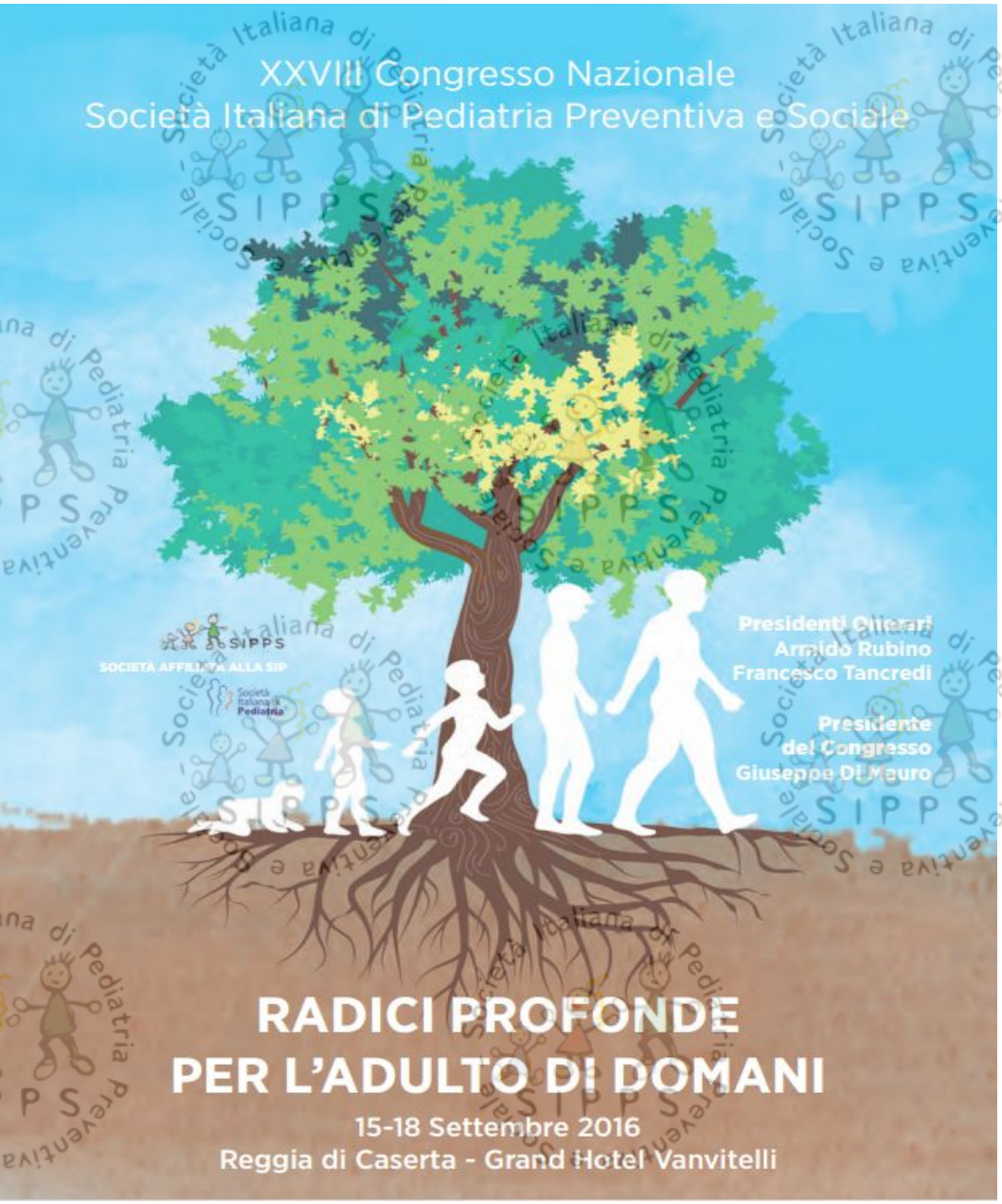


Le Immunodeficienze nell'ambulatorio del Pediatra: "la conferma"

Baldassarre Martire

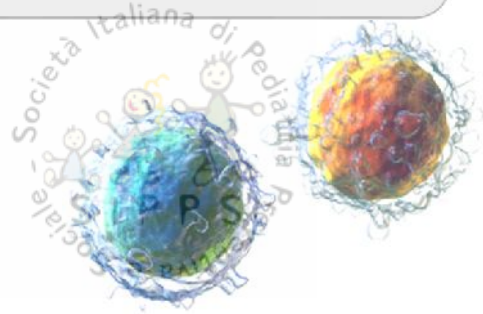
Centro di riferimento Immunodeficienze Primitive
Regione Puglia
Dipartimento di Scienze e Chirurgia Pediatriche
Azienda Ospedaliero - Universitaria
"Policlinico-Giovanni XXIII" Bari

Immunodeficienze: non solo infezioni

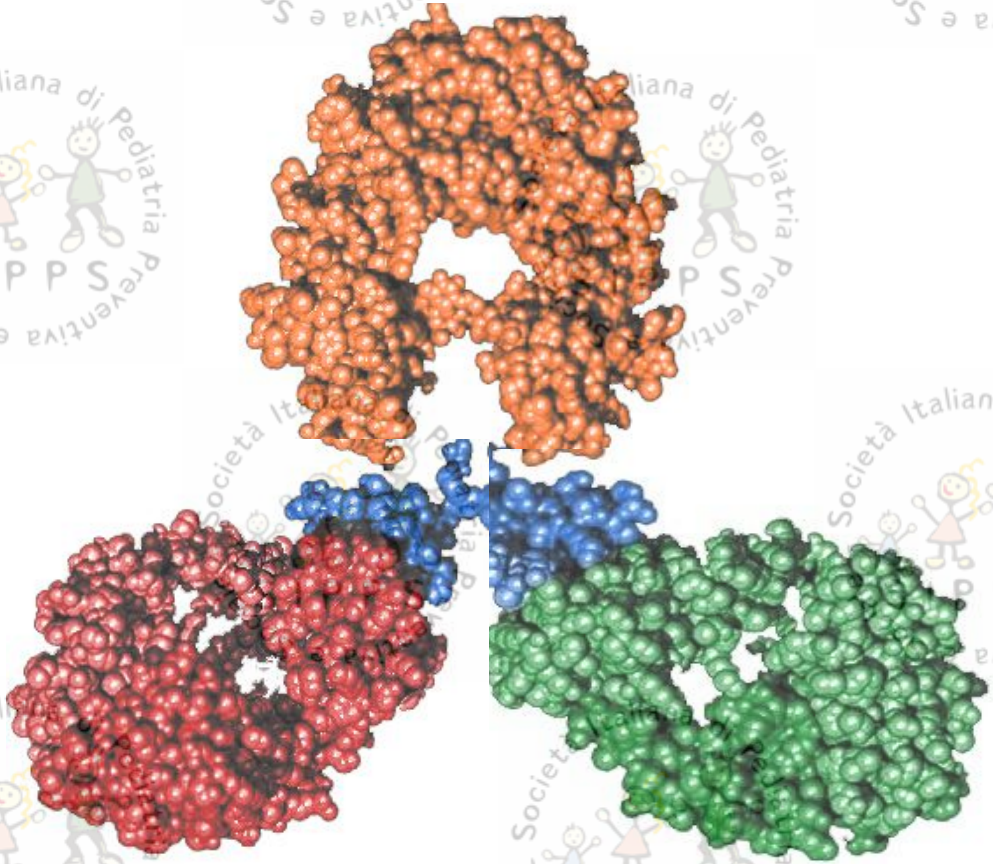
Di solito siamo abituati a pensare alle immunodeficienze primitive come condizioni caratterizzate da un'anomala suscettibilità a infezioni ricorrenti o gravi

Tuttavia, negli anni più recenti, si è teso a includere nel campo delle IDP tutti i difetti congeniti di funzionamento del sistema immunitario, che possono manifestarsi con varie combinazioni *di sintomi infettivi, infiammatori e autoimmuni* e presentare da un elevato rischio di *complicanze neoplastiche*

La estrema eterogeneità dei quadri clinici sia di esordio che evolutivi fa si che queste malattie siano oggetto di sottostima



Infezioni ricorrenti



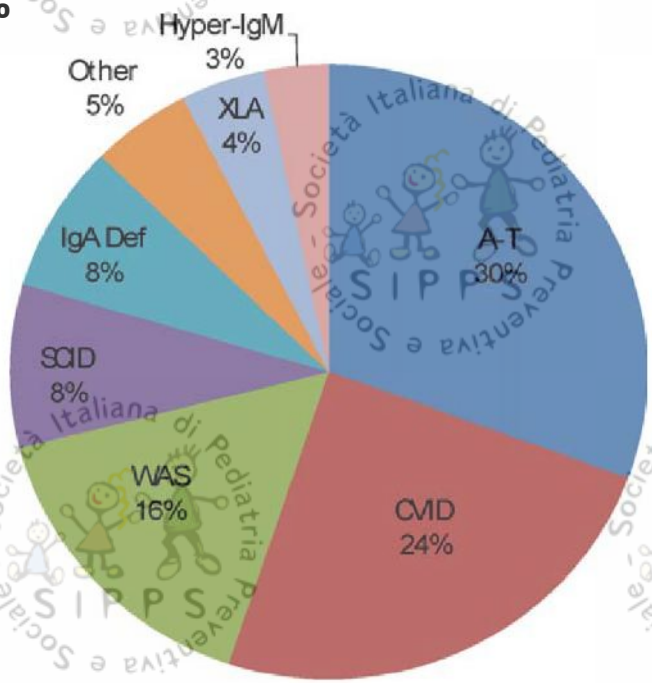
Manifestazioni infiammatorie/ autoimmuni

Manifestazioni linfoproliferative/ neoplastiche

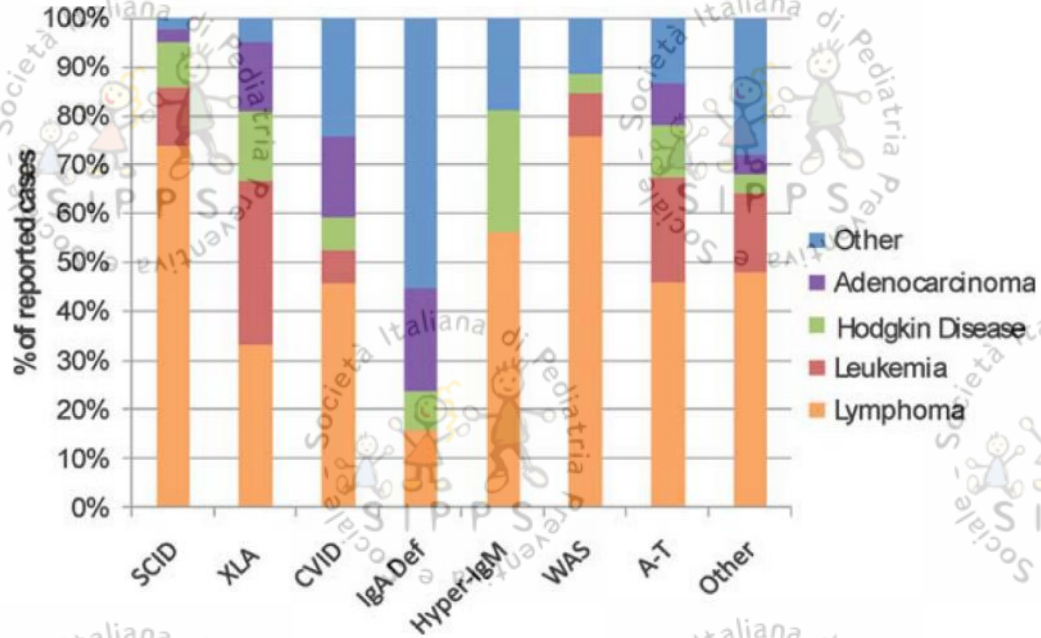
Malignancies in the setting of primary immunodeficiency: implications for hematologists/oncologists

Ralph S. Shapiro*

4-25%



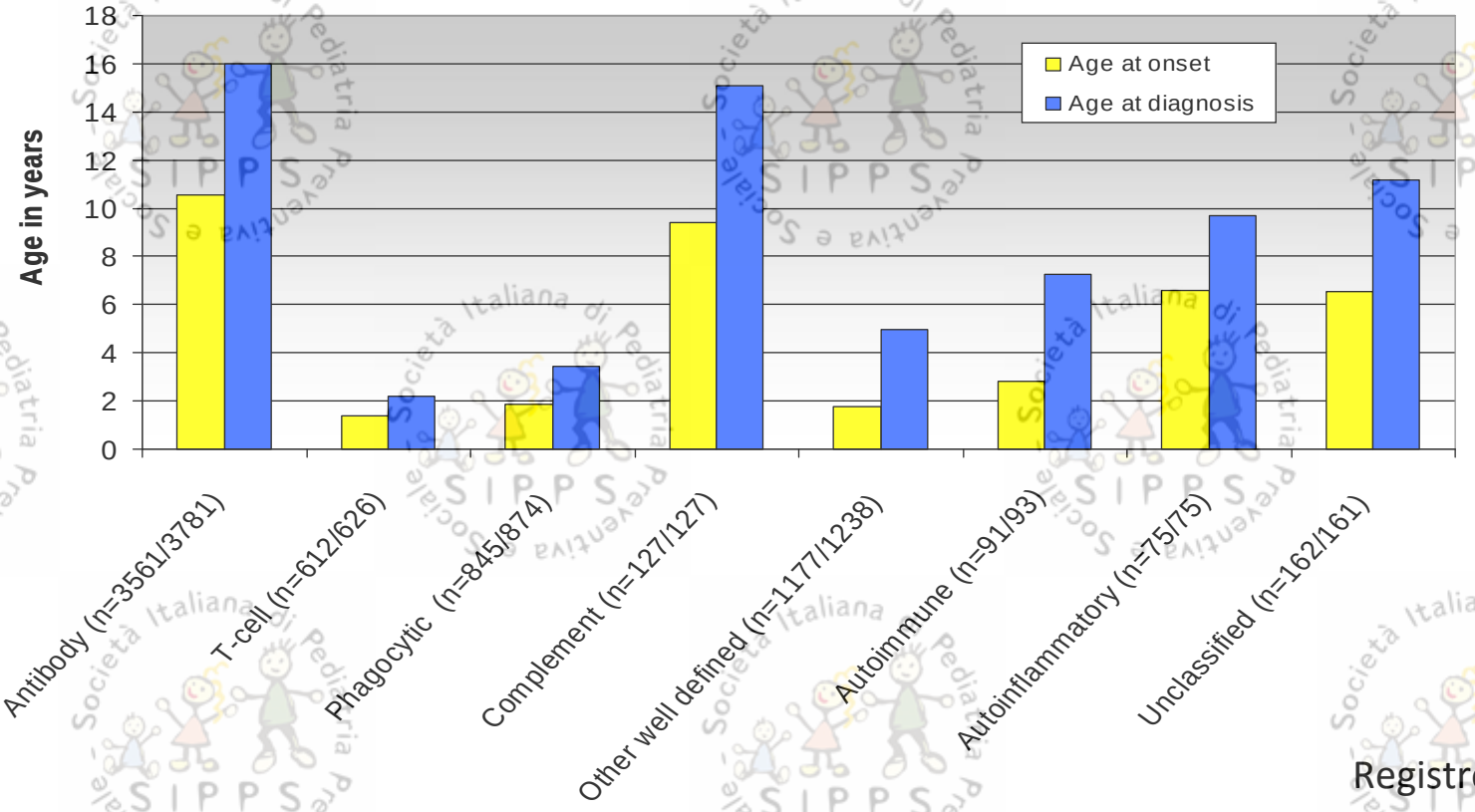
Distribution of PID disorder subtypes most commonly associated with reports of malignancy



Distribution of malignancies among PID disorder subtypes

American Journal of Hematology, 2011

Ritardo di diagnosi nei pazienti europei con immunodeficienza



Registro ESID 2014

Le Immunodeficienze Primitive

Fare una diagnosi " precoce e certa e " è di estrema importanza

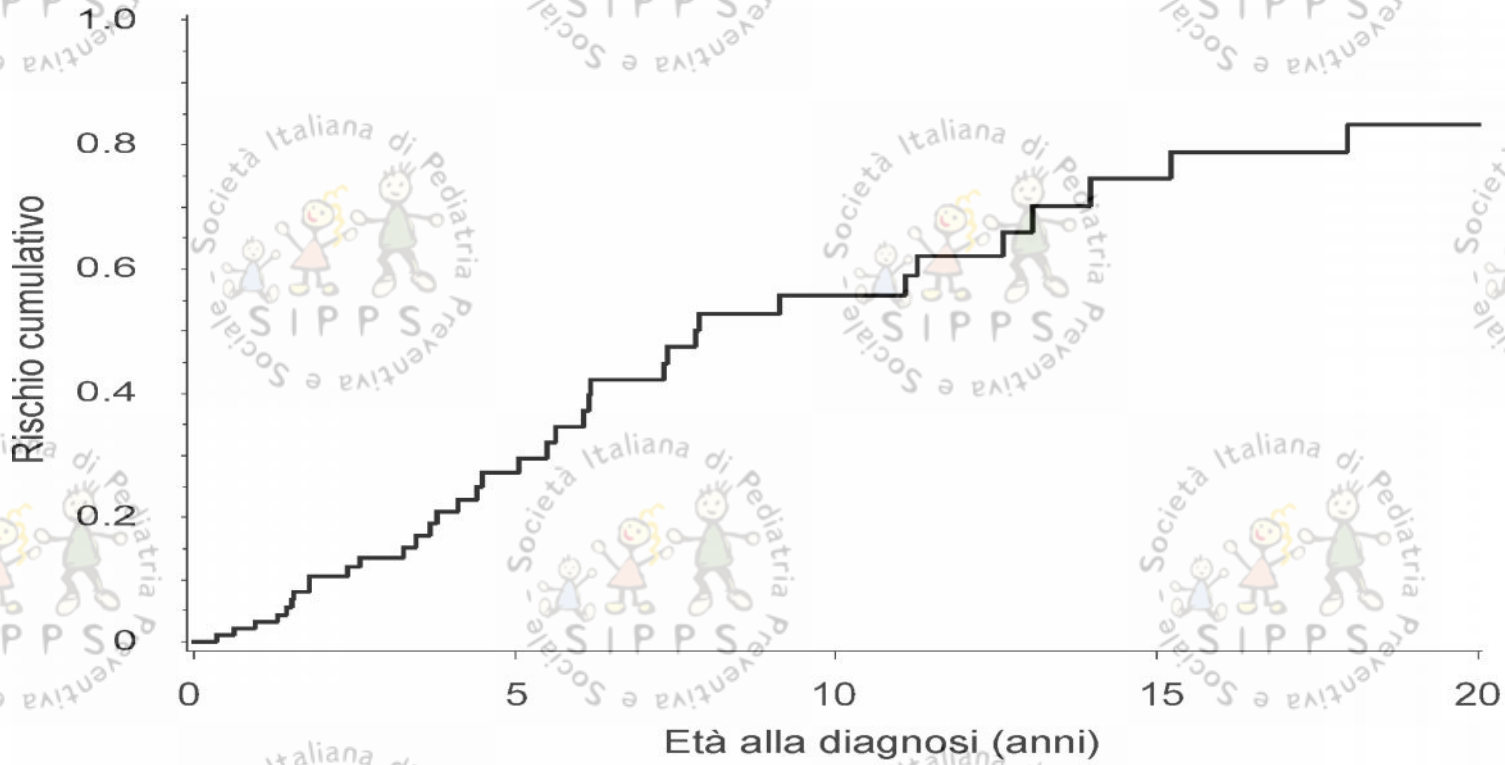
Molte IDP hanno un decorso rapidamente fatale : in particolare *le* ***SCID e le sindromi emofagocitiche*** familiari rappresentano delle autentiche ***urgenze immunologiche***

Tutte possono essere curate e molte possono guarire: il 90% dei bambini con SCID guarisce se trapiantati con cellule staminali ematopoietiche prima del terzo mese di vita e prima che si instaurino infezioni gravi *Brown L. et al Blood 2011*

Fornire una adeguata consulenza genetica alla famiglia

Ridurre l'incidenza di comorbidità e complicanze croniche

XLA: CORRELAZIONE TRA ETA' ALLA DIAGNOSI E BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA



Età alla diagnosi	Rischio cumulativo	Errore standard
5 anni	0.16	0.05
10 anni	0.42	0.09
15 anni	0.66	0.10
20 anni	0.78	0.10

Registro AIEOP XLA

Diagnosi precoce dei disordini immunitari

A CHI E' AFFIDATA ???

E’ affidata principalmente

- all’ esperienza
- alla sensibilità clinica del

PEDIATRA DI FAMIGLIA

La ricorrenza e / o la gravità degli episodi è

"normale" o "espressione di patologia"?

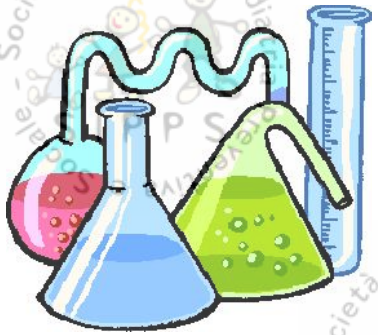
BB normale

BB con IRR

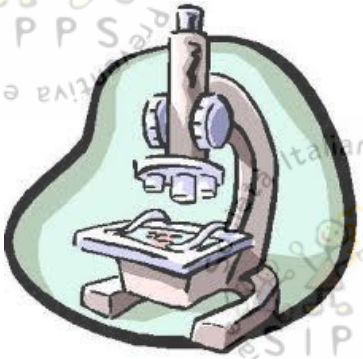
BB patologico

Compito delicato e complesso

Il confine tra il recidivare fisiologico e patologico delle infezioni non è sempre facile da tracciare



L' appropriatezza e l'attenzione alla scelta degli esami più utili all'inquadramento diagnostico, sono assolutamente critici anche in un quadro di economia sanitaria



Quando richiedere gli esami di laboratorio?

- bambini che presentino due o più criteri di sospetto
- infezioni persistenti o ricorrenti per lo stesso patogeno
- dermatosi
- lesioni granulomatose
- manifestazioni autoimmuni non altrimenti spiegabili
- A dispetto della loro complessità fisiopatologica e del costante aumento di nuove forme di IDP con fenotipo clinico “non convenzionale”, *poche indagini consentono di identificare la maggior parte delle più frequenti IDP*

UN PO' DI ORDINE…

Emocromo

TEST DI CITOTOSSICITA'

Ig SIERICHE

ANTICORPI SPECIFICI

COMPLEMENTO

CHEMIOTASSI

SINTESI IN VITRO IG

HLA

NGS

SOTTOCLASSI IgG

NBT

ELETTROFORESI PROTEICA

DHR- 123

BLASTIGENESI

APOPTOSI

CGH-ARRAY

TRECS

SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE

CH50

Il laboratorio

1° livello:

Emocromo

- Conta linfociti (percentili!) => SCID

- Eosinofili => SCID e disregolazioni

- Granulociti => neutropenie, LAD

- Conta e volume piastrine => WAS

Spesso basta la attenta lettura dell'emocromo!

- **Protidogramma, Immunoglobuline** => SCID, Agammaglobulinemia, ICV

Valori normali di linfociti e neutrofili per fascia di età

	Neutrofili		Linfociti	
Età	range	%	range	%
nascita	(6.0- 26.0)	61	(2.9- 11.0)	31
24 ore	(5.0- 21.0)	61	(2.0- 11.5)	31
1 settimana	(1.5- 10.0)	45	(2.0- 17.0)	41
1 mese	(1.0- 9.0)	35	(2.5- 16.5)	56
6 mesi	(1.0- 8.5)	32	(4.0- 13.5)	61
1 anno	(1.5- 8.5)	31	(4.0- 10.5)	61
2 anni	(1.5- 8.5)	33	(3.0- 9.5)	59
4 anni	(1.5- 8.5)	42	(2.0- 8.0)	50
6 anni	(1.5- 8.5)	42	(2.0- 8.0)	50
8 anni	(1,5- 8.0)	53	(1.5- 6.8)	39
10 anni	(1.8- 8.0)	54	(1.5- 6.5)	38
16 anni	(1.8- 8.0)	57	(1.2- 5.2)	35
21 anni	(1.8- 7.7)	59	(1.0- 4.8)	34

Ugazio AG, Duse M,et al. Il bambino immunodepresso 2^ Ed., Editrice Ambrosiana, Milano, 1995

LINFOCITOPENIA

Una **linfocitopenia**, nel contesto di un quadro clinico caratterizzato *diarrea cronica* con *distrofia*, *infezioni polmonari* recidivanti o severe (specie se da patogeni opportunisti), *candidosi orale* persistente o *sistemica* e *dermatite severa o eritrodermica*, deve far immediatamente sospettare una ***SCID***

DIVERSE FORME DI LINFOPENIE PRIMITIVE

- Difetti di riparazione del DNA (Atassia-Teleangectasia)
- SCID (deficit di ADA, PNP)
- Sindrome di Nijmegen,
- Deficit di ligasi IV
- Sindrome di Wiskott-Aldrich
- Sindrome di DiGeorge
- Ipoplasia cartilagine-capelli
- Deficit di DOCK8
- Linfopenia CD4 idiopatica

La linfopenia si riscontra in varie IDP, *pensaci se…*

- …si associa ad *anemia, piastrinopenia e/o alterazioni scheletriche* :

  Difetti di riparazione del DNA

- … si associa *a piastrinopenia con piastrine piccole* :

  Sindrome di Wiskott-Aldrich

- …si associa ad *anomalie scheletriche, capelli sottili e/o bassa statura*:

  Ipoplasia cartilagine-capelli

- …si associa a *ipogammaglobulinemia, broncopolmoniti e sinusiti :*

  Immunodeficienza comune variabile

- …si *associa a eczema e alti livelli di IgE :*

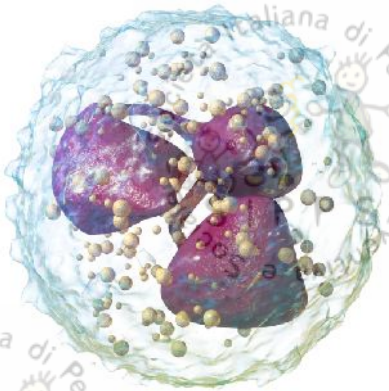
  Sindrome IperIgE da deficit di DOCK8

- … si riscontra nel primo anno di vita, si *associa a grave dermatite, distress respiratorio e/o infezioni invasive* :

  SCID

- …si associa a ***cardiopatie congenite, ipocalcemia*** ecc. :

  Sindrome di DEL 22



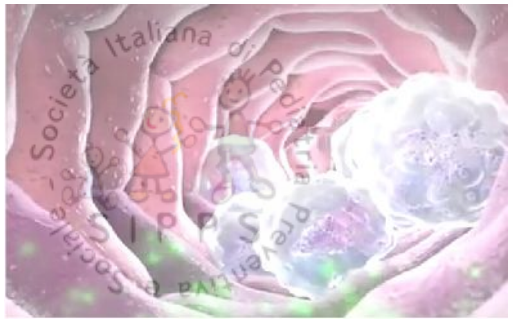
Neutropenia: PMN < 1500/mmc

< 1anno: PMN <1000/mmc

PMN 1500- 1000 → Neutropenia lieve

PMN 1000-500 → Neutropenia moderata

PMN < 500 → Neutropenia grave



Primary Immunodeficiencies :2012 update

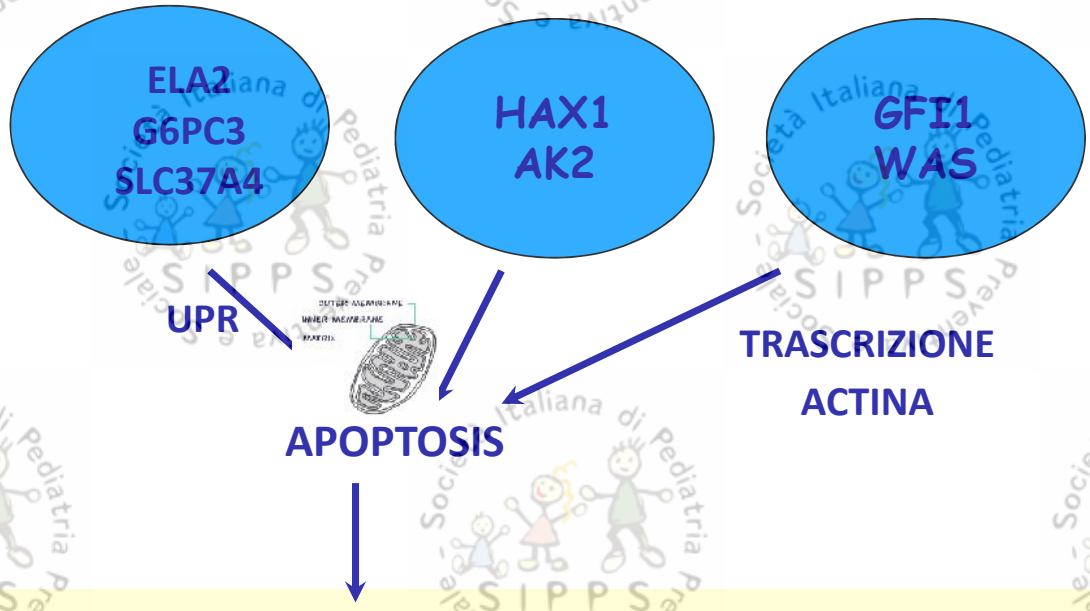
J Allergy Clin Immunol

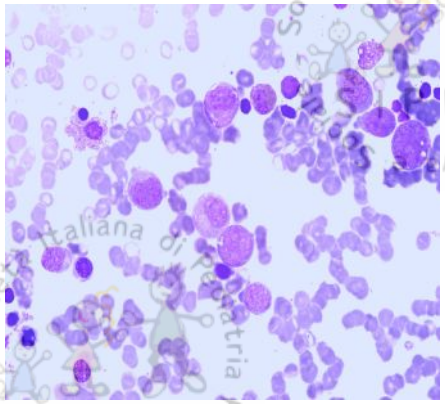
NEUTROPENIE EREDITARIE

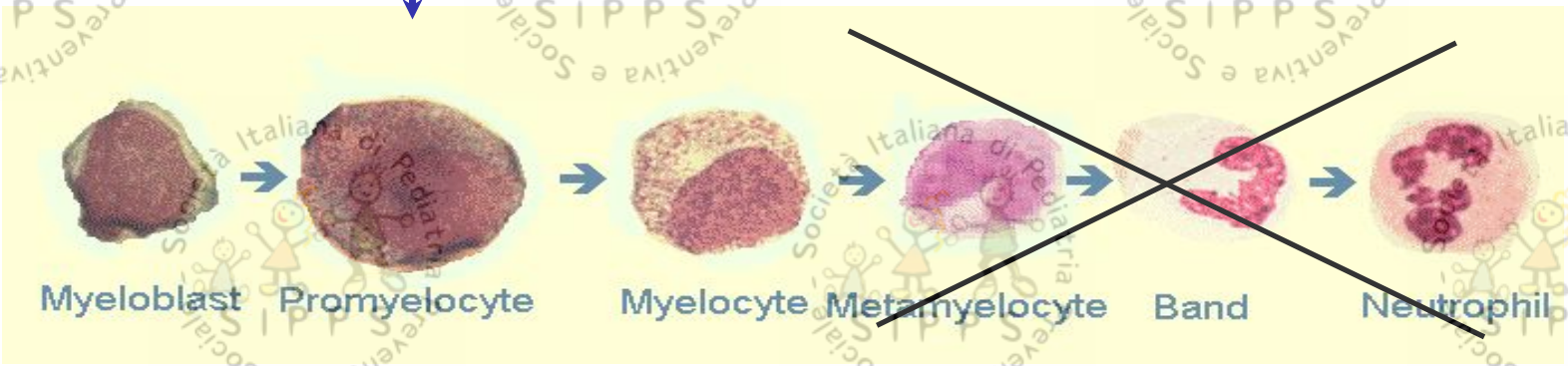
MALATTIA	CELLULE COINVOLTE	FUNZIONE ALTERATA	CARATTERISTICHE ASSOCIATE	EREDITARIETA'	DIFETTO GENETICO e PRESUNTA PATOGENESI	FREQUENZA
Neutropenia congenita severa	N	Differenziazione mieloide	Sottogruppo con mielodisplasia	AD	ELA2: mistrafficking dell'elastasi	Rara
	N	Differenziazione mieloide	Linfopenia B/T	AD	GFI1: inbizione dell'elastasi	Estremamente rara
Malattia di Kostmann	N	Differenziazione mieloide	Difetti cognitivi e neurologici	AR	HAX 1: controllo dell'apoptosi	Rara
Neutropenia Con Malformazioni Cardiache ed urogenitali	N+F	Differenziazione mieloide	Difetti cardiaci, malformazioni urogenitali ed angiectasie venose del tronco e degli arti	AR	G6PC3: abolizione dell'attività della glucosio-6-fosfatasi e aumentata apoptosi di N ed F	Molto rara
Neutropenia ciclica	N	?	Oscillazioni dei leucociti e delle piastrine	AD	ELA2: mistrafficking dell'elastasi	Molto rara
Neutropenia XL mielodiplasia	N+M	?	Monocitopenia	XL	WAS: regolatore dell'actina (perdita dell'autoinibizione)	Estremamente rara

Il 25-30% delle SCN NON ha gene malattia!

Meccanismo patogenetico delle forme genetiche di Neutropenia con blocco midollare







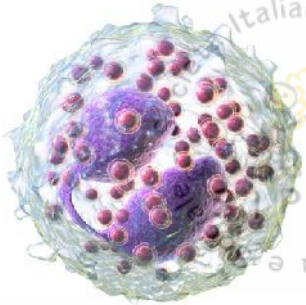
Neutropenie congenite associate ad altre condizioni patologiche o sindromiche

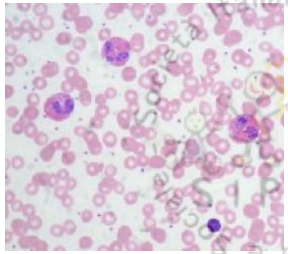
Neutropenia associata ad immunodeficienza	Gene	Ereditarietà
Disgenesia reticolare	*AK2*	AR
Sindrome WHIM	*CXCR4*	AD
X-linked Ipogammaglobulinemia	*BTK*	X-linked
Deficit di CD40 ligando o Iper IgM	*CD40L*	X-linked
Ipoplasia Cartilagine-capelli	*RMRP*	AR
Deficit di purina nucleoside fosforilasi	*PNP*	AR
Neutropenia associata ad immunodeficienza e ipopigmentazione		
Sindrome di Chédiak Higashi (tipo 2)	*LYST*	AR
Sindrome di Griscelli (tipo 2)	*RAB27A*	AR
Sindrome di Hermansky-Pudlak (tipo 2)	*AP3B1*	AR
Deficit di P14	*MAPBPIP*	AR
Neutropenia associata a malattie metaboliche		
Sindrome di Shwachman Bodian Diamond	*SBDS*	AR
Sindrome di Pearson	*DNA Mitocondriale*	-
Glicogenosi IB	*G6PT*	AR
Sindrome di Barth	*TAZ*	X-linked
Neutropenia associate a malattia autoimmune		
ALPS (Sindrome autoimmune linfoproliferativa)	*FAS, FAS-L, Caspase 8,10*	AD o Sporadica
Neutropenia associate a malformazioni		
Sindrome di Cohen	*COH*	AR
Neutropenia associate ad insufficienza midollare		
Discheratosi congenita	*DKC1, TERC TERT, TINF2NOP10, NHP2*	X-linked, AD AR
Anemia di Blackfan Diamond	*RPS 14, 16, 17, 19, 25. PL 5, 11, 35 A*	AR, AD o Sporadica
Anemia di Fanconi	*FANCA, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N*	AR e X-linked

CSS AIEOP Insufficienze Midollari *Prospettive in Pediatria 2010*

LAD 1

Un incremento del valore assoluto dei neutrofili (con livelli 5-10 volte superiori al normale) associato a *infezioni batteriche ricorrenti senza produzione di pus* e una storia di *ritardata caduta del cordone ombelicale* (>4 settimane) o di *disfunzione piastrinica*, deve far sospettare una ***sindrome da deficit di adesione leucocitaria*** (LAD)





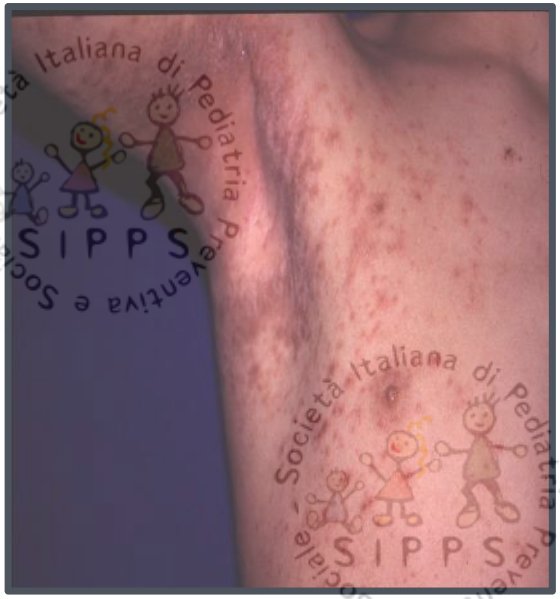
Eosinofilia:

valori molto elevati di eosinofili sono indicativi di disregolazione immune e si trovano frequentemente in alcune ***SCID (Omenn), nella Iper-IgE, IPEX e IPEX-like***

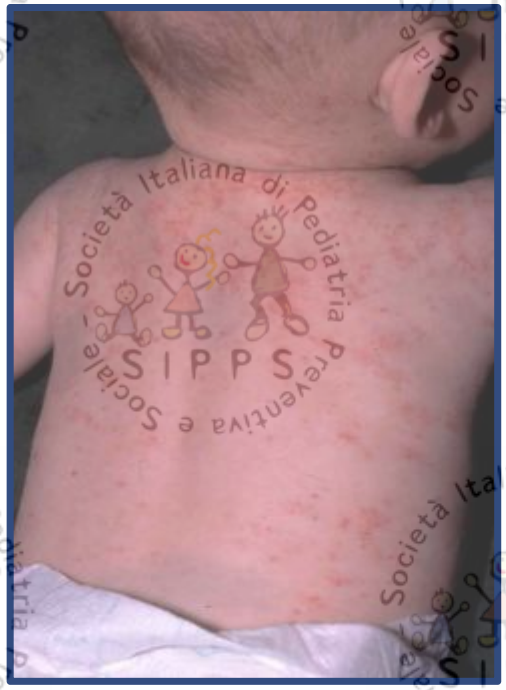
SCID Omenn

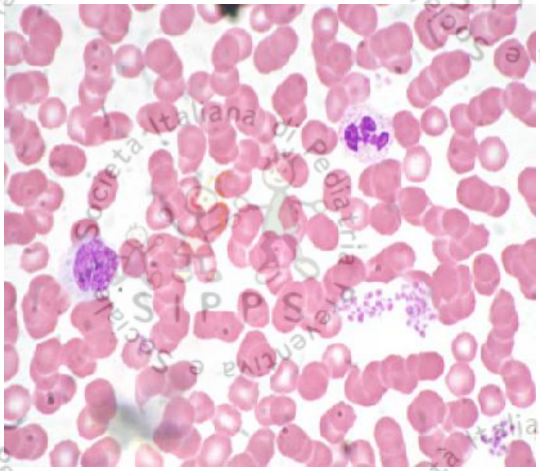
IPEX

Sindrome da Iper-IgE

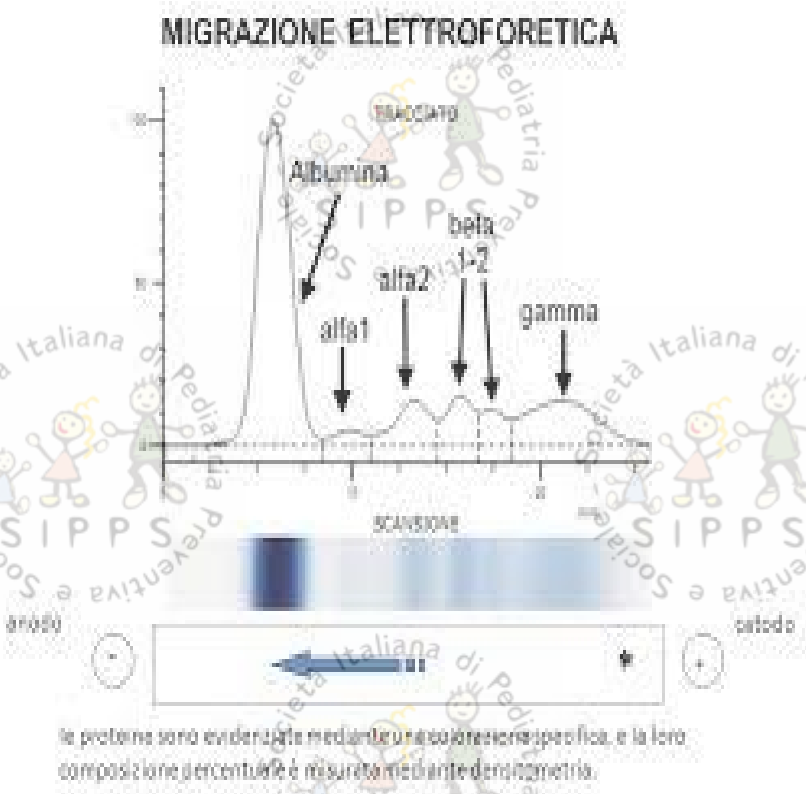


- Una **trombocitopenia con piastrine piccole** (<6 ⇑^{3}) associata ad eczema e ad un deficit anticorpale o ad una neutropenia è fortemente sospetta per una ***sindrome di Wiskott Aldrich***.





Protidogramma



Non consente di escludere un deficit anticorpale, ma può servire ad escludere una ipogammaglobulinemia da perdita di Ig, attraverso il riscontro di un quadro di ipodisprotidemia

Dosaggio delle immunoglobuline sieriche

Bassi livelli di uno o più isotipi delle Ig sono presenti nella *maggioranza delle IDP di tipo "convenzionale" e in quasi tutti i deficit dell'immunità umorale*

IDP	IgG	IgA	IgE	IgM
Atassia telangiectasia	Sottoclassi +/- basse	Spesso basse	spesso basse	Alte (monomeri)
XLA	basse	basse	basse	basse
CD40/CD40Ldefic.	basse	basse	basse	N o alte
CVID / THI	basse	basse	A volte basse	A volte basse
IperIgE	N	N	alte	N
SCID	Generalmente basse	Generalmente basse	Basse/alte(S. di Omenn)	Generalmente basse
Deficit di IgA	N	Basse/ assenti	N	N
WAS	Spesso alte	Spesso alte		Basse

Modificata da L. Leonardi et al.: Le ID nell' ambulatorio del pediatra. Ed. Sintesi Infomedica 2016

Dosaggio delle immunoglobuline sieriche

Nel considerare i valori delle Ig sieriche è fondamentale ***riferirsi a valori di normalità per fascia di età***, in quanto in età pediatrica la produzione di Ig è correlata alla maturazione età-dipendente del sistema immunitario

Nei primi mesi di vita le IgG circolanti sono soprattutto di origine materna, trasmesse per via transplacentare nelle ultime settimane di età gestazionale

In generale, valori di IgG <200 mg/dl in un bambino di età >2 anni devono sempre far sospettare una IDP umorale

Valori di IgA <7 mg/dl, dopo i 4 anni, con IgG e IgM normali e normali livelli di cellule B circolanti, identificano un ***deficit assoluto di IgA*** (DIgA). Livelli di IgA <3° centile per l'età, ma >7 mg/dl identificano un DIgA parziale

Valori normali di Ig per età

Età	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)
Cordone ombelicale	1112 (862-1434)	Non dosabili	9 (5-14)
1-3 mesi	468 (231-947)	24 (8-74)	74 (26-210)
4-6 mesi	434 (222-846)	20 (6-60)	62 (28-39)
7-12 mesi	569 (351-919)	29 (10-85)	89 (38-204)
13-24 mesi	801 (264-1509)	54 (17-178)	128 (48-337)
2-3 anni	889 (462-1710)	68 (27-173)	126 (62-257)
4-5 anni	1117 (528-1959)	98 (37-257)	119 (49-292)
6-8 anni	1164 (633-1016)	113 (41-315)	121 (56-261)
9-11 anni	1164 (707-1919)	127 (60-270)	129 (61-276)
12-16 anni	1105 (640-1909)	136 (61-301)	132 (59-297)

Ugazio AG, Duse M,et al. Il bambino immunodepresso. Editrice Ambrosiana, Milano, 1995

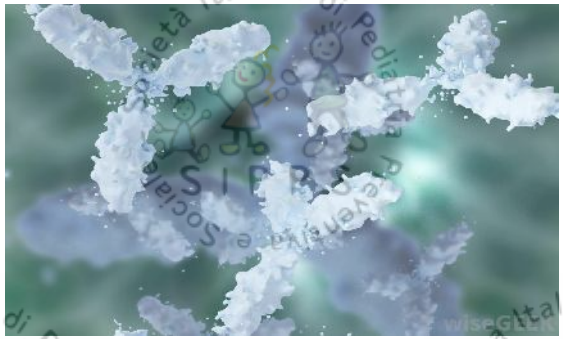
INDAGINI DI 2° LIVELLO

COMPONENTI	TEST
	IgE, IgD, Sottoclassi IgG
Linfociti	- Risposta anticorpale - Sottopopolazioni linfocitarie - Proliferazione in vitro ai mitogeni, agli antigeni - Produzione di citochine - Produzione in vitro di Ig - TCR - HLA - Studio della Apoptosi
Complemento	- Attività emolitica CH50 e frazioni del C
Cellule NK	- Attività citotossica
Fagociti	- Burst respiratorio (NBT) o analisi in citofluorimetria con DHR 123 - Studio delle Integrine in citofluorimetria - Dosaggio della mieloperossidasi, del G6PDH

Primary Immune Deficiencies with aberrant production of IgE

	Difetto genetico	Meccanismo di immunodeficienza	Meccanismo di aumento delle IgE
WAS	Deficit WASP	Anormalità citoscheletro di actina e alterata stabilità immunosinapsi	Disfunzione T-reg
IPEX	Mutazioni FOXP3	Deficit T-reg	Deficit T-reg
S.Omenn	Mutazioni RAG, ARTEMIS, IL-7R, RMRP, IL-2Rγ, ZAP70…	Ly T oligoclonali e assenza Ly B	T-reg ridotti, Ly T oligoclonali, aumentata produzione IL-4
S.DiGeorge	Delezione 22q.11.2	Ly T oligoclonali	Ly T oligoclonali
S.Netherton	Mutazioni SPINK5	Deficit di LEKTI	Deficit di LEKTI
HIES	Mutazioni STAT3, TYK2, DOCK8	Signaling citochine difettivo	Difetto di IL-21?

Notarangelo LD, Geha RF. ***J Allergy Clin Immunol. 2008***



Livelli sierici elevati di IgD frequentemente associati anche ad un aumento delle IgA sono stati descritti nella Iperimmunoglobinemia D con febbre periodica (HIDS)

Dosaggio delle sottoclassi IgG ha scarso significato diagnostico e non è ritenuto utile prima dei 3 anni: i difetti isolati sono molto rari, si accompagnano in genere ad altre alterazioni immunologiche

Dosaggio di anticorpi specifici

La determinazione dei titoli anticorpali specifici verso Ag vaccinali o frutto di esposizione naturale rappresenta un'indagine di estrema importanza nel valutare la capacità dell'individuo di elaborare un'adeguata risposta anticorpale

Sono generalmente studiate le risposte anticorpali verso antigeni vaccinali proteici ad es. il *tossoide tetanico*, e polisaccaridici, come quello dello *Streptococcus pneumoniae* o dell'*Haemophilus influenzae* valutata a distanza di 4-6 settimane dalla somministrazione di una dose booster di vaccino. Viene considerata adeguata quando si osserva un incremento di circa 4 volte tra il titolo anticorpale pre- e post-vaccinale

La risposta anticorpale agli antigeni polisaccaridici è fisiologicamente ridotta nei pazienti di età inferiore ai 2 anni mentre raggiunge adeguata maturazione sopra i 2 anni di età

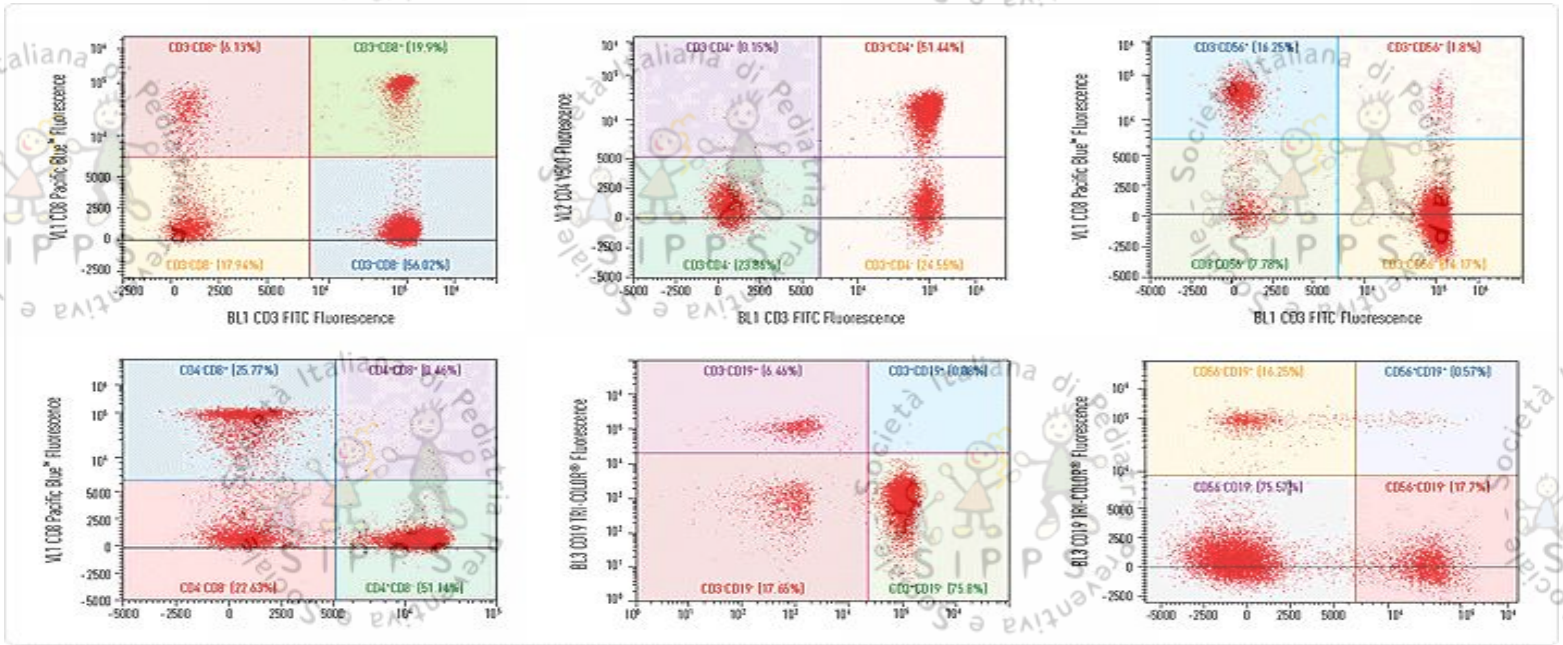
Altro parametro utile, in età superiore a 1-2 anni di vita, è la titolazione dei valori delle **isoemoagglutinine**. Sono anticorpi di tipo IgM rivolti verso gli antigeni polisaccaridici naturali del sistema ABO presenti sui globuli rossi. La titolazione delle isoemoagglutinine può essere considerata come l'espressione della risposta anticorpale IgM-mediata.

Rappresenta uno dei criteri diagnostici di *Immunodeficienza Comune Variabile (CVID)*

Sottopopolazioni linfocitarie

- L'analisi quantitativa in citofluorimetria è la metodica più diffusamente impiegata per la valutazione delle varie componenti linfocitarie, il loro stato di attivazione prima e dopo stimolo (CD38, CD25, CD69, CD40L, HLA-DR) e le popolazioni naive e memory dei T e B linfociti (CD45RO, CD45RA, CD27)

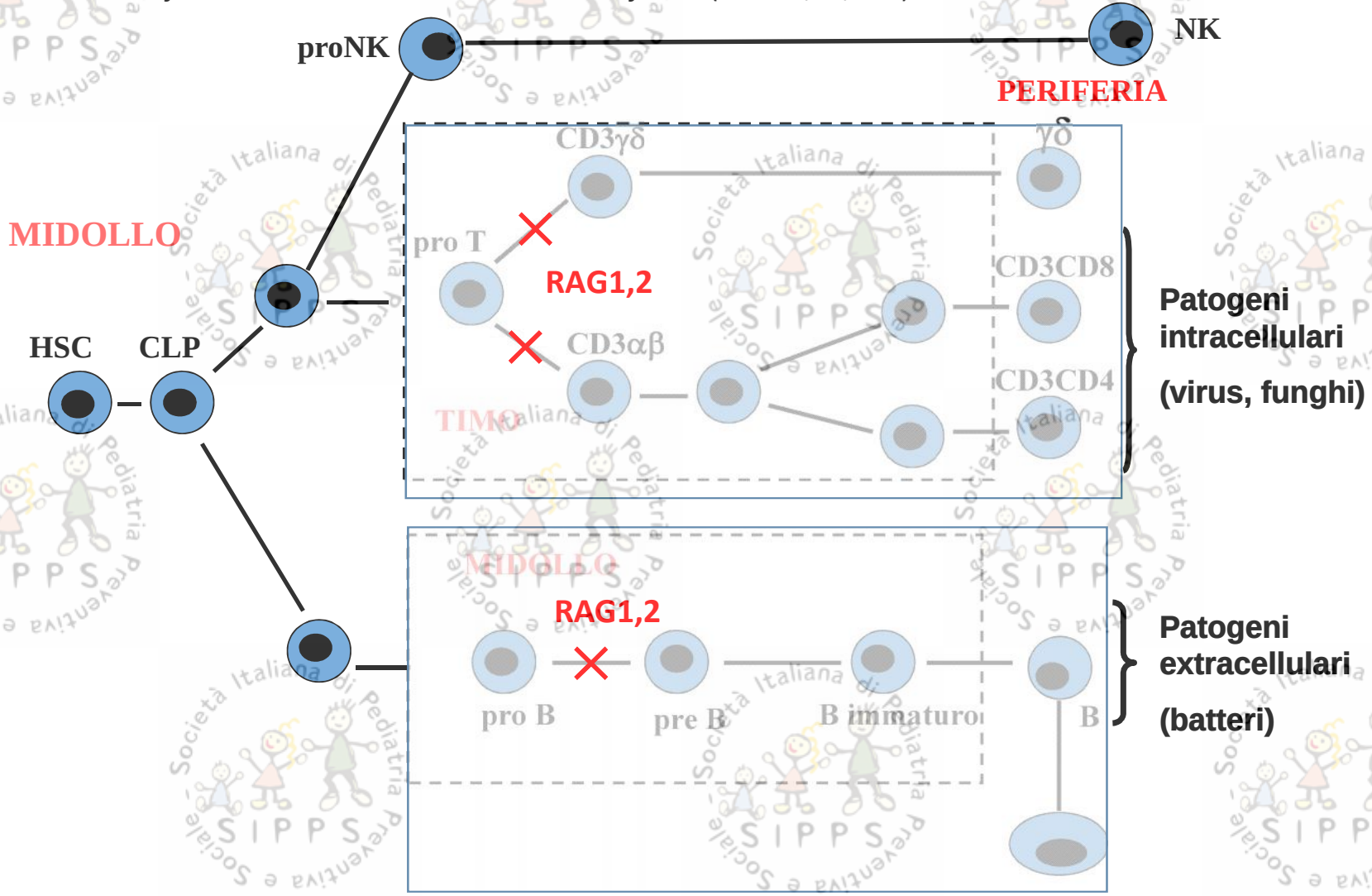
- Alterati rapporti tra le diverse popolazioni dei linfociti T, B e NK permettono di indirizzare il sospetto di SCID verso specifici ambiti molecolari



Immunodeficienze combinate T- B-

difetti di generazione del recettore (TCR , BCR) da difetto delle proteine di ricombinazione RAG

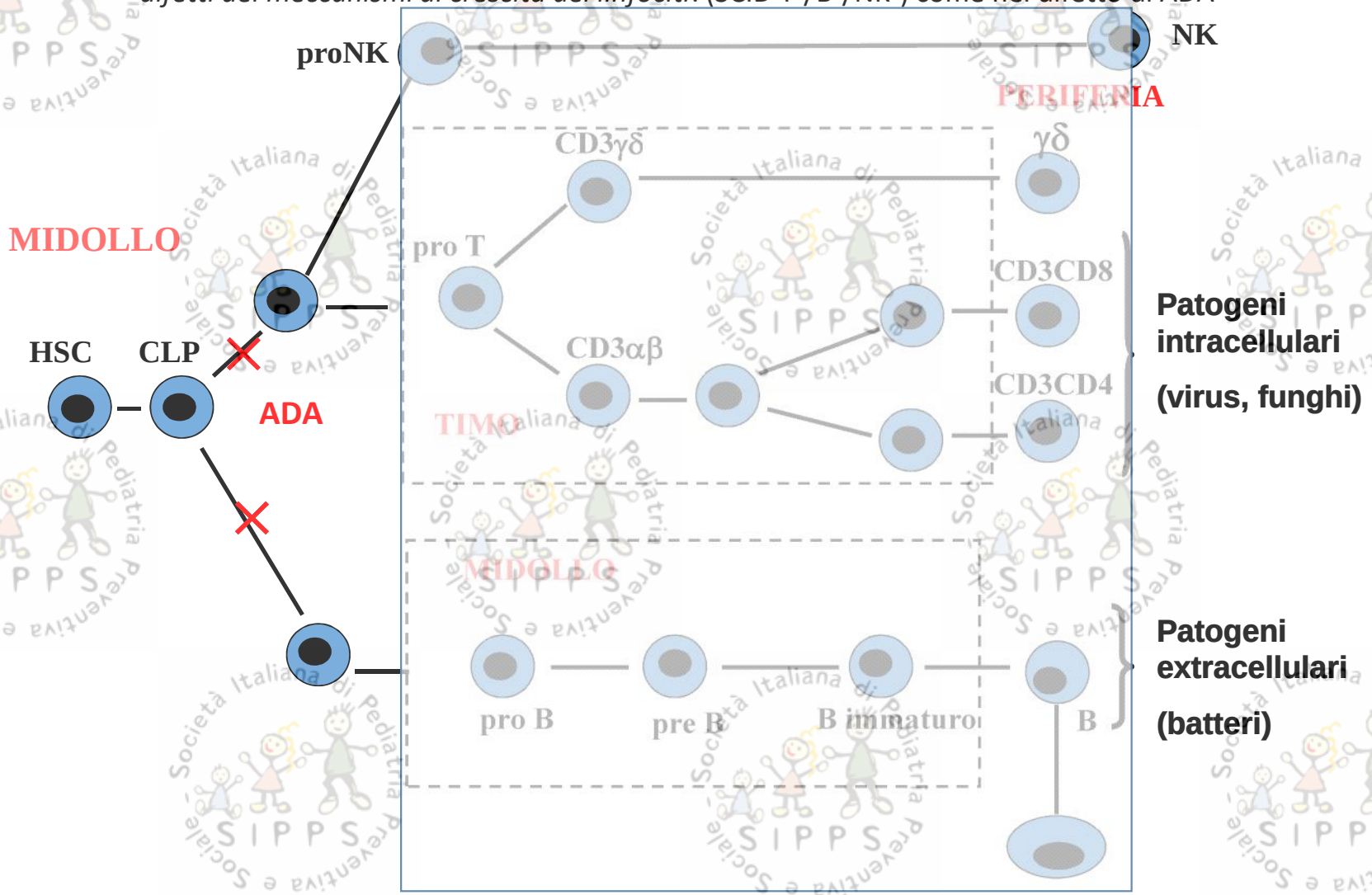
- *difetti dei meccanismi di crescita dei linfociti*: (SCID T-/B-/NK-) come nel difetto di ADA



Immunodeficienze combinate T- B-NK-

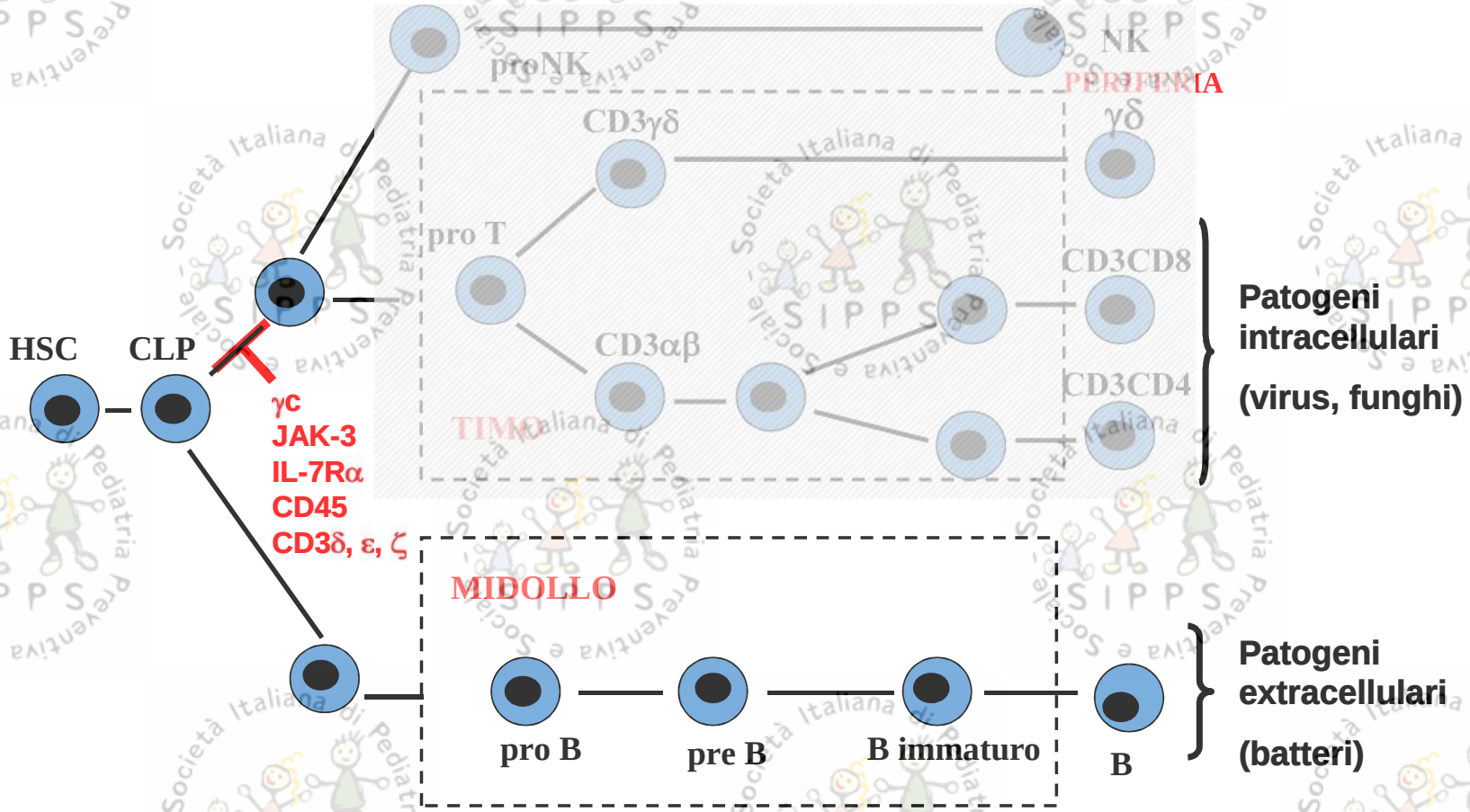
difetti di generazione del recettore (TCR , BCR) da difetto delle proteine di ricombinazione RAG

- *difetti dei meccanismi di crescita dei linfociti*: (SCID T-/B-/NK-) come nel difetto di ADA



Immunodeficienze combinate T-B+

-*difetti nella trasmissione del segnale di citochine linfotropiche*: si riflettono sulla generazione di linfociti T e NK ma non sui B (SCID T-/B+/NK-); ad esempio nel difetto di **γc** o di **JAK-3**



B cell subsets

- L'analisi citofluorimetrica permette anche di effettuare una valutazione quantitativa e dello stadio maturativo dei linfociti B. Un difetto isolato di linfociti B è caratteristico delle agammaglobulinemie (X-R o AR)

- La valutazione della distribuzione delle sottopopolazioni B linfocitarie ha un valore classificativo e prognostico nei pazienti con ICV, chiarire il meccanismo alla base del difetto anticorpale e permettere di discriminare la THI rispetto alla ICV

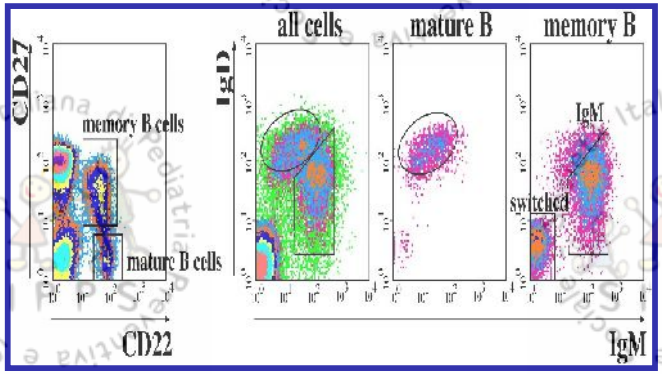
CD22, CD27 → **mature B cells** $CD22^{+}CD27^{-}$

CD22, CD27 → **memory B cells** $CD22^{+}CD27^{+}$

IgM, IgD

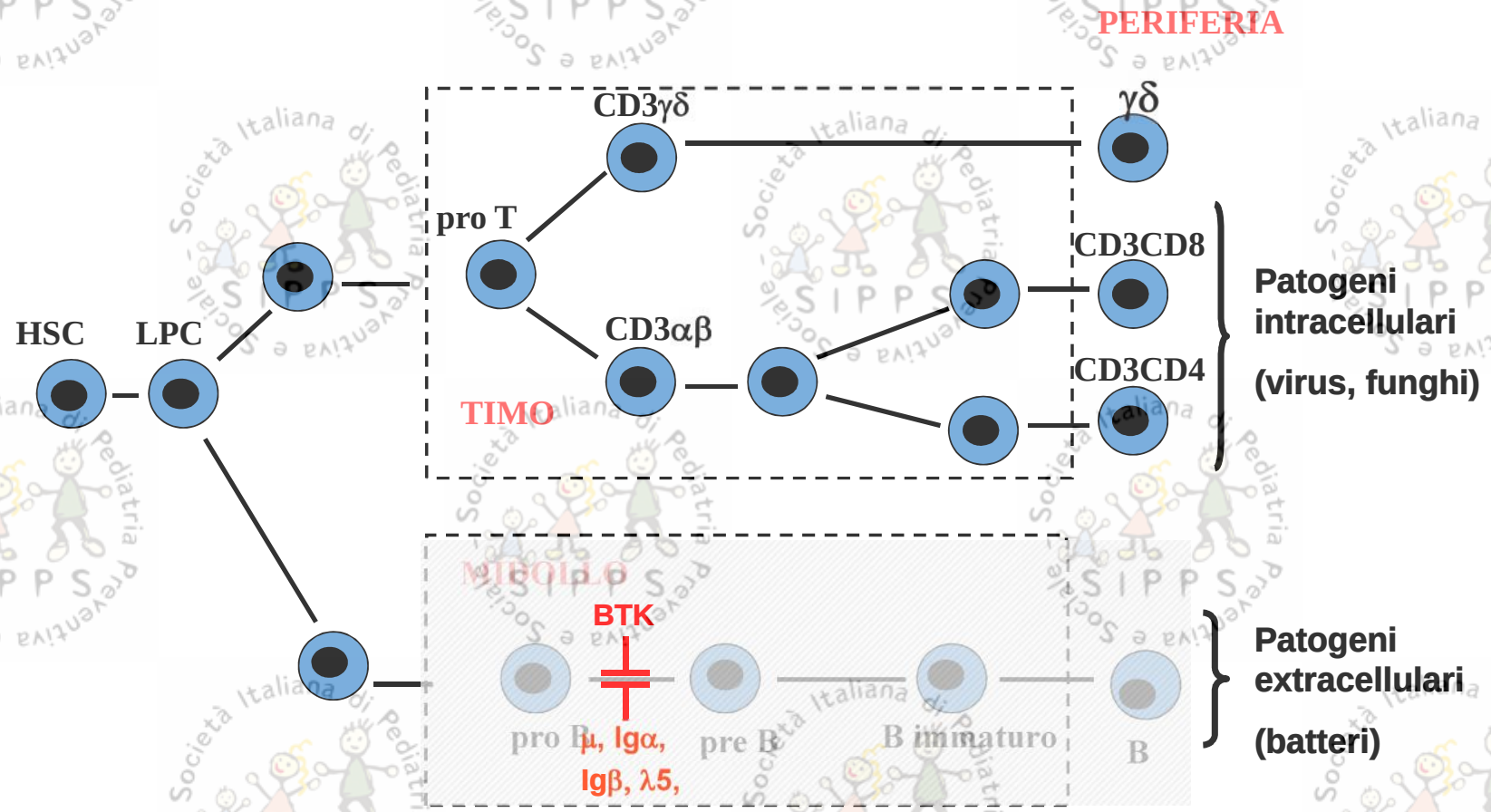
IgM memory ($IgM^{bright}IgD^{dull}$)

Switched memory B cells ($IgM^{-}IgD^{-}$)



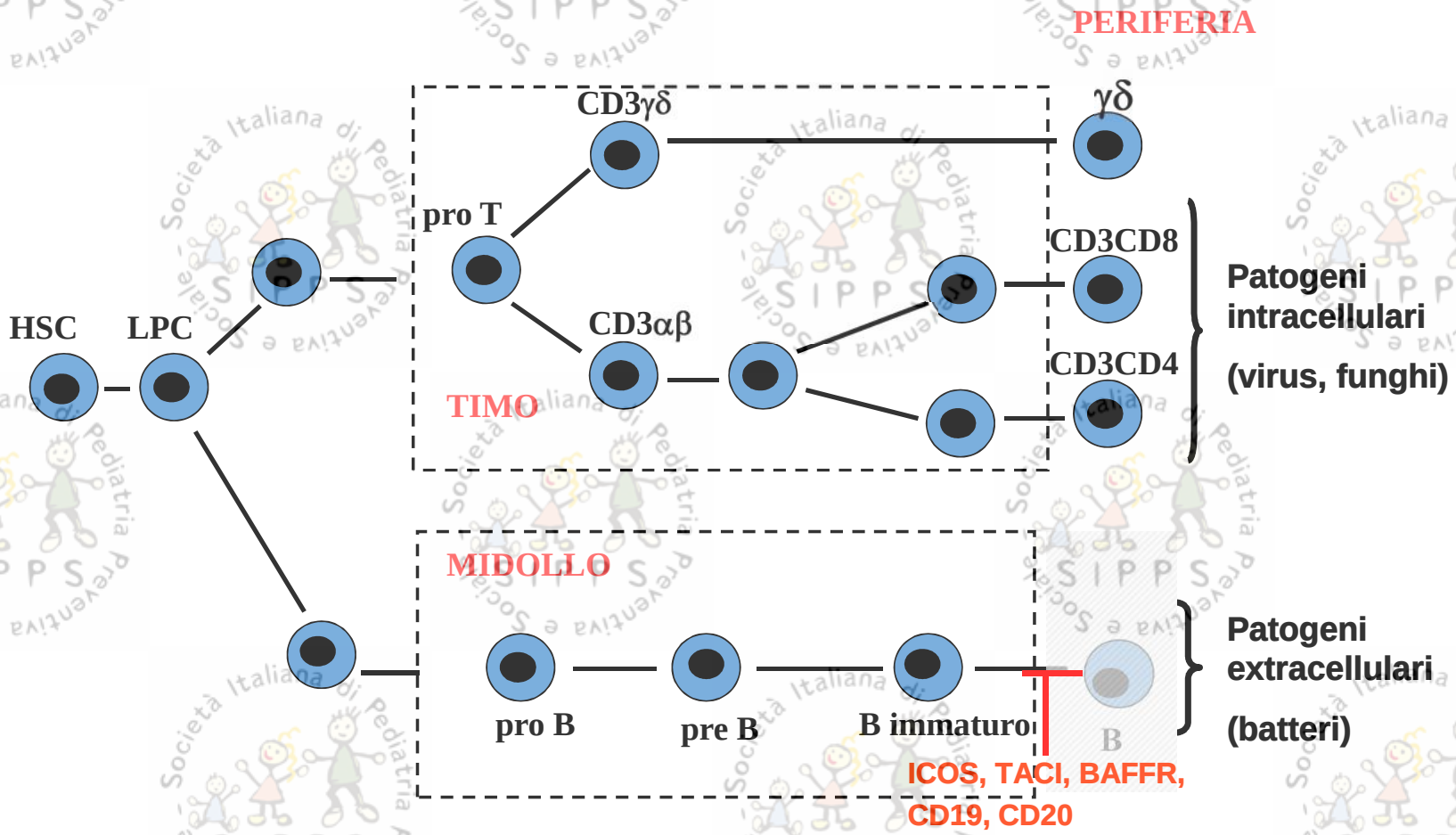
Immunodeficienze umorali T+ B-

Agammaglobulinemia X-R e AR



Immunodeficienze umorali T+ B+

Ipogammaglobulinemia comune variabile



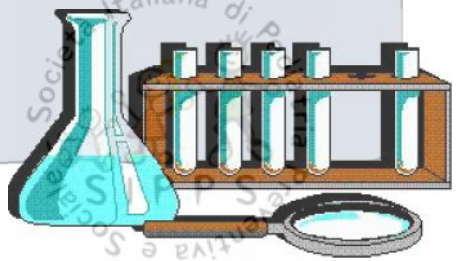
Test funzionali

…di blastigenesi *:* indagano sulla capacità delle cellule linfocitarie di proliferare in risposta a stimoli (mitogeni, stimolo recettoriale ecc.) o di esprimere determinati antigeni in seguito ad attivazione (espressione di CD25, CD40L ecc.)

…. di citotossicità – Le diverse forme di citotossicità (*natural killer*, anticorpo-dipendente o delle cellule T citotossiche) vengono misurate utilizzando diverse cellule tumorali o cellule bersaglio infettate da virus. Un risultato patologico può essere dovuto nel maggior parte dei casi a un *difetto* di rilascio dei granuli litici (*degranulazione)* o della *produzione di molecole citolitiche*, come la *perforina.* In rari casi ad un difetto numerico di queste cellule

….. di apoptosi – indaga l'integrità della via di segnale del FAS su linfociti attivati, e dà risultati patologici in presenza di mutazioni dei geni codificanti per FAS, FAS-ligando e per altre proteine coinvolte in questa via (CASP8 e CASP10). Mutazioni in eterozigosi di uno di questi geni sono responsabili della sindrome linfoproliferativa autoimmune (ALPS)

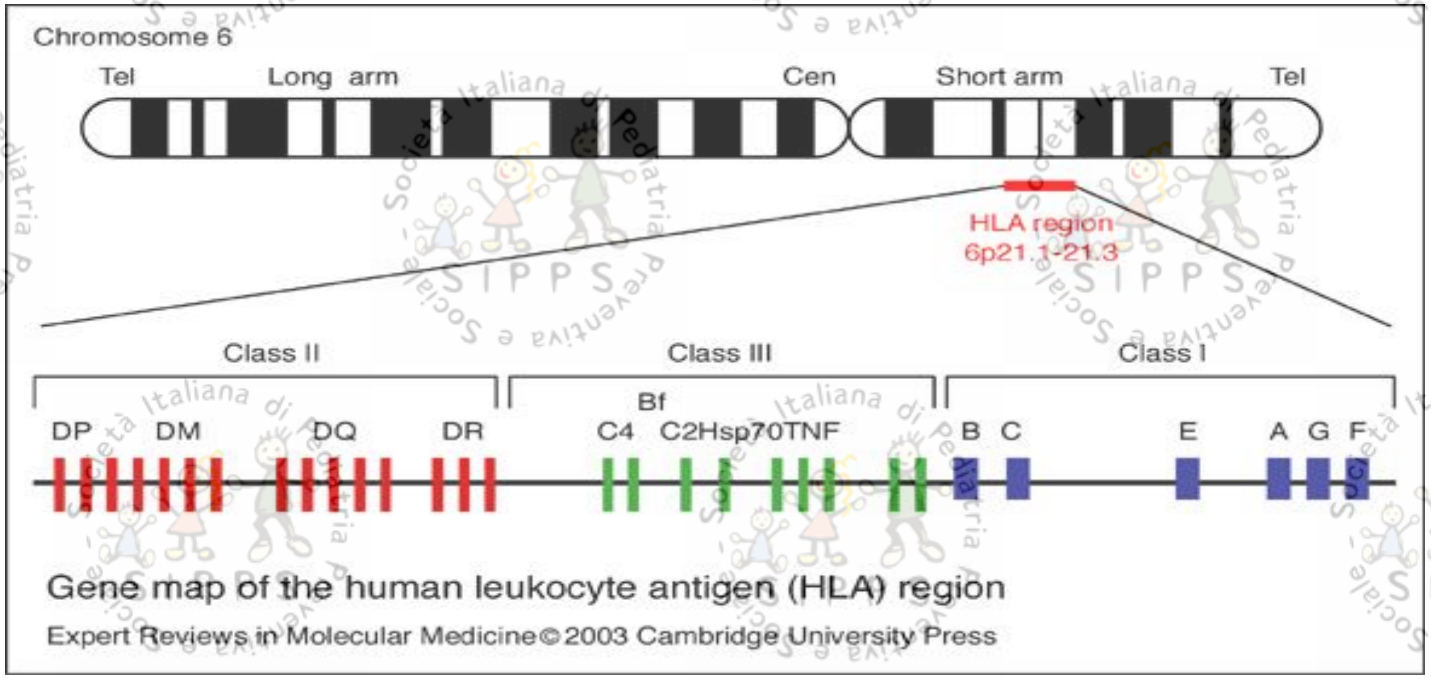
….integrità del T-cell receptor e della via di trasduzione del segnale



Tipizzazione HLA

lo studio di espressione degli antigeni HLA di classe I e II permette di identificare alcune specifiche forme di immunodeficienza caratterizzate da mancata espressione degli antigeni HLA come si osserva nei deficit di classe I o di classe II (sindrome del linfocita nudo)

può essere di valido aiuto per distinguere quelle forme di immunodeficienze in cui vi sia attecchimento di linfociti materni (maternal engraftment) dalla sindrome di Omenn



Dosaggio e attività del Complemento

Lo studio dell'attività emolitica totale del siero (CH50) e il dosaggio dei fattori specifici C3, C4 e può svelare alterazioni della cascata complementare e permettere una prima approssimativa distinzione tra difetti della via classica e della via alternativa.

Indicazioni : un difetto della funzionalità del Complemento dovrebbe essere preso in considerazione in tutti i pazienti affetti *da angioedema ricorrente, malattie autoimmuni, infezioni ricorrenti da piogeni, o in un secondo episodio di sepsi a qualunque età*

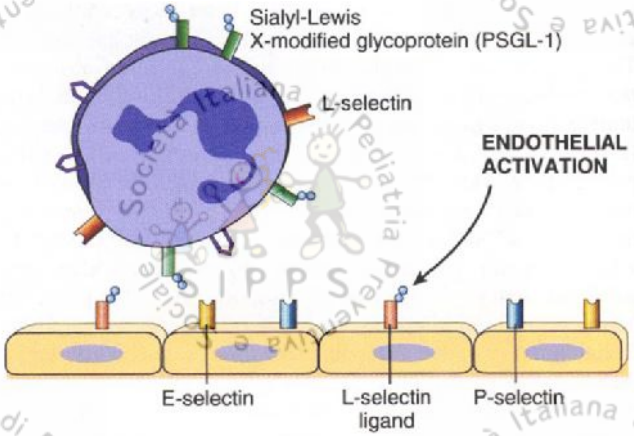
Test per i deficit delle cellule fagocitarie

L'ulteriore step diagnostico di 2° livello prevede lo studio delle funzioni dei fagociti: **adesione**, **chemiotassi**, **fagocitosi** e **"killing" intracellulare**.

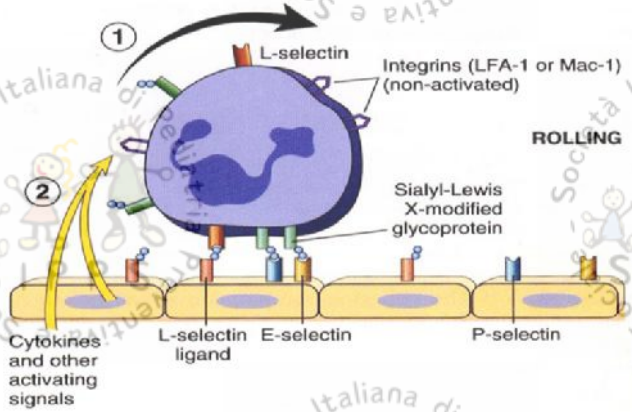
Un **difetto di chemiotassi** per esempio può essere suggerito dalla mancata formazione di pus nella sede di un'infiammazione e un ritardo della caduta del cordone ombelicale accompagnato da leucocitosi marcata. Un gruppo di immunodeficienze è causato da difetti nella capacità di queste cellule di aderire all' endotelio. La diagnostica di queste forme si basa **sull'analisi in citofluorimetria delle molecole di adesione presenti sui granulociti neutrofili e i monociti (integrine)**

Difetti delle proteine di adesione (LAD)

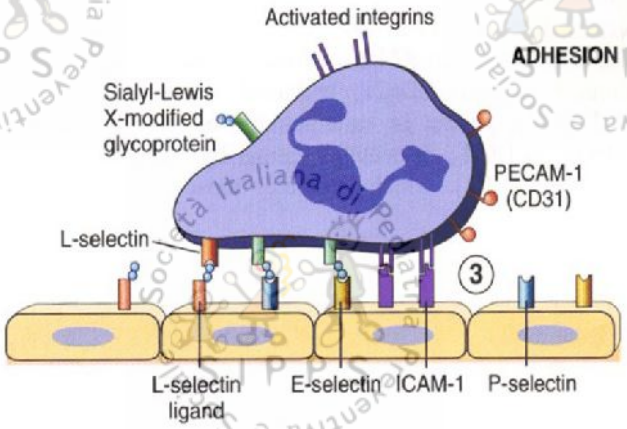
SULL'ENDOTELIO ATTIVATO COMPAIONO LE SELECTINE



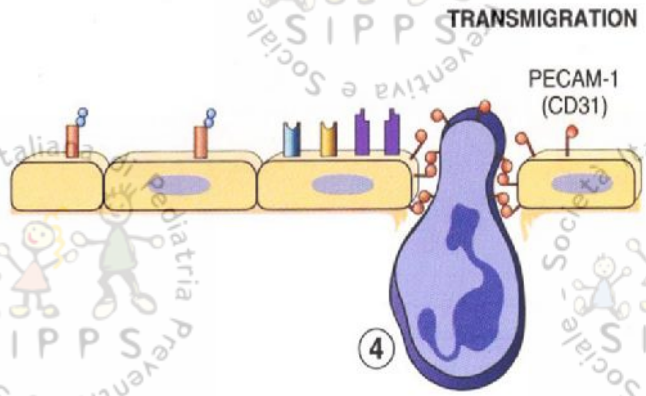
I NEUTROFILI MARGINALIZZATI SI LEGANO BLANDAMENTE ALLE SELECTINE E A ICAM-1



LE CHEMOCHINE AUMENTANO L'AVIDITA' DI LEGAME DELLE INTEGRINE PER ICAM-1



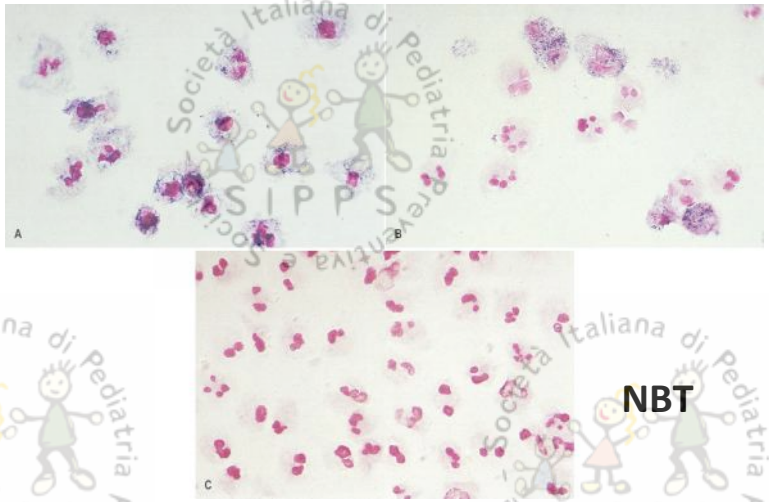
MIGRAZIONE GRAZIE ALLA INTERAZIONE INTEGRINE /PECAM-1



Malattie ereditarie associate con anomalie della motilità leucocitaria

	Leukopenia	Leukocytosis	T-cell defect	B-cell defect	Locus
WHIM syndrome	+	–	+	+	CXCR4
Classical Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)	+	–	+	+	WAS
X-linked thrombocytopenia (XLT)	–	–	–	–	WAS
X-linked neutropenia (XLN)	+	–	–	–	WAS
WIP deficiency	+	–	+	+	WIP
Coronin 1A deficiency	+	–	+	–	CORO1A
Leukocyte adhesion deficiency I	–	+	+	–	ITGB2
Leukocyte adhesion deficiency II	–	+	–	–	SLC35C1
Leukocyte adhesion deficiency III	–	+	+	–	FERMT3
Rac2 deficiency	–	+	+	–	RAC2

R. Badolato, *Eur J Immunol 2013*

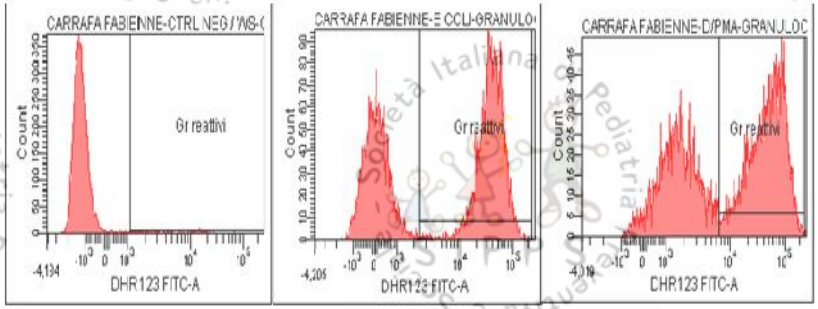


NBT

Killing

DHR123

	Risultati	Range
Granulociti resting:	2.0%	
Granulociti reattivi a E.Coli:	57.0%	95-100
Granulociti reattivi a PMA:	57.2%	99-100

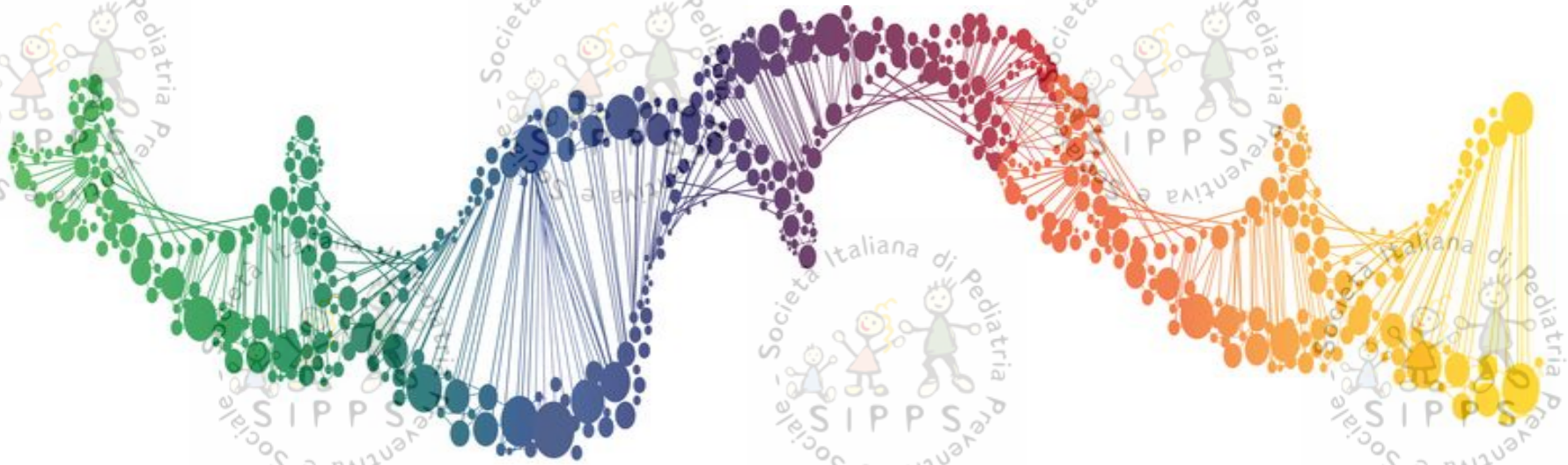


Test di produzione del superossido o Burst test

- Permette di identificare i difetti della catena ossidativa dei granulociti, che sono alla base delle diverse forme di CGD
- Valuta la produzione di superossido in granulociti stimolati con cellule batteriche formalinizzate o con attivatori (esteri del forbolo), mediante test colorimetrico semiquantitativo (NBT) o citofluorimetria a flusso con DHR- 123
- **Il test andrebbe eseguito in tutti i pazienti con infezioni piogeniche ricorrenti, ascessi profondi, osteomieliti da saprofiti (*Aspergillus*, *Nocardia, Klebsiella*), ma anche in pazienti con malattia infiammatoria intestinale ad esordio precoce.**

INDAGINI DI 3° LIVELLO

Analisi molecolari che consentono di analizzare la presenza di una mutazione in un gene candidato. L'identificazione del difetto genetico responsabile permette di effettuare una ***diagnosi definitiva*** e soprattutto di fornire alla famiglia un adeguato ***counseling genetico***



History of Genome Sequencing

1950 | 1960 | 1970 | 1980 | 1990 | 2000

Discovery of DNA structure by Watson and Crick (1953)

Development of Sanger Sequencing by Frederick Sanger (1977)

Polymerase Chain Reaction (PCR) invented by Kary Mullis (1983)

Human Genome Project Initiated

Development of Pyrosequencing by Pål Nyrén

454 Life Sciences Corp. is founded

Sequence of Human Genome Completed (2003)

454 Sequencing™ was used to sequence the following genomes (along with many others):

- Barley (plant)
- Neanderthal
- Helicobacter pylori (*H.pylori* - bacteria that cause gastric ulcers)
- HIV mutant strains

Next generation sequencing

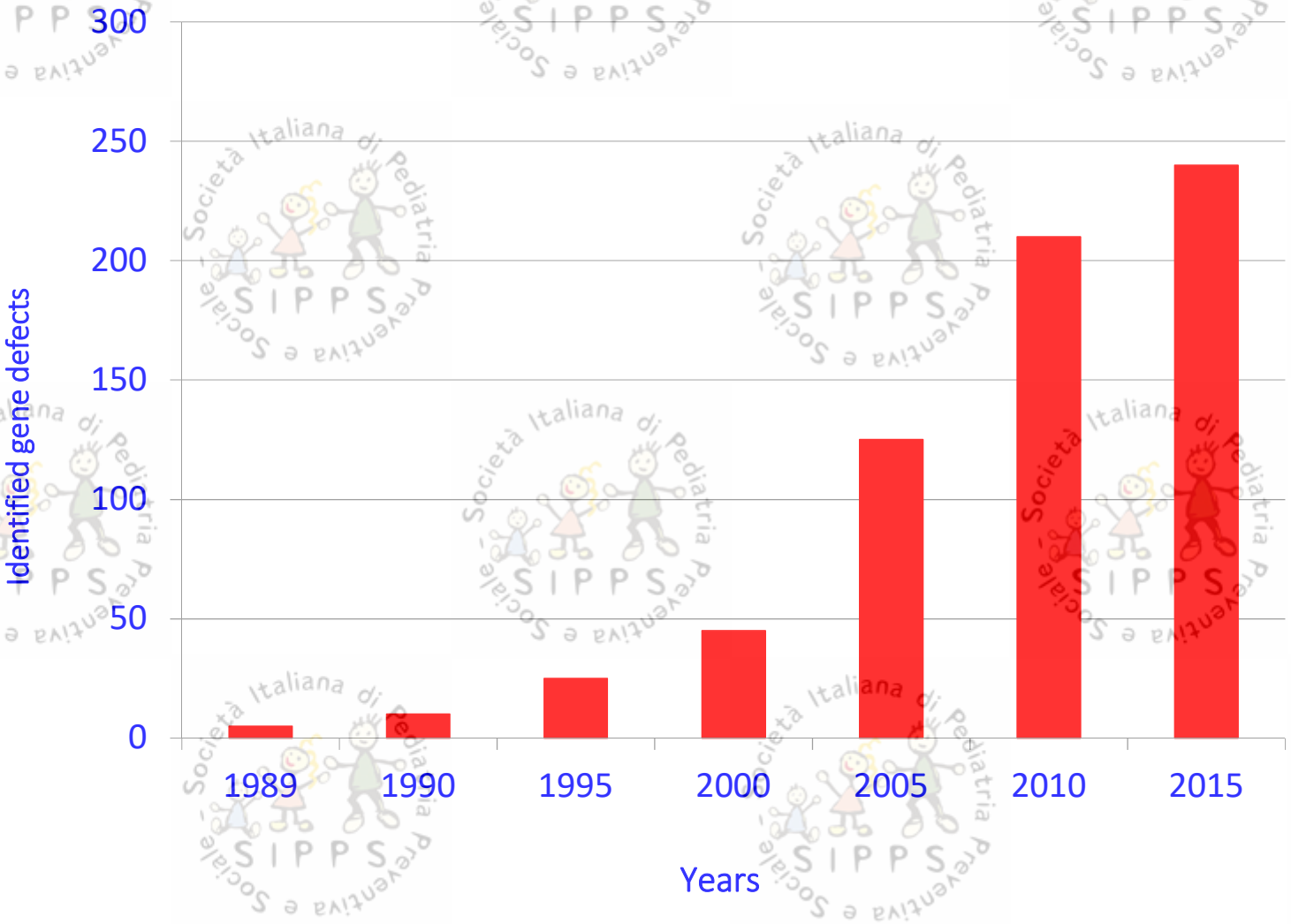
Crick and Watson correctly identify the double-helix structure of DNA

1953

They based their discovery on Rosalind Franklin's X-ray diffraction photograph of DNA.

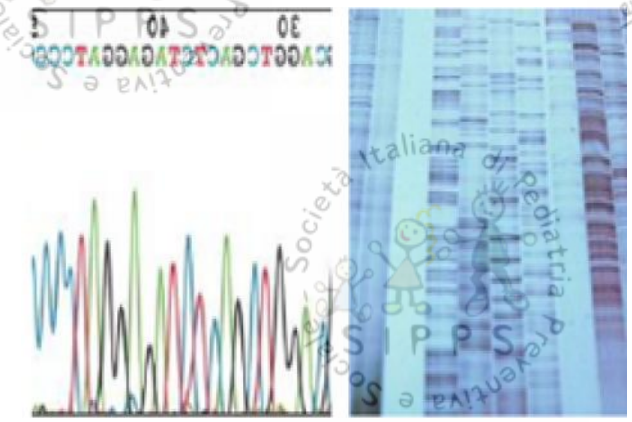
©2010, Illumina Inc. All rights reserved.

Diagnosi genetica : caratterizzazione del difetto molecolare

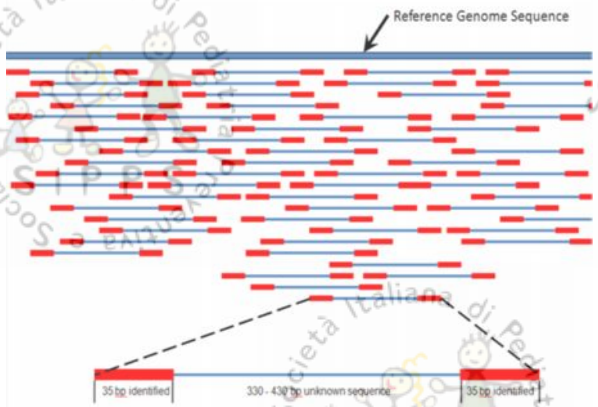


INDAGINI DI 3° LIVELLO

Sequenziamento genico **di un singolo gene candidato** (tecnica Sanger): a questa tecnica si è aggiunta più recentemente l'analisi di **sequenziamento parallelo** (***next generation sequencing***, **NGS o *deep sequencing***) che permette di sequenziare decine di geni contemporaneamente, o al limite l'intera porzione codificante del genoma (esoma)



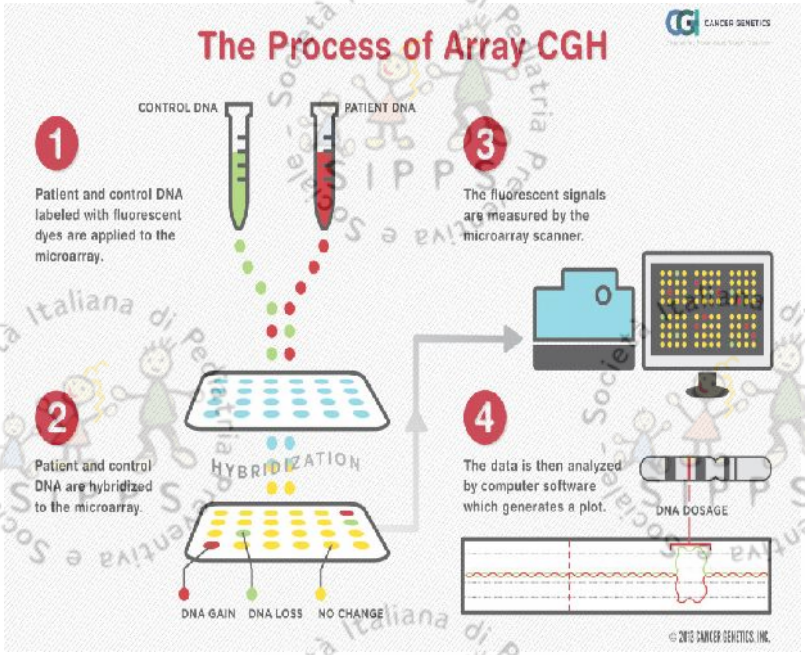
Questo ha permesso di sviluppare l'analisi di gruppi di geni associati a diverse forme di immunodeficienza, come per esempio analisi dei geni associati a linfopenia, ipogammaglobulinemia etc.



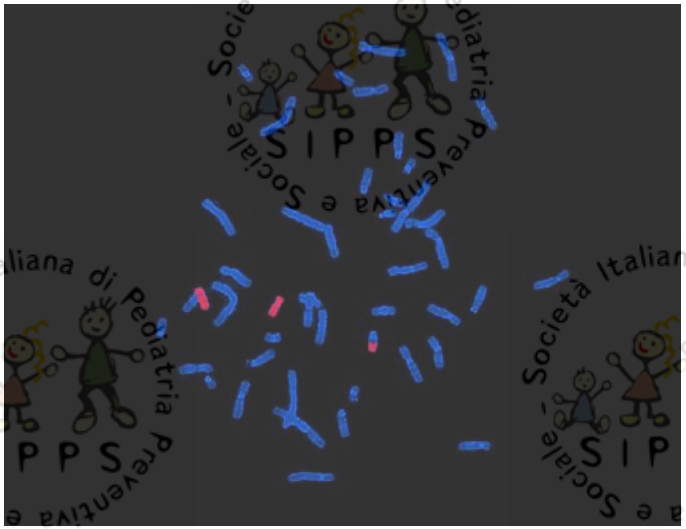
Alle indagine genetiche possono seguire le indagini di **analisi dell'espressione del RNA messaggero (mRNA) e/o della proteina**, qualora vi siano dei dubbi sul possibile significato delle mutazioni identificate

INDAGINI DI 3° LIVELLO

Per la diagnosi di determinate sindromi associate ad immunodeficienza che si caratterizzano per alterazioni citogenetiche, *es. Sindrome di DiGeorge*, si può procedere ad *analisi del cariotipo molecolare* mediante tecnica **Array-CGH**



oppure quando esista un sospetto di una precisa alterazione citogenetica la ricerca di delezioni e/o duplicazioni attraverso tecnica di ***fluorescent in situ hybridization*** **(FISH)**



Screening neonatale delle Immunodeficienze

- Fare diagnosi precoce di linfopenia severa in epoca pre-sintomatica permette di abbattere i tassi di mortalità e di morbidità per questi pazienti

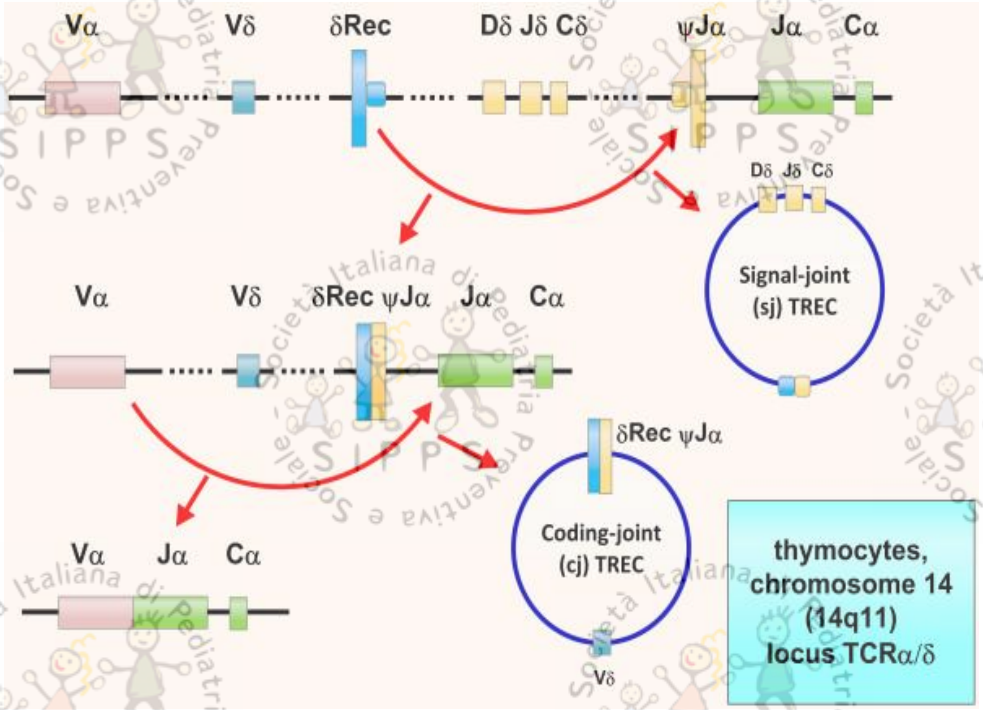
- In molti Paesi occidentali sono stati avviati programmi di screening neonatali basati sulla analisi dei TRECS su *dried blood spot* (DBS).

Screening neonatale delle Immunodeficienze

I **TREC** (T-*cell receptor excision circles*) sono piccoli frammenti di DNA in eccesso che si formano durante lo sviluppo delle cellule T naïve nel timo. Derivano dal processo di differenziazione del TCR, che prevede il riarrangiamento casuale tra sequenze geniche specifiche V, D, J

Gli scarti di DNA che si aggregano a costituire delle strutture circolanti, appunto i TREC. Questi non si moltiplicano durante la divisione cellulare cosicché un dosaggio quantitativo di questi elementi dà un'idea sul numero delle cellule T che sono andate incontro a maturazione.

La maggior parte delle SCID presentano un ridotto numero di cellule T naïve e quindi di TREC



ID identificate dall'analisi TREC

SCID tipiche	SCID-forme intermedie (leaky)	Linfopenia congenita idiopatica	Altre sindromi genetiche con noto difetto delle cellule T	Altre cause di linfopenia Con linfociti T circolanti bassi
IL2R¥ (X-linked)	Sindrome di Omenn		Sindrome di DiGeorge	
ADA			CHARGE	Prematuri < 30settimane (linfopenia transitoria)
IL-7R			Trisomia 21	IUGR
JAK3			Sindrome IperIgE	Linfangectasia
RAG1/RAG2			Cartilage hair hypoplasia	Leucemia neonatale
DCLRE1C (Artemis)				
TCRD/TCRE/TCRZ				
CD45				

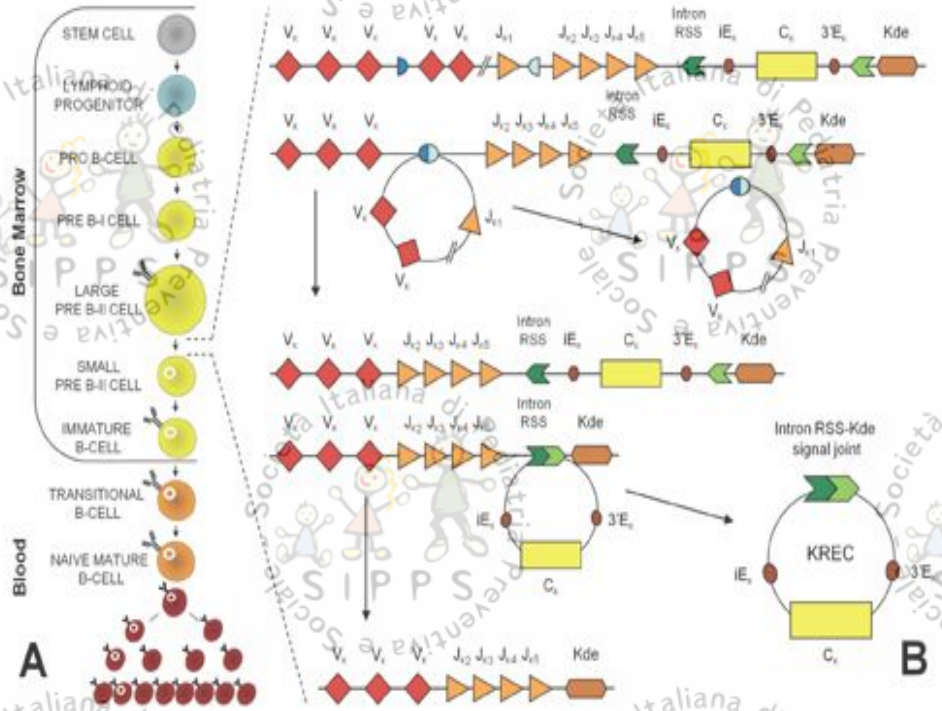
Mod. da C. Azzzari et al : Le ID nell' ambulatorio del pediatra. Ed. Sintesi Infomedica 2016

KREC assay

Analogamente a quanto avviene nella maturazione del TCR nelle cellule T, anche nelle cellule B si verifica una ricombinazione che estromette piccole parti di DNA "avanzato". Con procedura simile a quella dei TREC, che utilizza lo stesso metodo di amplificazione genica in *Realtime*, questi frammenti di DNA, chiamati **KREC** (*kappa-deleting-recombination-excision circles)* possono essere individuati e quantizzati, consentendo cosi di *individuare forme di immunodeficienza con deficit isolato dei B*

In alcune forme di SCID con fenotipo più lieve, può essere alterato anche uno solo dei due test TREC/KREC.

L'utilizzo di entrambi i metodi contemporaneamente consente di migliorare la sensibilità di diagnosi



Lo screening con tandem Mass applicato alle ID

In grado di identificare **due forme di SCID, il difetto di ADA e di PNP**. Le alterazioni già presenti alla nascita sono caratterizzate, nel caso di ADA-SCID, dall'accumulo di due metaboliti, l'adenosina e la desossiadenosina e, nel caso di PNP-SCID, di guanosina, inosina e dei loro deossi-derivati

I metaboliti specifici sono individuabili negli spot di sangue prelevati alla nascita, utilizzando la stessa procedura di MS con cui oggi, si effettua lo *screening* neonatale per gli errori congeniti del metabolismo

La differenza tra i valori nei pazienti con ADA-SCID e i controlli sani è molto ampia e non esiste alcun *overlapping* tra soggetti sani e malati.: *Il test è altamente specifico e sensibile*

Lo screening per ADA e PNP-SCID mediante spettrometria di massa può essere facilmente incluso in un programma di *screening* sulla popolazione a causa del suo basso costo (inferiore a 0.05 €/test) e perché richiede personale e tecnologia già impiegati nei programmi di *screening*

quotidianosanità.it Governo e Parlamento

04 AGO -Approvato il disegno di legge che introduce l'obbligatorietà della diagnosi precoce allargata neonatale, inserendo nei LEA gli accertamenti diagnostici obbligatori per la prevenzione della malattie metaboliche ereditarie

TAKE HOME MESSAGE

Le IDP sono sempre più numerose ma restano malattie rare. Gli esami di screening immunologico consentono nella maggior parte dei casi di fare diagnosi, ma in presenza di un quadri clinici suggestivi la valutazione immunologica deve essere più approfondita

E' quindi fondamentale lavorare in rete tra ospedale-territorio, pediatra di famiglia e centri di 2° livello

…ma soprattutto….occorre pensarci !!

Giorgio 1 anno..

- Primogenito nato a termine da T.C. NGA (3470gr)
- Allattato al seno , vaccinato con esavalente (3 dosi)
- Tappe di sviluppo psicomotorio nella norma
- All' età di 8 mesi comparsa di 2 noduli eritematosi al volto, il più grande di circa 2 cm…

… inviato in consulenza dopo 4 mesi dall'esordio delle manifestazioni cutanee, n*on responsive* al trattamento antibiotico topico ed orale con *macrolide ed amoxicillina, per il riscontro di un aumento dell' LDH (535 U/L) alle indagini di routine*

Peso 12,240 Kg (90°-95°)
Condizioni cliniche generali buone
Due noduli eritematosi di circa 1 e 2 cm di diametro, in sede perilabiale-sottogeniena dx, di consistenza aumentata, dolenti alla palpazione

Assenti linfoadenopatie e organomegalia. Obiettività cardiorespiratoria e addominale nella norma.

Indagine microbiologica

TAMPONE CUTANEO

Negativo per batteri e miceti

Granuloma asettico

…ipotesi diagnostiche ?

Il granuloma può essere segno di disregolazione della risposta immunitaria
e pertanto una spia di immunodeficienza.

- Immunodeficienza Comune Variabile (CVID)
- Malattia granulomatosa cronica (CGD)
- Varianti di SCID
- Atassia-Teleangiectasia (AT)
- Suscettibilità mendeliana alle malattie da Micobatteri (MSMD)

SCID

AT

CGD

Esami nel sospetto di deficit immunologico

EMOCROMO

Globuli bianchi	9480	/µL
Neutrofili	37.8	%
Linfociti	52.0	%
Monociti	8.2	%
Hb	12	g/dl
MCV	72.8	fl
RDW	14.9	%
Piastrine	348000	/µl

IMMUNOGLOBULINE

IgG	670	mg/dl
IgA	47	mg/dl
IgM	115	mg/dl
IgE	20	UI/ml

No SCID
No CVID

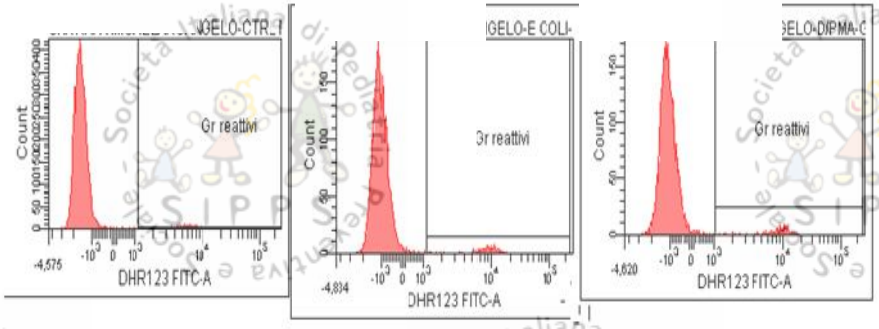
LINFOCITOGRAMMA

Linf. T	CD3	65%
Linf. T	CD3+ CD4+	49%
Linf. T	CD3+ CD8+	15%
Linf. NK	CD3- CD16+ CD56+	15%
Linf. B	CD19	20%
Leuc.	CD11a	75%
Leuc.	CD11b	79%
Leuc.	CD11c	65%
Leuc.	CD18	90%

...nel sospetto di deficit del killing dei fagociti

BURST TEST (analisi dell'attività ossidativa dei granulociti)
Metodica: ossidazione di diidrorodamina (DHR) valutata in citofluorimetria
Stimoli utilizzati: batteri (E. Coli) opsonizzati; forbol-miristato-acetato (PMA)

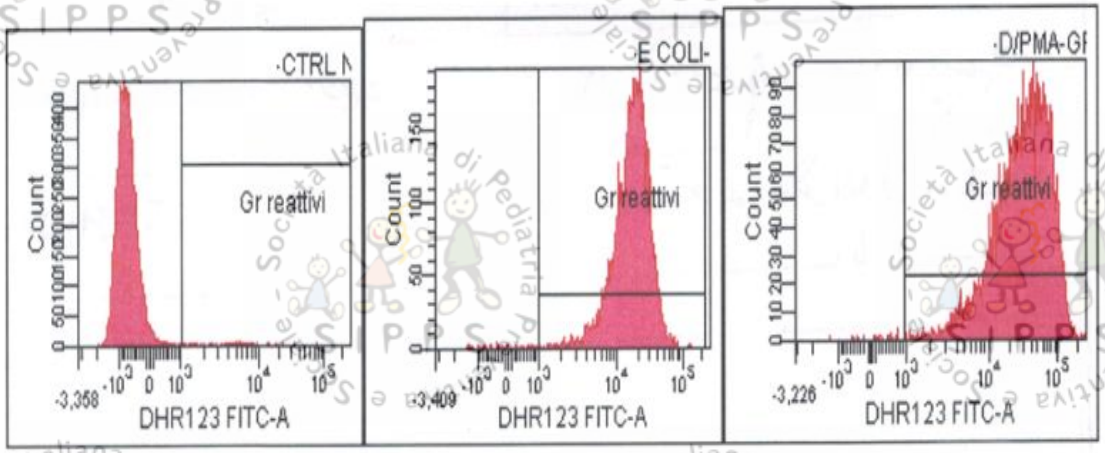
	Risultati	Range
Granulociti resting	3.3%	
Granulociti reattivi a E.Coli: →	3.3%	95-100
Granulociti reattivi a PMA: →	3.5%	99-100



Attività ossidativa ***assente*** con stimolo corpuscolato e con PMA

BURST test effettuato su campione ematico materno

	Risultati		Intervallo di riferimento
Granulociti resting	0.7	%	
Granulociti reattivi a E.Coli:	99.4	%	95-100
Granulociti reattivi a PMA:	99.6	%	99-100

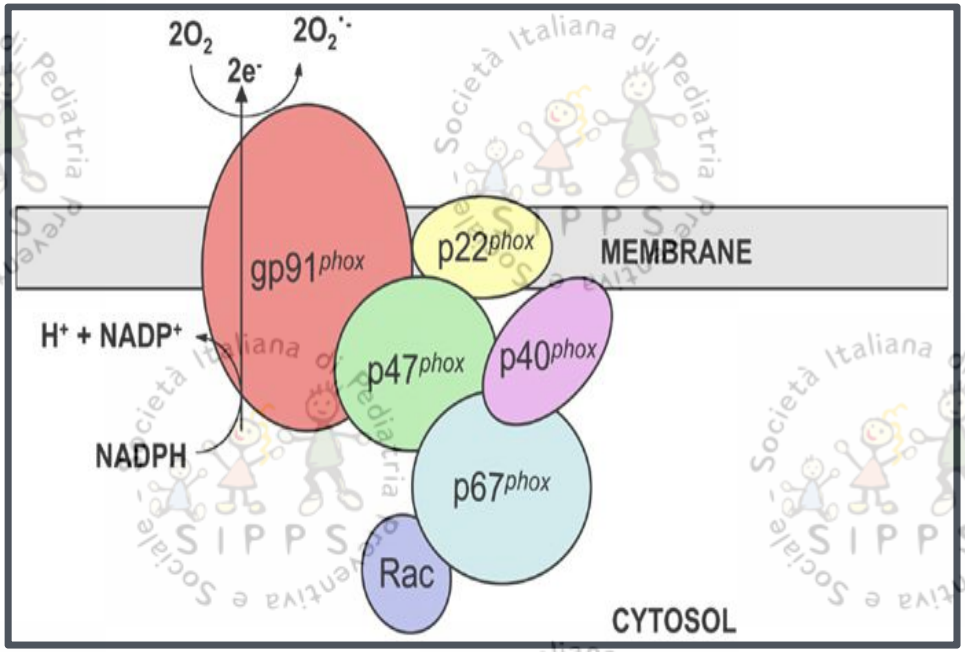


Attività ossidativa nella norma

MALATTIA GRANULOMATOSA CRONICA

Incidenza 1:250.000 nati vivi

NADPH ossidasi (burst respiratorio)

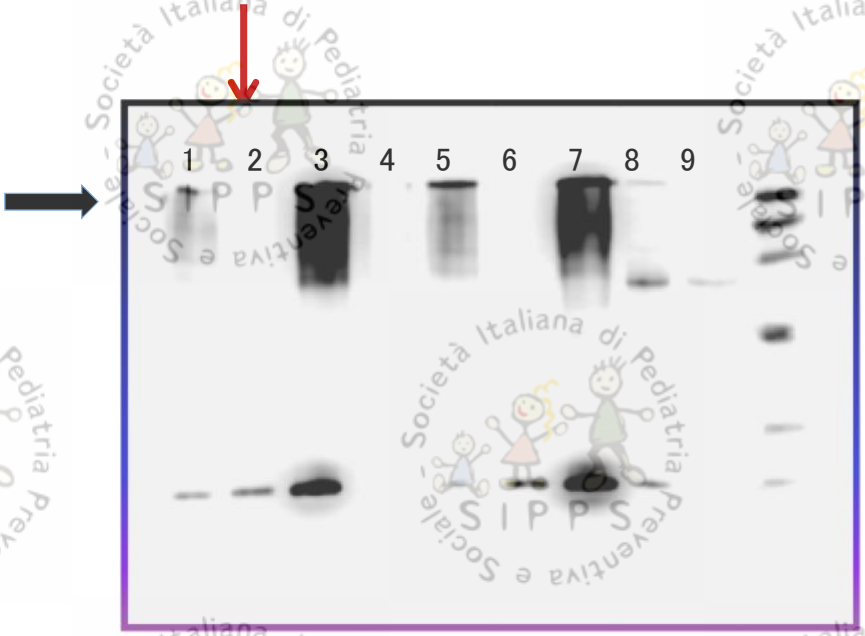


Proteina alterata	Locus genico	Ereditarietà	Sottotipo[a] (%)	Frequenza dei casi (%)
gp91phox	Xp21 (CYBB)	XL	X91⁰ X91⁻ X91⁺	55-60 5 1-3
p22phox	16p24 (CYBA)	AR	A22⁰ A22⁺	5 1
p47phox	7q11.23 (NCF1)	AR	A47⁰	25
p67phox	1q25 (NCF2)	AR	A67⁰ A67⁺/⁻	5 <1
p40phox	22q13.1 (NCF4)	AR	A40⁰/⁺	/

Tabella 1. [a] La soprascritta indica che la proteina viene espressa in quantità normale (+), ridotta (-) o è assente (0).

Analisi Western Blot

(analisi gp91^{phox}, forma più comune di CGD)



1 CGD pz1 (gp91^{-})
2 Giorgio (gp91°)
3 K
4 CGD pz3 (gp91°)
5 CGD pz 4 (gp91^{-})
6 CGD pz6 (gp91°)
7 BA-FE (wt)
8 BA-EDO1 (gp91°)
9 BA-EDO2 (gp91°)

proteina gp91^{phox} assente

INDAGINE MOLECOLARE

Metodo di analisi: amplificazione dei 13 esoni del gene CYBB tramite PCR e sequenziamento

Presenza in emizigosi della ***mutazione c.433G>A*** che comporta il cambio aminoacidico *p.G145R.*
La mutazione, mai precedentemente descritta, si presenta ***de novo*** nel paziente.

...CGD X-linked

TERAPIA

Profilassi antinfettiva: Cotrimossazolo/Itraconazolo

Marcata regressione delle lesioni infiammatorie cutanee del volto a 13 mesi dalla diagnosi di malattia

TAKE HOME MESSAGE

Le IDP sono sempre più numerose ma restano malattie rare. Gli esami di screening immunologico consentono nella maggior parte dei casi di fare diagnosi, ma in presenza di un quadri clinici suggestivi la valutazione immunologica deve essere più approfondita

E' quindi fondamentale lavorare in rete tra ospedale-territorio, pediatra di famiglia e centri di 2° livello

…ma soprattutto….occorre pensarci !!

Grazie per l' attenzione