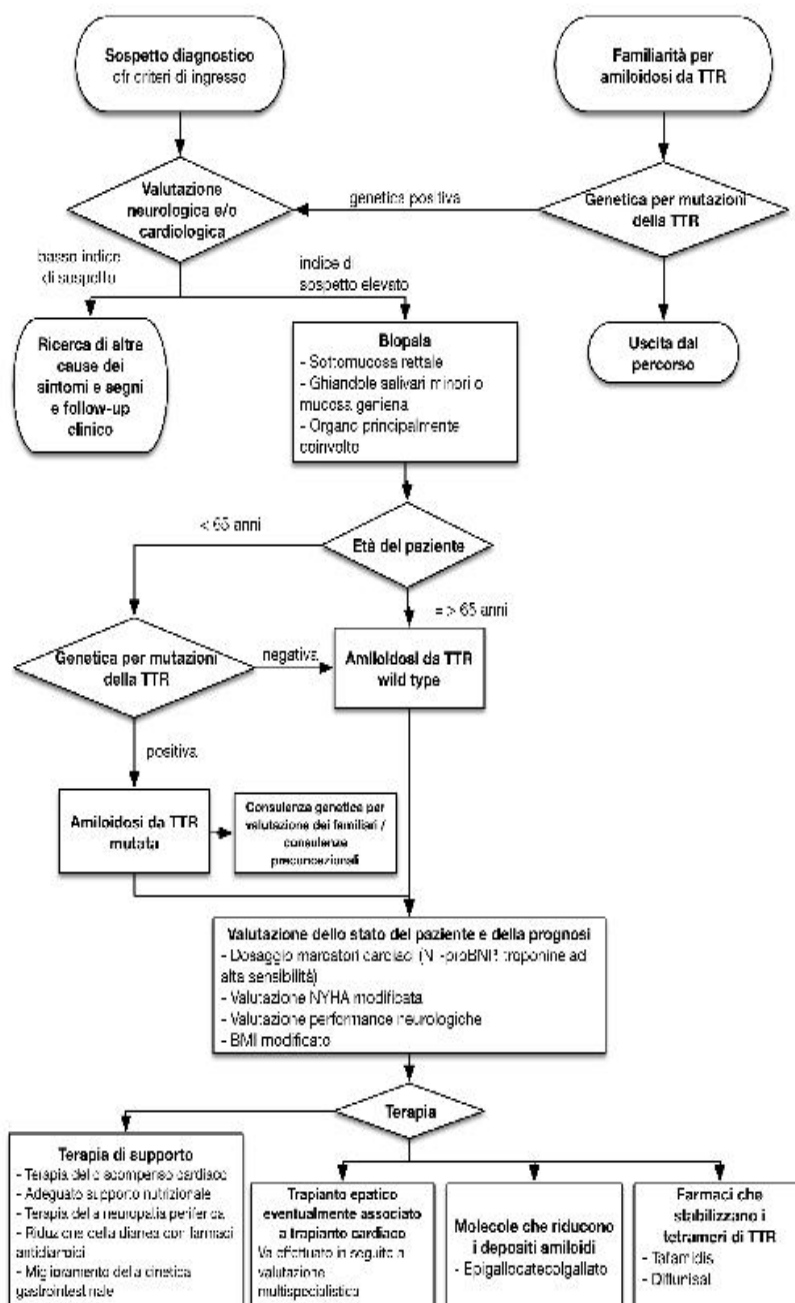
La [tabella 3](#) elenca i principali organi coinvolti nelle diverse forme di amiloidosi familiare e rappresenta un ausilio per il percorso diagnostico dei pazienti.

La maggior parte delle forme di amiloidosi familiare presenta un coinvolgimento multiorganico mentre le forme localizzate risultano più rare.

Le indagini genetiche supportano anche la diagnosi delle forme di amiloidosi reattiva (AA) secondarie a sindromi autoinfiammatorie croniche ereditarie caratterizzate da febbri ricorrenti (cfr. paragrafo dedicato).

Tabella 3: principali forme di amiloidosi familiare sistemica

Proteina mutata	Trasmissione	Principali organi coinvolti e manifestazioni cliniche	Sede di esecuzione del test genetico
Transtiretina	AD	Sistema nervoso periferico, apparato cardiovascolare, apparato gastroenterico, rene (in alcune mutazioni)	AOU Città della Salute e della Scienza, Istituto Auxologico di Piacavallo
Apolipoprotein a AI	AD	Sistema nervoso periferico, rene, fegato, cuore, laringe, cute. Lo spettro del coinvolgimento d'organo è variabile a seconda del tipo di mutazione	AOU Città della Salute e della Scienza
Gelsolina	AD	Sistema nervoso periferico, cornea	Istituto Auxologico di Piacavallo
Cistatina C	AD	Emorragie cerebrali	Istituto Auxologico di Piacavallo
Fibrinogeno A	AD	Rene, sistema nervoso periferico	AOU Maggiore della Carità di di Novara
Lisozima	AD	Rene, sistema gastrointestinale, petecchie	AOU Maggiore della Carità di di Novara
Apolipoprotein a AII	AD	Nefropatia	AOU Maggiore della Carità di di Novara

Amiloidosi familiare da Transtiretina (ATTR)
Flowchart del percorso per le amiloidosi da TTR (familiari o senili)


L'amiloidosi da transtiretina è la forma più comune di amiloidosi ereditaria. Le mutazioni note sono circa 120 e correlano con fenotipi diversi, nella maggior parte dei casi caratterizzati da depositi amiloidi a livello del sistema nervoso periferico ed autonomo e nel cuore. Meno frequentemente si osserva un coinvolgimento del vitreo e delle meningi e molto raramente un coinvolgimento renale. La transtiretina è prodotta



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

principalmente dal fegato ma una piccola quota è prodotta a livello dell'epitelio pigmentato retinico e dei plessi coroidei.

Le mutazioni presenti in un numero elevato di famiglie sono poche. La mutazione più frequente è la Val30Met che si associa prevalentemente a neuropatia. Altre mutazioni relativamente frequenti associate a un prevalente coinvolgimento cardiaco sono la Val122Ile, la Ile68Leu, la Thr60Ala, e la Leu111Met.

La penetranza della malattia è molto variabile e quindi molti casi possono apparire sporadici pur non essendolo. A causa di questi problemi, spesso le amiloidosi da transtiretina non sono diagnosticate o sono diagnosticate scorrettamente con un conseguente ritardo diagnostico e nel trattamento.

In Italia esistono alcune zone di endemia nella zona di Noto in Sicilia e nel saviglianese.

Oltre alle forme familiari di amiloidosi da TTR è possibile il deposito di TTR "wild type" che dà origine a forme senili sistemiche (SSA) che colpiscono principalmente i soggetti di sesso maschile dopo la 6° decade di età. Queste forme coinvolgono primariamente il miocardio, ma formano depositi amiloidi anche nei vasi, a livello polmonare, e del tunnel carpale. Alcuni dati biotipici indicano che il 25% degli ultra ottantenni sia affetto da SSA. La progressione delle amiloidosi secondarie al deposito di TTR "wild type" è più lento di quello secondario alle forme familiari (cfr. paragrafo 10).

Criteri di ingresso:

- Storia familiare di neuropatia, soprattutto se associata a scompenso cardiaco
- Dolore neuropatico o disturbi della sensibilità di eziologia non nota
- Sindrome del tunnel carpale senza cause apparenti, soprattutto se bilaterale
- Disturbi della motilità gastrointestinale o disfunzioni autonome di eziologia non nota (es. disfunzione erettile, ipotensione ortostatica, vescica neurologica)
- Patologia cardiaca (spesso associata a scompenso cardiaco) con ispessimento delle pareti ventricolari in assenza di ipertensione
- Blocchi atrio-ventricolari avanzati di origine non chiara, soprattutto se associati a ispessimento delle pareti cardiache
- Inclusi vitreali del tipo a fiocco di cotone

Esami da effettuare al momento del sospetto diagnostico

- Valutazione neurologica
 - o Visita neurologica
 - o Elettromiografia
 - o Valutazione della risposta simpatica cutanea
 - o Test autonomici indicati dallo specialista neurologo in presenza di specifici sintomi e segni di presentazione
- Valutazione cardiologica
 - o Visita cardiologica
 - o ECG,
 - o Ecocardiogramma (cfr. paragrafo dedicato all'interno delle raccomandazioni)
 - o Dosaggio di NT-pro-BNP e delle troponine ad alta sensibilità
 - o Holter ECG
 - o Risonanza magnetica cardiaca: in casi selezionati sulla base della valutazione cardiologica
 - o Scintigrafia cardiaca con Tc99-DPD
- Biopsia della sottomucosa rettale, delle ghiandole salivari minori o degli organi coinvolti. La biopsia del grasso periumbelicale risulta spesso negativa nelle amiloidosi da transtiretina. Nei pazienti con i tipici segni di malattia, soprattutto se provenienti da zone di endemia un risultato biotipico negativo non esclude la diagnosi di malattia ed occorre comunque procedere all'analisi genetica.
- Analisi genetica nelle forme familiari o nelle forme sporadiche insorte prima della 6° decade. In Piemonte e Valle d'Aosta i test genetici per l'amiloidosi TTR sono effettuati presso la Città della Scienza e della Salute di Torino e presso l'Istituto Auxologico di Piancavallo – Sede di Verbania



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Una volta effettuata la diagnosi occorre procedere con la valutazione del **performance status del paziente** per stabilire **l'approccio terapeutico più adeguato e la prognosi** del paziente.

- Test neurologici (es. test disautonomici, tilting test, etc.)
- Dosaggio di NT-pro-BNP e delle troponine ad alta sensibilità
- mBMI: BMI moltiplicato per l'albuminemia in g/l, utilizzato per la valutazione dello stato nutrizionale e dell'eventuale cachessia.

La terapia delle amiloidosi da TTR si basa su tre cardini:

- **Terapia di supporto** e controllo delle principali manifestazioni cliniche
 - Aritmie: impianto di pace-maker o terapia farmacologica
 - Scompenso cardiaco: diuretici, ACE inibitori, ultrafiltrazione peritoneale negli scompensi refrattari.
 - Ipotensione ortostatica: midodrina, elastocompressione arti inferiori
 - Disturbi gastrointestinali: metoclopramide
 - Diarrea severa: loperamide
 - Dolore neuropatico: pregabalin, gabapentin, amitriptilina, duloxetina
 - Sindrome del tunnel carpale: intervento chirurgico
 - Xerostomia: cevimelina
 - Ipoglicemia: assunzione di glucosio
 - Insufficienza renale: diuretici, emodialisi, dialisi peritoneale, ultrafiltrazione
 - Anemia: eritropoietina, ferro, B12, folati
 - Ipotiroidismo: levotiroxina
 - Amiloidosi oculare: vitrectomia, trebeculotomia
- **Terapia per inibire la formazione ed il deposito di sostanze amiloidi**
 - Tafamidis: è un farmaco che permette di stabilizzare i tetrameri di TTR. Gli studi di fase 2/3 hanno mostrato una buona tollerabilità e il possibile rallentamento della progressione di malattia nei pazienti con una malattia allo stadio 1. I principali effetti collaterali sono il possibile peggioramento della diarrea e l'insorgenza di infezioni urinarie e genitali. Il farmaco è approvato in Italia per i pazienti con amiloidosi in stadio 1 e con un coinvolgimento del sistema nervoso mentre non esistono dati a supporto dell'uso nei pazienti con FAP in stadio 2 e 3 o con solo coinvolgimento cardiaco. La prescrizione del farmaco richiede l'inserimento nel registro AIFA dei farmaci orfani.
 - Diflunisal: è un farmaco antiinfiammatorio non steroideo che stabilizza i tetrameri di transtiretina. E' possibile ottenerlo come farmaco estero tramite le farmacie ospedaliere. Sono stati effettuati uno studio di fase 1 uno di fase 2-3 sull'uso del diflunisal. I principali rischi sono connessi ai sanguinamenti gastroenterici e al danno della funzione renale.
 - Docixiclina + acido taurodesossicolic: l'uso combinato della doxiciclina (che riduce la formazione di fibrille) e dell'acido taurodesossicolic (che riduce la deposizione di TTR non fibrillare) hanno dimostrato un effetto sinergico nel ridurre il deposito fibrillare su modelli animali. I risultati di uno studio di fase due open label sono attesi nei prossimi mesi.
 - Trapianto di fegato e/o di cuore: è la principale opzione terapeutica per i pazienti affetti da forme familiari con manifestazioni cliniche lievi o moderate. Va effettuato solo in seguito ad una valutazione multispecialistica del caso clinico. Il trapianto non arresta la formazione di depositi a livello del vitreo e delle leptomeningi.
- **Terapia per rimuovere i depositi amiloidi:** attualmente non esistono terapie approvate che permettano la rimozione dei depositi di ATTR. Sono in corso degli studi sul ruolo dell'epigallocatechingallato che secondo alcuni dati preliminari sembra essere efficace nelle forme da AL e ATTR. Attualmente l'epigallocatechingallato è prodotto come farmaco galenico dall'ASL Città di Torino (Farmacia dell'Ospedale Maria Vittoria di Torino).

AMILOIDOSI AA: IDENTIFICAZIONE E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA DI BASE
TABELLA 4: malattie associate allo sviluppo di amiloidosi reattiva (AA)
modificata)
(da Obici L et al, SMW 2012 -

ARTRITI INFIAMMATORIE	MALATTIE NEOPLASTICHE	SINDROMI AUTOINFIAMMATORIE EREDITARIE
Artrite reumatoide	Malattia di Castleman	Febbre familiare mediterranea
Spondilite anchilosante (syndrome)	Linfoma di Hodgkin	TRAPS (TNF receptor-associated periodic
Morbo di Still dell'adulto	Macroglobulinemia di Waldstrom	Sindrome di Muckle-Wells
Artrite idiopatica giovanile	Leucemia a cellule capellute	Sindrome NOMID/CINCA
Artrite psoriasica	Adenoma epatico	Sindrome da iperIgD
Gotta	Carcinoma a cellule chiare del rene	
	Adenocarcinoma del polmone	VASCULITI SISTEMICHE
MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI	Adenocarcinoma dell'intestino	Malattia di Behçet
Morbo di Crohn	Mesotelioma	Poliarterite nodosa
Rettocolite ulcerosa		Arterite a cellule giganti
	INFEZIONI CRONICHE	Arterite di Takayasu
IMMUNODEFICIENZE EREDITARIE E ACQUISITE	Bronchiectasie infette	Polimialgia reumatica
Immunodeficienza comune variabile	Ostemielite	
Ipgammaglobulinemia	Tubercolosi	CONDIZIONI PREDISPONENTI LO SVILUPPO
Agammaglobulinemia X-linked	Pielonefrite cronica	DI INFEZIONI CRONICHE
Neutropenia ciclica	Lebbra	Fibrosi cistica
HIV/AIDS	Morbo di Whipple	Epidermolisi bullosa
	Ulcere cutanee croniche	Consumo di droghe endovena
ALTRE	Epatite B (?)	By-pass digiuno-ileale
Obesità (?)		Paraplegia
Sarcoidosi		
Sindrome SAPHO		
Sindrome di Schnitzler		

La tabella 4 riporta l'elenco delle malattie neoplastiche, infiammatorie o infettive croniche nel corso delle quali è stata descritta un'associazione con lo sviluppo di amiloidosi AA; tra esse, quelle di cui è più frequente il riscontro e più robusto il sospetto di un ruolo patogenetico sono le artriti croniche e le malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

Attualmente, in seguito all'introduzione di nuovi approcci terapeutici per le malattie sopraindicate, sta aumentando l'incidenza relativa delle amiloidosi secondarie a sindromi autoinfiammatorie di origine monogenica.

In presenza di amiloidosi AA devono quindi essere avviate tutte le indagini anamnestiche, cliniche, laboratoristiche e strumentali necessarie ad identificare la malattia di base: laddove il ruolo patogenetico nell'associazione con l'amiloidosi AA da parte della malattia di base sia fortemente sospetto è raccomandato orientare nei confronti di quest'ultima tutti i successivi provvedimenti, medici o chirurgici, finalizzati ad ottenere il controllo del processo flogistico/infettivo, o la rimozione chirurgica della neoplasia di partenza. In questi casi, la scelta della terapia ottimale varia quindi necessariamente in funzione della malattia di base,



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

avendo come minimo comune denominatore l'obiettivo di mantenere la concentrazione della proteina di fase acuta siero amiloide A (SAA), che è anche il precursore amiloidogenetico, al di sotto dei 10 mg/L: questa è infatti la soglia al di sotto della quale si è osservata regressione dei depositi tissutali di amiloide AA e recupero funzionale degli organi colpiti. L'amiloidosi AA colpisce il rene nel 90% dei casi esordendo tipicamente con manifestazioni proteinuriche

AMILOIDOSI AA SECONDARIE A SINDROMI AUTOINFIAMMATORIE

Le sindromi autoinfiammatorie sistemiche rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di amiloidosi AA. Le forme di amiloidosi secondarie a sindromi autoinfiammatorie familiari sono generalmente distinte dalle amiloidosi familiari in quanto le mutazioni non colpiscono delle proteine amiloidogeniche ma delle proteine coinvolte nella risposta immunitaria innata.

La [tabella 5](#) illustra i geni ad oggi noti coinvolti nello sviluppo di sindromi autoinfiammatorie.

Tipicamente le sindromi autoinfiammatorie sono caratterizzate da episodi febbrili ricorrenti, presenza di rush cutanei, eventuale presenza di coinvolgimento articolare artritico, eventuale presenza di algie addominali e di coinvolgimento multiorganico. La periodicità e durata degli attacchi febbrili, il coinvolgimento d'organo e il tipo di rash cutaneo variano a seconda dei geni coinvolti.

Esentabilità dei pazienti affetti da sindrome autoinfiammatoria

I pazienti affetti da sindrome autoinfiammatoria possono ottenere l'esenzione dalle spese sanitarie a prescindere dalla presenza di amiloidosi. I codici di esenzione da utilizzare sono:

- RCG161 Sindromi autoinfiammatorie ereditarie/familiari
- RC0241 Febbre mediterranea familiare
- RC0243 Sindrome TRAPS

Come previsto dal DM 279/2001 i familiari di pazienti affetti da sindrome autoinfiammatoria possono usufruire dalla partecipazione alle spese sanitarie per l'effettuazione degli esami necessari ad escludere o confermare la patologia (dosaggio degli indici di flogosi, test genetici sul gene presente nel probando).

Tabella 5: geni coinvolti nello sviluppo delle sindromi autoinfiammatorie

Patologia	Gene	Trasmissione	Amiloidosi	Clinica	Terapia	Sede di esecuzione del test genetico
FMF	MEFV	AR (però la malattia può insorgere nel 10% degli eterozigoti)	11%	Gli attacchi febbrili durano 1-4 giorni e sono accompagnati da algie addominali (peritonite), dolori toracici (pleurite), monoartriti ed eritema "erisipela like" Gli attacchi ricorrenti possono associarsi a anemia da malattia cronica, splenomegalia, algie da sforzo agli arti inferiori.	Colchicina, IL-1β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Città della Salute e della Scienza
TRAPS	TNFRSF 1A	AD	14-25%	Gli attacchi febbrili durano più di 1 settimana. Possono essere presenti eritemi "erisipela like" migranti, dolore agli arti, dolore addominale (peritonite), dolore toracico (pleurite), artrite delle grosse articolazioni, congiuntivite, edema periorbitale.	Steroidi, TNF bloccanti, IL-1β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Città della Salute e della Scienza



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Patologia	Gene	Trasmissione	Amiloidosi	Clinica	Terapia	Sede di esecuzione del test genetico
				Gli attacchi ricorrenti possono associarsi a anemia da malattia infiammatoria cronica e splenomegalia.		
FCAS	<i>NLRP3</i>	AD	Rara	Attacchi orticarioidi secondari all'esposizione al freddo, non sempre associati a febbre. Può presentare i segni e i sintomi della MWS.	IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta
MWS	<i>NLRP3</i>	AD (presenza di cluster familiari)	33%	Gli attacchi febbrili durano 1-3 giorni. Sono accompagnati da rash orticarioidi, congiuntivite, dolori addominali, artralgie. Cronicamente può svilupparsi sordità sensineurale, amiloidosi e rash cutanei anche in assenza di febbre.	IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta
NOMID/CINCA	<i>NLRP3</i>	AD (possibile presentazione sporadica)	Rara	Episodi febbrili di breve durata. Presenza di sintomi di lunga durata o cronici quali i rash orticarioidi. Cronicamente possono svilupparsi meningiti asettiche, ritardo mentale, papilledema, sordità, uveiti, congiuntiviti, artriti delle grosse articolazioni, contratture muscolari	IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta
FCAS2	<i>NLRP1 2</i>	AD	Non descritta			Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta
HIDS	<i>MVK</i>	AR	Molto rara	Gli attacchi febbrili durano 3-7 giorni e sono accompagnati da rash cutanei maculo-papulari, adenomegalia cervicale, artralgie, poliartrite simmetrica, dolori addominali (peritonite) e diarrea.	Steroidi, IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Città della Salute e della Scienza
PAPA	<i>PSTPIP 1/ CD2BP</i>	AD	Non descritta	Rash papulopustolari episodici posttraumatici che evolvono in pochi giorni verso ulcere necrotiche; pustole acneiformi episodiche; artiti episodiche.		Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta
DIRA	<i>IL1RN</i>	AR	Non descritta	Episodi afebrili caratterizzati da rash pustolari ittiosiformi e da lesioni osteolitiche multifocali	IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta
Sindrome di Schnitzler	<i>Non noto</i>			Febbri episodiche di 1-2 giorni di durata, rash orticarioidi, artralgie o artiti Nel cronico possono svilupparsi linfadenopatie, splenomegalia,	IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab), steroidi	Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Patologia	Gene	Trasmissione	Amiloidosi	Clinica	Terapia	Sede di esecuzione del test genetico
				algie ossee, gammopatia monoclonale IgM		
Sindrome di Majeed	LPIN2	AR		Febbri episodiche di 1-3 giorni di durata. Nel cronico possono svilupparsi osteomieliti ricorrenti multifocali sterili che provocano dolore osseo e gonfiore degli arti, anemia diseritropoietica.	IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab), steroidi	Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta
Sindrome di Blau	NOD2	AD		Presenza di episodi occasionali di febbre, rash cutanei, artrite e uveite. Nel cronico possono svilupparsi granulomi epatici, danni cardiaci e renali, neuropatia dei nervi cranici.	Steroidi, TNF bloccanti, IL-1 β bloccanti (Anakinra, Kanakinumab)	Non effettuato in Piemonte e Valle d'Aosta

Legenda: FMF = Febbre Mediterranea Familiare, MEFV = MEditerranean FeVer gene, IL-1 β = interleuchina 1 beta, TRAPS = sindrome periodica associata al tumor necrosis factor (TNF) receptor, TNFRSF1A = tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A, HIDS = sindrome da iperimmunoglobulinemia D, MVK = mevalonico chinasi, MWS = sindrome di Muckle-Wells, NLRP3 = recettore Nod-like con dominio pirinico 3, FCAS = sindrome familiare associata al freddo, CINCA/NOMID = sindrome infantile cronica neuro-cutanea articolare / sindrome infiammatoria multisistemica ad esordio neonatale, PAPA = artrite piogenica, pioderma gangrenoso e acne, NOD2 = Proteina 2 contenente il dominio di legame e oligomerizzazione dei nucleotidi, DIRA = deficit di antagonista del recettore dell'Interleuchina 1, IL-1RN = antagonista dell'interleukina 1.

Follow-up dei pazienti

Il follow-up dei pazienti affetti da sindromi autoinfiammatorie può essere diviso in una fase antecedente lo sviluppo dell'amiloido ed in una fase successiva all'eventuale sviluppo di amiloidosi.

1) Fase pre-amiloidosi

- a) Monitoraggio semestrale degli indici di flogosi: PCR, VES, SAA:
- b) Monitoraggio annuale della funzione renale e della proteinuria
- c) Monitoraggio degli organi bersaglio delle nelle specifiche patologie causali.
- d) Terapia causale delle specifiche patologie sottostanti (cfr. [tabella 5](#)).
 - i) Si sottolinea che l'uso della colchicina e degli steroidi e degli anti TNF risultano "off label" per la cura delle malattie autoinfiammatorie. Occorre pertanto acquisire il consenso informato del paziente al trattamento.
 - ii) Il Kanakinumab è sottoposto a monitoraggio AIFA.

- 2) In presenza di amiloidosi, oltre all'intensificazione della terapia di base occorre attuare una terapia ed un follow-up della funzione renale e della proteinuria in quanto l'organo principalmente coinvolto da questa forma di amiloidosi è il rene. Il paziente con presenza di amiloidosi renale AA può anche essere avviato a studi sperimentali. Per avere ulteriori informazioni a riguardo si può contattare il CMID - Centro di Coordinamento della Rete Interregionale per le Malattie Rare del Piemonte e della Valle d'Aosta o consultare il sito della Società Italiana per lo studio delle Amiloidosi (www.amiloidosi.it).

AMILOIDOSI SISTEMICA SENILE

Forma di amiloidosi che colpisce prevalentemente (anche se non esclusivamente) i maschi ultrasessantenni, caratterizzata da deposizione cardiaca isolata di transtiretina cosiddetta "wild type", cioè non mutata.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Si manifesta clinicamente con cardiopatia ipertrofica e/o restrittiva, aritmie atriali e anomalie della conduzione, ma, nonostante colpisca soggetti anziani, ha una progressione nettamente più lenta rispetto all'interessamento cardiaco che si osserva in corso di amiloidosi AL.

Come già precedentemente riportato, la diagnosi di certezza dovrebbe basarsi sul riscontro di depositi di amiloide reattivi all'anticorpo anti-transtiretina alla biopsia endomiocardica, in assenza di mutazioni del gene per la transtiretina all'analisi genetica; è stato tuttavia recentemente segnalato il possibile ruolo diagnostico della scintigrafia con Tc99-DPD che mostra un significativo accumulo del tracciante in sede miocardica con frequenza di molto superiore rispetto a quella osservata nell'amiloidosi cardiaca AL. Attualmente la Scintigrafia con DPD per le amiloidosi cardiache è effettuabile c/o la Medicina Nucleare Ospedaliera del Presidio Ospedaliero Molinette.

Dal punto di vista del trattamento, attualmente non sono ancora stati individuati provvedimenti terapeutici specifici e mirati di riconosciuta efficacia.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

APPROCCIO TERAPEUTICO

Terapia patogenetica delle amiloidosi AL

La terapia non va iniziata prima di essere giunti a individuare con certezza il tipo di amiloidosi in causa e di avere ottenuto i parametri necessari per la valutazione del rischio e per la definizione della risposta al trattamento:

- caratterizzazione immunoistochimica in microscopia elettronica o proteomica dei depositi di amiloide,
- quantificazione delle catene leggere libere circolanti,
- quantificazione di NT-proBNP e cTnT (o cTnl).

Stratificazione del rischio [12,13]

Basso rischio

Devono essere soddisfatte tutte le seguenti condizioni:

- età ≤ 65 anni,
- cTnT (o cTnl) e NT-proBNP all'interno dei limiti di riferimento,
- frazione d'eiezione $>45\%$,
- pressione arteriosa sistolica in ortostatismo >90 mmHg,
- DLCO $>50\%$,
- ECOG performance status <3 ,
- velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) >50 mL/min

Rischio intermedio

Tutti i pazienti che non possono essere considerati a rischio basso o alto.

Alto rischio

E' sufficiente che sia soddisfatta una delle seguenti condizioni:

- cTnl >0.1 ng/mL (o cTnT >0.035 ng/mL) e NT-proBNP > 332 ng/L*,
- ECOG performance status* ≥ 3 , purché non sia determinato da interessamento del sistema nervoso periferico.

Tabella 6 – ECOG performance status secondo Oken MM et al, 1982 [10].

Grado	ECOG
0	Completamente attivo, in grado di eseguire senza restrizioni tutte le prestazioni pre-malattia.
1	Restrizioni nelle attività fisicamente faticose, ma deambulante e in grado di svolgere lavoro leggero o di natura sedentaria (ad esempio lavori leggeri di casa, lavoro d'ufficio).
2	Deambulante e in grado di aver cura della propria persona, ma incapace di svolgere qualsiasi attività lavorativa; in piedi e in giro per oltre il 50% delle ore di veglia.
3	Solo parzialmente in grado di aver cura della propria persona; costretto a letto o sulla sedia più del 50% delle ore di veglia.
4	Completamente disabile. Non in grado di aver cura della propria persona. Totalmente costretto a letto o in poltrona.
5	Morto.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Terapia

L'obiettivo della terapia è il raggiungimento della risposta completa o almeno di una risposta parziale associata a risposta d'organo [14].

Paziente a basso rischio

1) Induzione con CyBorDex (ciclofosfamide, bortezomib, desametasone) e autotrapianto con Mel200 mg/mq

CyBorDex[15]:

- Cy 300 mg/mq *per os* giorni 1, 8, 15 e 22 (2 somministrazioni, una al mattino e una a mezzogiorno) oppure Cy 300 mg/mq (max 500 mg) *ev* giorni 1, 8, 15
- Bor: 1.3 mg/m² giorni 1, 4, 8, 11 di ogni ciclo oppure giorni 1, 8, 15, 22, S.C
- Dex: 40 mg *per os* nei giorni 1, 8, 15 e 22 di ogni ciclo.

2) 3 cicli e poi rivalutazione malattia (remissione sierologica completa e risposta d'organo):

- se remissione completa prosegue con VCD
- se non remissione completa trapianto autologo

3) Mobilizzazione: primo tentativo con solo fattore di crescita, se inefficace (CTX 3 g tot)+GCSF

4) Condizionamento: melphalan 200 mg/mq

Paziente a rischio intermedio

Terapia convenzionale

- M-DEX [16] (melphalan, desametasone):
 - Mel 0.22 mg/Kg giorni 1-4 (0.16 mg/Kg se clearances ≤30 mL/min);
 - Dex: 40 mg giorni 1-4 (oppure 1-8-15-22).
 Cicli di 28 giorni. 9 cicli totali.

Terapie alternative

- VMP [bortezomib (Velcade®), melphalan, prednisone]:
 - Vel 1.3 mg/mq giorni 1, 8, 15, 22 (SC);
 - Mel 9 mg/mq giorni 1-4,
 - Prednisone 60 mg/mq giorni 1-4.
 Cicli di 28-35 giorni. 9 cicli totali.
- BMDEX [17] [bortezomib (Velcade®), melphalan, desametasone]:
 - Vel 1.3 mg/mq giorni 1, 4, 8, 11;
 - Mel 0.22 mg/Kg giorni 1-4 (0.16 mg/Kg se clearances ≤30 mL/min);
 - Dex: 40 mg giorni 1-4 (oppure 1-8-15-22).
 Cicli di 28 giorni.

oppure [18]

 - Vel 1.3 mg/m² giorni 1, 8, 15, 22;
 - Mel 9 mg/m² giorni 1-4; 6 mg/m² (se Cr > 2.5 mg/dL),
 - Dex 40 mg (20 mg se 70 aa o coinvolgimento cardiaco).
 Cicli di 28-42 giorni.
- CY-BOR-DEX [15,17,19,20]: (ciclofosfamide, bortezomib, desametasone)
 - Cy 300 mg/mq *per os* giorni 1, 8, 15 e 22 (2 somministrazioni, una al mattino e una a mezzogiorno) oppure Cy 300 mg/mq (max 500 mg) *ev* giorni 1, 8, 15;
 - Vel: 1.3 mg/m² giorni 1, 4, 8 e 11 di ogni ciclo oppure giorni 1 8 15 22 (SC)
 - Dex: 40 mg *per os* nei giorni 1, 8, 15 e 22 di ogni ciclo.
 Cicli di 28 giorni. 9 cicli totali.
- VD[21,22]: (bortezomib, desametasone)
 - Vel 1.3 mg/mq giorni 1,4,8,11 (oppure 1.6 mg/mq (?) giorni 1-8-15-22);
 - Dex 40 mg giorni 1, 4, 8, 11 (oppure 1-8-15-22). SC
 Cicli ogni 21-35 giorni. 9 cicli totali.

AUTOTRAPIANTO A DOSAGGIO RIDOTTO? NO



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Valutare inserimento pazienti in protocolli sperimentali con nuovi farmaci.

Paziente ad alto rischio

Terapia convenzionale

- **MDEX** (melphalan, desametasone) attenuato:
 - Mel 0.22 mg/Kg giorni 1-4 (0.16 mg/Kg se clearances ≤ 30 mL/min);
 - Dex: 20 mg giorni 1-4 (oppure 1-8-15-22).

Cicli di 28 giorni.

Terapia alternativa

- **BMDEX** [bortezomib (Velcade®), melphalan, desametasone] attenuato:
 - Vel 1 mg/mq giorni 1-4-8-11 (oppure 1-8-15-22) SC; 0.22 mg/Kg giorni 1-4 (0.16 mg/Kg se clearances ≤ 30 mL/min);
 - Dex 20 mg giorni 1-8-15-22.

Cicli di 28-35 giorni. 9 cicli totali.

Outcome

Ogni linea di chemioterapia ciclica deve essere proseguita fino al raggiungimento di una delle seguenti condizioni:

- 1) Remissione completa (CR) al secondo controllo (dopo il quarto ciclo)
- 2) Risposta parziale molto buona (VGPR) o remissione parziale (PR) con risposta d'organo al secondo controllo (dopo il quarto ciclo)
- 3) completamento del nono ciclo
- 4) refrattarietà (assenza di risposta)
- 5) esaurimento della risposta tra un controllo e quello precedente
- 6) tossicità inaccettabile.

Malattia refrattaria o recidiva

Se possibile, nei pazienti che recidivano dopo tre mesi dalla fine del trattamento, si raccomanda di ripetere la terapia di prima linea che ha indotto la risposta.

Se questo non è possibile, o se la recidiva avviene entro tre mesi dal termine della terapia di prima linea, i pazienti in recidiva dovranno essere trattati come i pazienti refrattari.

Per i pazienti refrattari che non possono essere inclusi nelle sperimentazioni cliniche, la scelta della terapia dipende dal trattamento impiegato in prima linea e, naturalmente, dalle condizioni individuali che possono rappresentare controindicazioni all'uso di farmaci particolari (per esempio età, neuropatia periferica, storia di trombosi, interstiziopatia polmonare, ecc.).

Indicazioni per la scelta della terapia di seconda linea sulla base del trattamento praticato all'esordio, come riportato in tabella 7.

Tabella 7 Indicazioni per la scelta della terapia di seconda linea sulla base del trattamento praticato all'esordio

Terapia di prima linea	Terapia suggerita per la seconda linea
ASCT	BDex, TalDex
CyBorD + ASCT	LenDex
BMDex	LenDex
MDex	CyBorD
CyBorD	ASCT (se eligibili), MDex, CTD (per risparmiare le cellule staminali)



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

- **TALDEX** [23] (thalidomide, desametasone):
 - Thal 100/die da aumentare ogni settimana di 50 mg/die se tollerata fino a 200 mg/die;
 - Dex 20 mg giorni 1, 8, 15, 22.

Cicli di 28 giorni.
Controlli mensili dell'ECG dinamico secondo Holter (bradicardia).
Se cTnI <0.1 ng/mL o cTnT <0.035 ng/mL e non aritmie ventricolari ripetitive all'ECG Holter, Dex 40 mg/die
- **LENDEX** [24,25] (lenalidomide, desametasone):
 - Len: 15 mg/die (con le riduzioni posologiche previste in caso di insufficienza renale);
 - Dex 20 mg giorni 1, 8, 15 e 22 di ogni ciclo.

Cicli di 21 giorni.
- **CTD** [26] (ciclofosfamide, thalidomide, desametasone):
 - Cyclo: 250 mg per os due volte al dì giorni 1, 8 e 15;
 - Thal: 100 mg/die, da aumentare ogni settimana di 50 mg/die se ben tollerata fino a 200 mg/die;
 - Dex 20 mg/die giorni 1-8-15-22.

Cicli di 28 giorni.

Valutazione della risposta alla terapia e monitoraggio nel tempo

Il monitoraggio della malattia con valutazione della risposta alla terapia segue criteri proposti dall'*International Society of Amyloidosis* e si avvale dei parametri già elencati nel paragrafo dedicato alla quantificazione clinica, laboratoristica e strumentale del danno d'organo.

L'obiettivo della terapia deve essere il raggiungimento della risposta ematologica completa o almeno di quella parziale associata a risposta d'organo.

Definizione di risposta ematologica

- **Risposta completa** (CR): assenza di componenti monoclonali all'immunofissazione di siero e urine e presenza di normale rapporto κ/λ delle catene leggere libere circolanti.
- **Risposta parziale molto buona** (VGPR) [27]: differenza tra la concentrazione delle catene leggere libere circolanti amiloidogeniche e non amiloidogeniche ($dFLC = \kappa - \lambda$ oppure $\lambda - \kappa$) <40 mg/L.
- **Risposta parziale** (PR): riduzione di $dFLC >50\%$.
- **Pazienti non responsivi**: tutti quelli che non raggiungono uno dei suddetti criteri.

Definizione di risposta d'organo

- **Rene**: riduzione $\geq 50\%$ della proteinuria (se era almeno 0.5 g/24h prima della terapia) in assenza di comparsa o di progressione di una insufficienza renale (definita come riduzione della $eGFR \geq 25$ mL/min \times 1.73 m² e aumento della creatininemia di almeno 0.5 mg/dL).
- **Cuore**: riduzione di almeno due classi NYHA (in pazienti che erano in classe NYHA III o IV prima dell'inizio della terapia) e riduzione $\geq 30\%$ e ≥ 300 ng/L del NT-proBNP (anche se in realtà i livelli di peptidi natriuretici sono correlati sia con il grado di congestione venosa polmonare e sistemica, sia con l'entità del filtrato glomerulare). Ulteriori indici di buona risposta alla terapia sono anche la riduzione degli spessori parietali, l'aumento dei voltaggi dell'ECG basale e il miglioramento della funzione diastolica.
- **Fegato**: almeno un criterio soddisfatto tra riduzione ≥ 2 cm delle dimensioni del fegato alla TC o all'ecografia addominale e riduzione $\geq 50\%$ della fosfatasi alcalina.
- **Sistema nervoso periferico e autonomo**: non ci sono metodi validati per definire la risposta e la progressione di malattia.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Periodicità di esecuzione dei controlli

La valutazione della risposta alla terapia deve essere eseguita almeno ogni due cicli di trattamento oppure tre mesi dopo autotrapianto di cellule staminali; nei pazienti che hanno risposto alla terapia con una remissione completa, sono poi consigliati controlli ogni quattro mesi per i primi tre anni e controlli con cadenza annuale in seguito; nei pazienti con remissione parziale e risposta d'organo è preferibile proseguire sempre con controlli quadrimestrali.

Il coinvolgimento cardiaco è sempre indice di gravità della patologia e della prognosi, pertanto il paziente deve essere sottoposto a stretto follow-up cardiologico personalizzato. ECG ad ogni controllo clinico, possibilmente anche l'ecocardiogramma (utile come guida alla terapia di supporto). ECG-Holter ogni 3 mesi nel paziente asintomatico e comunque sempre in caso di comparsa all'ECG di blocchi AV anche transitori, di bradicardia e di aritmie sopraventricolari o ventricolari.

La [tabella 8](#) riassume i parametri da rivalutare periodicamente nel follow-up delle forme AL, ed anche in quelle AA, ATTR e AApoA-1.

TABELLA 8: accertamenti da eseguire durante il follow-up delle amiloidosi sistemiche e loro periodicità

Amiloidosi AL

- FLC	
- IFE siero e urine	A ogni valutazione della risposta alla terapia e, nei pazienti off-therapy, a ogni controllo
- NT-proBNP, BNP, troponine	
- proteinuria 24 ore	
- emocromo con formula, sCr, ALT, AST, ALP, PCR, SAA	
- Ecocardiografia	A ogni valutazione della risposta alla terapia e, nei pazienti off-therapy, a ogni controllo o a ogni incremento biomarcatori
- ECG dinamico secondo Holter	In base alla terapia e a ogni incremento biomarcatori
- Aspirato midollare	Alla documentazione della remissione completa
- EMG	Ogni 12 mesi

Amiloidosi ATTR

- NT-proBNP, BNP, troponina	A ogni controllo
- proteinuria 24 ore	A ogni controllo
- emocromo con formula, sCr, ALT, AST, ALP, PCR, SAA	A ogni controllo
- ecocardiografia	A ogni controllo
- EMG	Ogni 12 mesi
- Conta delle piccole fibre nervose cutanee	Ogni 12 mesi nei presintomatici
- RR-Index	Ogni 12 mesi

Amiloidosi AApoA-I

- NT-proBNP, BNP, troponine	A ogni controllo
- proteinuria 24 ore	A ogni controllo
- emocromo con formula, creatinina, ALT, AST,ALP	A ogni controllo
- testoster	
one, SHBG, FSH, LH	A ogni controllo
- ecocardiografia	A ogni controllo
- ECG dinamico secondo Holter	A ogni controllo

Amiloidosi AA

- NT-proBNP, BNP, troponine	A ogni controllo
- proteinuria 24 ore	A ogni controllo
- emocromo con formula, sCr, ALT, AST, ALP, PCR, SAA	A ogni controllo
- ecocardiografia	A ogni controllo o a ogni incremento biomarcatori



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

TERAPIA DI SUPPORTO E ASPETTI ASSISTENZIALI

Terapia nefrologica conservativa e sostitutiva

Nella sindrome nefrosica sono indicati la restrizione sodica e l'impiego dei diuretici dell'ansa, da attuarsi con cautela, a posologia gradualmente crescente, per evitare disidratazioni eccessive /o troppo rapide (aggravamento dell'ipotensione e del rischio trombotico, aritmie da ipokaliemia, deterioramento del filtrato glomerulare da ipoperfusione renale).

Qualora la pressione arteriosa sistemica lo permetta, l'introduzione di ace-inibitori o sartani può consentire il parziale contenimento della proteinuria.

Quando concomiti già un'insufficienza renale, in base ai livelli di funzione renale residua, essa va gestita con la terapia conservativa (dieta ad apporto proteico controllato, chelanti del fosforo, vitamina D, allopurinolo, agenti stimolanti l'eritropoiesi, ecc.) o con quella dialitica sostitutiva; il trapianto renale può essere considerato solo dopo una positiva risposta alla terapia eziopatogenetica nelle forme acquisite sistemiche, oppure unitamente al trapianto di fegato, in talune forme familiari.

Terapia di supporto cardiologica

La terapia di supporto dell'amiloidosi cardiaca scompensata si fonda sulla terapia diuretica; in assenza di ipotensione ortostatica può anche essere considerato il cauto impiego di ace-inibitori e beta-bloccanti a basso dosaggio.

La digitale è controindicata a causa della sua particolare affinità di legame con le fibrille di amiloide cui consegue abnorme sensibilità al farmaco e rischio di aritmie da sovradosaggio relativo. Lo stesso dicasi per i calcio antagonisti non diidropiridinici.

Il trattamento delle aritmie sopraventricolari prevede l'impiego del propafenone, quello delle aritmie ventricolari complesse l'amiodarone; nelle forme ipocinetiche è indicato il posizionamento del pace-maker con elevata soglia di stimolazione.

I pazienti con FA parossistica o permanente andrebbero scoagulati, tenendo conto dell'HAS-BLED bleeding risk score [11] e della presenza di ipotensione ortostatica con rischio di cadute.

Se si tratta di amiloidosi AL con coinvolgimento cardiaco severo e isolato, può anche essere presa in considerazione l'eventualità di eseguire un trapianto cardiaco prima dell'avvio della chemioterapia.

Diarrea

La diarrea può essere controllata con l'impiego dell'octreotide, iniziando con 0.05 mg sc per due volte al dì e regolando la posologia del farmaco in base alla risposta del paziente fino ad un massimo di 0.1 mg per tre volte al dì.

Supporto nutrizionale

Al momento della diagnosi è indicato il counselling nutrizionale (dietologo/dietista), poiché lo stato nutrizionale dei pazienti con amiloidosi AL è un importante fattore prognostico: in tutte le situazioni di calo ponderale clinicamente rilevante è pertanto indicata l'integrazione proteico-calorica e la supplementazione multivitaminica (con prodotti a composizione nota in sodio, potassio e fosforo, in particolare quando coesistono problemi renali o cardiaci); qualora il calo ponderale non si arresti con la suddetta integrazione, è necessario considerare l'avvio di una nutrizione artificiale enterale o parenterale.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Ipotensione ortostatica

L'impiego di calze elastiche di classe I e la somministrazione di midodrina cloridrato possono avere un ruolo nel tentativo di contrastare l'ipotensione ortostatica.

Neuropatia

Il trattamento sintomatico della polineuropatia sensitiva si avvale dell'utilizzo di farmaci antinevralgici quali pregabalin, gabapentin, carbamazepina per il controllo delle disestesie e delle parestasie, di trattamenti riabilitativi finalizzati a migliorare l'equilibrio statico e dinamico. I deficit motori non sono passibili di un trattamento farmacologico specifico ma si giovano del trattamento fisiokinesiterapico e di ortesi come la molla di Codeville per il deficit di dorsiflessione del piede.

Va ricordato che negli ultimi anni è entrato nella pratica clinica un nuovo trattamento farmacologico per l'amiloidosi ATTR con interessamento polineuropatico. Si tratta di un farmaco, il tafamidis, in grado di stabilizzare il tetramero della TTR impedendone la denaturazione e successiva polimerizzazione in amiloide. Il tafamidis si è dimostrato efficace nel ridurre la progressione della polineuropatia ed è riservato ai pazienti in stadio I di malattia, cioè soggetti sintomatici ma con deficit neurologici lievi al fine di posticipare il trapianto epatico, che, ad oggi, è il trattamento più efficace nell'arrestare la progressione della polineuropatia da ATTR.

Ovviamente i pazienti che assumono questo farmaco devono essere sottoposti ad uno stretto follow-up clinico-strumentale per monitorare l'evoluzione della malattia che se dimostrata pone indicazione al trapianto epatico.

ACCESSO AL TRAPIANTO D'ORGANO

Il **trapianto renale** rimane controverso nei pazienti con amiloidosi sistemica in seguito al rischio di perdita del rene per recidiva della malattia amiloidotica e di progressione della malattia sistemica in altri organi. In linea generale, in assenza di Linee Guida specifiche al riguardo, l'amiloidosi non configura una controindicazione assoluta per un trapianto da donatore deceduto, a condizione di affrontarlo in una fase di remissione e stabilità della patologia sistemica sia clinica che sierologica. Più discutibile il trapianto di rene da donatore vivente, nel quale l'indicazione deve nascere da una attenta valutazione clinica caso per caso. A scopo indicativo si riportano i dati di una ampia casistica di trapianti di rene [28] effettuati ed osservati durante un lungo periodo (1978-2011) presso l'"UK National Amyloidosis Centre", da cui emergono differenze di andamento anche in rapporto al tipo di amiloidosi: a) nella Amiloidosi ereditaria da Apolipoproteina A-I, la sopravvivenza mediana del rene è di 13.1 anni in linea con il buon andamento di questa patologia; b) per l'amiloidosi AA, AL e da fibrinogeno, un trapianto di rene è stato effettuato solo nel 20% dei pazienti con ESRD, con una successiva mediana di sopravvivenza del rene rispettivamente di 10.3, 5.8 e 7.3 anni; c) nell'amiloidosi AL la sopravvivenza del paziente è stata di 8.9 anni tra coloro che avevano avuto almeno una risposta parziale.

Il **trapianto cardiaco** Data la variabilità eziologica dell'amiloidosi e la frequente discrepanza tra danno d'organo e manifestazioni cliniche, non è possibile stabilire dei criteri generalizzati di idoneità al trapianto cardiaco. Esso può essere preso in considerazione in casi particolari, quando la prognosi a medio-lungo termine del paziente è buona, dopo valutazione collegiale multidisciplinare insieme con l'Heart-Team.

Il **trapianto di fegato** nell'amiloidosi ATTR è una pratica consolidata con storia oramai ventennale: il primo trapianto epatico fu infatti eseguito nel 1990 in Svezia, mentre il primo trapianto italiano risale al 1992. Il rationale di questa pratica si basa sull'osservazione biochimica che la produzione di TTR sierica avviene a livello del fegato; fu quindi ipotizzato che la sostituzione del fegato potesse azzerare i livelli ematici di TTR mutata e guarire dall'amiloidosi ATTR. È ormai dimostrato sulla base dell'evidenza clinica che il trapianto epatico arresta la progressione della neuropatia; sono però descritti casi di progressione cardiaca, oculare e soprattutto endocranica.



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

Quest'ultima evenienza, seppur rara, spesso si associa a mutazioni specifiche, è molto temibile in quanto causa emorragie encefaliche ricorrenti che conducono a un severo danno encefalico incompatibile con la vita.

Va detto che la selezione del paziente da sottoporre a trapianto è di primaria importanza e va tenuto in considerazione che: non tutti i soggetti portatori di mutazioni amiloidogeniche della TTR svilupperanno la malattia (penetranza incompleta); più precoce è il trapianto, minore è la probabilità di complicanze legate al trattamento; più precoce è il trapianto, minore è la disabilità residua; la presenza di un rilevante interessamento cardiaco necessita di un trapianto combinato fegato e cuore; la presenza d'amiloidosi oculoleptomeningea gravemente sintomatica sconsiglia il trapianto epatico. Quindi, i candidati al trapianto sono pazienti sintomatici, auspicabilmente in fase precoce di malattia. Ciò detto ne consegue che: la diagnosi di amiloidosi ATTR deve essere il più precoce possibile; che i soggetti presintomatici devono essere sottoposti a stretto follow-up clinico-strumentale; che i pazienti in trattamento con tafamidis devono essere monitorati con molta attenzione.

Anche dopo il trapianto epatico è indicato un monitoraggio clinico-strumentale per valutare la progressione di malattia con particolare attenzione all'interessamento cardiaco. Al momento non è indicato l'utilizzo del tafamidis in soggetti già trapiantati.

3 BIBLIOGRAFIA

- 1) PDTA relativo a Amiloidosi primarie e familiari – Regione Lombardia, 1 giugno 2011.
- 2) Sipe JD et al – Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis - *Amyloid* 2012; 19 (4): 167-170.
- 3) Linee-guida SIA 2011-2012: Diagnosi delle amiloidosi sistemiche
- 4) Linee-guida SIA 2011-2012: Terapia dell'amiloidosi AL sistemica
- 5) Obici L, Merlini G – AA amyloidosis: basic knowledge, unmet needs and future treatments – *Swiss Medical Weekly* 2012; 142:w13580.
- 6) Leung N et al – How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing – *Blood* 2012; 120 (16): 3206-13.
- 7) Guy CD, Jones CK. Abdominal Fat Pad Aspiration Biopsy for Tissue Confirmation of Systemic Amyloidosis: Specificity, Positive Predictive Value, and Diagnostic Pitfalls. *Diagnostic Cytopathology, Vol 24, No 3 181-185*
- 8) Ando et al. - Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians - *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013, 8:31
- 9) Adams D. - Recent advances in the treatment of familial amyloid polyneuropathy - *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 2013; 6 129–139
- 10) Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E.T., Carbone, P.P.: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5:649-655, 1982.
- 11) Olesen JB, Lip GY, Lindhardsen J, Lane DA, Ahlehoff O, Hansen ML, Raunsø J, Tolstrup JS, Hansen PR, Gislason GH, Torp-Pedersen C. Risks of thromboembolism and bleeding with thromboprophylaxis in patients with atrial fibrillation: A net clinical benefit analysis using a 'real world' nationwide cohort study. *Thromb Haemost.* 106(4):739-49, 2011.
- 12) Dispenzieri A, Gertz M, Kyle R, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004;22:3751-7.
- 13) Palladini G, Merlini G. Transplantation vs. conventional-dose therapy for amyloidosis. *Curr Opin Oncol* 2011;23:214-20.
- 14) Gertz MA, Merlini G. Definition of organ involvement and response to treatment in AL amyloidosis: an updated consensus opinion. *Amyloid* 2010;17:48-9.
- 15) Jimenez-Zepeda V, Reeder C, Mikhael J, et al. Cyclophosphamide, Bortezomib and Dexamethasone (CyBORD) Induces Rapid and Complete Responses in Patients with Amyloidosis Not Eligible for Peripheral Blood Stem Cell Transplant. *Blood* 2009:737
- 16) Palladini G, Perfetti V, Obici L, et al. Association of melphalan and high-dose dexamethasone is effective and well tolerated in patients with AL (primary) amyloidosis who are ineligible for stem cell transplantation. *Blood* 2004;103:2936-8.
- 17) Palladini G, Milani P, Foli A, et al. Treatment of AL Amyloidosis with Bortezomib Combined with Alkylating Agents: Results From a Prospective Series of Unselected Patients. *Blood* 2011 [abs]
- 18) Zonder J, Sanchorawala V, Snyder R, et al. Melphalan and Dexamethasone Plus Bortezomib Induces Hematologic and Organ Responses in AL-Amyloidosis with Tolerable Neurotoxicity. *Blood* 2009 [abs]
- 19) Mikhael J, Schuster S, Jimenez-Zepeda V, et al. Cyclophosphamide-Bortezomib-Dexamethasone (CyBorDex) produces rapid and complete hematologic response in patients with AL amyloidosis. *Blood* 2012
- 20) Venner C, Lane T, Foard D, et al. Cyclophosphamide, Bortezomib and Dexamethasone therapy in AL amyloidosis is associated with high clonal response rates and prolonged progression free survival. *Blood* 2012



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

- 21) Kastiris E, Wechalekar A, Dimopoulos M, et al. Bortezomib with or without dexamethasone in primary systemic (light chain) amyloidosis. *J Clin Oncol* 2010;28:1031-7.
- 22) Reece DE, Hegenbart U, Sancharawala V, et al. Efficacy and safety of once-weekly and twice-weekly bortezomib in patients with relapsed systemic AL amyloidosis: results of a phase 1/2 study. *Blood* 2011; 118:865-873
- 23) Palladini G, Perfetti V, Perlini S, et al. The combination of thalidomide and intermediate-dose dexamethasone is an effective but toxic treatment for patients with primary amyloidosis (AL). *Blood* 2005;105:2949-51.
- 24) Sancharawala V, Wright D, Rosenzweig M, et al. Lenalidomide and dexamethasone in the treatment of AL amyloidosis: results of a phase 2 trial. *Blood* 2007;109:492-6.
- 25) Dispenzieri A, Lacy M, Zeldenrust S, et al. The activity of lenalidomide with or without dexamethasone in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2007;109:465-70.
- 26) Wechalekar A, Goodman H, Lachmann H, Offer M, Hawkins P, Gillmore J. Safety and efficacy of risk-adapted cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone in systemic AL amyloidosis. *Blood* 2007;109:457-64.
- 27) Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar S, Wechalekar A, Hawkins PN, Schönland S, Hegenbart U, Comenzo R, Kastiris E, Dimopoulos MA, Jaccard A, Klersy C, Merlini G. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol.* 30(36):4541-9, 2012.
- 28) Pinney JH, Lachmann HJ, Sattianayagam PT, Gibbs SD, Wechalekar AD, Venner CP, Whelan CJ, Gilbertson JA, Rowczenio D., Hawkins PN, Gillmore JD. Renal Transplantation in systemic amyloidosis – importance of amyloid fibril type precursor protein abundance. *Transplant* 13(2),433-41, 2013.

4 REDAZIONE DEL DOCUMENTO

Coordinatori:

Simone Baldovino, Marco Manganaro, Dario Roccatello

Estensori delle sezioni del documento:

Anatomia Patologica:	G. Mazzucco
Cardiologia:	W. Grosso Marra – P. Lusardi
Ematologia:	G. Benevolo – F. Cavallo
Genetica:	S. Baldovino – S. D'Alfonso – K. Giancaspero – G. Restagno
Laboratorio:	D. Cosseddu
Nefrologia:	L. Besso – M. Quaglia – D. Roccatello - C. Rollino – P. Stratta
Neurologia:	A. Mauro – L. Pradotto

Partecipanti al gruppo tecnico:

dr. Aiosa – Medicina Alessandria
 prof. Albera – Pneumologia S.Luigi
 dr. Baldovino – SCDU IMMUNOLOGIA CLINICA – S. G. Bosco
 dr.ssa Baraldi – Ematologia Alessandria
 dr. Bazzan – Ematologia – S. Giovanni Bosco
 dr.ssa Bellis - Anat Pat Osp Martini
 prof.ssa Bernengo – Dermatologa
 dr.ssa Bertero - Immunol Mauriziano
 dr.ssa Benevolo - Ematol II Molinette
 dr. Besso - Nefrologia Molinette
 dr.ssa Bonvicino – Dermatol S. Lazzaro
 dr. Bonzano - Cardiologia Candiolo



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

dr. Canepari - Nefrologia Cuneo
 dr. Cardesi - Anat Pat osp Martini
 dr.ssa Cavallo - Ematol Univ Molinette
 Dr. Cicilano - Lab Analisi S. Giovanni Bosco
 dr.ssa Colla - Nefrologia Molinette
 dr. Cosseddu - Lab Analisi Mauriziano
 prof. Dalfonso - Genetica Novara
 dr. Davio - Medicina Alessandria
 dr. Decrescenzo - Ematologia Mauriziano
 dr. Della Volpe - Nefrologia Novi ligure
 dr. Formica - Nefrologia Ceva
 dr.ssa Giacchino - Nefrologia Ivrea
 dr. Grosso - Genetica Molinette
 dr. Grosso Marra - Cardiologia Molinette
 dr.ssa Giancaspero - SCU IMMUNOLOGIA CLINICA - S. G. Bosco
 dr.ssa Guastamacchia - Neurol ASL To2
 dr.ssa Gueli - Ematologia Mauriziano
 dr.ssa Guglielmelli - Ematologa S. Luigi
 dr. Guarnieri - Nefrologia Cuneo
 dr. Imperiale - Neurologia Maria Vitt
 dr. Leone - Neurologia Novara
 dr.ssa Lusardi - Cardiologia S. G. Bosco
 dr.ssa Marchese - Lab.Analisi Mauriziano
 dr. Manganaro - Nefrologia Alessandria
 dr. Marazzi - Nefrologia Ceva
 dr.ssa Marcuccio - Nefrologia Mauriziano
 dr. Mauro - Neurologia Piancavallo
 prof. Mazzucco - Anat. Patol Molinette
 dr. Mengozzi - Lab. Analisi Molinette
 dr.ssa Merlini - Ematologia S. Luigi
 dr.ssa Messuerotti - Nefrologia Chivasso
 prof Migone - Genetica Molinette
 dr. Modena - Reumatologo
 dr.ssa Moggia - Nefrologia Cuneo
 prof. Momigliano - Genetica Novara
 dr. Nebiolo - Nefrologia Aosta
 dr. Orzan - Cardiologia Univ Molinette
 dr. Pacitti - Nefrologia Cuneo
 dr. Pagetto - Medicina Alessandria
 dr.ssa Peroni - Reumatologia Molinette
 dr.ssa Peruzzi - Nefrologia OIRM
 dr. Pezzana - Dietologia G. Bosco
 dr. Luca Pradotto - Neurologia Piancavallo
 dr. Quaglia - Nefrologia Novara
 dr.ssa Ravarino - Anat. Patologica Mauriziano
 dr.ssa Restagno - genetista
 prof. Roccatello - SCU IMMUNOLOGIA CLINICA - S. G. Bosco
 dr.ssa Rollino - Nefrologia - S. G. Bosco
 dr.ssa Rota - Ematologia IRCC Candiolo
 dr. Sancipriano - Nefrologia Ciriè
 dr.ssa Solfietti - SCU IMMUNOLOGIA CLINICA - S. Giovanni Bosco
 prof. Stratta - Nefro Novara
 prof. Tarella - Ematologia Mauriziano
 dr. Torchio - Neurologia Molinette
 prof.ssa Elisa Menegatti - Patol Clinica Univ To
 dr.ssa Mirella Alpa - SCU IMMUNOLOGIA CLINICA - S. G. Bosco
 dr.ssa Antonella Vaccarino - Ematologia S. G. Bosco
 dr. Gian Maria Iadarola - Nefrologia S. G. Bosco
 prof.ssa Silvana Martino - Immunol OIRM S. Anna
 dr. Davide Montin - Immunol OIRM S. Anna
 dr. Baccega - Medicina Nucleare Molinette



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

5 AGGIORNAMENTI

Gli aggiornamenti periodici della raccomandazione saranno resi disponibili sul portale della rete interregionale per le malattie rare del Piemonte e della Valle d'Aosta – <http://www.malattierepiemonte.it>



Rete Interregionale del Piemonte e della Valle d'Aosta
per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi, la terapia delle malattie rare

6 ALLEGATI

ALLEGATO 1 - LE ASSOCIAZIONI DEI PAZIENTI

A.A.M.I (Associazione Amiloidosi Italiana)

Sede: via San Francesco 12 - 38068 Rovereto (TN)

E-mail: aamiamiloidosi@libero.it

ALLEGATO 2 – COLORAZIONE ROSSO CONGO SECONDO WESTERMARK

PREPARAZIONE

Soluzione satura di Rosso Congo in etanolo all'80% contenente cloruro di sodio: etanolo 80% (80% di alcool assoluto e 20% di acqua distillata), 0.3% Rosso Congo (3 g); versare il tutto in un cilindro da 1 L e agitare un'ora, quindi, in agitazione, aggiungere 20 g di NaCl. Coprire il cilindro con carta stagnola e lasciare in agitazione ON. Trasferire in una beuta e conservare per un anno (avvolgere la beuta con carta stagnola al riparo dalla luce).

Si ricorda che il rosso Congo è una sostanza cancerogena ed è necessario mettere in atto le opportune precauzioni per minimizzare il rischio degli operatori.

La soluzione colorante si ottiene filtrando su carta bibula a doppio strato un'aliquota della soluzione base (diluire il filtrato 1:20 in cloruro di sodio in etanolo all'80%, quindi aggiungere 1% di NaOH all'1%). La soluzione di colorazione, così ottenuta, deve essere preparata al momento dell'uso e conservata al massimo 24 ore.

ESECUZIONE

- 1) Fissare i vetrini con acetone, quindi porre la soluzione colorante sui preparati (ne occorrono circa 2.5 ml per ogni vetrino).
- 2) Dopo 90 minuti di colorazione, eliminare l'eccesso di colorante lavando rapidamente i vetrini sotto acqua corrente.
- 3) I vetrini, lasciati asciugare in termostato a 37°C, sono inclusi con DPX (porre una goccia di DPX su un vetrino copri-oggetto e lasciare aderire delicatamente sul vetrino porta-oggetto).