

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede amministrativa del Dottorato di Ricerca

XXIII CICLO DEL
DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA MATERNO-INFANTILE, PEDIATRIA DELLO SVILUPPO E
DELL'EDUCAZIONE, PERINATOLOGIA

Vecchie e nuove Immunodeficienze Primitive: strategie per il sospetto e la diagnosi.

Settore scientifico-disciplinare: PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA

DOTTORANDO

Dr. Alberto Tommasini

COORDINATORE DEL COLLEGIO DOCENTI

Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura
Università degli Studi di Trieste

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura
Università degli Studi di Trieste

TUTORE

Dr. Tarcisio Not
Università degli Studi di Trieste

ANNO ACCADEMICO 2009 – 2010

INTRODUZIONE.

Le Immunodeficienze Primitive (PID) sono state inizialmente descritte come difetti di risposta a microrganismi patogeni. Nel corso del secolo scorso, grazie ai cambiamenti socio-ambientali e allo sviluppo di vaccini e antibiotici, si è assistito ad un ridimensionamento del ruolo delle malattie infettive nella patologia umana. In questo contesto, è aumentata progressivamente la consapevolezza che malattie infettive ricorrenti o gravi possono essere la spia di un difetto del sistema immune. Parallelamente, lo studio di questi difetti ha permesso di acquisire conoscenze fondamentali riguardo al funzionamento del sistema immune. Ad esempio, l'identificazione della malattia di Bruton, caratterizzata dall'assenza delle gammaglobuline sieriche, ha aiutato a comprendere il ruolo degli anticorpi nella risposta immune^[1]; ancora, la descrizione della malattia granulomatosa cronica ha permesso di confermare il ruolo fondamentale dei fagociti nella risposta ad alcuni tipi di batteri e funghi^[2]; la descrizione di immunodeficienze con linfopenia ha permesso di sottolineare il ruolo di coordinamento dei linfociti T su diverse funzioni immunitarie, tanto che un loro difetto condiziona quasi sempre un'Immunodeficienza Combinata Grave (SCID)^[3]. In pratica, al difetto di ciascuna modalità della risposta immunitaria, di ciascun braccio effettore, corrispondevano una o più malattie genetiche. D'altra parte, le conoscenze derivate dallo studio delle immunodeficienze permettevano di affinare gli strumenti diagnostici dell'immunologia, conducendo via via ad identificare nuove varietà di difetti immuni. L'introduzione degli anticorpi monoclonali nella diagnostica immunologica negli ultimi due decenni del secolo, permetterà un rapido aumento delle capacità di analisi, portando ad ampliare progressivamente la lista delle PID.

Nonostante ciò, persisterà per un po' di tempo l'idea che i difetti del sistema immunitario possano essere raggruppati in tre categorie diverse, sulla base della funzione prevalentemente interessata: la produzione anticorpale, l'immunità cellulare, la fagocitosi. Di conseguenza, i nuovi difetti potevano essere raggruppati in queste tre categorie principali. Nel gruppo dei difetti anticorpali, accanto alla malattia di Bruton (agammaglobulinemia X-recessiva senza linfociti B in circolo) venne descritta una condizione con ipogammaglobulinemia ma con presenza di linfociti B in circolo, che venne denominata Ipogammaglobulinemia Comune Variabile. Tra i difetti cellulari, si definirono diversi sottotipi di patologie a seconda che la linfopenia interessasse linfociti T, B e/o NK. Le strategie diagnostiche e terapeutiche erano ancora abbastanza omogenee all'interno di uno stesso gruppo: i difetti anticorpali avevano una prognosi migliore e si beneficiavano della terapia sostitutiva con immunoglobuline umane^[4]; i difetti cellulari avevano una

prognosi infausta in assenza di trattamento, ma molti casi potevano essere curati con successo per mezzo del trapianto di midollo^[5].

Nell'insieme, le immunodeficienze primitive erano viste come difetti di risposta (principalmente verso i patogeni), diversamente dalle malattie autoimmuni, allergiche e infiammatorie, che erano invece considerate come eccessi dell'immunità.

Ben presto, tuttavia, ci si accorse che il sistema è più complesso e che molti difetti possono presentarsi con fenotipi parziali o sovrapposti tra loro. Verso l'inizio del nuovo millennio, anche la dicotomia tra immunodeficienza e autoimmunità sarebbe stata messa duramente in discussione dalla caratterizzazione molecolare e immunologica di un nuovo gruppo di malattie genetiche, indicate come "disregolazioni immunitarie", caratterizzate da autoimmunità, allergia e infiammazione^[6, 7]. Ancora una volta, l'esperimento della natura, o meglio il paziente, permisero di caratterizzare un importante braccio effettore dell'immunità: quello della tolleranza immune^[8]. L'esistenza di linfociti regolatori, attivamente impiegati nel mantenimento della tolleranza, postulata su basi teoriche e su esperimenti nell'animale trovava qui la sua realtà e dignità nella fisiopatologia umana.

A questo punto, si poteva pensare di aver definito con gli esempi della patologia genetica i quattro grandi pilastri del funzionamento dell'immunità: la risposta umorale, quella cellulare, quella dei fagociti ed infine la tolleranza. In realtà, si cominciava a mettere in discussione la definizione stessa di immunodeficienza, non più letta solo come "mancanza di immunità", ma piuttosto come un generale "errore congenito dell'immunità". Quest'idea permise, negli anni seguenti, di puntualizzare quello che già si sapeva, e cioè che molte immunodeficienze potevano esprimersi sia con sintomi infettivi che con sintomi autoimmuni e infiammatori. E ancora, che terapie immunosoppressive, apparentemente paradossali per curare un difetto di linfociti, potevano costituire imprescindibili presidi in molte immunodeficienze.

Negli anni più recenti, la comprensione degli errori congeniti dell'immunità è proseguita con l'identificazione di una grande varietà di difetti, alcuni dei quali responsabili di complesse manifestazioni immunopatologiche, altri responsabili della selettiva suscettibilità a singole infezioni^[9]. Non è molto lontano dalla verità ammettere, oggi, che qualsiasi malattia autoimmune o infiammatoria o infettiva grave che si sviluppi nei primi anni di vita è, fino a prova contraria, espressione di un sottostante errore congenito dell'immunità. Di fatto, la lista dei difetti genetici conosciuti (circa 160) potrebbe ancora ampliarsi^[10]. La conoscenza purtroppo, non porta solo miglioramenti al nostro operare. Sospettare e diagnosticare più di 100 diverse malattie è certo cosa diversa dalla diagnosi dei tre gruppi di malattie che avevamo imparato alla fine del secolo scorso: i criteri di sospetto diventano più ampi e gli algoritmi più complicati, con il rischio di rendere più

difficile anche quel compito che già eravamo riusciti a svolgere sulle vecchie immunodeficienze^[11].

La domanda che ci poniamo con questo lavoro di tesi è come in un centro ospedaliero di terzo livello siano stati affrontati questi cambiamenti, come l'epidemiologia delle immunodeficienze sia cambiata, quali siano le ripercussioni sui percorsi di sospetto e diagnosi, quali le strategie ancora da attuare.

La domanda, in altre parole, è come possiamo modificare i nostri comportamenti in modo che le *“nuove immunodeficienze”* possano entrare nelle nostre capacità di sospetto e diagnosi senza complicare il nostro approccio verso le *“vecchie immunodeficienze”*, che meritano tuttora un pensiero rapido e una diagnosi tempestiva per giungere ad un trattamento efficace.

OBIETTIVI.

L'obiettivo generale è quello di capire come la conoscenza di nuove immunodeficienze e la disponibilità di nuovi strumenti diagnostici possano influenzare le nostre strategie per il sospetto e diagnosi di PID e quali interventi possano rendersi necessari per ottimizzare la pratica clinica in questo campo in continua evoluzione. A questo scopo sono state eseguite le seguenti attività:

Raccolta di tutti i casi di Immunodeficienza Primitiva diagnosticati negli ultimi 35 anni presso l'IRCCS Burlo Garofolo e presso la Clinica Pediatrica dell'Ospedale Universitario di Lubiana.

- L'epidemiologia locale è stata confrontata con altre esperienze pubblicate e con registri nazionali ed internazionali;
- le caratteristiche cliniche (infettive, infiammatorie, autoimmuni, altro) che hanno condotto al sospetto di PID sono state confrontate con i criteri di sospetto proposti dall'ESID;
- considerata la diversa età tipica di presentazione di molte PID, si è valutato se la suddivisione in gruppi per età possa facilitare un approccio al sospetto e alla diagnosi.

Analisi prospettica dell'iter di sospetto e diagnosi di PID presso l'IRCCS Burlo Garofolo negli ultimi due anni.

- E' stata analizzata l'efficacia diagnostica di test immunologici eseguiti in seguito a consulenza presso un laboratorio specializzato in immunodeficienze a confronto con l'attività di analisi immunologica di "routine" svolta presso il laboratorio ospedaliero di citometria.

Proposta di un iter pratico per il sospetto e diagnosi di PID presso un centro di terzo livello.

Sulla base dei risultati precedenti, si vogliono identificare strategie pratiche per il sospetto e per l'iter diagnostico immunologico.

METODI

Pazienti.

Sono stati registrati nello studio tutti i pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di Immunodeficienza Primitiva presso l'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste e la Clinica Pediatrica dell'Ospedale Universitario di Lubiana negli ultimi 35 anni. Sono state considerate come immunodeficienze primitive le malattie incluse nella più recente revisione della classificazione della Unione Internazionale delle Società di Immunologia, con esclusione dei deficit isolati di IgA.

Le categorie diagnostiche sono:

- *Difetti anticorpali*: malattia di Bruton, ipogammaglobulinemia comune variabile.
- *Immunodeficienze combinate*: SCID, sindrome di Omenn, sindromi con IperIgM.
- *Difetti dei fagociti*: malattia granulomatosa cronica, difetti di adesione leucocitaria, neutropenie congenite.
- *Altre ID ben definite (o ID sindromiche)*: Sindrome di Wiskott Aldrich, sindrome di Di George, etc.
- *Difetti del complemento*: difetti di singoli fattori del complemento.
- *Immunodeficienze disregolatorie*: APECED, IPEX, IPEX-like, fHLH, ALPS
- *Sindromi auto infiammatorie*: CIAS1patie, febbre mediterranea familiare, TRAPS, difetto di mevalonato kinasi, DIRA
- *Non classificate*

Per ciascun paziente, sono stati raccolti i dati anagrafici essenziali, gli elementi caratterizzanti il quadro clinico di presentazione, gli esami eseguiti per giungere alla diagnosi con particolare riferimento alle valutazioni immunologiche e genetiche e la diagnosi finale.

L'analisi dei dati ha compreso:

- La definizione dell'epidemiologia delle diverse forme di PID.
- La valutazione degli elementi clinici alla diagnosi. Dato che esistono criteri per facilitare il sospetto di PID sulla base della presenza di varie categorie di sintomi (infezioni ricorrenti, infezioni inusuali, autoimmunità, etc), abbiamo valutato quanti dei sintomi da noi riscontrati rientrassero in ciascuna di queste categorie.

- La valutazione delle diagnosi e dei sintomi in diverse classi di età. Dato che molte PID mostrano una diversa epidemiologia per età è logico aspettarsi che diversi tipi di sintomi ed esami diagnostici possano avere diversa rilevanza in diverse classi di età.

Studio prospettico

Da alcuni anni, si è sviluppato presso i laboratori di ricerca dell'IRCCS Burlo Garofolo un gruppo di lavoro impegnato nella diagnosi e nello studio delle immunodeficienze primitive. Uno degli scopi di questo lavoro è anche quello di valutare l'utilità diagnostica di esami immunologici di nuova introduzione, rispetto alle prestazioni diagnostiche convenzionali (cosiddetto "pannello base" dell'immunofenotipo), disponibili presso il laboratorio di Citometria dell'ospedale.

Sono stati registrati tutti gli esami eseguiti negli ultimi 3 anni ed il loro contributo alla diagnosi di immunodeficienza. Riassumiamo di seguito una lista dei nuovi test introdotti in questi anni. Per molti degli esami più specialistici sono utilizzati valori di riferimento già definiti in letteratura e/o sviluppati presso laboratori specializzati (in particolare, dal laboratorio di analisi della Mayo Clinics).

Analisi di commutazione e memoria dei linfociti B (B commutati memoria).

Questo test permette di identificare ed enumerare i linfociti B che hanno sviluppato una risposta anticorpale adattativa in seguito al contatto con un antigene. Questi linfociti esprimono sulla propria superficie il marcatore CD19, identificativo dei linfociti B, il CD27, indicativo dello sviluppo di memoria in seguito a pregresso contatto con l'antigene mentre non esprimono più le immunoglobuline IgD o IgM, a conferma che hanno compiuto la cosiddetta commutazione di classe isotipica. Nei bambini molto piccoli, il test ha scarsa validità, perché l'esperienza di confronto con antigeni ambientali è ancora limitata. Nei bambini più grandi e negli adulti la percentuale di linfociti B *switched memory* sale progressivamente fino a valori intorno al 10% dei linfociti B totali. Un valore molto basso di questo parametro (sotto il 2%) indica una relativa incapacità di montare una risposta anticorpale adattativa. Di solito, i pazienti con difetto di questi linfociti hanno anche un difetto della risposta anticorpale contro i vaccini. Lo studio dei B commutati memoria è utile nella diagnosi delle ipogammaglobulinemie (agammaglobulinemia, ipogammaglobulinemia comune variabile, sindromi con IperIgM) e può dare informazioni utili anche in alcune immunodeficienze complesse come la sindrome di Wiskott-Aldrich. Nei pazienti con ipogammaglobulinemia comune variabile, la valutazione della distribuzione dei sottogruppi di linfociti B può avere un valore classificativo e prognostico.

Analisi di output timico di linfociti T (RTE = recent thymic emigrants).

I linfociti T periferici sono composti da due gruppi principali: 1) linfociti fuoriusciti dal timo e non ancora proliferati in periferia (RTE); 2) linfociti che hanno proliferato in periferia. Le due popolazioni non corrispondono esattamente a quelle identificate dal cosiddetto fenotipo memoria (espressione dell'isoforma R0 dell'antigene CD45) e *naïve* (isoforma RA del CD45), dato che non tutti i linfociti proliferati in periferia assumono il fenotipo memoria. L'espressione contemporanea di CD31 e di CD45RA sulla superficie di linfociti CD4 permette di discriminare gli RTE dagli altri linfociti *naïve*^[12-15]. I valori di RTE sono tanto più elevati quanto più il bambino è piccolo. Bassi valori di RTE suggeriscono la presenza di un difetto di maturazione dei linfociti T. Questo test è particolarmente utile in bambini molto piccoli in cui si sospetti un difetto combinato dell'immunità in assenza di linfopenia o con linfopenia *border-line* (ad esempio nelle cosiddette *leaky SCID*, nella sindrome di Di George, Cartilage Hair Hypoplasia). Il test è inoltre utilizzabile per valutare la capacità di rigenerazione timica in diverse categorie di pazienti: nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche per sapere se la rigenerazione linfocitaria è maggiormente rappresentata dalla proliferazione di linfociti infusi al momento del trapianto (post-timici) o dalla generazione di nuovi linfociti a partire dalle cellule staminali infuse; nei pazienti con infezione da HIV sottoposti ad HAART; in pazienti sottoposti a chemioterapia o immunomodulazione; per controllare la presenza di eventuali residui timici dopo timectomia; per l'analisi della timopoiesi dopo trapianto o terapie citostatiche o antivirali.

Linfociti T con fenotipo di memoria o naïve.

I linfociti T memoria sono linfociti già commissionati a rispondere verso specifici antigeni. Essi esprimono sulla propria superficie l'isoforma R0 dell'antigene leucocitario CD45. Una quota aumentata di queste cellule in bambini molto piccoli è suggestiva di disregolazione immunitaria con sostenuta attivazione periferica (ad esempio nella sindrome di Omenn, nella GVHD materna e nell'IPEX). Il valore è in qualche misura speculare rispetto agli RTE. Il parametro può essere utilmente valutato nel *follow-up* di malattie autoimmuni particolarmente aggressive come correlato biologico della risposta ai farmaci immunomodulanti.

Linfociti T doppio negativi con recettore alfa/beta (DNT).

Sono una popolazione anomala di linfociti T caratterizzati dalla presenza del marcatore CD3 e del recettore T alfa/beta in assenza sia del CD4 che del CD8. Si tratta di una popolazione che rispecchia probabilmente linfociti precedentemente attivati ma non correttamente eliminati per difetto dei meccanismi di apoptosi. Il test ha buona sensibilità e specificità nell'identificare la maggior parte dei difetti congeniti di apoptosi^[16]. Valori al di sopra del 2.5% dei linfociti T sono fortemente suggestivi di difetto di apoptosi. L'esecuzione del test è indicata in tutti i bambini con ipertrofia linfatica e/o citopenia (piastrinopenia, sindrome di Evans) non spiegata^[17]. Può essere completato con la valutazione di altri biomarcatori, come la vitamina B12 e con test funzionali di apoptosi e, infine, con l'analisi genetica^[18]. Recenti dati suggeriscono che la percentuale di DNT possa essere valutata anche per studiare la risposta al trattamento in questi pazienti^[19].

Linfociti regolatori.

Sono una popolazione di linfociti T difficilmente definibile, che correla con l'elevata espressione degli antigeni CD25 e FOXP3 in linfociti T CD4, in assenza di elevata espressione di CD127^[20]. Un difetto di questi linfociti è indicativo di disregolazione immune tipo IPEX^[8]. Se un difetto di queste cellule ha un indubbio valore diagnostico, la loro presenza non permette di escludere una sindrome tipo-IPEX, dato che esistono casi in cui questi linfociti sono presenti ma non pienamente funzionali^[21, 22].

Test di espressione di antigeni dopo attivazione (CD25, CD69, CD40L, HLA-DR etc)

L'analisi valuta la capacità dei linfociti periferici di attivarsi in seguito all'aggiunta di determinati stimoli (fitoemoagglutinina, esteri del forbolo, ionomicina, stimolo recettoriale). I dati sono confrontati con quelli ottenuti da un donatore sano di controllo esaminato contemporaneamente. A 24 ore dall'attivazione, >50% dei linfociti CD3 deve esprimere gli antigeni di attivazione CD2, HLA-DR e CD69. Il risultato del test va sempre interpretato sulla base del quesito clinico e di eventuali altri dati di laboratorio.

Questo test è particolarmente importante per valutare la capacità di esprimere antigeni che sono espressi in modo evidente solo su linfociti attivati. Un difetto di espressione del CD40L su linfociti T attivati è caratteristico della immunodeficienza con IperIgM legata al cromosoma X. Un difetto di espressione dell'antigene CD25 dopo attivazione è caratteristico di una disregolazione immunitaria grave dovuta a mutazione del CD25.

Test di fagocitosi e produzione di superossido.

E' un test molto semplice che valuta la capacità di sviluppo del *burst* ossidativo in granulociti stimolati con cellule batteriche formalinizzate o con attivatori (esteri del forbolo). La produzione di superossido viene rivelata dall'attivazione di un colorante che, una volta ossidato, emette intensa fluorescenza (di-idrorodamina 123). Il test permette di identificare i difetti della catena ossidativa dei granulociti, che sono alla base delle diverse forme di Malattia Granulomatosa Cronica. Una diminuzione della reazione ossidativa può essere documentata anche nei difetti completi di mieloperossidasi.

Test di proliferazione

L'analisi valuta la capacità dei linfociti periferici di proliferare in seguito all'aggiunta di determinati stimoli^[23]. I dati sono confrontati con quelli ottenuti da un donatore sano di controllo esaminato contemporaneamente. Non ci sono valori normali di riferimento: i risultati devono sempre essere valutati sulla base del quesito clinico. I linfociti vengono marcati con un colorante fluorescente che permetterà di valutare, dopo 84 ore di coltura, le generazioni proliferate. Il risultato viene espresso come percentuale di precursori proliferati e come numero di generazioni prodotte. Il test viene considerato informativo se la percentuale di proliferazione del donatore è superiore al 30% (in almeno 2 generazioni) con lo stimolo più potente e superiore al *background* con lo stimolo più blando. In casi particolari, possono essere eseguite valutazioni di proliferazione con aggiunta di citochine (IL2 o IL15). Il test permette di discriminare tra difetti maggiori nei meccanismi di attivazione e proliferazione (difetto con tutti gli stimoli), e difetti legati all'intensità del segnale (difetto solo allo stimolo con CD3). Un difetto a uno o più stimoli può essere evidenziato nelle immunodeficienze combinate gravi (SCID) e in alcuni difetti combinati più subdoli (sindromi da IperIgM, sindrome di Wiskott Aldrich, displasie ectodermiche con difetto di NEMO)^[24, 25].

Test di apoptosi.

Il test funzionale di apoptosi indaga l'integrità della via di segnale del FAS e dà risultati patologici in presenza di mutazione del FAS e di altre proteine coinvolte in questa via.

Normalmente, i linfociti periferici sono relativamente resistenti all'induzione di apoptosi, ma tendono a diventare suscettibili dopo un periodo di attivazione più o meno lungo. Questa caratteristica rispecchia i meccanismi con cui il sistema immune mantiene la propria omeostasi, eliminando i linfociti attivati al termine di una fisiologica risposta immune. Per eseguire il test, i linfociti periferici del soggetto devono quindi essere sottoposti ad attivazione *in vitro*, e solo successivamente potrà essere somministrato lo stimolo apoptotico, utilizzando anticorpi IgM anti FAS. L'esecuzione del test non è semplice e deve essere utilizzato sempre un controllo sano. Il test dà risultati informativi solo quando si riesca ad ottenere un elevata percentuale di linfociti vitali a distanza di 1-2 settimane dall'attivazione^[16].

Test di citotossicità.

Si tratta di un test funzionale che indaga la capacità da parte di linfociti CD8 e cellule NK di lisare cellule tumorali. Come bersaglio convenzionale viene utilizzata una linea di leucemia mieloide (K562) colorata con tracciante fluorescente in modo da essere identificabile in analisi citometrica dopo incubazione con i linfociti. L'attività citotossica delle cellule del sangue (CD8 e NK) viene misurata sulla base della percentuale di cellule bersaglio che va incontro ad apoptosi o necrosi dopo il periodo di incubazione. Un risultato patologico può essere dovuto ad un difetto numerico di queste cellule o ad un difetto nella produzione di molecole citolitiche, come le perforine e il granzimaB. Il test dà di solito risultati indicativi nelle sindromi linfocitarie emofagocitiche, sia familiari che sporadiche, quale che sia la loro causa molecolare^[26-28].

Altri test.

L'analisi funzionale del sistema immunitario può contare su numerosi altri test che di solito vengono svolti nel contesto di progetti di ricerca. Ad esempio, l'espressione della proteina WASP (non eseguita presso il nostro laboratorio) all'interno dei leucociti può avere un significato sia diagnostico che prognostico. Ancora, l'analisi di espressione del fattore FOXP3 all'interno dei linfociti regolatori può permettere di identificare un sottogruppo di pazienti con sindrome IPEX, in cui la mutazione genica si associa a diminuita produzione della proteina. Altri test hanno un significato funzionale e sono utilizzati per indagare percorsi di trasduzione del segnale: lo studio della fosforilazione del fattore STAT5 dopo esposizione a diverse citochine (test non ancora disponibile presso il nostro laboratorio)

permette di identificare le principali cause di SCID legate a difetto di segnale (mutazione della catena gamma comune; difetto di JAK3; difetto di IL7R).

Studio della risposta anticorpale ai vaccini.

Presso i laboratori della maggior parte degli ospedali è possibile verificare la risposta anticorpale verso i vaccini obbligatori. La presenza di anticorpi anti-tetano e/o anti HBsAg correla con la capacità di compiere una risposta anticorpale adattativa verso antigeni proteici. La produzione di anticorpi anti-pneumococco dopo vaccinazione, in un bambino sopra i 5 anni di età, correla con la capacità di rispondere ad antigeni polisaccaridici.

La ricerca degli anticorpi anti tetano e anti HBsAg può aiutare nella definizione delle ipogammaglobulinemie del bambino pre-scolare: la presenza di una risposta anti vaccinale depone in questi casi per una diagnosi di ipogammaglobulinemia transitoria dell'infanzia. In bambini più grandi e negli adulti, l'assenza di una risposta anti-vaccinale è un elemento contributivo per la diagnosi di immunodeficienza anticorpale. L'assenza di anticorpi anti-pneumococco dopo vaccinazione identifica un sottogruppo di immunodeficienze anticorpali selettive.

Analisi genetiche.

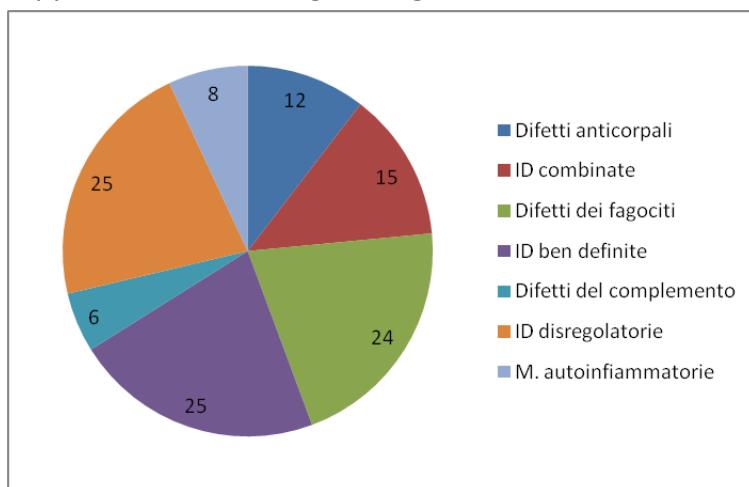
Lo studio del fenotipo e della funzione immune consente nella maggior parte dei casi di identificare uno o pochi geni candidati che possono essere oggetto di studio molecolare. Nei casi in cui non dovesse essere identificata nessuna mutazione, lo studio immunologico può fornire dati utili per una diagnosi clinico-funzionale di immunodeficienza. Tuttavia, la maggior parte dei test immunologici resta poco standardizzata e a volte di esecuzione complessa. Al contrario, l'analisi genetica può essere eseguita in modo altamente automatizzato e con prezzi che tendono ad essere progressivamente più contenuti. Questi vantaggi dovrebbero permettere nel corso di pochi anni di eseguire analisi molecolari contemporaneamente su numerosi geni, accorciando i tempi ed i costi della diagnosi. Indagini genetiche ad alta processività possono inoltre essere utilizzate per identificare nuove cause genetiche di immunodeficienza, anche se per ora questo rimane un approccio ad elevata complessità bioinformatica, sostanzialmente dedicato alla ricerca.

RISULTATI

1) Epidemiologia delle immunodeficienze primitive in Friuli Venezia Giulia e in Slovenia.

Una diagnosi di immunodeficienza primitiva è stata posta in 115 pazienti (78 maschi e 37 femmine) provenienti dal Friuli Venezia Giulia e dalla Slovenia. A questi si aggiungono 29 pazienti riferiti da altre aree geografiche.

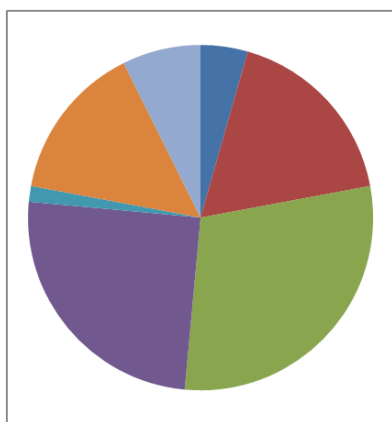
La distribuzione dei pazienti nelle diverse categorie di immunodeficienza (vedi “Metodi”) è rappresentata nella figura seguente.



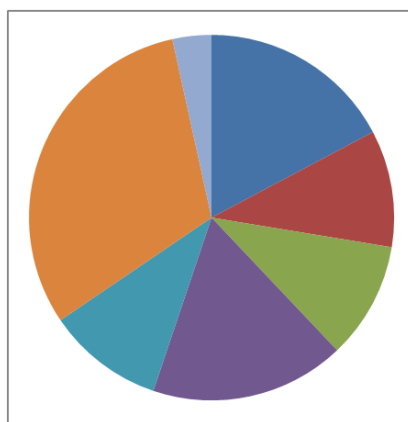
Le singole diagnosi più comuni sono risultate: malattia granulomatosa cronica (15 casi), APECED (14), CID-SCID (10), CVID (7), fHLH (6), WAS (6), XLA (5).

I dati sono stati successivamente scorporati in tre gruppi sulla base dell'età all'esordio dei sintomi: entro il primo anno; tra 1 e 6 anni; al di sopra dei 6 anni.

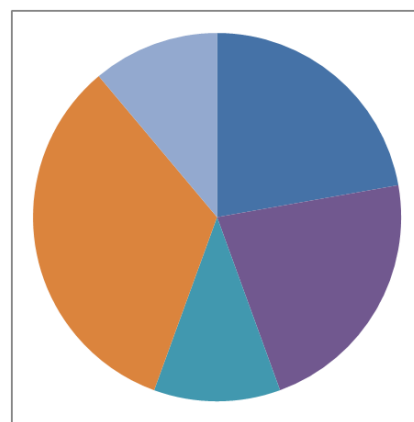
La distribuzione delle diagnosi nelle diverse categorie è riportata nei tre grafici sottostanti.



Esordio < 1 anno



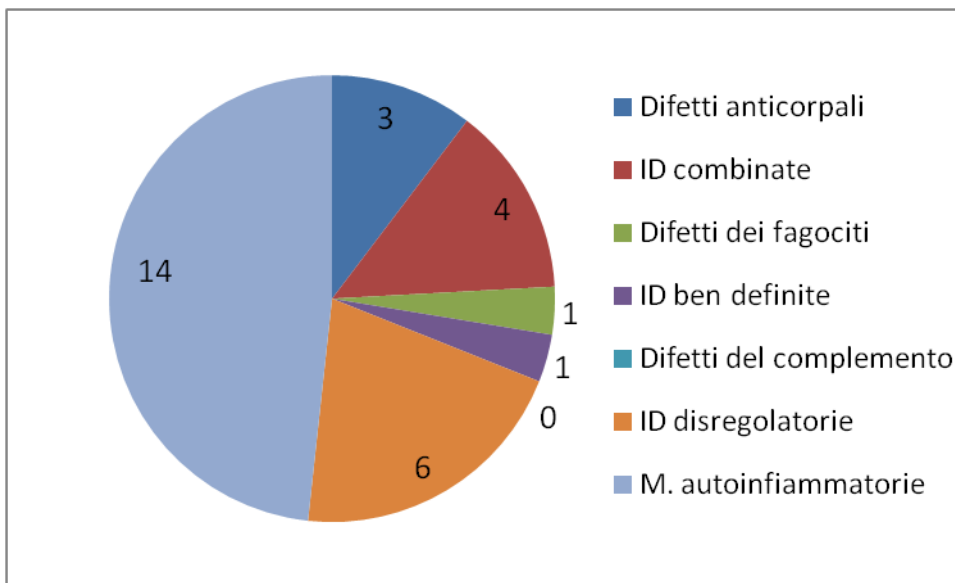
Esordio 1 – 6 anni



Esordio > 6 anni

Nel gruppo con esordio nel primo anno di vita, i difetti dei fagociti (malattia granulomatosa cronica, sindrome di Shwachman e neutropenie congenite) e le immunodeficienze sindromiche (malattia di Wiskott Aldrich, malattia di Di George, etc) sono i due gruppi più numerosi; da 1 a 6 anni, diventano più frequenti le sindromi disregolatorie (APECED, ALPS, fHLH, IPEX); al di sopra dei 6 anni, scompaiono le immunodeficienze combinate e i difetti dei fagociti, mentre continuano ad aumentare le immunodeficienze disregolatorie e i difetti anticorpali.

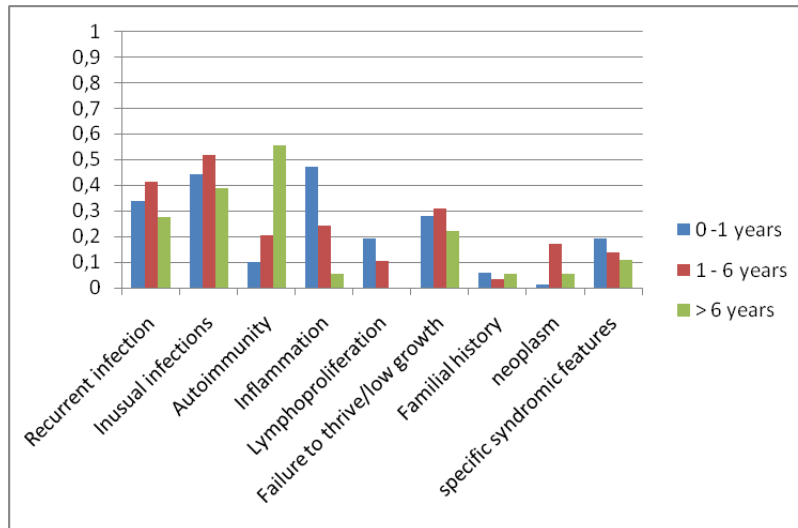
La distribuzione delle diagnosi nella popolazione riferita da altre aree geografiche è riportata nel grafico seguente (tutte le classi di età raggruppate).



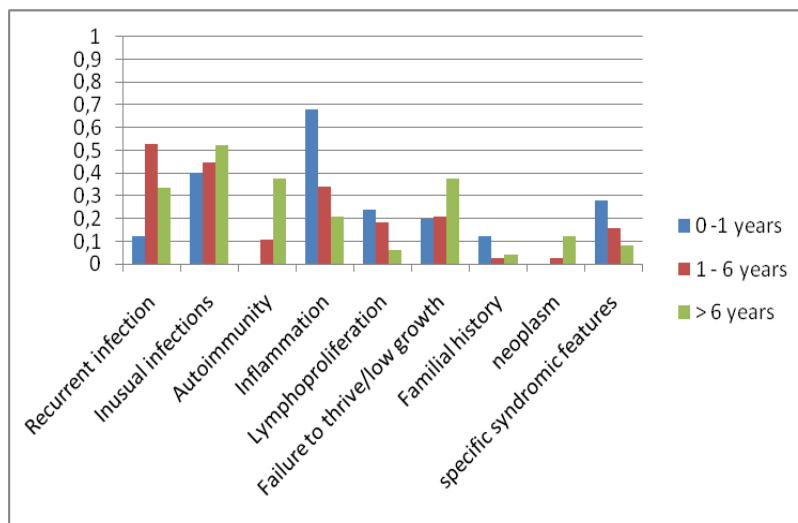
Il gruppo più rappresentato in questo caso è quello delle sindromi auto-infiammatorie, seguito da quello delle immunodeficienze disregolatorie.

Sintomi di presentazione suddivisi per età all'esordio.

I sintomi all'esordio sono stati registrati dalle cartelle di ammissione prima che la diagnosi di immunodeficienza venisse formalizzata. I dati sono stati analizzati dapprima suddividendo la casistica in base all'età di comparsa dei sintomi e successivamente suddividendola in base all'età del paziente alla diagnosi.



Sintomi di presentazione. Pazienti suddivisi in base all'età all'esordio dei sintomi.



Sintomi di presentazione. Pazienti suddivisi in base all'età alla diagnosi.

Le infezioni ricorrenti o inusuali hanno un'elevata importanza in tutte le età. I bambini con esordio nel primo anno di vita hanno più frequentemente sintomi di tipo infiammatorio (di solito a carico di intestino e cute) e più raramente malattie autoimmunitarie e neoplasie. Indipendentemente dall'età all'esordio, nei casi con diagnosi prima dell'anno, le infezioni ricorrenti hanno raramente costituito il sintomo di presentazione, mentre un ruolo più

importante è stato giocato dai sintomi infiammatori (presenti in quasi il 70% dei casi) e dalle infezioni inusuali (40%).

2) Analisi prospettica dell'iter di sospetto e diagnosi di PID presso l'IRCCS Burlo Garofolo.

Dal febbraio del 2008 al gennaio del 2011, presso il "Laboratorio delle Immunodeficienze", sono stati analizzati campioni da 58 pazienti con sospetto di immunodeficienza.

Nella maggior parte dei casi la scelta degli esami da eseguire è stata concordata attraverso una discussione del caso tra i medici della clinica ed il laboratorio.

Gli esami eseguiti più frequentemente sono stati, nell'ordine:

- analisi dei B commutati memoria nel 62% dei casi (36/58 pazienti),
- profilo base delle sottopopolazioni linfocitarie nel 38% (22/58)
- RTE nel 26% (15/58).

Le indicazioni all'esecuzione degli esami sono state:

- difetti anticorpali (36),
- sospette immunodeficienze combinate (15),
- sospette disregolazioni immuni (14 casi).

I test che complessivamente hanno dato più risultati contributivi per la diagnosi sono risultati:

- lo studio dei B commutati memoria, che ha fornito dati utili in 7/58 pazienti (12%)
- la valutazione degli RTE in 4/58 (7%).

	Paz. Totali	T-B-NK	RTE	B mem	T mem	T attiv	T reg	DNT	prolif	apopt	Antig.	anti-pneumo
eseguiti	58	22	15	36	5	7	5	8	5	3	7	3
informativi		1	4	7	0	2	2	2	0	2	2	1

Esami eseguiti presso il Laboratorio Immunodeficienze e numero dei casi in cui il risultato ha contribuito a definire la diagnosi.

Data la scarsa numerosità del campione, non possiamo calcolare la specificità dei vari test nell'indicare la presenza di un difetto immune.

I test specialistici eseguiti per situazioni clinicamente ben selezionate hanno dato generalmente buoni risultati, rivelandosi utili in un'elevata percentuale dei casi in cui sono

stati eseguiti. In particolare lo studio di antigeni di attivazione dei T ha dato risultati contributivi nel 28% dei casi in cui è stato eseguito e lo studio dei DNT nel 25%.

Complessivamente, questi esami hanno permesso di eseguire o confermare la diagnosi di immunodeficienza in 15 casi:

- 6 casi di ipogammaglobulinemia comune variabile (confermati dall'analisi dei linfociti B memoria),
- 2 casi di Displasia metafisaria di McKusic (già diagnosticati in precedenza, ma caratterizzati da una chiara alterazione degli RTE),
- 6 casi di disregolazioni immuni (definiti grazie all'analisi di antigeni di attivazione e all'analisi dei linfociti DNT).

Nello stesso periodo, presso il laboratorio di citometria sono state eseguite circa 500 analisi del "profilo base" delle sottopopolazioni linfocitarie (linfociti T CD4, T CD8, B, NK), per varie indicazioni diagnostiche, senza contribuire alla diagnosi di un singolo caso di immunodeficienza. Un caso di malattia granulomatosa cronica è stato diagnosticato per mezzo del test del superossido.

Discussione

Nuove e vecchie immunodeficienze hanno una frequenza paragonabile. Singolarmente, le due immunodeficienze più comuni sono risultate la malattia granulomatosa cronica e la APECED.

Le diagnosi di PID risultano distribuite in tutte le categorie diagnostiche, senza una evidente prevalenza di un gruppo sugli altri. Questi dati danno un'immagine alquanto diversa rispetto a quelle che deriva da registri internazionali come quello tenuto presso l'Organizzazione Europea per le Immunodeficienze (ESID), i cui dati sono riportati nella tabella seguente, insieme a quelli di una recente analisi epidemiologica francese e del presente studio. In particolare, la casistica dell'ESID mostra una netta prevalenza dei difetti anticorpali e invece una scarsa rappresentazione dei difetti dei fagociti e delle immunodeficienze disregolatorie.

Diagnosi	ESID 2011	Francia 2010	FVG-SLO 2011
Difetti anticorpali	55.5%	42.8%	10.4%
Difetti combinati	7.7%	17.3%	13.0%
Difetti dei fagociti	10.2%	18.7%	20.9%
Difetti del complemento	4.7%	0.5%	5.2%
Altre (sindromiche)	16.9%	14.1%	21.7%
Disregolatorie	1.4%	6.6%	21.7%
Auto-infiammatorie	1.9%		6.9%
Inclassificate	1.8%		
	Include adulti	Include adulti	Solo pediatrica

Epidemiologia delle immunodeficienze primitive in tre registri diversi: ESID = organizzazione Europea per le Immunodeficienze.

Il primo motivo che è alla base di queste differenze è l'inclusione nel registro ESID, ma non nella nostra casistica, di pazienti adulti, nei quali la PID di più frequente riscontro è senza dubbio l'ipogammaglobulinemia comune variabile.

Un secondo motivo potrebbe risiedere nel carattere "volontaristico" dei registri internazionali, che fa sì che le diagnosi eseguite da alcuni specialisti (ad esempio gli immunologi) abbiano maggior probabilità di essere segnalate rispetto a quelle formulate da altri specialisti (endocrinologi, gastroenterologi, pneumologi, etc). Nel nostro caso, il comune denominatore della casistica è stato quello pediatrico, cosa che ha permesso di includere nella pazienti seguiti da diversi specialisti all'interno di uno stesso Istituto.

Questo dato può spiegare una maggiore rappresentazione nella nostra casistica di determinate malattie, come ad esempio quelle su base auto-infiammatoria che sono di solito seguite dal reumatologo.

Di fatto, anche il registro Nazionale Francese, recentemente pubblicato, presenta aumentate percentuali dei difetti combinati, dei difetti dei fagociti e delle immunodeficienze disregolatorie rispetto al database ESID. Similmente al registro dell'ESID, questo registro include i casi adulti ma, al contrario non include le diagnosi di APECED (Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dysplasia) e le sindromi auto-infiammatorie. Per questi motivi, la scarsa rappresentazione dei difetti anticorpali è ancor più significativa.

Infine, è possibile che in molti centri alcune delle immunodeficienze "nuove" siano sotto-diagnosticate. Questo viene suggerito dall'analisi dei pazienti giunti alla nostra attenzione da altre aree: in questi casi la frequenza di malattie auto-infiammatorie e disregolatorie è apparse molto superiore all'atteso.

Partendo da questi dati possiamo fare le seguenti considerazioni:

- Alcune immunodeficienze, prese singolarmente, appaiono più frequenti di altre. Tra queste è importante segnalare la malattia granulomatosa cronica e la APECED. La diagnosi precoce è importante in entrambi i casi e può essere indirizzata e/o formulata con esami semplici (test del superossido, dosaggio di autoanticorpi).
- Le immunodeficienze non sono una specialità di un singolo medico, ma un problema trasversale comune a diverse malattie seguite da diversi specialisti. Il fatto che in un ambito pediatrico sia più facile mettere insieme tutte le diverse immunodeficienze (vecchie e nuove), sottolinea la multidisciplinarietà del problema.

Distribuzione per età.

Come era da attendersi, la prevalenza di diverse immunodeficienze cambia sensibilmente con l'età. I difetti più gravi e di più urgente necessità diagnostica si verificano nei primi anni di vita. Ci sembra perciò pretenzioso e poco utile definire criteri di sospetto delle immunodeficienze che non tengano, in primo luogo, conto dell'età. Anche sulla base dello spettro allargato di diagnosi possibili, la costruzione di criteri di sospetto e di iter diagnostici validi per tutte le condizioni sembra più un esercizio di algoritmi matematici che una attività medica^[11]. Al contrario, il pensiero in modo strutturato per età può semplificare l'approccio ai pazienti con immunodeficienza e può facilitare un approccio pesato secondo priorità cliniche (urgenza della diagnosi).

Le immunodeficienze combinate gravi si presentano solo nei primissimi anni di vita e rappresentano sempre un'urgenza diagnostica, questo è in parte vero anche per le più

comuni immunodeficienze sindromiche (o “Altre ID ben caratterizzate”); le immunodeficienze anticorpali si ritrovano invece prevalentemente nei bambini più grandi e raramente rappresentano un’urgenza diagnostica.

Tenuto conto di questa diversa distribuzione per età, anche i sintomi all’esordio sono stati analizzati separatamente nei tre gruppi per età.

Sintomi all’esordio.

Si è osservata una certa discrepanza tra sintomi di presentazione della malattia nel caso che si suddivida la casistica sulla base dell’età di esordio dei sintomi o sulla base dell’età alla diagnosi. In particolare, i bambini con esordio dei sintomi nel primo anno di vita presentano infezioni ricorrenti e inusuali in percentuali simili rispetto a quelli con esordio successivo. Tuttavia, se la suddivisione viene fatta per età alla diagnosi, i casi diagnosticati nel primo anno di vita non avevano per lo più sviluppato infezioni ricorrenti ma erano stati diagnosticati per il sommarsi di sintomi infiammatori, infezioni inusuali e altri elementi (arresto di crescita, sintomi specificamente suggestivi di una specifica sindrome di immunodeficienza). Questi dati permettono di sottolineare l’importanza di sospettare un’immunodeficienza nel primo anno di vita senza attendere una ricorrenza di fatti infettivi.

I sintomi autoimmuni assumono progressivamente più importanza con il progredire dell’età: questa tendenza è dovuta in buona parte allo sviluppo di malattie autoimmuni in pazienti affetti da APECED, mentre le manifestazioni autoimmuni nei bambini più piccoli sono limitate alle gravi disregolazioni immuni (IPEX, IPEX-like). Diversamente, i sintomi infiammatori costituiscono, insieme all’arresto di crescita, una modalità di presentazione frequente nei piccoli lattanti: tenerne conto può permettere di giungere a formulare la diagnosi prima ancora del verificarsi di fatti infettivi potenzialmente gravi.

Iter diagnostico

Per molte immunodeficienze primitive c’è ancora un ritardo diagnostico elevato. Tuttavia l’urgenza di arrivare ad una diagnosi non è uguale per tutte le malattie. Per proporre un iter diagnostico è opportuno distinguere innanzitutto i casi per i quali la diagnosi rappresenta un’urgenza da quelli in cui questa può essere procrastinata senza danni rilevanti.

Nel primo gruppo si trovano senza dubbio la maggior parte delle cosiddette “immunodeficienze vecchie”, malattie che è opportuno conoscere singolarmente per poterci pensare prontamente. In particolare, vanno ricordate in questo gruppo le immunodeficienze combinate gravi, alcune sindromi ben definite (ad esempio la sindrome di Wiskott Aldrich), la malattia granulomatosa cronica e la sindrome con IperIgM, tutte

condizioni che possono beneficiare di un trapianto di cellule staminali ematopoietiche eseguito in condizioni elettive.

L'analisi della nostra casistica mostra che nella maggior parte dei casi, questi pazienti tendono ad avere diversi sintomi (infiammatori, difetto di crescita, altro) che possono suggerire la diagnosi tempestivamente, prima della comparsa di infezioni inusuali potenzialmente letali o di infezioni ricorrenti. Alcuni esami, dalla linfopenia agli RTE, permettono di impostare il problema diagnostico nella maggior parte di questi casi.

Le "nuove immunodeficienze" rappresentano più raramente un'urgenza diagnostica e richiedono spesso di praticare analisi immunologiche e genetiche più complesse e specialistiche.

L'importante, come si diceva, in questi casi è pensarci, pensare alla possibile presenza di un'immunodeficienza e cercare, nella clinica e nel laboratorio i piccoli tasselli che possono aiutare a definire con chiarezza la malattia. Per fare ciò, occorre anche utilizzare in modo corretto l'armamentario diagnostico, oggi arricchito di diversi esami. Nella piccola casistica seguita negli ultimi 3 anni presso il Laboratorio delle Immunodeficienze, abbiamo mostrato come il profilo base delle sottopopolazioni linfocitarie, che rappresentava fino a pochi anni fa l'esame standard per l'analisi di una possibile immunodeficienza, sia raramente utile a meno che non ci si trovi di fronte ad una SCID o una agammaglobulinemia legata al cromosoma X, che insieme rappresentano solo il 15% delle PID.

In 58 pazienti valutati per un sospetto di immunodeficienza sono stati identificati 15 casi di immunodeficienza caratterizzati da sostanziali anomalie del fenotipo e/o della funzione immunologica *in vitro* (solo uno dei quali con alterazione del profilo base delle sottopopolazioni). L'elevato potere diagnostico di questi esami nella nostra esperienza dipende almeno in parte da una stringente selezione clinica dei casi da analizzare presso il laboratorio, che spiega l'elevata percentuale di diagnosi formalizzate. A conferma di questo sta l'osservazione che, nello stesso periodo, diverse centinaia di analisi delle sottopopolazioni linfocitarie, eseguite senza altrettanto chiare indicazioni presso il laboratorio di citometria dell'ospedale, non hanno portato ad alcuna diagnosi di immunodeficienza primitiva.

In generale, i test più frequentemente utili sono risultati lo studio dei linfociti B memoria (utile nel 12% dei casi analizzati) e lo studio degli recenti emigranti timici, o RTE, (informativi nel 7% dei pazienti).

Sulla base di queste considerazioni e di dati della letteratura possono essere fatte alcune considerazioni pratiche o raccomandazioni:

- Di fronte ad un sospetto di SCID occorre richiedere l'esecuzione almeno del profilo base delle sottopopolazioni e degli RTE. In caso di infezioni atipiche, in particolare in presenza di difetto di IgA e/o neutropenia, è utile studiare l'espressione del CD40L su

linfociti T attivati. Lo studio degli RTE può essere di particolare importanza in presenza di difetti senza linfopenia o con lieve linfopenia.

- Di fronte a un'ipogammaglobulinemia occorre valutare sempre la percentuale di linfociti B e le caratteristiche dei linfociti B immaturi e memoria. La valutazione di anticorpi anti-vaccinali e della risposta al vaccino pneumococcico possono contribuire alla definizione diagnostica.
- In casi di citopenie autoimmuni e linfoproliferazione, va sempre richiesta la determinazione dei DNT.
- In caso di malattie complesse, infiammatorie e autoimmuni devono essere studiati gli antigeni di attivazione (con particolare riferimento all'HLA-DR e al CD25), oltre agli RTE.
- In casi di infezioni suppurative, linfadeniti a lenta guarigione, infezioni fungine, osteomieliti da opportunisti, ascessi profondi, bisogna sempre fare il test del superossido, che per la semplicità di esecuzione e l'informatività dovrebbe essere considerato un test di primo livello. Questo anche in considerazione della relativa frequenza della malattia granulomatosa cronica.
- In molti casi tutti questi test non saranno in grado di condurre alla diagnosi e, se i dati clinici e di laboratorio lo suggeriscono, bisognerà rapidamente passare ad una valutazione molecolare di possibili geni candidati (e in un futuro forse non lontano anche all'analisi contemporanea di molti geni con tecnologie ad alta processività).

BIBLIOGRAFIA

- 1 Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; **9**(6): 722-728 [PMID: 14929630]
- 2 Kim MH, Rodey GE, Good RA, Chilgren RA, Quie PG. Defective candidacidal capacity of polymorphonuclear leukocytes in chronic granulomatous disease of childhood. *The Journal of pediatrics* 1969; **75**(2): 300-303 [PMID: 5795350]
- 3 Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO, Roberts JL, Puck JM. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *The Journal of pediatrics* 1997; **130**(3): 378-387 [PMID: 9063412]
- 4 Intravenous gammaglobulin for immunodeficiency: report from The European Group for Immunodeficiencies (EGID). *Clinical and experimental immunology* 1986; **65**(3): 683-690 [PMID: 2430746]
- 5 Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; **2**(7583): 1366-1369 [PMID: 4177932]
- 6 Baud O, Goulet O, Canioni D, Le Deist F, Radford I, Rieu D, Dupuis-Girod S, Cerf-Bensussan N, Cavazzana-Calvo M, Brousse N, Fischer A, Casanova JL. Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) by allogeneic bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine* 2001; **344**(23): 1758-1762 [PMID: 11396442]
- 7 Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 2001; **27**(1): 20-21 [PMID: 11137993]
- 8 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, NY)* 2003; **299**(5609): 1057-1061 [PMID: 12522256]
- 9 Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghonaium A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Marodi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *The Journal of experimental medicine* 2007; **204**(10): 2407-2422 [PMID: 17893200]
- 10 Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartrom L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009; **124**(6): 1161-1178 [PMID: 20004777]
- 11 de Vries E. Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. *Clinical and experimental immunology* 2006; **145**(2): 204-214 [PMID: 16879238]
- 12 Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A, Thiel A. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* 2002; **195**(6): 789-794 [PMID: 11901204]
- 13 McFarland RD, Douek DC, Koup RA, Picker LJ. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; **97**(8): 4215-4220 [PMID: 10737767]
- 14 Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, Keisker A, Salgo B, Fauchere JC, Scherer F, Shalaby T, Grotzer M, Siler U, Seger R, Gungor T. Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *European journal of immunology* 2007; **37**(11): 3270-3280 [PMID: 17935071]
- 15 Duszczyszyn DA, Beck JD, Antel J, Bar-Or A, Lapierre Y, Gadag V, Haegert DG. Altered naive CD4 and CD8 T cell homeostasis in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: thymic versus peripheral (non-thymic) mechanisms. *Clinical and experimental immunology* 2006; **143**(2): 305-313 [PMID: 16412055]

- 16 Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, Rieux-Laucat F, Siegel RM, Su HC, Teachey DT, Rao VK. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*; **116**(14): e35-40 [PMID: 20538792]
- 17 Seif AE, Manno CS, Sheen C, Grupp SA, Teachey DT. Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study. *Blood*; **115**(11): 2142-2145 [PMID: 20068224]
- 18 Caminha I, Fleisher TA, Hornung RL, Dale JK, Niemela JE, Price S, Davis J, Perkins K, Dowdell KC, Brown MR, Rao VK, Oliveira JB. Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*; **125**(4): 946-949 e946 [PMID: 20227752]
- 19 Teachey DT, Obzut DA, Axsom K, Choi JK, Goldsmith KC, Hall J, Hulitt J, Manno CS, Maris JM, Rhodin N, Sullivan KE, Brown VI, Grupp SA. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* 2006; **108**(6): 1965-1971 [PMID: 16757690]
- 20 Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 2006; **203**(7): 1701-1711 [PMID: 16818678]
- 21 Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, Roncarolo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *The Journal of clinical investigation* 2006; **116**(6): 1713-1722 [PMID: 16741580]
- 22 Gambineri E, Perroni L, Passerini L, Bianchi L, Doglioni C, Meschi F, Bonfanti R, Sznajder Y, Tommasini A, Lawitschka A, Junker A, Dunstheimer D, Heidemann PH, Cazzola G, Cipolli M, Friedrich W, Janic D, Azzi N, Richmond E, Vignola S, Barabino A, Chiumello G, Azzari C, Roncarolo MG, Bacchetta R. Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: inconsistent correlation between forkhead box protein 3 expression and disease severity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008; **122**(6): 1105-1112 e1101 [PMID: 18951619]
- 23 Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *The Journal of clinical investigation* 1997; **100**(12): 3173-3183 [PMID: 9399965]
- 24 Trifari S, Scaramuzza S, Catucci M, Ponzoni M, Mollica L, Chiesa R, Cattaneo F, Lafouresse F, Calvez R, Vermi W, Medicina D, Castiello MC, Marangoni F, Bosticardo M, Doglioni C, Caniglia M, Aiuti A, Villa A, Roncarolo MG, Dupre L. Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome: analysis of function and distribution in lymphoid organs. *The Journal of allergy and clinical immunology*; **125**(2): 439-448 e438 [PMID: 20159256]
- 25 Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Doffinger R, Cancrini C, Bonnet M, Puel A, Chable-Bessia C, Yamaoka S, Feinberg J, Dupuis-Girod S, Bodemer C, Livadiotti S, Novelli F, Rossi P, Fischer A, Israel A, Munnich A, Le Deist F, Casanova JL. A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *The Journal of clinical investigation* 2003; **112**(7): 1108-1115 [PMID: 14523047]
- 26 Cholujova D, Jakubikova J, Kubes M, Arendacka B, Sapak M, Ihnatko R, Sedlak J. Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays. *Immunobiology* 2008; **213**(8): 629-640 [PMID: 18765168]
- 27 Marcusson-Stahl M, Cederbrant K. A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. *Toxicology* 2003; **193**(3): 269-279 [PMID: 14599763]
- 28 Villanueva J, Lee S, Giannini EH, Graham TB, Passo MH, Filipovich A, Grom AA. Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *Arthritis research & therapy* 2005; **7**(1): R30-37 [PMID: 15642140]

Un grazie ai pazienti con Immunodeficienza e alle loro famiglie, perché la storia di questo campo del sapere ha coinciso, per noi, con la storia dei loro bambini.

Un grazie ai colleghi che, nelle diverse specialità della pediatria, hanno preso in carico questi pazienti, e un grazie ai nostri Capi, che hanno fatto sì che l'esperienza di uno diventasse quella di tutti.

Un grazie a Erica, Elisa ed Angela, senza le quali questo lavoro non sarebbe stato possibile.