

## Anticorpi antineuronali in un gruppo eterogeneo di giovani e giovani adulti con tic e Disturbo Ossessivo-Compulsivo

**Carol J. Cox, PhD,<sup>1\*</sup> Amir J. Zuccolo, PhD,<sup>1\*</sup> Erica V. Edwards, BS,<sup>1</sup> Adita Mascaro-Blanco, BS,<sup>1</sup> Kathy Alvarez, BS,<sup>1</sup> Julie Stoner, PhD,<sup>2</sup> Kiki Chang, MD,<sup>3</sup> and Madeleine W. Cunningham, PhD<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma.

<sup>2</sup>Department of Biostatistics and Epidemiology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma.

<sup>3</sup>Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, PANS Clinic and Research Program, Stanford University School of Medicine, Stanford, California.

\*The first two authors contributed equally.

Funding: This study was funded by the following (to M.W.C.): Oklahoma Center for the Advancement of Science and Technology; David Judah Fund from D. Michael Jenike, MD, Harvard University; Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorder Associated with Streptococci (PANDAS) Research Fund, University of Oklahoma; Pepsi/Global Giving; and National Institute of Mental Health (NIMH) Bench to Bedside Grant.

The work of Dr. Julie Stoner was supported in part by a grant from the National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences, grant 1 U54 GM104938-01A1.

### Abstract

**Contesto e obiettivi:** gli anticorpi anti-neuronali sono stati implicati nei disturbi da tic e nel DOC (Disturbo ossessivo-compulsivo) associati a infezioni da streptococco del gruppo A. Abbiamo studiato i livelli di autoanticorpi anti-neuronali così come l'attività di segnalazione delle cellule neuronali mediata da anticorpi, come riportato in precedenza per la Corea di Sydenham e per la PANDAS, per determinare i profili immunologici in un'ampia coorte di giovani con tic e/o DOC.

**Metodi:** I partecipanti allo studio (n = 311; età da 4 a 27 anni, 66% maschi) sono stati selezionati da un gruppo più ampio di persone con sintomi neuropsichiatrici "autodiagnosticati" (n = 742) e sono stati inclusi solo quelli con documentazione di infezioni da streptococco Gruppo A, fatta eccezione per quattro persone in cui lo stato di infezione da streptococco era sconosciuto. I campioni di controllo sani (n = 16; prelevati da soggetti di età da 5 a 14 anni, 81% maschi), sono pervenuti dal *National Institute of Mental Health* e dalla *Yale University*. Oltre alle donazioni di siero, i partecipanti e/o i tutori legali hanno fornito anamnesi neuropsichiatriche e storie mediche correlate ai sintomi che durava da più di 1 anno. Le titolazioni delle immunoglobuline anti-neuronali G (IgG) sono state misurate mediante il test immunoenzimatico standard (ELISA) e confrontate con campioni di pari età, nella norma per: lisoganglioside, tubulina, e recettori della dopamina (D1R e D2R). È stata testata nel siero l'attività di segnalazione mediata da anticorpi della proteina dipendente dalla calmodulina attivata dal calcio, la CaMKII, in una linea cellulare neuronale umana (SK-N-SH).

**Risultati:** Dei 311 individui, 222 (71%) avevano prove documentate di infezione da streptococco Gruppo A, che è stato associato con tic e/o DOC (p = 0,0087). I sieri degli individui con tic e/o DOC (n = 261) presentavano anticorpi sierici IgG contro la dopamina D1R umana (p < 0,0001) e contro il lisoganglioside (p = 0,0001), e una maggiore attivazione nel siero dell'attività CaMKII (p < 0,0001) in una linea cellulare neuronale umana, rispetto ai sieri di controllo sani (n = 16). Inoltre, nei pazienti con tic e DOC era significativamente maggiore l'attivazione dell'attività CaMKII rispetto ai pazienti con solo tic o solo DOC (p < 0,033 per ciascuno).

**Conclusioni:** Il nostro studio ha suggerito una correlazione significativa tra tic e DOC associati a streptococco, e elevati anticorpi anti-neuronali anti-lisoganglioside e anti-D1R in concomitanza nel siero con una maggiore attivazione delle CaMKII nelle cellule neuronali umane. Giovani e giovani adulti con tic cronici e DOC possono presentare alla base un'etiologia di tipo infettivo/immunologica.

### Introduzione

Negli ultimi decenni, si è registrato un crescente interesse per l'associazione tra infezioni, autoimmunità e cambiamenti comportamentali, e il loro impatto sulla genesi dei disturbi neuropsichiatrici (Murphy et al. 2012). Nel 1998, un legame tra disturbo ossessivo-compulsivo (DOC) e infezioni da streptococco di Gruppo

A, è stato identificato dalla dr. Swedo presso l'Istituto Nazionale per la Salute Mentale (*NIMH*) (Swedo et al. 1998). Questi disturbi possono essere identificati come PANDAS (Swedo et al. 1998), o PANS in presenza di altre cause, comprese le infezioni (Swedo et al. 2012). Questa scoperta è il risultato di due studi paralleli condotti presso il *NIMH*, che includevano indagini su bambini con DOC e tic e su bambini con corea di Sydenham (SC), la principale manifestazione neurologica della febbre reumatica acuta (IRA), che si presenta con movimenti involontari e disturbi neuropsichiatrici, compresi sintomi ossessivo-compulsivi, iperattività e labilità emotiva (Marques-Dias et al. 1997). Swedo e colleghi hanno identificato una coorte di pazienti che hanno sperimentato un'improvvisa insorgenza acuta di ossessioni e compulsioni che seguivano un andamento sintomatologico recidivante-remittente. Cinque criteri diagnostici sono emersi dall'osservazione attenta di questi pazienti: 1) Presenza di DOC (dal Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali, DSM IV) o tic, 2) esordio dei sintomi tra i 3 anni di età e la pubertà, 3) corso episodico della malattia, con riacutizzazioni brusche e marcate dei sintomi, 4) insorgenza dei sintomi e riacutizzazioni associate temporalmente a infezioni da streptococco Gruppo A, e 5) presenza di anomalie neurologiche, tra le quali movimenti coreiformi durante le riacutizzazioni dei sintomi (Swedo et al. 1998).

Murphy descrive anche sintomi neurologici in pazienti con tic/DOC ad insorgenza acuta, tra i quali iperattività grave, perdita di capacità motorie (deterioramento della scrittura), o presenza di movimenti avventizi, come i movimenti coreiformi (Murphy et al. 2012). I sintomi psichiatrici come descritto da Murphy et al., inclusi irritabilità, cambiamenti di umore frequenti, ansia da separazione, iperattività, problemi di attenzione ad insorgenza tardiva, cambiamenti di personalità, comportamenti oppositivi, disturbi del sonno, deterioramento delle competenze matematiche. Anche se le infezioni da streptococco sono state strettamente associate con l'esordio della PANDAS, è in corso un dibattito in letteratura se le infezioni da streptococco di Gruppo A siano casuali o causali. I resoconti storici dei primi 50 casi di PANDAS indicano che almeno in alcuni casi la PANDAS sia insorta subito dopo o durante un'infezione da streptococco di Gruppo A (Swedo et al. 1998). Se la PANDAS sia o meno è una variante della Febbre reumatica acuta è ancora argomento dibattuto (Kurlan et al. 2008). Anche la discussione per quanto riguarda il meccanismo d'azione della PANDAS è ancora in corso, i criteri PANDAS attuali ribadiscono che una storia di Febbre reumatica (RF) è fattore di esclusione per una diagnosi PANDAS. Tuttavia, esiste una polemica tra alcuni neurologi sulla validità della diagnosi PANDAS come sottoinsieme di DOC/tic rispetto all'ipotesi del suo essere una forma atipica di RF (SC). Nella Corea di Sydenham i sintomi neuropsichiatrici precedono i movimenti coreici. Nella PANDAS si descrive la presenza di movimenti coreiformi delle dita delle mani (simili ai movimenti di quando si suona il piano) e dei piedi (Swedo et al. 1998).

Dall'identificazione iniziale del sottogruppo PANDAS, è stato proposto che il disturbo possa svilupparsi come risultato di processi autoimmuni post-infettivi (Swedo et al. 1998; 2006b Kirvan et al.). Noi ipotizziamo che gli anticorpi antistreptococcici prodotti in risposta all'infezione streptococcica di Gruppo A, cross-reagiscano con obiettivi neuronali in pazienti sensibili attraverso il processo di mimetismo molecolare (Kirvan et al. 2003). Noi pensiamo che la patogenesi della PANDAS potrebbe essere simile a quella della Corea di Sydenham (SC), che è stata delineata studiando anticorpi monoclonali umani (mAbs) derivati da un paziente malato di SC. Tre anticorpi monoclonali umani hanno reagito con la superficie di cellule neuronali dimostrando cross-reattività anticorpale con l'epitopo carboidrato del Gruppo A N-acetil-b-Dglucosamine (GlcNAc) e con il lisoganglioside. L'anticorpo monoclonale umano 24, uno dei mAbs studiati, possedeva la più alta affinità con il lisoganglioside, ed inoltre determinava l'innalzamento dei livelli di CaMKII nella SK-N-SH, una linea cellulare neuronale umana. Studi successivi su sieri prelevati da pazienti con SC acuta o in convalescenza, hanno dimostrato che gli anticorpi nei sieri di pazienti SC in fase acuta avevano profili di reattività delle immunoglobuline G (IgG) simili a quelli del mAb 24 (Kirvan et al. 2003). Gli autoanticorpi anti-tubulina e anti-lisoganglioside erano presenti anche nella PANDAS (Kirvan et al. 2006b). Inoltre i sieri di pazienti con SC e PANDAS stimolavano cellule neuronali in coltura in una reazione IgG-dipendente, portando all'attivazione delle CaMKII.

Esperimenti condotti su topi e ratti, avvalorano l'ipotesi autoimmune streptococcica. Cavie immunizzate con streptococco di Gruppo A, presentavano immunoreattività sierica e un aumento di depositi di IgG nei nuclei profondi del cervelletto (DCN) (Hoffman et al. 2004). Topi immunizzati con lo streptococco con positività per anticorpi anti-DCN, sviluppavano diversi disturbi motori e comportamentali correlati coi livelli di immunoreattività alla DCN (Hoffman et al. 2004). La validità dell'ipotesi autoimmune nel modello murino è stata ulteriormente dimostrata attraverso trasferimento passivo di sieri antistreptococcici da topi

immunizzati su topi non esposti (insieme a lipopolisaccaridi [LPS] per rompere la barriera emato-encefalica) (Yaddanapudi et al. 2010). Si è constatato, inoltre, che i destinatari passivi del trasferimento di anticorpi sierici, svilupparono disturbi motori e comportamentali. I comportamenti ripetitivi sia nei donatori che nei destinatari passivi di GABHS, ricordano tic, ossessioni e compulsioni (Yaddanapudi et al. 2010).

In uno studio sulle caratteristiche neuronali e immunitarie specifiche con un modello di ratto Lewis, Brimberg et al. riferiscono che l'esposizione di ratti Lewis maschi ad antigeni GABHS, portava i ratti a sviluppare comportamenti simili a DOC/tic, così come a sviluppare caratteristiche immunologiche e neurali simili a quelle di SC e PANDAS (Brimberg et al. 2012). Dal punto di vista comportamentale, i ratti esposti allo streptococco avevano difficoltà a manipolare alimenti e a camminare sopra un'asticella stretta. Studi sul siero di topi immunizzati con GABHS, presentavano anticorpi in grado di attivare la segnalazione CaMKII, inoltre i sieri di ratti immunizzati con GABHS hanno reagito in modo più significativo con gli antigeni di membrana del recettore della dopamina D1 e D2 umana, rispetto ai ratti di controllo. La reattività dei sieri di ratto GABHS con l'antigene dei recettori D1 e D2 è stata confermata dal test *Western immunoblot*. L'alterata manipolazione del cibo e l'aumento ossessivo delle pratiche di pulizia nei ratti esposti a GABHS, sono stati alleviati dalla somministrazione di aloperidolo D2-bloccante, che viene utilizzato per trattare i sintomi motori e compulsivi nella SC e nella PANDAS (Brimberg et al. 2012). Prove a sostegno del ruolo degli autoanticorpi nella PANDAS e nella SC, comprendono diversi studi che hanno dimostrato concentrazioni significativamente più elevate di anticorpi antineuronali nei pazienti con SC, DOC e sindrome di Tourette rispetto a soggetti di controllo sani, (Husby et al 1976. Kiessling et al 1993, 1994;. Singer et al 1998).; tuttavia, ulteriori studi non sono riusciti a replicare questi risultati (Black et al. 1998). A ulteriore sostegno dell'ipotesi autoimmune e del ruolo degli autoanticorpi, ci sono diverse segnalazioni di trattamenti immunosoppressivi (ad esempio plasmateresi, immunoglobuline per via endovenosa [IVIG] e prednisone) con conseguente soppressione immediata e marcata del DOC infantile acuto e sindrome di Tourette (Kondo e Kabasawa 1978 ; Matarazzo 1992; Swedo 1994; Allen et al 1995;. Perlmutter et al 1999).

Il rilevamento degli autoanticorpi e l'identificazione dei loro obiettivi neuronali nella Corea di Sydenham e nella PANDAS è stato oggetto di esame per un certo tempo (Husby et al 1976. Chiesa et al 2002;. Kirvan et al 2003;. Singer et al 2005;. Dale et al . 2006; Brilot et al 2011;. Dale et al 2012;. Mohammad et al 2013;. Pathmanandavel et al 2013;.. Ramanathan et al 2013). L'ipotesi degli autoanticorpi è stata discussa in letteratura con risultati inconsistenti, (Chiesa et al 2003..; Kirvan et al 2006b;. Pavone et al 2006) cioè con risultati positivi e negativi (Singer et al 2005;. Morris et al., 2009). Ci sono diverse questioni da affrontare nell'ambito della ricerca di questi autoanticorpi, tra le quali anche la distinzione clinica della PANDAS da altre presentazioni di DOC o tic (Murphy et al. 2012), e c'è una mancanza di studi prospettici che esaminino la relazione temporale tra infezioni GABHS antecedenti autentiche e la comparsa o l'esacerbazione di tic e sintomi ossessivo-compulsivi (Leckman et al. 2011). Più di recente, gli autoanticorpi contro i recettori della dopamina D1 e D2 sono stati confermati nella Corea di Sydenham da uno studio indipendente in cui il rapporto tra i recettori anticorpali anti-D1/anti-D2 è correlato con i sintomi (Ben-Pazi et al. 2013) e un altro studio sul siero e sugli anticorpi monoclonali umani (mAbs) in giovani pazienti con SC e PANDAS che ha dimostrato che la reazione tra D2R e anticorpi monoclonali umani derivati dalla Corea, prendono di mira i neuroni dopaminergici in topi transgenici (Tg) (Cox et al. 2013).

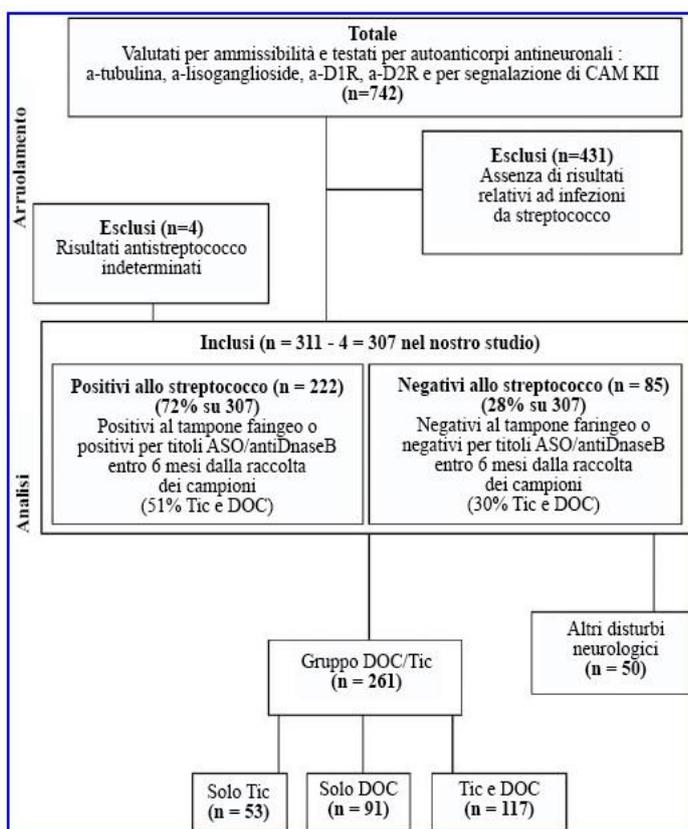
Lo scopo di questo studio era di determinare se i nostri risultati precedenti potevano essere applicati ad un'ampia coorte di pazienti provenienti dalla comunità con sintomi neuropsichiatrici auto-valutati. Abbiamo ipotizzato che i giovani con DOC e/o tic avrebbero presentato più episodi di infezioni GABHS storia rispetto a quelli senza DOC/tic, e più elevati livelli di lisoganglioside, tubulina, e anticorpi antirecettori della dopamina D1 e D2 rispetto ai soggetti di controllo sani. Inoltre abbiamo ipotizzato che i livelli sierici di attivazione della CaMKII nei pazienti con DOC e/o tic siano elevati e correlabili con una storia positiva per infezioni GABHS.

## Metodi

La nostra indagine (n = 742) è stata condotta per valutare la presenza di autoanticorpi antineuronali elevati nei pazienti con tic e/o DOC. Questo studio ha incluso i dati del sottogruppo di 311 soggetti della presente relazione (vedi schema **Figura 1**). I criteri di inclusione dello studio prevedevano il riferire di tic, DOC, o entrambi, da parte di un genitore e/o di un medico. Il reclutamento prediligeva soggetti con una storia documentata di infezione da streptococco, positività o negatività delle colture dei tamponi faringei o

dei titoli anticorpali antistreptococcici (antistreptolisina O [ASO] o anti-desossiribonucleasi B [anti- DNAsi B]). Non sono stati esclusi pazienti che assumono farmaci psicotropi, antibiotici o steroidi per la loro condizione. Inoltre i pazienti che avevano in passato ricevuto immunoglobuline per via endovenosa o plasmateresi, ma che manifestavano ancora sintomi, non sono stati esclusi. Solo i pazienti con documentazione accurata relativa ad infezioni da streptococco del Gruppo A (n = 311) sono stati inclusi in questo studio. Dei 311 selezionati, tutti tranne 4 sono stati classificati con o senza storia di infezione da streptococco. 261 pazienti manifestavano tic/DOC, e il restante numero presentava altri sintomi neuropsichiatrici e non sono stati inclusi nell'analisi (vedi **Figura 1**). 16 soggetti di controllo sani selezionati presso l'Istituto Nazionale di Salute Mentale (NIMH) e presso la *Yale University*, sono risultati normali all'esame fisico; i partecipanti e i loro parenti di primo grado non presentavano nella loro storia personale malattie inserite nel Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali, 4a ed. (DSM IV), quindi nessuna diagnosi di tic, sindrome di Tourette, Disturbo ossessivo compulsivo, o Disturbo da deficit di attenzione/iperattività (ADHD); e presentavano titoli ASO compresi tra 70 e 513 (unità Todd) (American Psychiatric Association, 1994). La **figura 1** è un diagramma che raffigura il reclutamento dei soggetti studiati.

**Figura. 1. Diagramma raffigurante il reclutamento dei soggetti nello studio**



### Procedure di studio

Il nostro studio è stato condotto presso l'Università dell' *Oklahoma Health Sciences Center*. Questo studio è stato approvato dal *University of Oklahoma Health Sciences Center human subjects institutional review board*. Anche se lo studio non è stato formalmente annunciato, i genitori sono stati informati circa lo studio in corso, dai partecipanti che all'inizio avevano contattato il nostro laboratorio di ricerca sugli studi di ricerca per la PANDAS. Prima della partecipazione, i genitori o i tutori legali hanno fornito il consenso scritto. Il consenso orale è stato fornito dai pazienti maggiori di 7 anni, e quando di l'età appropriata ( $\geq 13$  anni), i soggetti hanno dato assenso scritto. I soggetti con più di 18 anni hanno dato il consenso informato. Sono stati raccolti campioni di sangue, e campioni e moduli di consenso sono stati restituiti nell'arco di una notte al laboratorio di ricerca da tutti gli Stati Uniti.

### Stato di infezione streptococcica

Lo stato di infezione streptococcica è stato determinato per 311 pazienti: 222 (72%) erano positivi allo streptococco, 85 (28%) erano negativi allo streptococco, e 4 (1%) presentavano un quadro incerto. Lo stato di infezione streptococcica è stata determinata utilizzando il tampone faringeo, il dosaggio degli anticorpi ASO, o il dosaggio degli anticorpi anti-DNaseB, o una combinazione dei tre esami. Quando l'età del partecipante era certa ed erano disponibili sia i titoli ASO che gli anti-DNAsi B, le soglie sono state regolate per età come descritto in precedenza. (Kaplan et al., 1998). Laddove l'età non erano disponibile, le soglie utilizzate erano  $\geq 200$  per i titoli ASO e  $\geq 240$  per gli anti-DNAsi B (Murphy et al. 2012).

### Titoli anticorpali antineurali tramite test ELISA.

Novantasei pozzetti per microtitolazione Immunolon-4 (Dynatech Laboratories) sono stati rivestiti con l'antigene: lisoganglioside (Sigma, 20 Ig/mL), tubulina (MP biomedica, 10 Ig/mL), antigene umano del

recettore della dopamina D1 (Perkin Elmer, 10 Ig / mL), e antigene umano del recettore della dopamina D2L (Perkin Elmer, 10 Ig / mL), e incubati nell'arco della notte a 4°C. Il test ELISA è stato effettuato sul siero dei pazienti e dei soggetti sani di controllo come precedentemente descritto (Cox et al. 2013).

#### *Analisi CaM-chinasi*

Colture cellulari. Cellule di neuroblastoma umano SK-N-SH ottenute dalla *American Type Culture Collection (ATCC)* sono state trattate con siero dopo essere cresciute in *F12 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)* (insieme a 10% di siero fetale bovino e Pen/Strep) come precedentemente descritto (Kirvan et al. 2003). Gli estratti cellulari sono stati centrifugati a 15.000 rpm per 20 minuti a 4°C. La concentrazione proteica dei lisati cellulari è stata determinata tramite il test *Bradford* (Bio-Rad Protein Assay Kit II # 500-0002).

#### *Analisi dell'attività CaMK-II*

L'attività chinasi della proteina è stata misurata usando il sistema di analisi CAM-chinasi (kit di analisi *signa-TECT CaM Kinase, Promega*) secondo le istruzioni del produttore. In breve, 5 µL di lisato cellulare sono stati incubati con 50 µM di substrato peptidico e [γ-<sup>32</sup>P] adenosina trifosfato (ATP) per 2 minuti a 30°C come precedentemente descritto (Kirvan et al. 2003). I sieri sono stati testati a 1: 100 (Brimberg et al 2012; Cox et al 2013..).

#### *Analisi statistiche*

Le medie delle distribuzioni simmetriche sono state confrontate tra i gruppi utilizzando un test indipendente *t*. Le distribuzioni delle misurazioni deviate positivamente sono state confrontate tra i due gruppi indipendenti utilizzando il test Wilcoxon non parametrico, e sono state confrontate tra più di due gruppi utilizzando il test di Kruskal Wallis. Le proporzioni sono state confrontate tra i gruppi usando un test *v2* o il test esatto di Fisher (quando più del 20% dei conteggi di frequenza attesi erano <5). Un livello  $\alpha$  di 0.05 è stato utilizzato per definire la significatività statistica, con aggiustamenti per le coppie multiple utilizzando la *Correzione di Bonferroni* per il valore *p* calcolato.

### **Risultati**

Un totale di 311 su 742 pazienti volontari è stato selezionato per il nostro studio, sulla base della presenza o meno nella loro storia medica di infezioni streptococciche. Di questi 311 volontari, l'età era nota solo per l'85%, e la razza/etnia era nota per il 62%. L'età dei pazienti variava da 4 a 27 anni, con un'età media di 9,91 anni (deviazione standard, - 3,95 anni), con 8 pazienti  $\geq$  19 anni di età. Nel nostro gruppo di studio, il 66,6% dei pazienti era di sesso maschile e il 90% era di origine caucasica. I soggetti di controllo sani (n = 16) avevano tra i 5 e i 14 anni di età, con un'età media di anni  $10 \pm 3$ , e 13 (81%) erano maschi. I dati demografici, le diagnosi (DOC e/o tic) e i dati sull'infezione da streptococco per i 311 partecipanti sono riportati nella **tabella 1**.

Un totale di 261 soggetti ha presentato una storia documentata (maggiore di 1 anno) di DOC e/o tic. I restanti 50 presentavano una varietà di altri disturbi neuropsichiatrici, o nessun episodio confermabile di tic e/o DOC (**Figura 1**). La presenza di DOC e/o tic era significativamente associata con lo stato dell'infezione da streptococco (test *v2*, *p* = 0,0087) (**Figura 2**). I soggetti che sono risultati positivi per infezione da streptococco (n = 184, **Figura 2**) avevano più probabilità di avere sia tic che DOC (51%, 94/184), rispetto a quelli che sono risultati negativi o non presentavano titoli ASO o titoli anti-DNAse-B positivi o colture faringee positive per infezione/esposizione allo streptococco (n = 76, **Figura 2**) (30%, 23/76, *p* corretto = 0,0063). Non è risultata alcuna differenza tra la percentuale di soggetti con solo tic (18%, 34/184, contro il 25%, 19/76, *p* corretto = 0,72) e la percentuale con solo DOC (30%, 56/184, vs 45%, 34/76, *p* corretto = 0,083) quando si confrontavano i partecipanti risultati positivi, con coloro che sono risultati negativi per infezione da streptococco. I soggetti con infezioni da streptococco indeterminate (n = 4) non sono stati inclusi nell'analisi, per cui il numero totale dei soggetti che hanno riportato storie relative ad infezioni da streptococco positive o negative è di 307.

La **figura 3** è una sintesi grafica che mostra che l'attivazione mediata da anticorpi della CaMKII è associata a DOC e tic (*p* = 0.0008 complessiva). I 261 soggetti con DOC e/o tic avevano una segnalazione neuronale mediata da anticorpi (CaMKII) significativamente elevata rispetto ai soggetti di controllo sani

(Figura 4 e Tabella 2). I titoli anticorpali IgG Anti-D1R e anti-lisoganglioside (n = 16) sono risultati significativamente elevati rispetto a quelli dei soggetti di controllo sani (Tabella 2, Figura 5 e Figura 6). La Figura 7 (A-C) mostra l'analisi dei sieri completa (742 persone), e dimostra una segnalazione neuronale (CaMKII) significativamente elevata (A), e titoli anticorpali IgG anti-D1R (B) e anti-lisoganglioside (C) elevati.

**Tabella 1. Caratteristiche demografiche e sintomi per i 311 Partecipanti: Confronto tra maschi e femmine (la distribuzione non è risultata significativa)**

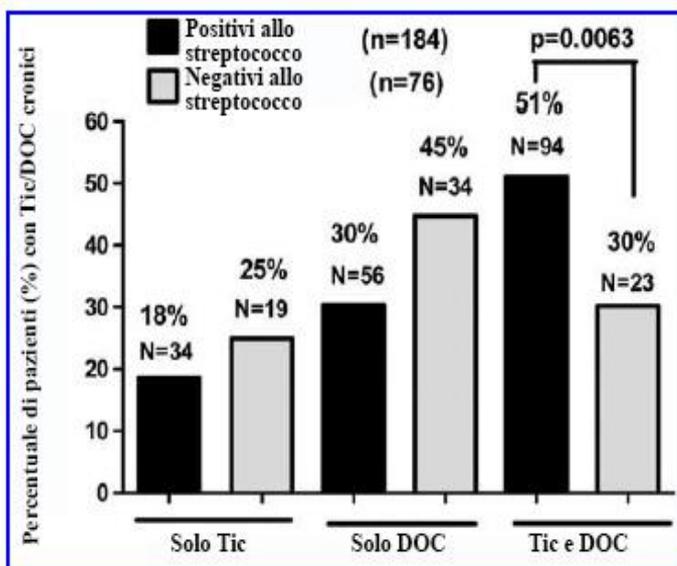
Caratteristiche	Totale dei pazienti (n=311)	Maschi(n=206)	Femmine (n=105)	p value*
Età - media in anni ( deviazione standard)	9.91 (±3.95)	9.70 (±3.95)	10.29 (±3.95)	0.24
Sesso - maschi in percentuale (%)	206 (66%)	—	—	0.16
Razza/etnia in percentuale (%)				
Afroamericani	5 (3%)	3 (2%)	2 (3%)	
Asiatici/Isole del Pacifico	9 (5%)	9 (7%)	0	
Caucasici	169 (90%)	111 (87%)	58 (95%)	
Ispanici	4 (2%)	3 (2%)	1 (2%)	
Nativi americani	1 (<1%)	1 (<1%)	0	
Razza/etnia sconosciuta in percentuale (%)	123 (40%)	79 (38%)	44 (42%)	
Sintomatologia - in percentuale (%)				0.84
Solo Tic	53 (20%)	35 (20%)	18 (20%)	
Solo DOC	91 (35%)	57 (33%)	33 (37%)	
Tic e DOC	117 (44%)	79 (46%)	38 (43%)	
	261			
Nè Tic nè DOC	2 (<1%)	2 (1%)	0	
Altri sintomi neurologici - in percentuale (%)	48 (15%)	33 (16%)	16 (15%)	
	50			
	311 Totale			
Infezioni da streptococco Gruppo A - 307 su 311 partecipanti (%)				0.89
Positivi	222 (72%)	148 (73%)	74 (72%)	
Negativi	85 (28%)	55 (27%)	29 (28%)	
Stato delle infezioni da streptococco Gruppo A sconosciuto	4 (1%)	3 (1%)	1 (1%)	

\* il confronto del valore *p* tra maschi e femmine non è risultato significativo. Sono stati utilizzati due test *t* per confrontare le medie delle misurazioni e il test esatto di Fisher è stato utilizzato per confrontare la distribuzione delle misurazioni tra maschi e femmine.

DOC= disturbo ossessivo-compulsivo.

## Discussione

Abbiamo riscontrato che i soggetti con tic cronici e/o DOC avevano elevati livelli sierici di diversi anticorpi antineuronali, e una maggiore attivazione di CaMKII, simile a quella dei pazienti con SC e PANDAS.



**Figura 2.** La presenza di disturbo ossessivo-compulsivo (DOC) e tic era significativamente associata con lo status di infezione streptococcica (test  $\chi^2$   $p = 0,0087$ ). I soggetti che erano positivi allo streptococco avevano più probabilità di avere sia tic che DOC (51%) rispetto ai soggetti risultati negativi allo streptococco (30%) ( $p = 0,0063$  rettificato). 311 - 4 soggetti indeterminati = 307 (vedi Figura 1 e Tabella 1). Dei 307/311 pazienti, 222 erano positivi allo streptococco (72%) (Vedi Tabella 1) e 85 negativi allo streptococco (28%). I 4 soggetti che erano risultati indeterminati (1%), non sono stati considerati nella coorte valutata per streptococco. Vedi Tabella 1 sotto la voce "Infezioni da streptococco Gruppo A". Tuttavia qui vengono messi a confronto solo 184 soggetti positivi allo streptococco e 76 negativi allo streptococco (del gruppo tic/DOC, n= 261).

In questo gruppo, i soggetti con una storia positiva di infezione GABHS avevano più probabilità di avere entrambi i disturbi, tic e DOC. Pertanto può darsi che diverse categorie di disturbi del movimento e comportamentali siano innescati da infezioni, e siano associati a livelli di anticorpi antineuronali elevati. Il nostro lavoro precedente ha sostenuto questa idea, dimostrando il legame tra anticorpi antistreptococcici/antineuronali (tra i quali gli anticorpi monoclonali umani), le cellule neuronali umane e l'attivazione di CaMKII attraverso le IgG sieriche di pazienti con SC e PANDAS (Kirvan et al 2003, 2006a, b, 2007; Brimberg et al 2012; Ben Pazi et al 2013; Cox et al 2013).

Abbiamo precedentemente affermato che i titoli anticorpali contro gli antigeni neuronali, lisoganglioside e tubulina sono risultati significativamente elevati nei sieri di pazienti con Corea di Sydenham acuta rispetto ai sieri dei pazienti convalescenti. Il lisoganglioside blocca in maniera competitiva l'interazione antigene-anticorpo nei sieri di pazienti con SC acuta con il GlcNAc, l'epitopo dominante del carboidrato GABHS (Kirvan et al 2003; 2006b Kirvan et al.). Inoltre nei sieri di pazienti con SC acuta sono stati trovati titoli Ab specifici per tubulina più alti rispetto ai sieri dei pazienti in convalescenza o rispetto a sieri di pazienti con Febbre reumatica acuta senza corea (Kirvan et al. 2007). Nel 2006, IgG sieriche di casi PANDAS acuti sono stati testati in un test di inibizione competitiva ELISA, e, analogamente ai sieri SC, si è riscontrato che il lisoganglioside bloccava in modo specifico l'interazione antigene-anticorpo in sieri di pazienti con SC acuta con il GlcNAc, l'epitopo dominante del carboidrato GABHS ( Kirvan et al. 2006b). Quando i sieri dei 261 pazienti con diagnosi di DOC, tic, o entrambi, sono stati posti a reagire in un test ELISA con il lisoganglioside come antigene, le IgG sieriche presentavano titoli statisticamente, significativamente superiori a quelli di soggetti di controllo sani (valori di media di 320 contro 100, rispettivamente ,  $p = 0,0001$ ) (Tabella 2, Figura 5). Il test ELISA con tubulina come antigene, non ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i sieri di pazienti con tic, con DOC, o con entrambi, messi a confronto con i sieri di soggetti di controllo sani (Tabella 2).

**Tabella 2. Titoli anticorpali antineuronali nei soggetti con tic e/o DOC a confronto con soggetti di controllo sani.**

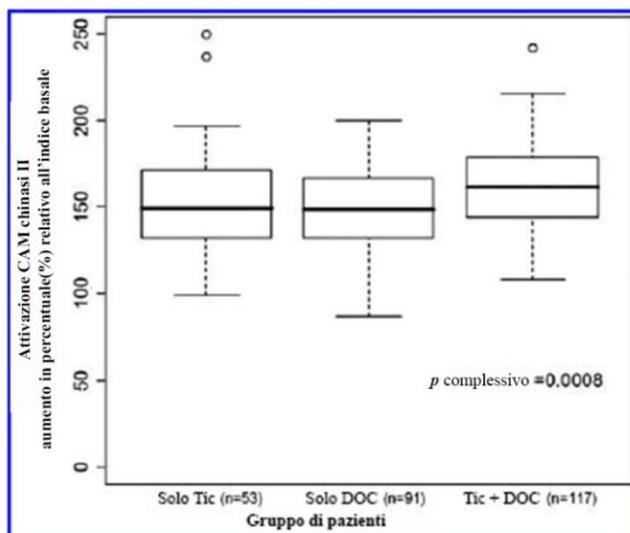
Caratteristiche	Pazienti con tic e/o DOC (n = 261)			Soggetti di controllo sani (n = 16)			valore $p^*$
	Media	P25	P75	Media	P25	P75	
Attivazione CAM chinasi II	157	137	173.5	94	90	99	<0.0001
Titoli IgG anti - D1R	2000	1000	4000	1000	500	1000	<0.0001
Titoli IgG anti - D2R	4000	2000	8000	4000	2000	8000	0.66
Titoli IgG anti - Lisoganglioside	320	160	320	100	80	160	0.0001
Titoli IgG anti - Tubulina	500	500	1000	500	500	1000	0.11

I titoli sono stati determinati come descritto nel paragrafo "Metodi". Il valore  $p^*$  mette a confronto la distribuzione dei dati tra i pazienti con tic/DOC e i soggetti di controllo sani, utilizzando il test di Wilcoxon.

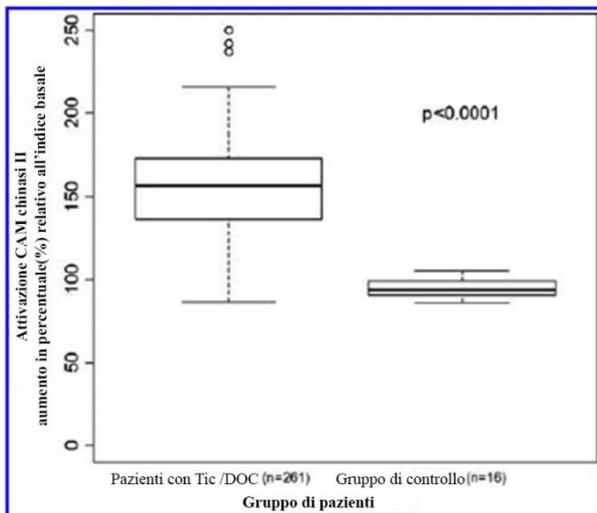
**DOC**= disturbo ossessivo-compulsivo; **P25**= 25 ° percentile; **P75**= 75 ° percentile; **D1R**= antigene del recettore della dopamina D1; **D2R**= antigene del recettore della dopamina D2L (la "L" si riferisce all'isoforma lunga del recettore della dopamina D2); **IgG**= immunoglobuline G, titoli specifici per ciascun antigene elencato.

Nel 2012, Brimberg et al. riferivano che il siero di topi immunizzati con GABHS avevano reagito in modo più significativo con gli antigeni dei recettori D1 e D2 umani, rispetto al siero di topi di controllo sani, tramite test ELISA e Western Blot. Per fare un confronto con la malattia nell'uomo, è stata testata tramite ELISA la reattività delle IgG sieriche di soggetti con PANDAS e Corea di Sydenham acute, e i sieri SC hanno reagito in modo più significativo con l'antigene di membrana dei recettori D2 della dopamina, rispetto ai sieri dei soggetti di controllo sani, mentre il siero dei soggetti PANDAS ha reagito in modo più significativo con entrambi gli antigeni dei recettori D1 e D2 rispetto al siero di soggetti di controllo sani. Il presente studio mostra che le IgG sieriche prelevate da soggetti con forma cronica di DOC , tic, o entrambi, hanno

reagito in modo più significativo con l'antigene del recettore D1 umano rispetto ai sieri di soggetti di controllo sani tramite test ELISA (valore medio di 2000 contro 1000, rispettivamente,  $p \leq 0,0001$ ) (Tabella 2, Figura 6). Tuttavia, questi soggetti non presentavano significativi livelli di anticorpi contro il recettore D2, in contrasto con le nostre precedenti osservazioni per la PANDAS.

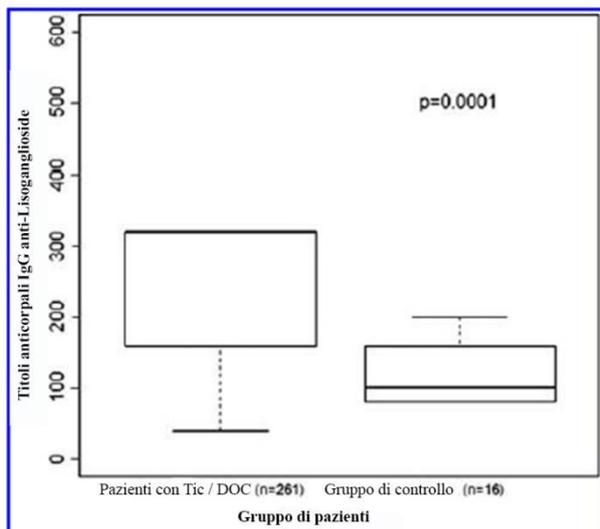


**Figura 3.** L'attivazione delle CaM chinasi II (CaMKII) è associata a disturbo ossessivo-compulsivo (OCD) e tic ( $p = 0.0008$ ). I livelli di attivazione dell'enzima CaMKII indicati, sono percentualmente al di sopra del livello base. L'attivazione percentuale normale delle CaMKII è: 94-100. Tutte l'attività CaMKII è calcolata come attività enzimatica in pmol/min/ $\mu$ g ( $p = 0,0008$ ). (Il valore  $p$  si riferisce alla comparazione tra i tre gruppi: solo tic, solo DOC, e tic/DOC -. Non è stato effettuato un confronto con soggetti sani di controllo.



calcolata come attività enzimatica di pmol/min/ $\mu$ g. L'attivazione percentuale normale delle CaMKII è: 94-100

Abbiamo dimostrato un aumento della segnalazione CaMKII anche nei soggetti con DOC e/o tic, in particolare in quelli con entrambi (DOC e tic). La CaMKII è un enzima multifunzionale fortemente concentrata nel cervello, che influisce su molti, differenti, percorsi cellulari che hanno a che fare con lo sviluppo, l'apprendimento, la memoria, e dispone di un'ampia specificità di substrato dipendente dalla concentrazione, dalla localizzazione intracellulare e dai livelli intracellulari di calcio (De Koninck e Schulman 1998; Bejar et al. 2002; Menegon et al 2002; Tsui et al 2005). In test preliminari su sieri di pazienti con SC in fase acuta ( $n = 5$ ) e su sieri di soggetti convalescenti ( $n = 3$ ), si è riscontrato un aumento di attivazione CaMKII nel siero dei malati in fase acuta (Kirvan et al. 2003). In una successiva indagine che comprendeva sieri PANDAS, il 75% dei sieri di pazienti PANDAS in fase acuta, inducevano l'attivazione mediata da anticorpi delle CaMKII a livelli significativamente più elevati di quanto facessero i sieri dei pazienti convalescenti ( $p = 0.001$ ) (Kirvan et al. 2006b). Il presente studio rivela due importanti correlazioni che coinvolgono l'attivazione di CaMKII nel siero: 1) La presenza di DOC e/o tic era positivamente associata con



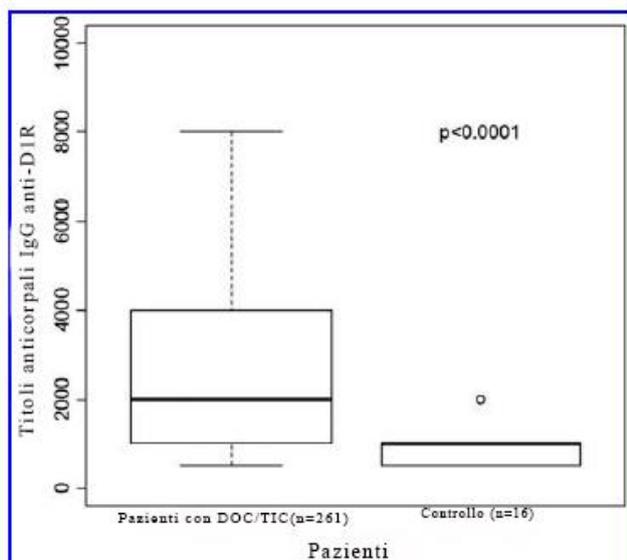
Dato che il gruppo di pazienti reclutato per questo studio era costituito da soggetti che segnalavano di soffrire di tic e DOC da più di 1 anno, con molti di loro che segnalavano di soffrire di tic e DOC da diversi anni, esso può rappresentare un fenotipo diverso rispetto alla prima coorte di pazienti PANDAS che presentava DOC e/o tic ad esordio acuto insieme a movimenti coreiformi ( le dita si muovono come per suonare il pianoforte). E' possibile quindi che differenti fenotipi possano essere caratterizzati da anticorpi anti-recettori differenti.

**Figura 4.** L'analisi di 261/307 soggetti dimostra una segnalazione delle cellule neuronali significativamente elevata (CaM chinasi II [CaMKII]) tra i pazienti con disturbi ossessivo-compulsivi e o tic rispetto ai soggetti di controllo sani. I livelli di attivazione degli enzimi CaMKII sono percentualmente al di sopra del livello base. Tutta l'attività CaMKII è

l'attivazione di CaMKII mediata da anticorpi ( $n = 261$ ,  $p = 0.0008$ ); e 2) l'attivazione di CaMKII mediata da anticorpi è risultata elevata in pazienti con DOC e/o tic ( $n = 261$ ), con un aumento percentuale medio che va da 149 a 162, mentre è rimasto inalterato nei soggetti di controllo sani, con una media del 94° percentile ( $n = 16$ ,  $p < 0,0001$ ). La differenza nel valore medio riferito all'attivazione di CaMKII tra i campioni dei pazienti malati e i campioni dei soggetti sani, è simile a quella riscontrata tra i sieri PANDAS e i sieri non-PANDAS negli studi precedenti (Kirvan et al. 2006b).

**Figura 5.** L'analisi dei 261/307 soggetti mostra i titoli anticorpali IgG anti-lisoganglioside significativamente elevati nei pazienti con disturbi ossessivo-compulsivi e/o tic rispetto ai soggetti di controllo sani.

In aggiunta a questi risultati immunologici, abbiamo riscontrato che la presenza di DOC e/o tic era associata con positività per infezioni streptococciche ( $p = 0,0087$ ) (Figura 2). Ci sono stati sia resoconti negativi che positivi sull'associazione tra infezioni da streptococco e tic o DOC (Murphy e Pichichero 2002; Luo et al 2004; Murphy et al 2004, 2007; Kurlan et al 2008; Leckman et al 2011; Martino et al 2011; Murphy et al 2012). A volte l'infezione da streptococco associata ad esacerbazioni di tic e DOC è difficile da rilevare, perché le infezioni possono precedere i sintomi di alcuni mesi, o può essere rappresentativa di uno stato di portatore cronico. È stato suggerito in studi precedenti che, per determinare con precisione



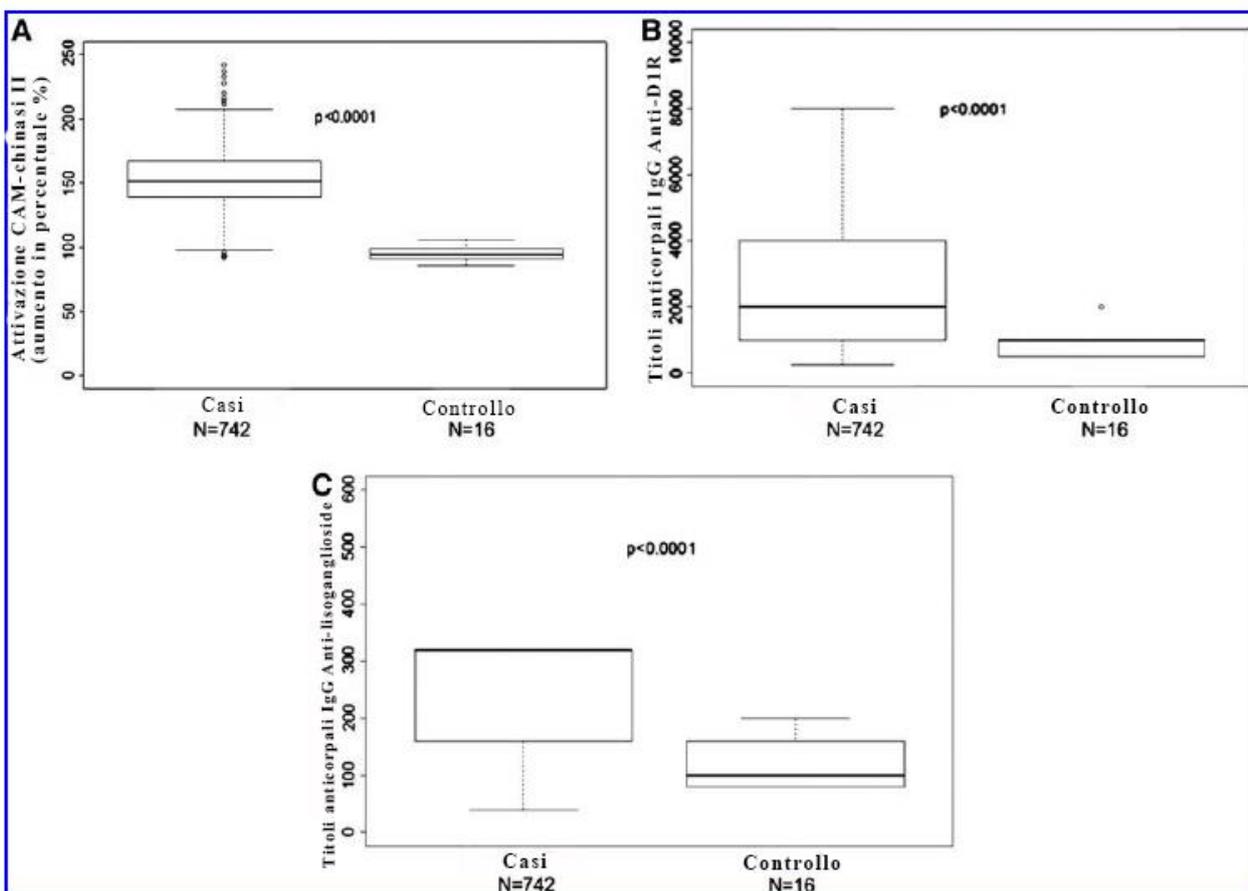
**Figura 6.** L'analisi di 261/307 soggetti mostra titoli anticorpali anti-D1R significativamente elevati in pazienti con DOC e/o tic rispetto a soggetti di controllo sani.

l'associazione con infezioni da streptococco, sono necessari campioni longitudinali piuttosto che il singolo campione prelevato in un determinato momento (Leckman et al. 2011). Questo nostro, è il primo resoconto che dimostra che le infezioni da streptococco possono essere più frequenti nei soggetti che hanno tic combinati e DOC.

Abbiamo anche riscontrato che i soggetti che avevano una storia positiva per infezione da streptococco hanno più probabilità di sviluppare sia DOC che tic (51%) rispetto a quelli risultati negativi (30%), mentre non abbiamo riscontrato alcuna associazione significativa col fattore

“infezione” quando tic o DOC venivano considerati singolarmente. Pertanto è possibile che i pazienti che si presentano con entrambi i disturbi, DOC e tic insieme, abbiano più probabilità di aver avuto infezioni da streptococco nella loro storia medica. Dato che ci possono essere varie eziologie per i sintomi ossessivo-compulsivi e per i tic, può essere che un'eziologia streptococcica possa rappresentare una causa più “virulenta” che intacca i gangli basali in maniera più diffusa, determinando la comparsa di sintomi neuropsichiatrici. Manifestazioni di solo DOC e solo tic hanno meno probabilità di essere manifestazioni di disturbi associati a GABHS, ma possono avere meccanismi patogenetici simili.

**Figura 7.** L'analisi del siero di tutti i partecipanti (742 soggetti) mostra (A) una segnalazione cellulare neuronale (CaM kinase II) elevata, ed elevati titoli IgG anti-D1R (B), e anti-lisoganglioside (C) titers,  $p < 0.0001$ .



Punti di forza dello studio includono campioni prelevati nella comunità in generale e l'utilizzo di cartelle cliniche, quando disponibili. Tuttavia, una diagnosi di disturbo da tic, DOC, o entrambi, si è basata sul resoconto fornito dai genitori, quando la diagnosi di un medico non era disponibile. Il resoconto fornito dai genitori non può essere certo stato preciso, e può aver portato ad errori di classificazione dei casi. Data la natura della provenienza dei dati da più fonti, non tutte le variabili (ad esempio età, etnia) sono complete. I dati mancanti possono comportare errori di informazione, se i casi con i dati disponibili non sono rappresentativi della popolazione target di giovani e giovani adulti con tic, DOC, o entrambi. I limiti dello studio includono anche la mancanza delle misurazioni relative alla gravità dei sintomi (ad esempio quelle misurate dalle *Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale [YBOCS]*, *TGSS*), la piccola dimensione del campione della coorte di controllo, e il fatto che i sintomi neuropsichiatrici siano stati auto-valutati. Inoltre, non abbiamo segnalazioni di sintomi neuropsichiatrici associati che i pazienti PANDAS possono sviluppare, quali ansia, depressione, irritabilità, o deficit cognitivo, tutti sintomi riportati dai giovani con PANDAS.

## Conclusione

Il nostro studio suggerisce una correlazione significativa tra tic e DOC associati a streptococco con elevata presenza nel siero di anticorpi antineuronali anti-D1R e anti-lisoganglioside e concomitante, maggiore attivazione di CaMKII nelle cellule neuronali umane. Giovani e giovani adulti con DOC e/o tic sembravano aver avuto nella loro storia medica, più episodi di infezione GABHS rispetto ai soggetti senza DOC e/o tic. Analisi del siero di tutti i soggetti (742) ha mostrato una segnalazione delle cellule neuronali significativamente attraverso le CaMKII, così come elevati titoli IgG anti-D1R e anti-lisoganglioside. DOC e tic cronici in giovani e giovani adulti, possono avere un'etiologia sottostante infettiva/immunologica.

## Importanza clinica

La correlazione statisticamente significativa tra una storia di tic e DOC con anticorpi antineuronali anti-D1R e anti-lisoganglioside, con attivazione funzionale delle CaMKII, suggerisce che anche i disturbi neuropsichiatrici pediatrici al di fuori della PANDAS possono essere associati ad autoimmunità contro il cervello. L'attività funzionale degli autoanticorpi nella segnalazione CaMKII in cellule neuronali umane, suggerisce che gli anticorpi possono prendere di mira i recettori nel cervello e alterare la neurotrasmissione della dopamina, determinando la comparsa di sintomi neuropsichiatrici quali tic e/o DOC. Inoltre, i giovani che manifestano DOC e/o tic, a prescindere dall'acuità dell'insorgenza, dovrebbero essere sottoposti a screening per infezioni da GABHS. Il trattamento di questi giovani però, va oltre la portata di questi risultati. Chiaramente, sono necessari ulteriori studi su giovani con tic e DOC cronici per determinare migliori approcci di valutazione e trattamento. Attraverso la comprensione dei fattori immunologici e fisiologici associati ad infezioni GABHS correlate a DOC e disordini da tic cronici, i medici alla fine potranno essere in grado di meglio identificare, diagnosticare e indirizzare il trattamento per gestire al meglio i sintomi cronici e migliorare la condizione di questi pazienti.

## Ringraziamenti

Ringraziamo la Dr. Tanya Murphy per la revisione critica di questo lavoro.

## Informativa

I Dr. Amir Zuccolo, Dr. Julie Stoner e Erica Edwards non hanno conflitti di interesse da dichiarare. Il Dr. Kiki Chang ha ricevuto finanziamenti per la ricerca da *GlaxoSmithKline* e *Merck*, è nel consiglio di sicurezza dei dati e del monitoraggio (DSMB) per *Sunovion*, ed è consulente non pagato per *Bristol Myers Squibb*, *GlaxoSmithKline*, e *Lilly*. Il Dr. Carol Cox, Adita Mascaro-Blanco, e Kathy Alvarez dichiarano interessi finanziari in *Moleculera Labs*, un laboratorio commerciale per l'esame diagnostico degli autoanticorpi contro il cuore e il cervello. La Dr. Madeleine Cunningham è direttore scientifico e co-fondatore con interessi finanziari in *Moleculera Labs*.

## References

Allen AJ, Leonard HL, Swedo SE: Case-Study - A new infection-triggered, autoimmune subtype of pediatric OCD and Tourette syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 34:307-311, 1995.  
American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.

Bejar R, Yasuda R, Krugers H, Hood K, Mayford M: Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: Dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *J Neurosci* 22:5719–5726, 2002.

Ben-Pazi H, Stoner JA, Cunningham MW: Dopamine receptor autoantibodies correlate with symptoms in Sydenham's Chorea. *PLoS One* 8:1–6, 2013.

Black JL, Lamke GT, Walikonis JE: Serologic survey of adult patients with obsessive-compulsive disorder for neuron-specific and other autoantibodies. *Psychiatry Res* 81:371–380, 1998.

Brilot F, Merheb V, Ding A, Murphy T, Dale RC: Antibody binding to neuronal surface in Sydenham chorea, but not in PANDAS or Tourette syndrome. *Neurology* 76:1508–1513, 2011.

Brimberg L, Benhar I, Mascaro-Blanco A, Alvarez K, Lotan D, Winter C, Klein J, Moses AE, Somnier FE, Leckman JF, Swedo SE, Cunningham MW, Joel D: Behavioral, pharmacological, and immunological abnormalities after streptococcal exposure: A novel rat model of Sydenham chorea and related neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 37:2076–2087, 2012.

Church AJ, Cardoso F, Dale RC, Lees AJ, Thompson EJ, Giovannoni G: Anti-basal ganglia antibodies in acute and persistent Sydenham's chorea. *Neurology* 59:227–231, 2002.

Church AJ, Dale RC, Lees AJ, Giovannoni G, Robertson MM: Tourette's syndrome: A cross sectional study to examine the PANDAS hypothesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:602–607, 2003.

Cox CJ, Sharma M, Leckman JF, Zuccolo J, Zuccolo A, Kovoov A, Swedo SE, Cunningham MW: Brain human monoclonal autoantibody from Sydenham chorea targets dopaminergic neurons in transgenic mice and signals dopamine D2 receptor: Implications in human disease. *J Immunol* 191:5524–5541, 2013.

Dale RC, Candler PM, Church AJ, Wait R, Pocock JM, Giovannoni G: Neuronal surface glycolytic enzymes are autoantigen targets in post-streptococcal autoimmune CNS disease. *J Neuroimmunol* 172:187–197, 2006.

Dale RC, Merheb V, Pillai S, Wang D, Cantrill L, Murphy TK, Ben-Pazi H, Varadkar S, Aumann TD, Horne MK, Church AJ, Fath T, Brilot F: Antibodies to surface dopamine-2 receptor in autoimmune movement and psychiatric disorders. *Brain* 135:3453–3468, 2012.

De Koninck P, Schulman H: Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* 279:227–230, 1998.

Hoffman KL, Hornig M, Yaddanapudi K, Jabado O, Lipkin WI: A murine model for neuropsychiatric disorders associated with group A beta-hemolytic streptococcal infection. *J Neurosci* 24:1780–1791, 2004.

Husby G, van de Rijn I, Zabriskie JB, Abidin ZH, Williams RC: Antibodies reacting with cytoplasm of subthalamic and caudate nuclei neurons in chorea and acute rheumatic fever. *J Exp Med* 144:1094–1110, 1976.

Kaplan EL, Rothermel CD, Johnson DR: Antistreptolysin O and antideoxyribonuclease B titers: Normal values for children ages 2 to 12 in the United States. *Pediatrics* 101:86–88, 1998.

Kiessling LS, Marcotte AC, Culpepper L: Anti-neuronal antibodies in movement disorders. *Pediatrics* 92:39–43, 1993.

Kiessling LS, Marcotte AC, Culpepper L: Antineuronal antibodies – Tics and obsessive-compulsive symptoms. *J Dev Behav Pediatr* 15:421–425, 1994.

Kirvan CA, Cox CJ, Swedo SE, Cunningham MW: Tubulin is a neuronal target of autoantibodies in Sydenham's chorea. *Journal of Immunology* 178(11):7412–7421, 2007.

Kirvan CA, Swedo SE, Heuser JS, Cunningham MW: Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med* 9:914–920, 2003.

Kirvan CA, Swedo SE, Kurahara D, Cunningham MW: Streptococcal mimicry and antibody-mediated cell signaling in the pathogenesis of Sydenham's chorea. *Autoimmunity* 39:21–29, 2006a.

Kirvan CA, Swedo SE, Snider LA, Cunningham MW: Antibody-mediated neuronal cell signaling in behavior and movement disorders. *J Neuroimmunol* 179:173–179, 2006b.

Kondo K, Kabasawa T: Improvement in Gilles de La Tourette Syndrome after corticosteroid-therapy. *Ann Neurol* 4:387, 1978.

Kurlan R, Johnson D, Kaplan EL, Tourette Syndrome Study Group: Streptococcal infection and exacerbations of childhood tics and obsessive-compulsive symptoms: A prospective blinded cohort study. *Pediatrics* 121:1188–1197, 2008.

Leckman JF, King RA, Gilbert DL, Coffey BJ, Singer HS, Dure LS, Grantz H, Katsovich L, Lin H, Lombroso PJ, Kawikova I, Johnson DR, Kurlan RM, Kaplan EL: Streptococcal upper respiratory tract infections and exacerbations of tic and obsessive-compulsive symptoms: A prospective longitudinal study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 50:108–118, 2011.

Luo F, Leckman JF, Katsovich L, Findley D, Grantz H, Tucker DM, Lombroso PJ, King RA, Bessen DE: Prospective longitudinal study of children with tic disorders and/or obsessive-compulsive disorder: Relationship of symptom exacerbations to newly acquired streptococcal infections. *Pediatrics* 113:e587–585, 2004.

Marques-Dias MJ, Mercadante MT, Tucker D, Lombroso P: Sydenham's chorea. *Psychiatr Clin North Am* 20:809–820, 1997.

Martino D, Chiarotti F, Buttiglione M, Cardona F, Creti R, Nardocci N, Orefici G, Veneselli E, Rizzo R, Gr ITSS: The relationship between group A streptococcal infections and Tourette syndrome: A study on a large service-based cohort. *Dev Med Child Neurol* 53:951–957, 2011.

Matarazzo E: Tourette's syndrome treated with ACTH and prednisone: Teport of two cases. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2:215–226, 1992.

Menegon A, Verderio C, Leoni C, Benfenati F, Czernik AJ, Greengard P, Matteoli M, Valtorta F: Spatial and temporal regulation of Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II activity in developing neurons. *J Neurosci* 22:7016–7026, 2002.

Mohammad SS, Ramanathan S, Brilot F, Dale RC: Autoantibody-associated movement disorders. *Neuropediatrics* 44:336–345, 2013.

Morris CM, Pardo-Villamizar C, Gause CD, Singer HS: Serum autoantibodies measured by immunofluorescence confirm a failure to differentiate PANDAS and Tourette syndrome from controls. *J Neurol Sci* 276:45–48, 2009.

Murphy M, Pichichero ME: Prospective identification and treatment of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorder associated with group A streptococcal infection (PANDAS). *Arch Pediatr Adolesc Med* 156:356–361, 2002.

Murphy TK, Sajid M, Soto O, Shapira N, Edge P, Yang M, Lewis MH, Goodman WK: Detecting pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcus in children with obsessive-compulsive disorder and tics. *Biol Psychiatry* 55:61–68, 2004.

Murphy TK, Snider LA, Mutch PJ, Harden E, Zaytoun A, Edge PJ, Storch EA, Yang MC, Mann G, Goodman WK, Swedo SE: Relationship of movements and behaviors to Group A Streptococcus infections in elementary school children. *Biol Psychiatry* 61:279–284, 2007.

Murphy TK, Storch EA, Lewin AB, Edge PJ, Goodman W: Clinical factors associated with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections. *J Pediatr* 160:314–319, 2012.

Pathmanandavel K, Starling J, Dale RC, Brilot F: Autoantibodies and the immune hypothesis in psychotic brain diseases: Challenges and perspectives. *Clin Dev Immunol* 2013:257184, 2013.

Pavone P, Parano E, Rizzo R, Trifiletti RR: Autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection: Sydenham chorea, PANDAS, and PANDAS variants. *J Child Neurol* 21:727–736, 2006.

Perlmutter SJ, Leitman SF, Garvey MA, Hamburger S, Feldman E, Leonard HL, Swedo SE: Therapeutic plasma exchange and intravenous immunoglobulin for obsessive-compulsive disorder and tic disorders in childhood. *Lancet* 354:1153–1158, 1999.

Ramanathan S, Mohammad SS, Brilot F, Dale RC: Autoimmune encephalitis: Recent updates and emerging challenges. *J Clin Neurosci* 21:722–730, 2013.

Singer HS, Giuliano JD, Hansen BH, Hallett JJ, Laurino JP, Benson M, Kiessling LS: Antibodies against human putamen in children with Tourette syndrome. *Neurology* 50:1618–1624, 1998.

Singer HS, Hong JJ, Yoon DY, Williams PN: Serum autoantibodies do not differentiate PANDAS and Tourette syndrome from controls. *Neurology* 65:1701–1707, 2005.

Swedo SE: Sydenham's chorea: A model for childhood autoimmune neuropsychiatric disorders. *JAMA* 272:1788–1791, 1994.

Swedo SE, Leckman JF, Rose NR: From research subgroup to clinical syndrome: Modifying the PANDAS criteria to describe PANS (pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome). *Pediatr Ther* 2:1–8, 2012.

Swedo SE, Leonard HL, Garvey M, Mittleman B, Allen AJ, Perlmutter S, Lougee L, Dow S, Zamkoff J, Dubbert BK: Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections: Clinical description of the first 50 cases. *Am J Psychiatry* 155:264–271, 1998.

Tsui J, Inagaki M, Schulman H: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation. *J Biol Chem* 280:9210–9216, 2005.

Yaddanapudi K, Hornig M, Serge R, De Miranda J, Baghban A, Villar G, Lipkin WI: Passive transfer of streptococcus-induced antibodies reproduces behavioral disturbances in a mouse model of pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection. *Mol Psychiatry* 15:712–726, 2010.

*Address correspondence to:*

*Madeleine W. Cunningham, PhD*

*Director, Immunology Training Program*

*Department of Microbiology and Immunology*

*University of Oklahoma Health Sciences Center*

*Biomedical Research Center Room 217*

*975 NE 10th Street*

*Oklahoma City, OK 73104*

*E-mail: madeleine-cunningham@ouhsc.edu*