

## Immunodeficienze

Le immunodeficienze **primitive** sono un gruppo di malattie congenite, dovute a differenti difetti genetici che precludono il corretto funzionamento di uno o più elementi del sistema immunitario. Sono piuttosto rare ed hanno quasi sempre una trasmissione ereditaria di tipo mendeliano, frequentemente legata al cromosoma X. Più frequenti sono invece le immunodeficienze **secondarie**, che possono conseguire a malnutrizione, trattamenti terapeutici, patologie infettive, neoplastiche, metaboliche e patologie d'organo croniche (vedi Tab. 6). La classificazione delle immunodeficienze, primitive e secondarie, si basa sullo stipite cellulare o sistema biologico coinvolto dal difetto che può riguardare l'immunità naturale, oppure l'immunità specifica.

### *Difetti dell'immunità naturale*

Comprendono deficit quantitativi o funzionali dei fagociti e alterazioni del sistema complementare. Si manifestano clinicamente con infezioni ricorrenti, più frequentemente da batteri piogeni oppure da altri microrganismi extracellulari. Nelle quattro tabelle che seguono vengono forniti elementi classificativi e accenni sui singoli quadri clinici.

### *Difetti delle cellule fagocitiche: classificazione*

Quantitativi	<ul style="list-style-type: none"><li>• Neutropenia congenite</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Sindrome di Kostmann</li><li>– Cronica benigna</li><li>– Ciclica</li><li>– Altre</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Neutropenia acquisite</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Farmaci</li><li>– Patologie ematologiche</li><li>– Deficit di vit. B12 e folati</li><li>– Infezioni</li></ul>
Qualitativi	<ul style="list-style-type: none"><li>• Deficit primitivi dei fagociti</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Deficit di mieloperossidasi</li><li>– Malattia granulomatosa cronica</li><li>– Sindrome di Chediak-Higashi</li><li>– Deficit di adesione leucocitaria I</li><li>– Deficit di adesione leucocitaria II</li><li>– Difetto dei granuli specifici</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Associati ad altre patologie</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Leucemie acute, diabete, drepanocitosi, altre patologie</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Iatrogeni</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Corticosteroidi, FANS, colchicina, antibiotici, etanolo, altri farmaci</li></ul>

## Principali difetti congeniti dei fagociti: quadri clinici

Patologia	Difetto genetico o molecolare	Difetto cellulare	Caratteristiche cliniche
<i>Neutropenia severa congenita (Sindrome di Kostmann)</i>	Sconosciuto	Arresto della maturazione dei PMN allo stadio di promielociti	Infezioni batteriche severe fin dalla prima infanzia, quali onfalite, accessi sottocutanei, gengiviti, IVU, polmoniti
<i>Neutropenia cronica benigna</i>	Sconosciuto	↓↓ del numero di PMN nel sangue periferico senza sintomi clinici	Lievi infezioni per lo più localizzate alla cute e alle mucose
<i>Neutropenia ciclica</i>	ELA2, gene che codifica per elastasi dei neutrofili	Oscillazioni cicliche regolari, ogni 21 gg, nel n° di PMN, monociti, linfociti e PLT	Infezioni cicliche (ogni 21 gg) a carico di cute, cavo orale, faringe
<i>Malattia granulomatosa cronica</i>	Diverse subunità del citocromo p-558 (vedi tab. 3)	↓↓↓ produzione di radicali liberi dell'ossigeno	Infezioni da microrganismi catalasi + (Stafilococchi, Candida, bacilli gram -). Accessi polmonari, cutanei ed epatici, linfoadeniti suppurative, osteomieliti.
<i>Deficit di mieloperossidasi</i>	Difetti trascrizionali o post-trascrizionali di mieloperassidasi su cr.17 (q11-21, q22-24, q21.3-23)	↓↓↓ contenuto di mieloperossidasi in monociti e neutrofili	Asintomatica nella maggior parte dei casi. Infezioni da Candida soprattutto in caso di fattori di rischio aggiunti quali diabete
<i>Sindrome di Chediak-Higashi</i>	LYST, gene (1q43) che codifica per una proteina citoplasmatica regolatrice del traffico lisosomiale	Lisosomi giganti nei GB, melanosomi giganti nei melanociti, ↓ capacità battericida dei neutrofili, perdita citotossicità di CTL ed NK	Infezioni ricorrenti specialmente da St. Aureus, parziale albinismo, neuropatia periferica, grave periodontopatia, malattie linfoproliferative
<i>Deficit di adesione leucocitaria tipo I</i>	CD18 - subunità β delle β <sub>2</sub> -integrine su 21q22.3	Difetto di chemiotassi e di adesione da parte dei neutrofili	Ricorrenti infezioni necrotiche, incapacità di produrre pus, neutrofilia, ritardato distacco del cordone ombelicale
<i>Deficit di adesione leucocitaria tipo II</i>	Fucosilazione dei carboidrati, con incapacità di sintetizzare il ligando Lewis <sup>x</sup> per le selectine	Difetto di chemiotassi e di adesione da parte dei neutrofili	Neutrofilia con infezioni ricorrenti
<i>Difetto dell'asse IFN-γ-IL-12</i>	Ligand-binding chain o signaling chain del recettore per IFN-γ, catena β <sub>1</sub> del recettore per IL2, catena β <sub>2</sub> di IL2	Incapacità di formare granulomi, ridotta risposta ad alte dosi di IFN-γ	Maggiore suscettibilità alle infezioni da microrganismi intracellulari, specialmente micobatteri. Osteomielite
<i>Difetto dei granuli specifici</i>	C/EBP $\epsilon$ gene che codifica per un fattore di trascrizione	Assenza di granuli specifici secondari nei neutrofili, alterazione della chemiotassi dei neutrofili e dei meccanismi battericidi	Infezioni cutanee, mucose e polmonari ricorrenti

## Difetti molecolari della Malattia Granulomatosa Cronica

Proteina	Trasmissione	Locus	Frequenza %
<i>gp91-phox</i> (subunità $\beta$ )	X	Xp21.1	56
<i>p22-phox</i>	AR	16q24	5
<i>p47-phox</i>	AR	7q11.23	33
<i>p67-phox</i>	AR	1q25	5

## Difetti del sistema complementare

Deficit	Localizzazione cromosomica	Caratteristiche cliniche
<b>Via classica</b>		
<i>C1q</i>	1p	Sindrome simil-lupica
<i>C1r/C1s</i>	12p /12p	Sindrome simil-lupica
<i>C4</i>	6p	Sindrome simil-lupica
<i>C2</i>	6p	Sindrome simil-lupica
<i>C3</i>	19q13	Infezioni piogeniche ricorrenti, sindrome simil-lupica
<i>C5</i>	9q	Infezioni da Neisseriae
<i>C6</i>	5q	Infezioni da Neisseriae
<i>C7</i>	5q	Infezioni da Neisseriae
<i>C8<math>\gamma</math>, C8<math>\alpha</math></i>	1p, 9q	Infezioni da Neisseriae
<i>C8<math>\beta</math></i>	1p	Infezioni da Neisseriae
<i>C9</i>	5p	Infezioni da Neisseriae
<b>Via alterna</b>		
<i>Properdina</i>	Xp	Infezioni da Neisseriae
<i>Fattore D</i>	?	Infezioni da Neisseriae
<b>Proteine regolatorie</b>		
<i>Inibitore di C1</i>	11q	Angioedema ereditario
<i>DAF</i>	1q	Emoglobinuria parossistica notturna (PNH)

## Diagnosi dei deficit dei fagociti e del complemento

L'esame **emocromocitometrico con formula leucocitaria** evidenzia riduzioni o aumenti del numero assoluto dei granulociti neutrofili e dei monociti nel sangue periferico ed è quindi utile nella diagnosi delle immunodeficienze caratterizzate da difetti *quantitativi* dei fagociti.

La diagnosi delle patologie conseguenti a difetti *qualitativi* si basa sullo studio delle funzioni dei fagociti in vitro, quali la chemiotassi, la fagocitosi, il burst ossidativo e l'espressione di recettori di membrana. Questa valutazione funzionale è talvolta preliminare e complementare alla definizione del

difetto genetico alla base della patologia, quando questo è noto, mediante tecniche di **biologia molecolare**.

Lo studio della **chemiotassi** valuta la migrazione dei polimorfonucleati (PMN) o dei monociti attraverso filtri posti in camere di migrazione composte da due compartimenti, il superiore contenente la sospensione di cellule fagocitiche e l'inferiore contenente il mezzo chemiotattico, separati da una membrana con pori di dimensioni inferiori al diametro cellulare. L'esame permette di studiare sia la risposta chemiotattica dei fagociti del paziente, sia l'attività chemiotattica del siero in esame. Nel primo caso una sospensione di fagociti del paziente è messa a contatto con sostanze chemiotattiche standard, quali N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), oppure un pool di sieri normali attivato con Zymosan (per ottenere chemioattrattanti complemento-derivati, prevalentemente C5a). Nel secondo caso una sospensione di fagociti normali viene posta in camera di filtrazione con il siero del paziente attivato con Zymosan. I risultati dell'esame si esprimono come distanza massima percorsa dalle cellule nello spessore del filtro, oppure come numero di cellule per campo microscopico presenti all'ultimo piano del filtro. Un difetto lieve-moderato di chemiotassi è di riscontro frequente in quanto associato a numerose patologie o secondario a trattamenti farmacologici. Raramente questi difetti hanno valore clinico. Un'attività chemiotattica inferiore al 40% rispetto ad un controllo normale si può accompagnare a manifestazioni cliniche.

La funzione fagocitica può essere valutata con il **test morfologico di fagocitosi di Candida Albicans**. Uguali volumi di sospensione di neutrofili o monociti, siero e sospensione di C. Albicans vengono incubati. Successivamente vengono allestiti vetrini colorati con May-Grunwald-Giemsa. L'osservazione al microscopio ottico valuta la *percentuale di fagocitosi*, o il numero di cellule fagocitanti almeno un lievito e l'*indice fagocitico*, ossia il numero medio di lieviti fagocitati per cellula. La capacità opsonizzante del siero di un paziente è studiata con la stessa metodica utilizzando concentrazioni scalari del siero in esame e fagociti di un controllo sano. La capacità fagocitica può essere compromessa in situazioni quali la LAD I per assenza del recettore di membrana CR3 (CD11b/CD18) implicato in questo test di fagocitosi o, ancora, nei difetti del sistema complementare nei quali sia compromessa la produzione di opsonine termolabili (C3b in particolare).

La **chemiluminescenza** valuta il *burst* ossidativo nei neutrofili e nei monociti e la produzione di radicali liberi ad esso conseguente. Il metabolismo ossidativo si associa alla generazione di energia luminosa, che è notevolmente amplificata dall'utilizzo di substrati come il luminolo e la lucigenina. Il test consiste quindi nella rilevazione con un apposito apparecchio, il luminometro, dell'energia luminosa prodotta dai fagociti spontaneamente e dopo aggiunta di sostanze attivanti quali Zymosan opsonizzato e PMA (forbolo miristato acetato). Il test permette una diagnosi rapida di *malattia granulomatosa cronica* (assenza totale di chemiluminescenza) e consente di sospettare un *deficit di mieloperossidasi* (difetto parziale di chemiluminescenza) che andrà confermato con un dosaggio diretto dell'enzima.

Infine, l'**immunofluorescenza indiretta** (con anticorpi monoclonali specifici) e analisi citofluorimetrica permette di valutare l'espressione di membrana del complesso molecolare CD11/CD18, assente nella LAD I, e dell'antigene CD15, assente nella LAD II.

Il **sistema complementare** può essere studiato con il dosaggio quantitativo o funzionale dei singoli fattori. Nella comune pratica clinica vengono misurati i livelli dei fattori **C3, C4 e C1INH**. La funzione del complemento in toto è studiata con la determinazione del **CH50**, che misura l'attività emolitica totale del sistema complementare, attivato attraverso la via classica. Il **C1INH** viene dosato anche

funzionalmente nei casi in cui a fronte di un quadro clinico suggestivo per edema angioneurotico si riscontra un livello di *CIINH* non significativamente ridotto.

### **Difetti primitivi a carico dei linfociti B, T e immunodeficienze combinate**

Sono patologie congenite che si manifestano entro il primo anno di vita. Alcune (ATM, Di George, Wiskott-Aldrich, S da iper-IgE) si accompagnano a manifestazioni cliniche e alterazioni di laboratorio che esulano dall'interessamento del sistema immunitario e riflettono il ruolo del gene interessato nello sviluppo di altri stituti cellulari. Le immunodeficienze che possono manifestarsi in età adulta e che sono relativamente più frequenti sono il deficit selettivo di IgA, in assoluto la più frequente con un tasso stimato di 1:700, e la ipogammaglobulinemia comune variabile. Tutte queste patologie si manifestano con infezioni recidivanti o cronicizzanti dovute a batteri, virus, miceti e agenti opportunisti. Altre manifestazioni comprendono lo sviluppo di malattie autoimmuni e di neoplasie.

### **Difetti primitivi dei linfociti B, T e combinati: classificazione**

<b>Patologia</b>	<b>CD3 Linfociti T</b>	<b>CD4 T helper</b>	<b>CD8 CTL</b>	<b>CD16 NK</b>	<b>CD20 Linfociti B</b>	<b>Ig</b>	<b>Gene e Prodotto</b>
<i>Agammaglobulinemia di Bruton</i>	N	N	N	N	↓↓↓↓	↓↓↓↓	Bruton tirosin-chinasi su Xq21.3
<i>Agammaglobulinemia autosomica recessiva</i>	N	N	N	N	↓↓↓↓	↓↓↓↓	Catena μ su 14q32.3 λ5/14 del B cell receptor su 22q.11.2 CD79a su 19q13.2
<i>Deficit selettivo di IgA</i>	N	N	N	N	N	IgA ↓↓ IgG, IgM N	Sconosciuto
<i>Deficit immunoglobulinico selettivo</i>	N	N	N	N	N	IgG ↓ oppure IgE	Geni della catena pesante delle Ig su 14q32.3
<i>Immunodeficienza comune variabile</i>	N	N	N	N	N	↓↓↓	Sconosciuto
<i>Sindrome da iper-IgM</i>	N	N	N	N	N	IgM ↑ IgA, IgG ↓↓	CD40L su Xq26.3-27.1
<i>Sindrome di DiGeorge</i>	↓↓	↓↓	↓↓	N	N - ↑	N o ↓	Difetto embriogenetico III e IV tasca faringea
<i>Atassia-teleangiectasia</i>	↓	↓	↓	↓	N	IgA ↓ IgG ↓	ATM su 11q22.3
<i>Sindrome di Wiskott-Aldrich</i>	↓	↓	↓	N	N	N	Proteina di WA su Xp11.22
<i>Difetti dei geni del complesso CD3</i>	↓↓	N	N	N	N	N o ↓	catena γ o ε del CD3 su 11q23
<i>SCID X-linked</i>	↓↓↓	↓	↓	↓↓↓↓	↑	N	catena γ <sub>c</sub> del recettore comune per IL2,4,7,9,15 su Xq13.1
<i>SCID autosomica recessiva T-,B+,NK+</i>	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	N	N	Catena α del recettore per interleuchina 7 su 5p13
<i>SCID autosomica recessiva T+,NK+,B+</i>	N	↓	N	N	N	N	p56 <sup>lek</sup>

<i>SCID da deficienza linfoproliferativa di linfociti T</i>	↓↓	↓	↓	↓	N	IgG, IgM ↑ IgA ↓↓	Catena α del recettore per interleuchina 2 su 10p14-15
<i>SCID da deficit di ADA</i>	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	adenosina deaminasi su 20q13.2-20q13.11
<i>SCID da deficit di PNP</i>	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	fosforilasi nucleosidica purinica
<i>SCID da deficit di linfociti T CD8+</i>	↓	N -↑	↓↓↓ ↓	N	N	N	ZAP-70 su 2q12
<i>CD4+ T-linfocitopenia idiopatica</i>	↓	↓↓↓	↓	N	N	N o ↓	Sconosciuto
<i>Deficit di MHC di classe II</i>	↓	↓↓	N-↑	N	N	N	RFXANK su 13q

CTL: linfociti T citotossici; NK: linfociti natural killer; N: normale; SCID: Immunodeficienza severa combinata, ↓ = diminuzione; ↑ = aumento

### Immunodeficienze secondarie

Le immunodeficienze secondarie sono conseguenti a diverse condizioni cliniche, che attraverso meccanismi patogenetici vari e spesso poco conosciuti determinano un difetto della risposta immunitaria. Esse sono molto più frequenti delle immunodeficienze primitive e la loro incidenza aumenta con l'età. Alcune forme sono transitorie e si risolvono in seguito all'eliminazione della causa che le ha determinate, altre invece possono essere permanenti.

### Cause di immunodeficienze secondarie

<i>Infekzioni</i>	Rosolia Morbillo CMV, EBV, HIV Plasmodium malariae Micobatteri
<i>Neoplasie</i>	Leucemie acute e croniche Linfomi, mieloma multiplo, neoplasie solide
<i>Iatrogeni</i>	Chemioterapici Farmaci immunosoppressivi, corticosteroidi Radiazioni Interventi chirurgici maggiori
<i>Metabolico-nutrizionali</i>	Diabete Insufficienza renale cronica Insufficienza epatica Alcolismo Denutrizione
<i>Patologie croniche</i>	BPCO Scompenso cardiaco congestizio grave Cirrosi epatica Malattie autoimmuni sistemiche
<i>Malattie con perdita proteica</i>	Sindrome nefrosica Enteropatie proteinodisperdenti Ustioni
<i>Età</i>	Immaturità Senescenza

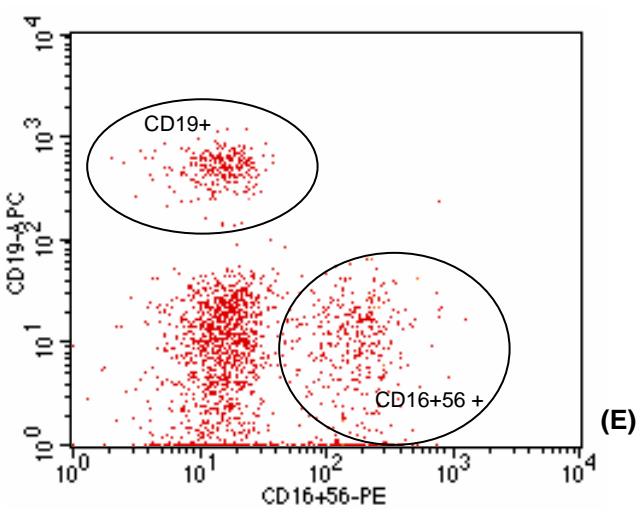
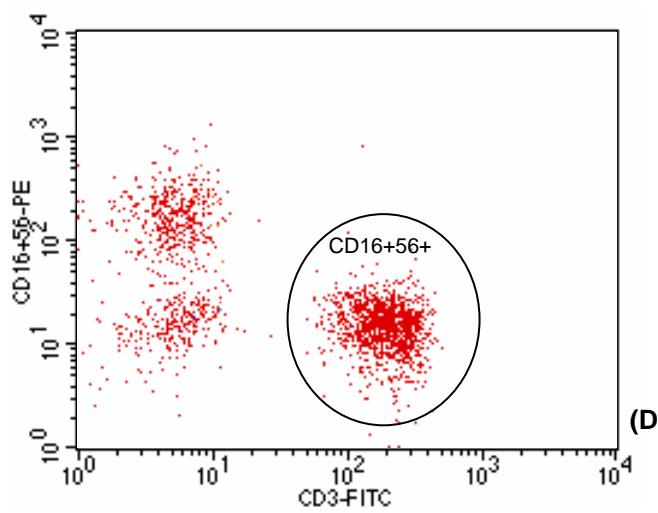
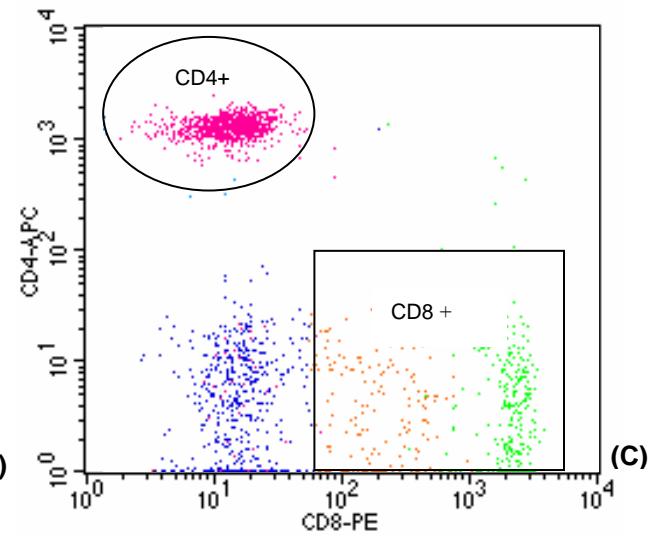
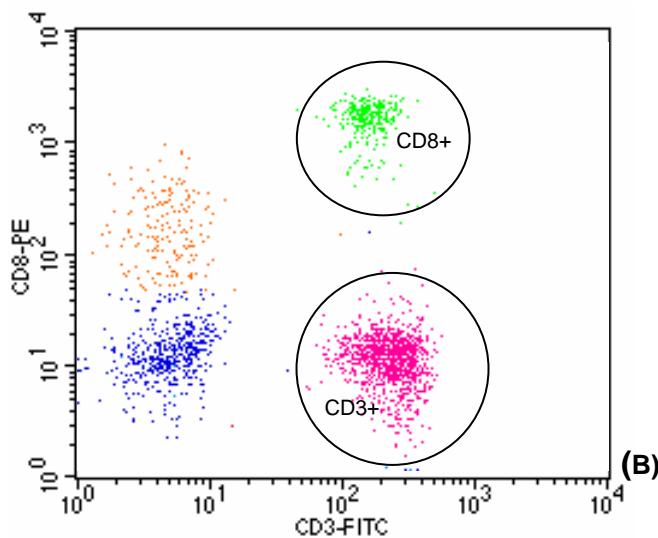
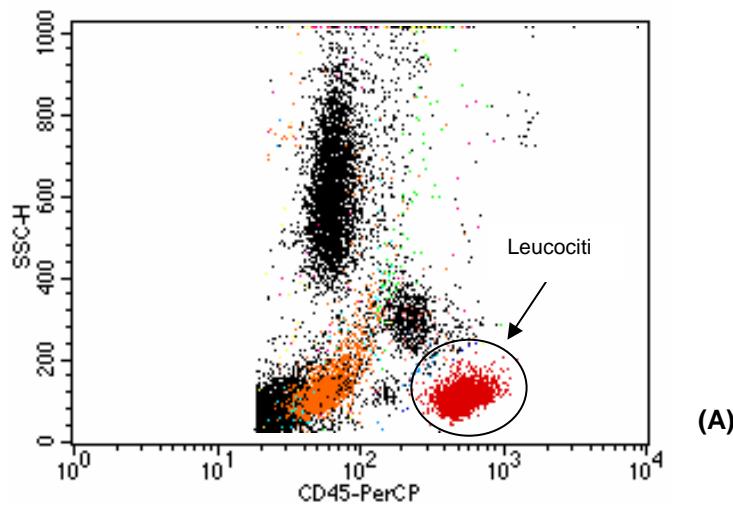
## **Diagnosi dei difetti dell'immunità specifica**

L'**emocromo con formula leucocitaria** consente una stima quantitativa dei leucociti e dei linfociti totali. Utile anche il numero delle piastrine che è ridotto in alcune patologie.

Il **dosaggio delle immunoglobuline** nel siero ed eventualmente in altri liquidi e secreti corporei, rappresenta la prima tappa nello studio delle immunodeficienze con alterata produzione di anticorpi. La determinazione delle Ig nel siero è eseguita come esame routinario mediante nefelometria. Essa può evidenziare una riduzione delle immunoglobuline, suggestiva di patologie quali la *Agammaglobulinemia di Bruton* o *autosomica recessiva*, il *Deficit selettivo di IgA* e l'*Immunodeficienza comune variabile*. Un incremento selettivo di un isotipo è osservato nella *Sindrome da iper-IgM* e nella *Sindrome da iper-IgE*. In presenza di una diminuzione delle immunoglobuline nel siero, può essere utile un approfondimento con lo studio della produzione spontanea e stimolata con mitogeno (pokeweed) delle immunoglobuline in vitro da parte di cellule mononucleate di sangue periferico.

Lo studio delle **sottopopolazioni linfocitarie** si è rivelato uno strumento utile per la diagnostica delle immunodeficienze primitive e secondarie e delle malattie ematologiche di tipo proliferativo (linfomi, leucemie). Lo studio viene eseguito mediante **citofluorimetria**, utilizzando un citometro a flusso automatizzato che analizza cellule in sospensione liquida fatte passare ad una ad una davanti ad un fascio focalizzato di luce laser. Lo strumento è in grado di determinare il diametro relativo, la granularità relativa o la complessità interna e l'intensità relativa di fluorescenza di una cellula. La fluorescenza cellulare si ottiene mediante l'impiego di anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi in grado di emettere luce a diverse lunghezze d'onda. Il fluorocromo, infatti, assorbe energia dal laser e la rilascia sotto forma di vibrazione, dissipazione di calore ed emissione di fotoni a lunghezze d'onda superiori. Gli anticorpi monoclonali marcati utilizzati nell'analisi citofluorimetrica legano specificamente determinanti di superficie diversi, espressi selettivamente da alcuni stituti cellulari. Con questo metodo le diverse sottopopolazioni cellulari sono identificate mediante gli anticorpi monoclonali specifici coniugati con fluorocromi che emettono luce a lunghezze d'onda diverse e possono pertanto essere riconosciute dal sistema ottico del citofluorimetro. Gli antigeni di superficie che vengono utilizzati come marcatori per lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie sono riassunti nella tabella che segue la figura seguente, nella quale è illustrata l'analisi al citofluorimetro di un campione di sangue normale sul quale è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie in sangue periferico da soggetto sano, dopo lisi degli eritrociti:

- ﴿ **A** - marcatura dei leucociti con monoclonale anti-CD45;
- ﴿ **B** - determinazione dei linfociti T in toto e dei linfociti T citotossici mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD3 e anti-CD8;
- ﴿ **C** - determinazione delle due sottopopolazioni di linfociti T, helper e citotossici, mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD4 e anti-CD8;
- ﴿ **D** - determinazione dei linfociti Natural Killer mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD16/CD56 e antiCD3;
- ﴿ **E** - determinazione dei linfociti B mediante doppia marcatura con monoclonale anti-CD19 e anti-CD16/CD56.



### ***Marcatori di superficie (CD) per sottopopolazioni linfocitarie***

<b><i>Popolazione</i></b>	<b><i>CD3</i></b>	<b><i>CD4</i></b>	<b><i>CD8</i></b>	<b><i>CD19</i></b>	<b><i>CD16/CD56</i></b>	<b><i>CD45</i></b>
<i>Linfociti B</i>	–	–	–	+	–	+
<i>Linfociti T helper</i>	+	+	–	–	–	+
<i>Linfociti T citotossici</i>	+	–	+	–	–	+
<i>Linfociti NK</i>	–	–	–	–	+	+

Incrementi e riduzioni nel numero assoluto o relativo di linfociti T, B ed NK, caratterizzano le diverse immunodeficienze (vedere la tabella *Difetti primitivi dei linfociti B, T e combinati: classificazione* riportata in precedenza). In particolare lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie viene utilizzato per monitorare l'andamento della malattia in pazienti con infezione da HIV, nella quale il numero dei linfociti T CD4+ è considerato un indicatore della competenza immunologica del paziente.