



# Approccio diagnostico ai difetti della risposta anticorpale

Viviana Moschese<sup>1</sup>  
Tiziana Lorenzini<sup>2</sup>  
Loredana Chini<sup>1</sup>  
Simona Graziani<sup>1</sup>

e a cura della Commissione  
di Immunologia della SIAIP:

Baldassarre Martire<sup>3</sup>  
Clementina Canessa<sup>4</sup>  
Fabio Cardinale<sup>5</sup>  
Davide Montin<sup>6</sup>  
Viviana Moschese<sup>1</sup>  
Melengu Taulant<sup>7</sup>  
Alberto Tommasini<sup>8</sup>  
Raffaele Badolato<sup>2</sup> (coordinatore)

<sup>1</sup> Immunologia e Allergologia Pediatrica, Policlinico Tor Vergata, Università di Roma Tor Vergata, Roma; <sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, Università di Brescia, Brescia; <sup>3</sup> U.O. di Oncoematologia e Immunologia Pediatrica, Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico-Giovanni XXIII e Scuola di Specializzazione in Pediatria Università di Bari, Bari; <sup>4</sup> Ospedale Pediatrico Universitario Meyer, Firenze; <sup>5</sup> U.O. di Pediatria, Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico-Giovanni XXIII, Bari; <sup>6</sup> Ospedale Regina Margherita, Torino; <sup>7</sup> U.O. Immunologia Pediatrica, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma; <sup>8</sup> Clinica Pediatrica, IRCCS Burlo Garofalo, Trieste

**Parole chiave: difetti anticorpali, linfociti B, immunodeficienze primitive**

## Corrispondenza

Viviana Moschese  
Immunologia ed Allergologia Pediatrica  
Policlinico Tor Vergata  
Università di Roma Tor Vergata  
E-mail: moschese@med.uniroma2.it

## Abstract

L'ipogammaglobulinemia e l'aumentata suscettibilità ad infezioni da patogeni capsulati extracellulari rappresentano le più comuni manifestazioni di un difetto della risposta anticorpale. L'iniziale iter diagnostico, sia nel difetto anticorpale primitivo sia secondario, si avvale dell'anamnesi e di semplici indagini di laboratorio quali l'emocromo ed il dosaggio delle immunoglobuline sieriche. L'identificazione dello specifico quadro clinico di presentazione dei difetti B linfocitari e delle rispettive cause molecolari è cruciale al fine di giungere ad una diagnosi precoce e di intraprendere un percorso terapeutico appropriato con conseguenti riduzione della morbilità e mortalità e miglioramento della qualità di vita di questi pazienti.

## Introduzione

Una presentazione clinica caratterizzata da infezioni da patogeni extracellulari, in associazione ad un quadro laboratoristico di ipogammaglobulinemia, rappresenta la più frequente manifestazione dei difetti anticorpali. Questi ultimi possono essere distinti in difetti anticorpali primitivi (DAP) e secondari (DAS). I DAP, il cui primo esempio fu identificato per la prima volta nel 1950 da Odgeon Bruton, rappresentano circa il 65% di tutte le forme di immunodeficienze primitive (IDP) <sup>1,2</sup> e, secondo l'ultima classificazione dell'*International Union of Immunological Societies Expert Committee* (IUIS) del 2013 <sup>3</sup>, sono stati distinti, sulla base delle principali caratteristiche immunologiche, nei seguenti gruppi: deficit di tutti gli isotipi di immunoglobuline associato ad un ridotto numero/assenza di linfociti B circolanti, deficit di due isotipi di immunoglobuline associati a normali/ridotti valori di linfociti B circolanti, difetto di IgG e IgA sieriche con valori di IgM normali/elevati e normali valori di cellule B, difetti di isotipi o della catena leggera associati a normali valori di cellule B circolanti, difetti anticorpali specifici con normali valori di Ig e linfociti B ed infine l'ipogammaglobulinemia transitoria dell'infanzia <sup>3</sup> (Tab. I).

I DAS possono essere determinati da patologie, quali neoplasie, patologie proteino-disperdenti, infezioni o anomalie cromosomiche, o da farmaci che causano immunodepressione (Tab. II). Tra i farmaci implicati nella possibile comparsa di ipogammaglobulinemia sono compresi gli anticonvulsivanti, i chemioterapici e gli immunosoppressori. In particolare, come recentemente riportato da Duraisingham. et al., il cortisone ed il rituximab sono più frequentemente in causa <sup>4</sup>. Clinicamente non esistono differenze rilevanti tra la presentazione clinica di un difetto primario o secondario, in quanto in entrambi i casi la manifestazione clinica predominante è rappresentata da un'aumentata incidenza di infezioni. Queste interessano, in più del 50% dei casi, le alte e basse vie respiratorie e, secondariamente, l'apparato gastrointestinale. I germi principalmente coinvol-

**Tabella I. Difetti anticorpali primitivi.**

Patologia	Gene	Valori di Ig	Linfociti B
<b>a) Deficit di tutti gli isotipi di Ig associato ad un ridotto/assenza numero di linfociti B</b>			
1) Agammaglobulinemia X-linked	BTK	Ridotti valori di IgG, IgA, IgM	< 2%
2) Agammaglobulinemia autosomica recessiva	a) $\mu$ Heavy chain b) $\lambda 5$ c) Ig $\alpha$ (CD79a) d) Ig $\beta$ (CD79b) e) BLNK	Ridotti valori di IgG, IgA, IgM	Ridotti/assenti
3) Deficit di PI3K chinasi	PI3KR1	Ridotti valori di IgG, IgA, IgM	Ridotti/assenti
4) Deficit del fattore E47	TCF3	Ridotti valori di IgG, IgA, IgM	Ridotti/assenti
<b>b) Deficit di almeno due isotipi di Ig associato a valori normali/ridotti di linfociti B</b>			
1) Immunodeficienza comune variabile	a) ICOS b) TAC1 (TNFRSF13B) c) CD19 d) CD81 e) CD20 f) CD21 g) LRBA h) BAFF-R (TNFRSF13C) i) TWEAK j) NFKB2	Ridotti valori di IgG associati a ridotti valori di IgA e/o IgM	Normali/ridotti
2) WHIM	CXCR4	Ridotti valori di IgG, IgA, IgM	Ridotti
<b>c) Deficit di IgG e IgA con valori normali/aumentati di IgM e normali valori di linfociti B</b>			
1) Iper-IgM	a) CD40L b) CD40 c) AID (AICDA) d) UNG	Ridotti valori di IgG e IgA, normali/aumentati valori di IgM	Normali
<b>d) Deficit di isotipi o delle catene leggere associati a normali valori di linfociti B</b>			
1) Mutazione o delezione della catena pesante delle Ig	Mutazioni o delezioni cromosomiche del 14q32	Ridotti/assenti valori di una o più sottoclassi IgG o IgA o IgE	Normali
2) Deficit della catena $\kappa$	Mutazioni del gene della catena K	Ig con catena leggera $\lambda$	Normali
3) Deficit isolato delle sottoclassi IgG	Non noto	Ridotti valori di una o più sottoclassi IgG	Normali
4) Deficit di IgA e delle sottoclassi IgG	Non noto	Ridotti valori di IgA e di una o più sottoclassi di IgG	Normali
5) PRKC $\delta$	Mutazioni di PRKCD	Ridotti valori di IgG, aumentati valori di IgA e IgM	Normali
6) PI3K- $\delta$	Mutazioni in PIK3CD, PI3K- $\delta$	Ridotti valori di IgG2	Normali
7) Difetto selettivo di IgA	Non noto	Ridotti/assenti valori di IgA	Normali
<b>e) Difetto anticorpale specifico</b>	Non noto	Normali	Normali
<b>f) Ipogammaglobulinemia Transitoria dell'infanzia</b>	Non noto	Ridotti valori di IgG e IgA	Normali

**Tabella II.** Cause di difetti anticorpali secondari.

<b>Farmaci</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticonvulsivanti</li> <li>• Corticosteroidi</li> <li>• Rituximab</li> <li>• Azatioprina</li> <li>• Imatinib</li> <li>• Ciclofosamide</li> <li>• Sulfasalazina</li> </ul>
<b>Neoplasie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gammopatia monoclonale</li> <li>• Leucemia linfocitica cronica</li> <li>• Mieloma multiplo</li> </ul>
<b>Patologie Autoimmuni</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artrite reumatoide</li> <li>• LES</li> <li>• Granulomatosi di Wegener</li> </ul>
<b>Patologie proteino-disperdenti</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enteropatia</li> <li>• Ustioni</li> <li>• Sindrome nefrosica</li> <li>• Linfangectasia</li> </ul>
<b>Infezioni</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EBV</li> <li>• CMV</li> <li>• Rosolia</li> <li>• HIV</li> <li>• Toxoplasmosi</li> </ul>
<b>Anomalie cromosomiche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trisomia 8</li> <li>• Sindrome di Down</li> <li>• Deficit della transcobalammina II</li> <li>• Sindrome del cromosoma 18</li> </ul>

ti sono lo *Streptococcus pneumoniae*, l'*Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp*, *Mycoplasma spp* ed *Ureaplasma spp*<sup>5</sup>. La principale complicanza delle infezioni dell'apparato respiratorio è la possibile comparsa di una broncopneumopatia cronica ostruttiva. Duraisingham et al. hanno riportato

che l'incidenza di tale complicanza è simile tra i pazienti con difetto anticorpale primitivo e secondario e generalmente viene influenzata dal ritardo di diagnosi<sup>4</sup>. In caso di manifestazioni infettive gastrointestinali i patogeni più frequentemente isolati sono la *Giardia*, il *Campylobacter jejuni*, la *Salmonella spp* e l'*Helicobacter pylori*.

Un meccanismo di immunodisregolazione sembra favorire l'insorgenza di manifestazioni autoimmuni, in particolare l'artrite idiopatica giovanile, l'anemia perniciosa, la vitiligine, la tiroidite autoimmune, il lupus eritematoso sistemico, le patologie tiroidee e le citopenie autoimmuni, quali in particolare la piastrinopenia autoimmune e l'anemia emolitica autoimmune<sup>6</sup>. Le manifestazioni autoimmuni hanno un'uguale incidenza tra le forme primitive e secondarie<sup>4</sup>. Nel 20-30% dei pazienti con immunodeficienza comune variabile possono rappresentare il principale sintomo di esordio<sup>6</sup>. Una storia clinica caratterizzata da episodi infettivi ricorrenti e patologia autoimmune deve far sospettare un difetto anticorpale e, quindi, indurre il clinico a procedere con ulteriori accertamenti<sup>7</sup>.

Un'altra possibile manifestazione d'esordio è costituita dalle linfoproliferazione che si può manifestare con splenomegalia, linfadenopatia (addominale, mediastinica o periferica) o iperplasia linfoide intestinale. In altri casi si assiste allo sviluppo di linfomi B-cellulari o MALT-associati che interessano prevalentemente i pazienti con Immunodeficienza Comune Variabile, nei quali infatti l'incidenza è compresa tra il 1,8% e l'8,2%<sup>8</sup>.

**Tabella III.** Segni di allarme per PID.

BAMBINI	ADULTI
1. ≥ 4 episodi/anno di otite	1. ≥ 2 episodi/anno di otite
2. ≥ 2 infezioni dei seni paranasali in un anno	2. ≥ 2 infezioni dei seni paranasali in un anno, in assenza di allergia
3. Terapia antibiotica con scarsa risoluzione clinica per ≥ 2 mesi	3. 1 episodio/anno di polmonite per più di un anno
4. ≥ 2 episodi di polmonite in un anno	4. Diarrea cronica con calo ponderale
5. Scarso accrescimento staturale-ponderale	5. Infezioni virali ricorrenti (condilomi, herpes, verruche)
6. Ascessi ricorrenti della cute o di altri organi	6. Necessità di terapia antibiotica e.v. per la risoluzione degli episodi infettivi
7. Candidiasi del cavo orale o infezioni cutanee funginee persistenti	7. Ascessi ricorrenti della cute o di altri organi
8. Necessità di terapia antibiotica e.v. per la risoluzione degli episodi infettivi	8. Candidiasi orale o infezioni fungine persistenti
9. ≥ 2 infezioni gravi o sepsi	9. Infezioni da batteri della TBC normalmente non patogeni
10. Storia familiare positiva per PID	10. Storia familiare positiva per PID

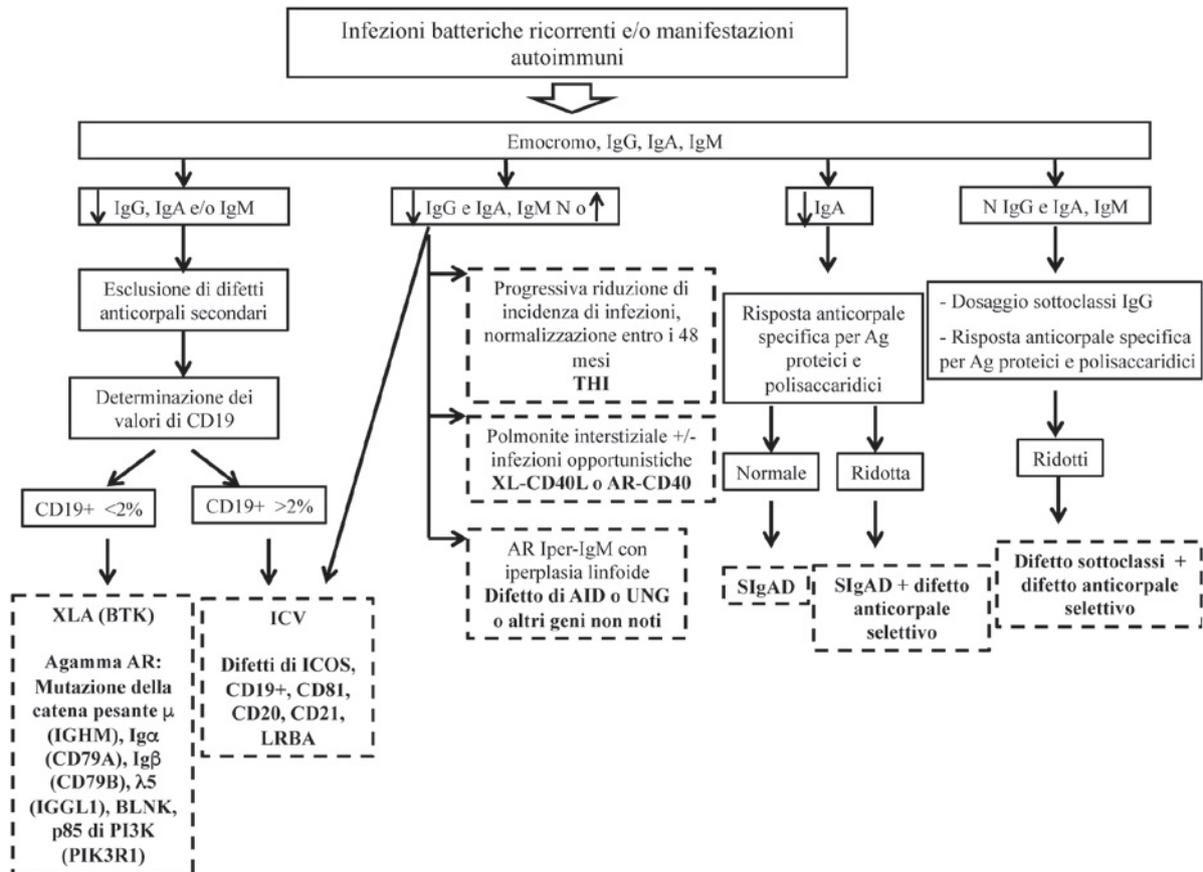


Figura 1. Algoritmo diagnostico.

## Diagnosi

Nell'ambito di una Consensus promossa dalla Jeffrey Modell Foundation, una organizzazione non-profit dedicata alla diagnosi e cura delle immunodeficienze primitive, sono stati elaborati i 10 segnali d'allarme per la diagnosi precoce delle immunodeficienze primitive nel bambino e nell'adulto (Tab. III). La storia familiare positiva per IDP è stata dimostrata come il più importante segnale di allarme. L'anamnesi patologica del paziente può talvolta aiutare a discriminare i DAS dai DAP, con particolare riferimento alle patologie ematologiche, ed al tempo di assunzione di specifici farmaci in relazione alla comparsa dei sintomi.

Indipendentemente dalla causa primitiva o secondaria del difetto anticorpale, l'iter diagnostico iniziale prevede l'esecuzione dell'emocromo e del dosaggio delle immunoglobuline (Fig. 1).

## Analisi dell'emocromo per identificare i difetti dei linfociti B associati a neutropenia e linfopenia

L'emocromo permette di identificare quelle alterazioni ematologiche, come la neutropenia o la linfopenia, che consentono di orientare la diagnosi. Nella sindrome WHIM (Warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis) l'ipogammaglobulinemia si associa ad una linfopenia, con riduzione prevalente dei linfociti B di memoria *switched*, e ad una neutropenia periferica a dispetto di un midollo osseo ipercellulare, in cui la linea dei granulociti neutrofili è ben rappresentata; tale condizione è definita mielocattessi. La conta dei neutrofili nel sangue periferico può transitoriamente aumentare in seguito ad un'infezione. Tuttavia, il mancato riscontro di ipogammaglobulinemia non permette di escludere la sindrome WHIM. I pazienti affetti presentano infezioni batteriche ricorren-

ti e sono suscettibili ad infezioni da *Papilloma virus*. Tale predisposizione è attribuibile ad un'alterazione dell'omeostasi delle cellule dendritiche plasmacitoidi<sup>9</sup>. Il difetto molecolare, a trasmissione autosomica dominante, risiede nel gene CXCR4 che determina un'iperfunzione del recettore stesso in risposta alla stimolazione da parte del ligando CXCL12<sup>10</sup>. Alcuni pazienti possono presentare anche malformazioni cardiache, quali la tetralogia di Fallot, ciò può essere spiegato dal fatto che CXCR4 forma eterodimeri con CXCR7 per regolare la risposta cellulare CXCL12 e l'angiogenesi. Una neutropenia può essere presente in altri difetti anticorpali, quali l'Agammaglobulinemia X-Linked o nei difetti di class switch recombination quali la Sindrome da Iper-IgM, in particolare nelle forme da difetto del CD40 e del CD40L<sup>5,11</sup>. In queste forme la neutropenia può essere talmente grave, fin dall'esordio, da richiedere il trattamento con il G-CSF<sup>5</sup>.

#### Dosaggio delle Immunoglobuline nell'inquadramento dei difetti anticorpali

Nel caso del dosaggio delle immunoglobuline è importante interpretare i risultati non solo sulla base dei valori appropriati per l'età (Tab. IV) e l'etnia, ma anche sulla base della metodica impiegata. Generalmente il metodo principalmente utilizzato è rappresentato dalla nefelometria che ha una buona sensibilità e specificità. Le IgG rappresentano circa il 75% delle immunoglobuline totali e sono l'unico isotipo di immunoglobuline

che attraversa la placenta, rappresentando quindi un importante strumento di difesa nei primi mesi di vita quando i linfociti B del neonato producono bassi livelli di Ig sieriche per poi incrementare gradualmente nei mesi successivi<sup>12</sup>. La definizione di ipogammaglobulinemia si basa sulla rilevazione di valori di immunoglobuline al di sotto dei livelli riscontrati nel 2,5% della popolazione sana. I valori sierici di IgG non permettono di discriminare le forme di DAP dal DAS, tuttavia i valori di IgA e di IgM tendono ad essere significativamente più elevati nei pazienti con DAS<sup>4</sup>.

Un parametro immunologico molto utile nella valutazione del paziente con difetto anticorpale è rappresentato dalla risposta anticorpale specifica agli antigeni vaccinali per ottenere informazioni funzionali e per aiutare a decidere sulla necessità di una terapia sostitutiva<sup>13</sup>. Questa analisi potrebbe non essere appropriata in quei pazienti con valori di IgG marcatamente ridotti (< 1,5 g/L) e/o linfociti B < 2%. Sono generalmente studiate le risposte anticorpali specifiche a due tipi di antigeni vaccinali: quello proteico, ad esempio il tossoide tetanico, e quello polisaccaridico, come quello dello *Streptococcus pneumoniae* o dell'*Haemophilus influenzae*. Nel caso del Tetano e dell'*Haemophilus Influenzae* i titoli anticorpali specifici vengono considerati protettivi quando pari o superiori a 0,1 IU/ml e 0,15 mg/ml, rispettivamente<sup>14</sup>. La risposta anticorpale agli antigeni polisaccaridici è ridotta nei pazienti di età inferiore ai 2 anni mentre raggiunge adeguata

Tabella IV. 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)

Da A.G. Ugazio "Il bambino immunodepresso: perché lo è e come va difeso".

maturazione sopra i 2 anni di età <sup>11</sup>. Generalmente viene considerata adeguata quando si osserva un incremento di circa 4 volte tra il titolo anticorpale pre e post-vaccinale, quest'ultimo dosato a distanza di 4-6 settimane dalla vaccinazione.

#### Deficit di tutti gli isotipi di immunoglobuline con ridotto numero/assenza dei linfociti B

Gli esami immunologici, che dimostrano bassi o assenti livelli di immunoglobuline sieriche, in associazione ad un difetto pressoché completo di linfociti B periferici, con le altre linee cellulari generalmente ben rappresentate, consentono di confermare la diagnosi di Agammaglobulinemia (Fig. 1).

In circa l'85% dei casi la causa dell'Agammaglobulinemia risiede in una mutazione del gene BTK, localizzato a livello del cromosoma X, per cui i maschi che ne sono portatori risultano affetti. BTK codifica per una tirosinchinasi citoplasmatica coinvolta nella trasduzione del segnale a partire dalla stimolazione del recettore dei linfociti B (pre-BCR/BCR) e nella conseguente differenziazione dei linfociti B. BTK è espresso anche a livello di altre linee cellulari, quali i monociti, i neutrofili, i macrofagi, le cellule dendritiche e le cellule NK, perciò diversi studi recentemente si sono concentrati sul suo ruolo nell'ambito dell'immunità innata <sup>15</sup>.

Circa il 5-7% dei casi di Agammaglobulinemia è dovuto ad un difetto di uno dei componenti del pre-BCR: la catena pesante  $\mu$  (IGHM),  $\lambda 5$  (IGLL1),  $Ig\alpha$  (CD79A) e  $Ig\beta$  (CD79B); si tratta di forme autosomiche recessive. Ne consegue un blocco della differenziazione dei linfociti B nella fase di transizione dallo stadio pro-B allo stadio pre-B. Un'altra piccola percentuale di casi è attribuibile ad una mutazione del gene BLNK che codifica per una proteina che funziona da ponte nella trasduzione del segnale tra il BCR attivato e proteine a valle. Anche quest'ultimo gene è associato ad un numero normale di cellule pro-B, in assenza di cellule pre-B e B mature: il blocco coincide con l'espressione del pre-BCR.

Nel 2003 è stato descritto un caso di Agammaglobulinemia associata a dismorfie facciali minori: l'analisi del cariotipo ha mostrato una traslocazione cromosomica bilanciata t(9;20): nel sito della traslocazione era presente il gene LRRC8A che risultava deletato. L'espressione di una forma deletata della proteina *Lrrc8a* nel modello murino ha determinato l'inibizione dello sviluppo dei linfociti B <sup>16</sup>. Infine nel 2012 è stata identificata per la prima volta una mutazione "stop codon" in omozi-

gosi a carico del gene PIK3R1 quale responsabile di un quadro di Agammaglobulinemia e assenza di cellule B. Tale mutazione provoca l'assenza della subunità p85 $\alpha$  del complesso PI3K, con una normale espressione delle subunità p50 $\alpha$  e p55 $\alpha$ . Ne consegue un blocco maturativo più precoce rispetto ai pazienti con un difetto della via di segnale del BCR, essendo marcatamente ridotti o assenti anche i linfociti allo stadio pro-B <sup>17</sup>. Recentemente la mutazione in eterozigosi del gene PIK3R1 è stata identificata in pazienti con infezioni respiratorie batteriche ad esordio precoce con fenomeni linfoproliferativi e tendenza allo sviluppo di bronchiectasie. Oltre il difetto dei linfociti B che si manifesta con ipogammaglobulinemia <sup>18</sup>, si rileva un moderato difetto dei linfociti T a recente emigrazione dal timo e un aumento di linfociti CD8 senescenti con inversione del rapporto CD4/CD8 <sup>19</sup>.

Infine, il gene TCF3, che codifica per un fattore di trascrizione, è stato associato ad ipogammaglobulinemia, con linfociti B assenti o ridotti.

#### Deficit di due isotipi di immunoglobuline con normale/ridotto numero di linfociti B

Qualora gli esami immunologici dimostrino una marcata riduzione di almeno due classi di immunoglobuline (IgG e IgA) e una ridotta risposta anticorpale alle vaccinazioni e l'età d'esordio dei sintomi sia variabile la diagnosi più probabile è quella di Immunodeficienza Comune Variabile (ICV). I pazienti soffrono di infezioni delle vie respiratorie e del tratto gastrointestinale e sono maggiormente a rischio di sviluppare malattie infiammatorie intestinali, neoplasie e fenomeni autoimmunitari. Si tratta della forma di immunodeficienza primitiva sintomatica più frequente nella popolazione e solo in circa il 10% dei casi diagnosticati c'è la possibilità di giungere alla definizione di un'eziologia genetica.

In circa l'8-10% dei pazienti con ICV risulta mutato il gene TNFRSF13B che codifica per TACI, un recettore espresso sui linfociti B che ha un ruolo cruciale nella maturazione e nella differenziazione degli stessi, mediante l'interazione con i ligandi BAFF, BCMA e APRIL <sup>20</sup>. Meno frequentemente risulta mutato il gene TNFRSF13C, che codifica per il recettore BAFFR, appartenente anch'esso alla famiglia dei recettori TNF-simili, coinvolto nell'attivazione dei linfociti B. Anche la mutazione del gene TWEAK, che codifica per una proteina della famiglia del TNF, è associata ad ipogammaglobulinemia, a una ridotta risposta anticor-

pale e ad infezioni ricorrenti. Recentemente sono stati descritti casi di Immunodeficienza Comune Variabile in pazienti con difetti a livello delle molecole CD19, CR2 e CD81, che insieme formano il complesso recettoriale dei linfociti B. Anche il gene PRKCD, che codifica per una proteina coinvolta nella via di segnale del BCR, è risultato mutato in una forma di difetto dei linfociti B associata a linfoproliferazione e autoimmunità. CD20 è un antigene di membrana dei linfociti B che, se difettivo, determina una compromissione della risposta anticorpale T-indipendente. Un altro gene descritto in associazione ad Immunodeficienza Comune Variabile è ICOS che appartiene alla famiglia delle molecole costimolatorie CD28 espresse esclusivamente sui linfociti T attivati. Infine il difetto di IL-21 è stato descritto in associazione ad un caso di malattia infiammatoria cronica intestinale associata ad una compromissione della differenziazione dei linfociti B <sup>21</sup>.

Nel 2012 è stata descritta una forma di ICV associata a fenomeni di autoimmunità e ad enterocolite dovuta a mutazione del gene LRBA. I linfociti B dei pazienti affetti presentavano una ridotta capacità differenziativa, un difetto nell'autofagia e un'aumentata suscettibilità all'apoptosi <sup>22</sup>. Un'altra forma di ICV che si manifesta con fenomeni autoimmunitari, come l'alopecia totale, e con insufficienza surrenalica, definita nel 2013, è attribuibile ad una mutazione in eterozigosi del gene NFKB2 <sup>23</sup>. Infine una sindrome autoinfiammatoria, associata a difetto anticorpale e disregolazione immunitaria è stata descritta nel 2012 come causata da mutazione del gene PLCG2. I pazienti descritti presentavano una malattia infiammatoria cronica intestinale, associata a lesioni cutanee, bronchiolite, artralgia, uveite ed enterocolite, insieme ad una ridotta risposta anticorpale <sup>24</sup>.

#### Difetto di IgG e IgA sieriche con valori di IgM normali o elevati e normali valori di cellule B

Un quadro clinico di infezioni ricorrenti, respiratorie, gastrointestinali e polmoniti da *Pneumocystis jirovecii*, insieme a livelli sierici molto ridotti di IgG e IgA, in presenza di valori normali o elevati di IgM, deve indurre il sospetto di un difetto dei meccanismi di scambio di classe. Tale difetto può essere estrinseco rispetto ai linfociti B e in tal caso dipende dalla mutazione, a trasmissione *X-linked* del gene CD40LG, espresso dai linfociti T CD4+ attivati. Il difetto può essere invece intrinseco ai linfociti B, a trasmissione autosomica re-

cessiva, quando è mutato il gene CD40. L'interazione tra CD40 e CD40LG attiva la via di trasduzione intracellulare del segnale NF- $\kappa$ B dipendente nei linfociti B che risulta nell'attivazione dei meccanismi di scambio di classe e di ipermutazione somatica.

Qualora invece il difetto molecolare risieda nei meccanismi di ipermutazione somatica, l'esordio clinico è generalmente più tardivo con infezioni respiratorie, gastrointestinali, batteriche ma non opportunistiche, linfadenopatia e, meno frequentemente, manifestazioni autoimmuni. Tra i geni da indagare vi sono AICDA e UNG che codificano per due enzimi coinvolti nell'ipermutazione somatica, attraverso la quale mutazioni sono introdotte nella regione V delle immunoglobuline. Si tratta quindi di un processo successivo all'interazione CD40-CD40LG necessaria, oltre che per la risposta anticorpale, anche per la funzionalità dei macrofagi. Si spiega così il motivo per il quale le infezioni opportunistiche sono frequenti nei difetti di CD40 e CD40LG, ma non nei difetti di AICDA e UNG. Recentemente è stata descritta la mutazione in eterozigosi di PMS2 in tre pazienti con un difetto dei meccanismi di riparo del DNA e di ipermutazione somatica e suscettibilità all'adenocarcinoma colon-rettile. Gli esami immunologici risultavano parzialmente sovrapponibili alla sindrome da Iper IgM, con bassi livelli sierici di IgG e IgA. Uno dei tre pazienti aveva avuto una storia di macchie caffè-latte e infezioni batteriche gravi prima di sviluppare un adenocarcinoma del colon <sup>25</sup>.

#### Difetti anticorpali lievi/moderati

Le ultime tre categorie della classificazione IUIS 2013, ovvero i difetti di isotipi o della catena leggera associati a normali valori di cellule B circolanti, i difetti anticorpali specifici con normali valori di Ig e linfociti B e l'ipogammaglobulinemia transitoria dell'infanzia, sono più difficilmente inquadrabili dal punto di vista diagnostico, genetico e molecolare.

Il ruolo delle sottoclassi di IgG è stato molto ridimensionato in quanto la diagnosi clinica di difetto delle sottoclassi IgG è tuttora controversa. Pertanto il loro dosaggio non è universalmente raccomandato nello screening per un difetto anticorpale, tanto più che è costoso e generalmente non è necessario quando viene effettuato il dosaggio sierico delle Ig e degli anticorpi specifici per gli antigeni vaccinali. Il loro dosaggio può essere indicato nei pazienti con una storia clinica di

infezioni ricorrenti delle vie respiratorie, ma i cui valori di Ig risultano nella norma, oppure nei pazienti con difetto anticorpale specifico che si può associare ad un difetto delle sottoclassi IgG2<sup>8</sup>.

Di recente è stata introdotta la possibilità di analizzare la risposta isotipo-specifica diretta verso i polisaccaridi dello *Streptococcus pneumoniae* (anti-PS23). La disponibilità di un test ELISA che consenta di studiare anche la risposta specifica IgA- ed IgM-mediata offre interessanti spunti applicativi. Lo studio della cinetica e della quantificazione delle IgA e delle IgM anti-pneumococco in una coorte di pazienti affetti da Immunodeficienza Comune Variabile vaccinati con il vaccino polisaccaridico 23-valente si è rivelato un utile strumento per valutare la funzionalità immunologica dei pazienti in terapia sostitutiva con le IgG. Inoltre, nei pazienti con ipogammaglobulinemia transitoria dell'infanzia sono stati rilevati ridotti livelli di anticorpi IgG, IgA ed IgM specifici anti-pneumococco<sup>26 27</sup>.

Altro parametro utile, in età superiore ad 1-2 anni di vita, è la titolazione dei valori delle isoemoagglutinine. Esse sono anticorpi di tipo IgM rivolte verso gli antigeni polisaccaridici naturali del sistema ABO presenti sui globuli rossi. La titolazione delle isoemoagglutinine è

rilevante in quanto può essere considerata come l'espressione della funzionalità IgM-mediata<sup>13</sup>.

## Ruolo diagnostico dell'analisi dell'immunofenotipo

Tra le indagini di secondo livello che permettono di orientare verso lo specifico difetto anticorpale, un ruolo fondamentale è svolto dall'analisi fluorocitometrica che permette di effettuare una valutazione qualitativa e quantitativa dei diversi subsets linfocitari e quindi dello stadio maturativo dei linfociti B. Con l'analisi dell'immunofenotipo l'espressione dei diversi sottotipi di linfociti CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ e dei CD16+, viene rapportata all'età del paziente. In particolare, le sottopopolazioni di cellule B vengono distinte in base all'espressione di specifiche molecole di superficie quali il CD19, il CD20 ed il CD22. Generalmente il marker di superficie principalmente utilizzato è il CD19 in quanto espresso su tutti i linfociti B circolanti, ed una volta isolate le cellule CD19+ l'espressione di altre molecole di superficie, quali l'IgM, l'IgD, il CD27 ed il CD38,

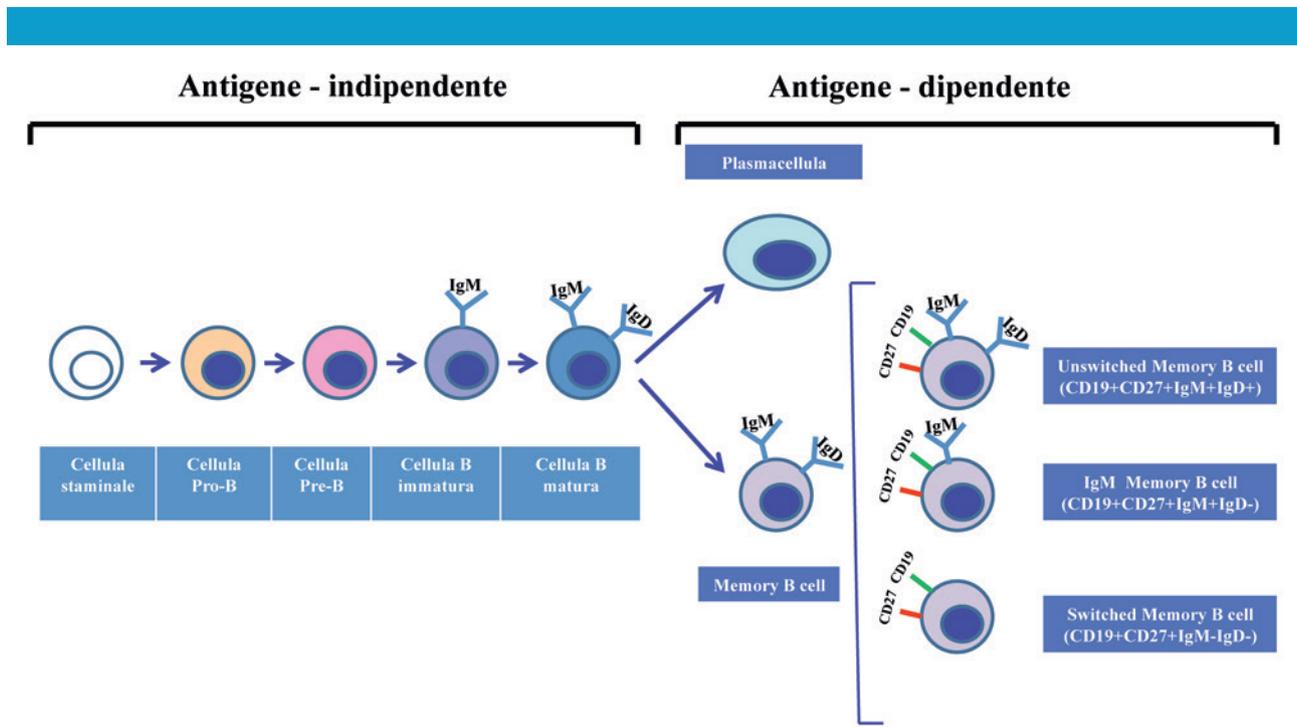


Figura 2. Sviluppo dei linfociti B.

permette di discriminare i diversi sottotipi di linfociti B (Fig. 2). Le cellule B mature naive esprimono solo le IgM e IgD in superficie, mentre dopo l'incontro con l'antigene e la conseguente attivazione esprimono il CD27 trasformandosi quindi in "memory B cells", a loro volta distinte in "unswitched" e "switched" sulla base dell'espressione o meno delle IgD di superficie. Le differenze di espressione dei sottotipi di cellule B possono aiutare a chiarire il meccanismo alla base del difetto anticorpale. Ridotti valori di linfociti B totali possono essere il risultato di un difetto della differenziazione precoce e bassi valori di *switched memory B cells* possono riflettere un difetto del centro germinativo. Ad esempio, è possibile la diagnosi di XLA o di ARA quando i linfociti B circolanti sono < 2% così come i ridotti valori di *switched memory B cells* contribuiscono ad identificare i pazienti con ICV<sup>28 29</sup>. In altre forme di difetti anticorpali primitivi, quali il Difetto Selettivo di IgA, l'immunofenotipo è generalmente normale, mentre nei pazienti con ipogammaglobulinemia non classificata in età superiore ai 24 mesi sono state riportate alterazioni delle sottopopolazioni di memory B cells rispetto a quei bambini in cui viene confermata la diagnosi di Ipogammaglobulinemia Transitoria dell'Infanzia (THI)<sup>30</sup>. Viceversa, nei pazienti con DAS, generalmente, i valori di *switched memory B cells* sono significativamente più elevati (6,9% vs 2,5%) rispetto ai pazienti con difetto anticorpale primitivo. Sono rari i casi di pazienti trattati con rituximab in cui tali valori risultano alterati<sup>4</sup>. I meccanismi molecolari dei DAS sono ancora oscuri e si ritiene che l'eterogeneità dipenda proprio dalla causa del difetto. Il normale numero di *switched memory B cells* dei DAS potrebbe suggerire un difetto post-germinativo, quale un difetto della differenziazione delle plasmacellule o della loro sopravvivenza e/o del riempimento di questo pool di cellule. L'immunofenotipo può risultare utile anche per identificare un difetto dei linfociti T che, in combinazione con un difetto dei linfociti B, concorre a determinare un quadro di immunodeficienza combinata.

#### Difetti dei linfociti B in combinazione a difetti dei linfociti T

Recentemente è stata descritta una nuova immunodeficienza caratterizzata da infezioni delle alte vie respiratorie ad esordio precoce, linfoproliferazione dovuta ad un'alterata risposta delle cellule T di memoria, infezioni croniche da virus *Epstein Barr* e *Cytome-*

*galovirus* e in alcuni casi da citopenia autoimmune. L'ampio spettro di infezioni alle quali i soggetti sono suscettibili è dovuto ad un difetto sia dei linfociti B, con ipogammaglobulinemia e ridotta risposta anticorpale, che dei linfociti T, con linfopenia e ridotta risposta ai mitogeni *in vitro*. Il gene mutato in eterozigosi con effetto *gain-of-function* è PIK3CD che codifica per la subunità p110δ del complesso PI3K e ne determina un incremento dell'attività<sup>31</sup>. Un altro gruppo di pazienti con manifestazioni cliniche simile presentava invece mutazioni in eterozigosi di PIK3R1.

Nel 2013 è stata descritta una forma di Immunodeficienza Grave Combinata ad esordio precoce in quattro pazienti con polmonite da *Pneumocystis jirovecii*, sepsi, candidiasi, infezioni croniche da *Cytomegalovirus*, infezioni respiratorie e gastroenteriti virali persistenti e diarrea protratta con difetto di crescita. I pazienti presentavano ipogammaglobulinemia o agammaglobulinemia, con un numero normale di linfociti T e linfociti B ridotti solo in un paziente. Il gene causale identificato, a trasmissione autosomica recessiva, è IKBKB che codifica per la proteina IκBβ, il cui difetto determina un'alterazione della via di segnale che porta all'attivazione di NF-κB<sup>32</sup>.

Un difetto della via di attivazione di NF-κB si riscontra anche in caso di mutazione in omozigosi di CARD11. La presentazione clinica dei pochi casi descritti è quella di un'immunodeficienza grave combinata. Gli esami immunologici hanno mostrato un'ipogammaglobulinemia, con un numero normale di linfociti B e T, tuttavia vi erano un blocco della differenziazione dei linfociti B, una diminuzione delle cellule T regolatorie e una disfunzione dei linfociti T<sup>33</sup>.

## Conclusioni

In conclusione, i difetti dei linfociti B si manifestano generalmente dopo il primo anno di vita; prevalentemente con infezioni da parte di patogeni extracellulari. Un semplice dosaggio delle immunoglobuline sieriche può indirizzare la diagnosi. Qualora si dimostri una agammaglobulinemia e il paziente sia maschio andrà indagato il gene BTK, altrimenti andranno valutate le forme a trasmissione autosomica recessiva (Fig. 1). Qualora almeno due classi di immunoglobuline risultino ridotte, ma non assenti, e l'età di esor-

dio sia variabile, potendo riguardare anche soggetti adulti in precedenza apparentemente sani, bisognerà indagare l'ampia e pleomorfa entità dell'immunodeficienza Comune Variabile. In questo caso sarà difficile giungere ad una diagnosi molecolare: andrà esclusa una possibile mutazione del gene TNFRSF13B che codifica per TACI, ma bisognerà anche prestare attenzione alle possibili manifestazioni autoimmuni e di disregolazione immunitaria, che potrebbero indirizzare la diagnosi verso le nuove forme descritte. Qualora invece il difetto anticorpale interessi le IgG e le IgA, ma non le IgM, si porrà la necessità di studiare eventuali difetti dei geni implicati nei meccanismi di scambio di classe e di ipermutazione somatica.

Recentemente sono state descritte condizioni caratterizzate da ipogammaglobulinemia non isolata: in questi casi lo studio della funzione degli altri effettori del sistema immunitario e delle manifestazioni cliniche associate può orientare la diagnosi.

Infine vi sono molte forme di difetto anticorpale di entità moderata o lievi, difficilmente inquadrabili dal punto di vista diagnostico, genetico e molecolare. Il corretto utilizzo delle indagini diagnostiche di primo e secondo livello può permettere di giungere ad un adeguato inquadramento del paziente con difetto anticorpale e, conseguentemente, all'adozione di misure terapeutiche appropriate, con particolare riferimento alla terapia sostitutiva con immunoglobuline.

## Take home message

### Come orientarsi nel sospetto di un difetto anticorpale:

- Anamnesi patologica e familiare.
- Emocromo e dosaggio delle immunoglobuline sieriche come indagini di primo livello.
- Valutazione delle sottopopolazioni dei linfociti T e B e della risposta anticorpale specifica come indagini di secondo livello.
- Analisi genetica nel sospetto di un difetto anticorpale primitivo.

## Anamnesi familiare

- Storia di PID in famiglia.
- Familiari con sintomatologia analoga al paziente indice.
- Morti precoci in famiglia.
- Familiari deceduti per infezione.
- Consanguineità.
- Manifestazioni autoimmuni o patologie neoplastiche nei familiari.

## Bibliografia

- 1 Cunnigham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:421-29.
- 2 Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2011;8:2-54.
- 3 Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014;5:162.
- 4 Duraisingham SS, Buckland M, Dempster J, et al. Primary vs. secondary antibody deficiency: clinical features and infection outcomes of immunoglobulin replacement. *PLoS One* 2014;9:e100324.
- 5 Hoernes M, Seger R, Reichenbach J. Modern management of primary B-cell immunodeficiencies. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:758-69.
- 6 Abolhassani H, Amirkashani D, Parvaneh N, et al. Autoimmune phenotype in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;23:323-9.
- 7 Younger EM, Epland K, Zampelli A, et al. Primary immunodeficiency diseases: a primer for PCPs. *Nurse Pract* 2015;40:1-7.
- 8 Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1186-205.

- 9 Tassone L, Moratto D, Vermi W, et al. Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood* 2010;116:4870-3.
- 10 Dotta L, Tassone L, Badolato R. Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med* 2011;11:317-25.
- 11 Driessen G, van der Burg M. Educational paper: primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr* 2011;170:693-702.
- 12 Jyothi S, Lissauer S, Welch S, et al. Immune deficiencies in children: an overview. *Postgrad Med J* 2013;89:698-708.
- 13 Kumar Y, Bhatia A. Common variable immunodeficiency in adults: current diagnostic protocol and laboratory measures. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9:959-77.
- 14 Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1055-65.
- 15 Lougaris V, Baronio M, Vitali M, et al. Bruton tyrosine kinase mediates TLR9-dependent human dendritic cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1644-50.
- 16 Sawada A, Takihara Y, Kim J, et al. A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans. *J Clin Invest* 2003;112:1707-13.
- 17 Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, et al. Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85-alpha subunit of PI3K. *J Exp Med* 2012;209:463-70.
- 18 Deau M-C, Heurtier L, Frange P, et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J Clin Invest* 2014;124:3923-8.
- 19 Lougaris V, Faletra F, Lanzi G, et al. Altered germinal center reaction and abnormal B cell peripheral maturation in PI3KR1-mutated patients presenting with HIGM-like phenotype. *Clin Immunol* 2015;159:33-6.
- 20 Salzer U, Chapel HM, Webster AD, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005;37:820-8.
- 21 Salzer E, Kansu A, Sic H, et al. Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1651-9.
- 22 Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet* 2012;90:986-1001.
- 23 Chen K, Coonrod EM, Kumanovics A, et al. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF-kappa-B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2013;93:812-24.
- 24 Zhou Q, Lee GS, Brady J, et al. A hypermorphic missense mutation in PLCG2, encoding phospholipase C-gamma-2, causes a dominantly inherited autoinflammatory disease with immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2012;91:713-20.
- 25 Peron S, Metin A, Gardes P, et al. Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2008;205:2465-72.
- 26 Cavaliere FM, Milito C, Martini H, et al. Quantification of IgM and IgA anti-pneumococcal capsular polysaccharides by a new ELISA assay: a valuable diagnostic and prognostic tool for common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2013;33:838-46.
- 27 Moschese V, Cavaliere FM, Graziani S, et al. Decreased IgM, IgA, and IgG response to pneumococcal vaccine in children with transient hypogammaglobulinemia of infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:617-9.
- 28 Warnatz K, Denz A, Dräger R, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99:1544-51.
- 29 Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 1998;91:595-602.
- 30 Moschese V, Carsetti R, Graziani S, et al. Memory B-cell subsets as a predictive marker of outcome in hypogammaglobulinemia during infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:474-6.
- 31 Lucas C.L, Kuehn H.S, Zhao F, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110-delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nature Immunol* 2014;15:88-97.
- 32 Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, et al. Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *New Eng J Med* 2013;369:2504-14.
- 33 Stepensky P, Keller B, Buchta M, et al. Deficiency of caspase recruitment domain family, member 11 (CARD11), causes profound combined immunodeficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:477-85.