



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA

Tesi di Laurea

“Autoimmunità in pazienti con deficit selettivo di IgA”

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Rita Consolini

CANDIDATO

Daiana Giannini

Anno Accademico 2015/2016

Indice generale

RIASSUNTO.....	3
CAPITOLO 1 : INTRODUZIONE.....	5
1.1 Definizione.....	6
1.2 Epidemiologia.....	8
1.3 Struttura e funzione delle IgA.....	9
1.4 Manifestazioni cliniche.....	16
1.4.1 Infezioni ricorrenti.....	17
1.4.2 Patologie del tratto gastro-intestinale.....	18
1.4.3 Malattie allergiche.....	19
1.4.4 Patologie autoimmuni.....	20
1.4.5 Patologie neoplastiche.....	29
1.5 Diagnosi e indagini di laboratorio.....	30
1.6 Trattamento.....	31
1.7 Prognosi.....	33
1.8 Patogenesi.....	34
1.8.1 Ereditarietà e genetica.....	36
1.9 Il sistema immunitario.....	40
1.9.1 Immunità innata.....	42
1.9.2 Immunità adattativa.....	48
1.10 Immunodeficienze primitive.....	83
1.10.1 Immunodeficienze e autoimmunità.....	87
CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO.....	94
CAPITOLO 3: PAZIENTI E METODI.....	97
3.1 Pazienti.....	98
3.2 Criteri di esclusione.....	108
3.3 Metodi.....	109
3.3.1 Esami di laboratorio.....	109
3.3.2 Citofluorimetria a flusso.....	111
3.3.3 Nefelometria e turbidimetria.....	120
CAPITOLO 4: RISULTATI.....	133
4.1 Caratteristiche della coorte di pazienti arruolati.....	133
4.2 Caratteristiche dei pazienti con disordini autoimmuni.....	136
4.2.1 Distribuzione per sesso.....	138
4.2.3 Prevalenza patologie autoimmuni.....	139
4.2.3 Altre condizioni cliniche associate nei pazienti con autoimmunità.....	140
4.2.4 Distribuzione per età.....	141
4.2.5 Storia familiare.....	141
4.2.6 Caratteristiche laboratoristiche.....	142
4.3 Confronto.....	145
CAPITOLO 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	147
BIBLIOGRAFIA.....	156

RIASSUNTO

Il deficit selettivo di IgA (SIgAD) è la più comune immunodeficienza primitiva, in particolare nella popolazione caucasica, in cui la prevalenza oscilla tra 1:142 e 1:965 nati vivi. Secondo i criteri della European Society for Immunodeficiency (ESID 2015) e quelli del Pan-American Group for Immunodeficiency (PAGID 2015) tale immunodeficit è definito come una riduzione dei livelli di IgA a valori inferiori a 7 mg/dl, in presenza di normali livelli per età degli isotipi immunoglobulinici G ed M, in individui di almeno 4 anni di età, dopo che altre cause di ipogammaglobulinemia siano state escluse. La risposta anticorpale ai vaccini è normale.

L'esatta patogenesi del SIgAD è ancora da definire; il principale difetto chiamato in causa sembrerebbe l'incapacità delle cellule B a differenziarsi in plasmacellule IgA secernenti, forse per alterazione dell'ambiente citochinico (carenza di IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TGF- β , IL-21). Le basi genetiche non sono completamente chiarite, un ruolo importante sembra svolto dalla presenza dell'aplotipo 8.1, che spiegherebbe anche l'associazione di tale immunodeficit con manifestazioni di tipo autoimmune. Tuttavia in considerazione della variazione dei modelli di ereditarietà (autosomica dominante, autosomica recessiva, difetto sporadico) e della mancanza di un difetto genetico primario identificato, è probabile che la carenza di IgA rappresenti un gruppo eterogeneo di anomalie genetiche, come la immunodeficienza comune variabile (CVID).

Nonostante il ruolo chiave svolto dalle IgA nella difesa mucosale (soprattutto a livello di tratto respiratorio e gastro-intestinale), nella maggior parte dei casi i soggetti affetti da SIgAD sono asintomatici e la diagnosi è occasionale. Nei pazienti sintomatici, tuttavia, lo spettro di manifestazioni cliniche è

estremamente vario: infezioni ricorrenti, malattie autoimmuni, allergie e disturbi del tratto gastro-intestinale. In casi rari, in età adulta vi può essere un aumentato rischio di sviluppare neoplasie, in particolare adenocarcinoma gastrico o del colon e malattie linfoproliferative. Altra condizione associata è la possibilità di reazione anafilattiche a seguito di trasfusione di emoderivati contenenti tracce di IgA, legata alla presenza in alcuni pazienti di IgE anti-IgA. La prognosi è generalmente buona e legata alla gravità delle patologie associate; circa il 5% dei casi evolve verso l'immunodeficienza comune variabile (CVID).

Il nostro studio ha preso in considerazione 25 pazienti (14 femmine e 11 maschi) in età pediatrica, afferenti all' Unità Operativa di Pediatria del dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università di Pisa, valutando in particolare la prevalenza dei disordini autoimmuni, con l'intento di evidenziarne la potenziale associazione con specifiche caratteristiche cliniche e/o immunologiche riscontrate in tali pazienti. Un disordine autoimmune è stato riscontrato in 6 dei 25 pazienti arruolati (24%, 3 maschi e 3 femmine). La manifestazione più frequentemente rilevata è stata la malattia celiaca, seguita da tiroidite e morbo di Basedow-Graves. Storia familiare di autoimmunità è stata rilevata in un solo paziente affetto da patologia autoimmune (17%), mentre si riscontrava in 9 pazienti (47%) con fenotipo clinico non autoimmune. Nella maggior parte dei casi (5/6) la diagnosi di patologia autoimmune ha preceduto quella di deficit selettivo di IgA; ciò sottolinea l'importanza di una valutazione immunologica nel bambino con manifestazioni autoimmuni, ai fini di un corretto inquadramento diagnostico e adeguata gestione delle altre condizioni patologiche eventualmente associate a tale immunodeficit.

CAPITOLO 1 : INTRODUZIONE

1.1 Definizione

Il deficit selettivo di IgA (SIgAD) è la più comune immunodeficienza primitiva(1). Questa immunodeficienza coinvolge prevalentemente il comparto umorale, con riduzione assoluta o parziale dei valori dell'isotipo immunoglobulinico A (IgA), in presenza di normali livelli serici per età degli isotipi M(IgM) e G (IgG) delle immunoglobuline in presenza di risposta anticorpale normale ai vaccini. Sebbene la maggior parte degli Autori definisca con il termine SigAD la presenza di livelli di IgA seriche inferiore a 5 (1–3) o 7 mg/dL (4), indipendentemente dal sesso, quando altre cause di ipogammaglobulinemia siano state escluse e in presenza di normali livelli serici per età di IgM e IgG totali, ancora non esiste una definizione universalmente accettata. Il sospetto diagnostico deve essere posto di fronte a un paziente di età minima variabile tra 12, 24 e 48 mesi di vita, a seconda degli Autori(5,6) (3,4,7) .

I criteri della European Society for Immunodeficiency (ESID 2015) e quelli del Pan-American Group for Immunodeficiency (PAGID 2015) definiscono il SigAD come la presenza di livelli serici di IgA inferiori a 7 mg/dL con normali livelli di IgG totali e IgM per età, in pazienti di sesso maschile o femminile di età superiore ai 4 anni, in cui altre cause di ipogammaglobulinemia siano state escluse. Nei bambini di età inferiore ai 4 anni il SDIgA potrebbe essere transitorio, associato ad un ritardo maturativo privo di alcun significato immunopatologico, andando incontro a risoluzione durante i follow-up successivi.

Si definisce difetto parziale di IgA la condizione in cui i livelli serici di questo isotipo immunoglobulinico seriche siano inferiori a 2 deviazioni standard rispetto ai valori normali per età e maggiori di 7 mg/dl, in soggetti di almeno 2

anni di età (8) .

La definizione di “deficit selettivo di IgA” va riservato ai casi in cui la riduzione dei livelli dell'isotipo immunoglobulinico A non sia secondario ad altre condizioni note. Tale immunodeficit, infatti, può anche non essere una condizione primitiva, bensì acquisita e secondaria a numerose cause come esposizione ambientale a farmaci, infezioni, malattie monogeniche e anomalie cromosomiche, riassunte in Tab.1 (9) In particolare, una riduzione dei livelli di IgA è stata associata con diversi farmaci antireumatici e antiepilettici (10) . In circa la metà dei casi il deficit sembrerebbe reversibile a seguito della sospensione della terapia, sebbene un recupero completo possa richiedere mesi o addirittura anni (1).

Cause di deficit di IgA acquisito	
Malattie monogeniche	Atassia-teleangectasia Sindrome di Wiskott-Aldrich Disordini linfoproliferativi X-linked (associati a EBV) Deficit di transcobalamina II e ipogammaglobulinemia
Anomalie cromosomiche	Sindrome da delezione del cromosoma 18q Monosomia 22 Trisomia 22 Trisomia 8
Esposizione ambientale	<p>Indotta da farmaci: Farmaci antimalarici Captopril Carbamazepina Valproato Glucocorticoidi Fenclofenac Sali d'oro Penicillamina Sulfasalazina</p> <p>Infezioni Rosolia congenita Infezione congenita da CMV Infezione congenita da <i>Toxoplasma Gondii</i> EBV HIV</p>

Tabella 1: Cause di deficit di IgA acquisito

1.2 Epidemiologia

Il deficit selettivo di IgA è la più comune immunodeficienza primitiva(11). L'incidenza varia a seconda dei diversi gruppi etnici. Nella razza caucasica è più frequente, con incidenza variabile da 1:142 a 1:965 nati vivi (12), più elevata in Europa e in America del Nord. Anche nel contesto dei vari Paesi Europei, l'incidenza è variabile, dipendendo dal background etnico: ad esempio 1:163 in Spagna(13), 1:875 in Inghilterra (14). Negli USA l'incidenza è stimata tra 1:223 e 1:1.000 negli studi di comunità e da 1:333 a 1:3.000 tra i donatori di sangue sani (15). In Brasile si registra una incidenza di 1:965(16), mentre è decisamente più alta in Nigeria (1:252) (17). L'incidenza più bassa si registra tra le popolazioni asiatiche: ad esempio tra 1:2.600 to 1:5.300 in China(18) , tra 1:14.840 to 1:18.500 in Giappone (19), mentre in Iran è di 1:651 negli adulti sani(20).

Dati variabili riguardo l'incidenza potrebbero derivare dal fatto che la definizione di deficit selettivo di IgA può differire nei vari studi. L'incidenza di tale deficit, inoltre, potrebbe essere anche più elevata rispetto ai valori attualmente a disposizione, poiché spesso i soggetti affetti sono asintomatici e non vi è alcun programma di screening di routine(11). Le ragioni delle notevoli differenze geografiche osservate in termini di prevalenza rimangono tuttora sconosciute; vi sono tuttavia ipotesi riguardo l'implicazione degli alplotipi HLA che potrebbero spiegare sia le differenze etniche, che l'associazione con malattie autoimmuni, che spesso si verifica nei pazienti con deficit selettivo di IgA (21) .

1.3 Struttura e funzione delle IgA

L'immunoglobulina A (serica e secretoria) è il più abbondante isotipo anticorpale prodotto(15,22–25). In forma circolante è il secondo isotipo più frequente dopo le IgG. L'immunoglobulina A, infatti, viene prodotta sia in forma serica che secretoria; le IgA secretorie sono prodotte localmente e sono le principali immunoglobuline presenti nelle secrezioni mucose, in particolare a livello di apparato respiratorio, intestinale e genitourinario; ma si ritrovano anche in latte materno, colostro, lacrime e saliva(26) . Esse rappresentano più dei due terzi delle IgA totali prodotte.

Le IgA esistono sia in forma monomerica che polimerica: le seriche sono monomeriche, mentre quelle secretorie sono soprattutto dimeriche (15,23,25), sebbene siano presenti anche minimi livelli di forme polimeriche, in particolare tetrameriche (26).

Come tutte le immunoglobuline, le IgA monomeriche sono costituite da due catene pesanti identiche (α , nel caso delle IgA), ciascuna costituita da una regione variabile e da tre regioni costanti, e da due catene leggere, anch'esse identiche e costituite da una regione variabile e una regione costante (Fig.1).

I dimeri si formano tramite interazione covalente di una catena di giunzione (J) attaccata alla regione costante terminale della porzione Fc (Fig2). Le forme dimeriche secretorie, inoltre, possiedono una “componente secretoria” o frammento SC (*secretory component*) che altro non è se non la componente secretoria, extracellulare, dello specifico recettore per la porzione Fc, detto recettore poli-Ig (pIgR, *polymeric Ig receptor*) poiché costituito da cinque domini Ig, espresso sulla superficie basolaterale delle cellule epiteliali della mucosa(27,28) . Il recettore pIgR (Fig.3) lega specificatamente e trasporta le Ig polimeriche. Una volta legato alle IgA, tale recettore viene internalizzato

per esocitosi e trasferito mediante una serie di vescicole attraverso la cellula (transcitosi cellulare) fino al versante luminale. A questo punto la porzione extracellulare di pIgR, legato alla IgA dimerica, non si distacca da essa, bensì ne avviene il clivaggio a costituire, appunto, il già citato frammento secretorio SC. Il complesso IgA-dimerica e SC viene quindi rilasciato nelle secrezioni che rivestono le superfici mucose(29,30).

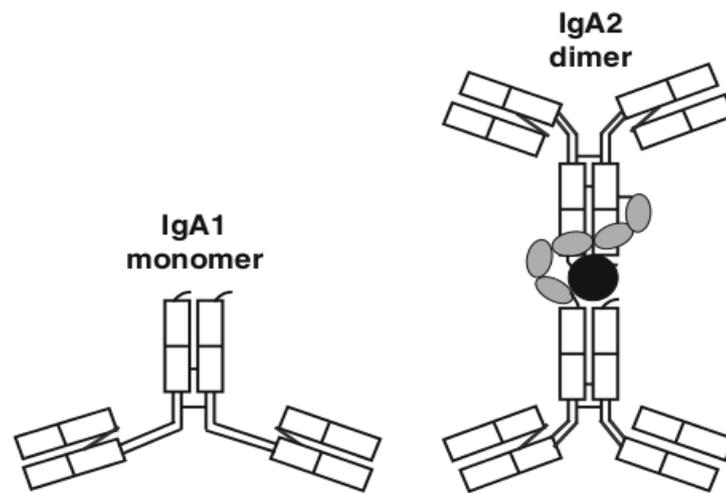


Illustrazione 1: Modelli di IgA monomeric e dimeric

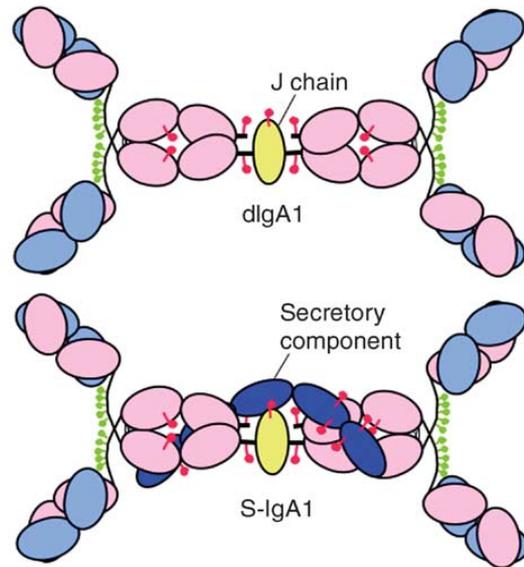
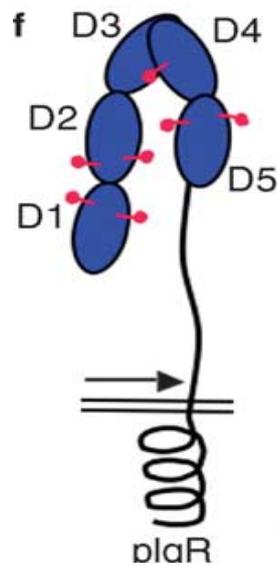


Illustrazione 2: Struttura delle IgA dimeriche



*Illustrazione 3:
pIgR - polymeric
immunoglobulin
receptor*

Sono state identificate due sottoclassi di IgA, IgA1 e IgA2, che differiscono per la catena pesante, la quale può essere codificata da due diversi geni $\alpha 1$ e $\alpha 2$

localizzati sul cromosoma 14 (30). La principale differenza strutturale tra le due sottoclassi è che le IgA2 hanno una regione cerniera più corta, maggiormente resistente alle proteasi batteriche nel lume dell'apparato gastro-intestinale e respiratorio(15,24,25)

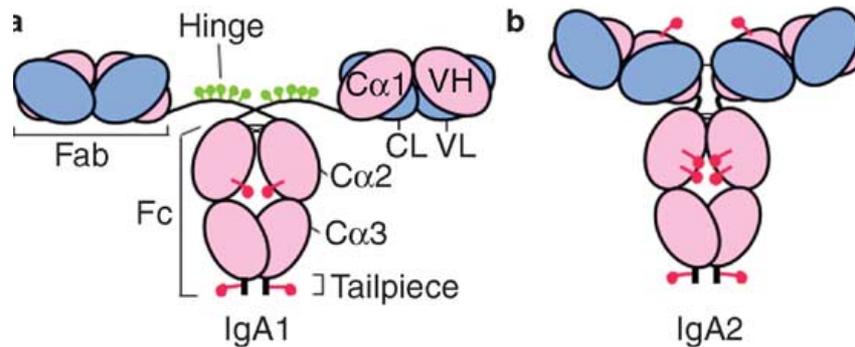


Illustrazione 4: Sottoclassi IgA1 e IgA2

Le IgA seriche, prevalentemente monomeriche, sono rappresentate per circa il 90% dalle IgA1 e per il 10% dalle IgA2. Per quanto riguarda le IgA secretorie, per la maggior parte dimeriche, sono rappresentate soprattutto dalle IgA2, essendo più resistenti all'attività proteolitica dei batteri (31), tuttavia entrambi i sottotipi possono formare dimeri. Le proporzioni delle sottoclassi variano a seconda del distretto considerato, ad esempio le IgA1 rappresentano l'80-90% delle IgA nelle secrezioni nasali, il 60% di quelle salivari; nelle secrezioni genitali femminili, le IgA2 costituiscono il 60%. (29-31).

La funzione delle IgA seriche nella risposta immunitaria sistemica non è ancora stata chiarita. Le IgA monomeriche circolanti non fissano la via classica del complemento; sembrerebbero tuttavia, avere un ruolo nell'attivazione del sistema dei fagociti mediante il recettore FcR α (24,25,32). Un mediatore chiave delle funzioni effettrici delle IgA è proprio il recettore FcR α , conosciuto anche come CD89, presente sulla superficie di monociti, granulociti (neutrofili ed eosinofili), ma anche di alcuni macrofagi e cellule

dendritiche (33). Dati scientifici riportano che le IgA seriche si legano a tali recettori; in tal modo gli immunocomplessi formati da IgA-antigene estraneo vengono fagocitati e rimossi dalla circolazione, senza attivare il sistema del complemento e senza determinare infiammazione (34,35). Le IgA seriche, inoltre, sembrerebbero anche implicate nel controllo del sistema immune, mediante l'inibizione della chemiotassi neutrofila attraverso il legame con altre proteine inibitorie come l' α 1- antitripsina e la formazione di complessi (24,25) .

Per quanto riguarda le IgA secretorie, queste per più del 95% sono prodotte localmente. A livello del sistema gastro-intestinale, nello specifico, ciò avviene sia ad opera di strutture organizzate, come le placche del Peyer e follicoli linfoidi isolati, che non organizzate, cioè in cellule linfatiche distribuite nella lamina propria, mediante meccanismi sia T-dipendenti che T-indipendenti(36–38). Anche le cellule epiteliali intestinali, le cellule dendritiche e le cellule stromali locali possono contribuire alla produzione T-indipendente delle IgA, attraverso la secrezione di fattori come linfopoietina timica stromale, interleuchina(IL) 6, IL-10, fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), fattore di crescita trasformante β (TGF- β) , fattore attivante i linfociti (BBAFF) e ligando inducente la proliferazione (APRIL)(37).

Una delle funzioni delle IgA secretorie è quello di esercitare un controllo sulla abbondante flora batterica endogena. Le superfici mucose corporee, infatti, coprono approssimativamente un'area di 200-400 m², ospitando 15.000-36.000 specie e 1.800 generi di microrganismi (39–42). Il numero totale delle cellule batteriche supera, quindi, il numero delle cellule nucleate. La maggior parte dei batteri commensali sono localizzati nel tratto intestinale, pertanto il mantenimento dell'omeostasi intestinale è di primaria importanza. Tale obiettivo è raggiunto attraverso una serie di meccanismi immunitari; tra

questi, assumono un ruolo fondamentale quelli mediati dalle IgA secretorie. I batteri endogeni di tratto intestinale, cavità orale, tratto respiratorio e genitale sono ricoperti di IgA secretorie, che ne limitano l'adesione e la penetrazione epiteliale, confinandoli alla superficie mucosa(41) . Il rivestimento dei batteri da parte delle IgA si verifica attraverso il legame antigene-specifico mediato dal frammento anticorpale legante l'antigene (Fab), pertanto è considerato un meccanismo della immunità adattativa. Alcuni studi(43) hanno evidenziato anche un potenziale ruolo delle IgA come molecole effettrici della immunità innata, in particolare l'immunità mucosale innata glicano-mediata. È stato notato come i glicani delle IgA secretorie interagiscano con recettori zuccherodipendenti sulle fimbrie della superficie batterica, inibendo così l'adesione di diverse specie batteriche alla mucosa(43). È probabile che le interazioni glicano-mediate insieme all'azione Fab-mediata rinforzino le funzioni protettive della IgA secretoria (40,41,44,45). A livello del tratto gastrointestinale, il ruolo protettivo delle IgA non sembrerebbe legato solo al confinamento dei batteri alle superfici mucose (*“immune exclusion”*) (37–41). Nel topo è stato dimostrato anche un ruolo cruciale nella regolazione delle comunità batteriche del lume intestinale. In topi knock-out per l'enzima citidina deaminasi attivazione-indotta (AID), fondamentale nei processi di switch isotipico e ipermutazione somatica anticorpale (quindi topi non in grado di produrre IgA) è stata riportata una eccessiva espansione dei batteri anaerobi(46,47). Analoghi risultati sono stati ottenuti con esperimenti su topi con deficit di IgA(48). Tale cambiamento nella flora microbica intestinale potrebbe determinare l'attivazione delle cellule immunitarie presenti a livello della mucosa: linfociti intraepiteliali, cellule di follicoli linfoidi isolati, placche del Peyer e linfonodi mesenterici. Questo stato di attivazione, inoltre, può divenire sistemico e coinvolgere i linfociti di tutti i centri germinativi e i tessuti linfoidi. Le IgA secretorie potrebbero anche giocare un ruolo nel determinare

una relazione ospite-microbo non infiammatoria, grazie all'incapacità di fissare il complemento e alla mancanza di recettori pro-infiammatori per le IgA sui macrofagi intestinali(11). Alcuni studi hanno dimostrato come anche le IgA seriche siano in grado di attivare la via lectinica del complemento, mediante il legame con la lectina legante il mannosio, qualora siano disponibili residui di mannosio terminale a livello di alcune catene glicaniche espresse dalle molecole di IgA. Tuttavia l'importanza di tale dato *in vivo* non è ancora stato chiarito(49). Nonostante il ruolo critico delle IgA secretorie, la maggior parte degli individui con deficit selettivo di IgA sono asintomatici. La diagnosi di SigAD si basa sui livelli di IgA seriche, mentre quello delle IgA secretorie non è determinato; è perciò possibile che in corrispondenza delle mucose siano in quantità sufficiente da sopperire ad alcune funzioni protettive. Inoltre, nella maggior parte dei pazienti affetti, si rileva un aumento nella produzione delle IgM secretorie, ad evidente scopo compensatorio (50,51). IgA e IgM presentano analogie evolutive, strutturali e funzionali: presenza di residui glicanici simili, presenza nella struttura di entrambe della catena J, formazione di molecole polimeriche e capacità di legare il recettore pIgR sul versante basolaterale delle epitelio mucosale, formando in tal modo molecole di immunoglobuline secretorie che contengono il frammento SC ("componente secretoria")(52-54). Vi sono, tuttavia, anche pazienti in cui non si osserva tale aumento compensatorio di IgM secretorie (55).

Nonostante le importanti funzioni a difesa delle mucose dell'isotipo immunoglobulinico A, va ricordato come nella maggior parte dei casi il deficit selettivo di IgA sia una condizione del tutto asintomatica e in tali casi sia una diagnosi del tutto accidentale. Molti adulti, infatti, giungono casualmente alla diagnosi, in assenza di una storia clinica di episodi infettivi ricorrenti; nel bambino sintomatico, invece, tale difetto nella maggior parte dei casi

determina morbidità frequente, in genere di modesta entità, fino a che non si sviluppa una adeguata memoria immunologica, con produzione di IgM secretorie e IgG a significato compensatorio.

1.4 Manifestazioni cliniche

Il difetto selettivo di IgA è generalmente considerato una condizione non-grave, che nella maggior parte dei casi decorre in maniera del tutto asintomatica, giungendo all'attenzione clinica solo accidentalmente, a seguito di controlli routinari. Pazienti asintomatici con SigAD possono, ad esempio, essere identificati nelle banche dei donatori di sangue (15) o in corso di screening familiare dopo diagnosi di SigAD/immunodeficienza comune variabile (CVID) in un membro della famiglia. A seconda delle casistiche, la frequenza dei soggetti asintomatici varia dal 50%(15) fino anche all'85-90% (11). Tale aspetto costituisce ancora un punto da chiarire, dato il ruolo chiave dell'isotipo immunoglobulinico A nella difesa immunitaria, in particolar modo mucosale.

Nelle forme sintomatiche, invece, vi è un ampio spettro di manifestazioni possibili. In particolare, data la specifica funzione delle IgA nella protezione delle barriere mucose, la sua assenza o carenza può determinare una maggiore suscettibilità alle infezioni ricorrenti, soprattutto respiratorie e gastro-intestinali, ad altri disturbi gastro-intestinali, a malattie allergiche, patologie autoimmuni e, in casi sporadici, anche a neoplasie (Tab.2) (56).

Patologia	Consensus Conference Gruppo immunologia e Allergologia Pediatrica (modificata) 1990	Cunningham-Rundles (modificata) 2004
Numero tot pazienti	258	127
Infezioni ricorrenti	123 (48%)	63 (50%)
Patologie allergiche	39 (15%)	16 (13%)
Patologie autoimmuni	32 (12%)	34 (28%)
Patologie gastro-intestinali	–	4 (3%)
Patologie tumorali	3 (1%)	9 (7%)

Tabella 2: Numero e percentuale di pazienti con patologie associate a SIgAD (da "Difetto selettivo di IgA", Commissione di Immunologia SIAIP, RIAP 2007) (57)

Altra condizione associata è la possibilità di reazione anafilattiche a seguito di trasfusione di emoderivati contenenti tracce di IgA, legata alla presenza in alcuni pazienti di anticorpi anti-IgA(58) . Infine, circa il 5% dei pazienti con SIgAD sviluppano immunodeficienze più severe come la immunodeficienza comune variabile (CVID) (59,60).

1.4.1 Infezioni ricorrenti

Le infezioni ricorrenti, soprattutto del tratto respiratorio, sono la manifestazione clinica più frequente nei pazienti affetti da deficit selettivo di IgA (6,15,61) e spesso costituiscono il motivo per cui essi giungono all'attenzione clinica ed eseguono un dosaggio immunologico(62). Le infezioni ricorrenti colpiscono soprattutto le vie respiratorie superiori ed inferiori con sinusiti, faringotonsilliti, bronchiti e meno frequentemente broncopolmoniti (63) . I patogeni più frequentemente coinvolti sono i batteri capsulati come *Streptococcus pneumoniae* ed *Haemophilus Influenzae* (64). Alcuni pazienti possono sviluppare un danno d'organo, ad esempio bronchiectasie secondarie ad infezioni ricorrenti o croniche(65,66).

Anche il tratto gastro-intestinale è più suscettibile alle infezioni, data la compromissione della barriera protettiva mucosale, in cui le IgA giocano un ruolo chiave. Le infezioni enteriche più frequentemente associate al SIgAD sono le enteropatie da *Giardia Lamblia* (67), da *Helicobacter pylori* (68) e le Salmonellosi (63).

Diversi fattori possono influenzare l'espressione clinica; in particolar modo un concomitante deficit delle sottoclassi anticorpali G2 (IgG2) (69,70) e/o G4 (IgG4) (71) determina una più alta incidenza di infezioni ricorrenti e di maggior gravità e un rischio più elevato di sviluppare complicanze (72) .

1.4.2 Patologie del tratto gastro-intestinale

Pazienti con deficit di IgA hanno la tendenza a sviluppare infezioni e disordini del tratto gastro-intestinale (1,15,61) . Tra le le malattie associate vi sono giardiasi, malassorbimento, intolleranza al lattosio, malattia celiaca, rettocolite ulcerosa, iperplasia nodulare linfonodale e neoplasie (11). Le parassitosi, come quella da *Giardia Lamblia*, sono legate alla compromissione della barriera protettiva mucosa gastro-intestinale, per cui i parassiti possono aderire all'epitelio, proliferare e determinare infezione (67). Il malassorbimento può insorgere secondariamente a danno strutturale a carico dei villi intestinali. Anche in assenza di infezione, alcune molecole possono penetrare a livello dei tessuti subepiteliali e della sottomucosa, data l'alterata clearance mucosale di macromolecole e proteine. Tale processo sembrerebbe facilitare la produzione di anticorpi verso determinati antigeni e lo sviluppo di intolleranze alimentari (73). Ad esempio, pazienti con SIgAD hanno una maggior probabilità di sviluppare la malattia celiaca(74). In tal caso, non si ritroveranno IgA anti-gliadina, anti-transglutaminasi tissutale o anti-

endomisio, bensì autoanticorpi di isotipo G diretti verso tali antigeni. In letteratura è riportata anche l'associazione con malattie infiammatorie intestinali, in particolare con la rettocolite ulcerosa(6,15,72,75).

1.4.3 Malattie allergiche

Manifestazioni allergiche sono comuni nei soggetti con deficit selettivo di IgA (6,15,61). L'incidenza di tale immunodeficit è di 1/200 fra i pazienti degli ambulatori allergologici(62). Tuttavia la frequenza dei disordini allergici varia sia in base alla definizione di deficit selettivo di IgA e di allergia, che in funzione delle metodiche diagnostiche. Nello studio di Buckley del 1975, il 58% dei pazienti adulti e pediatrici con SIgAD presentava atopia(76). Tuttavia, in uno studio successivo che prendeva in considerazione 127 pazienti con SIgAD tra 2 e 67 anni, il 13% dei pazienti aveva storia di asma o allergia. Tale percentuale non sembrerebbe superiore rispetto a quella della popolazione generale (6) . La storia di allergia era più frequente nei pazienti più giovani, con una età media di 10,5 anni. In uno studio condotto su 126 bambini e adolescenti brasiliani con deficit selettivo di IgA, il 48% della popolazione considerata presentava allergie respiratorie o dermatite atopica(75) . Uno studio prospettico svedese del 2009 effettuato su 2423 bambini di 4 anni, riscontrava un rischio più elevato di pseudocroup a 1 anno e di allergie alimentari a 4 anni nei bambini con SIgAD rispetto ai quelli con normali livelli serici di IgA (61). In un report più recente, in cui la condizione di allergia è stata determinato in maniera più affidabile, basandosi sulla presentazione clinica e sull'esecuzione del prick test per 14 allergeni standard comuni, manifestazioni allergiche (asma, dermatite atopica, rinite/congiuntivite

allergica, orticaria, allergia ai farmaci, allergia alimentari) si riscontrano nell'84% dei pazienti con SIgAD tra i 4 e i 32 anni (72). Da uno studio turco del 2014, emerge come atopie e malattie allergiche (in particolare asma, rinite allergica e dermatite atopica) sembrerebbero più frequenti nei pazienti con SIgAD rispetto alla popolazione generale(77).

Nel 40,5% dei pazienti, le manifestazioni allergiche sono il sintomo d'esordio. Sembrerebbe che il 25% dei pazienti con deficit selettivo di IgA siano identificati durante la valutazione per malattie allergiche (15). I pazienti con SIgAD hanno un decorso clinico della condizione atopica del tutto sovrapponibile a quello che si riscontra nei bambini senza immunodeficit; tuttavia l'asma bronchiale tende più facilmente a cronicizzare e spesso è più resistente al trattamento, forse a causa della facilità con cui si possono sovrapporre infezioni del tratto respiratorio (62).

1.4.4 Patologie autoimmuni

Le malattie autoimmuni sono tra le più importanti manifestazioni cliniche del deficit selettivo di IgA (6,15,75). La prevalenza dei disordini autoimmuni varia dal 7 al 36% a seconda della popolazione considerata(78). Autoanticorpi organo e non organo specifici, in particolare anti-sulfatide, Jo-1, cardiolipina, fosfatidilserina e collagene, si riscontrano in circa il 40% dei pazienti, anche in assenza di manifestazioni cliniche(79,80). Il rilievo di autoanticorpi, comunque, non sembrerebbe predittivo di una evoluzione verso una malattia autoimmune (81). In letteratura è stata riportata una moltitudine di disordini autoimmuni associati, comprendenti tiroiditi autoimmuni, artropatia cronica, anemia emolitica, porpora trombotica trombocitopenica, lupus eritematoso sistemico (LES), artrite idiopatica giovanile, colangite sclerosante, malattia celiaca,

vitiligo, psoriasi, colite ulcerosa, sindrome di Sjogren, poliarterite nodosa, sarcoidosi, epatite cronica autoimmune, malattia di Kawasaki e malattia di Bechet (21). In uno studio del 2004, Edwards e coll. evidenziavano come l'autoimmunità fosse la seconda più comune associazione con il deficit selettivo di IgA (28%) dopo le infezioni ricorrenti (50%) (6). La maggior prevalenza di malattia autoimmune si osservava negli adulti (età mediana di 29 anni) e nel sesso femminile. La condizione più comunemente riscontrata era la porpora trombocitopenica autoimmune, seguita dall'anemia emolitica, artrite reumatoide giovanile, tiroiditi, LES, diabete e presenza di vari anticorpi. In una popolazione più giovane, malattie autoimmuni, come tiroiditi, celiachia, artropatia, anemia emolitica autoimmune e LES, venivano riscontrate nel 19% dei pazienti. Inoltre, le malattie autoimmuni erano anche più frequenti nei parenti dei pazienti affetti da deficit selettivo di IgA; il 10% dei parenti di primo grado aveva manifestazioni autoimmuni, quindi una prevalenza più elevata rispetto alla popolazione generale (5%).

Nei pazienti con diagnosi di SIgAD vi è dunque una aumentata prevalenza di malattie autoimmuni; analogamente, nei soggetti inizialmente giunti all'attenzione clinica per disordini autoimmuni, è aumentata l'incidenza di deficit selettivo di IgA (21).

Una quota di pazienti con SIgAD possiede anticorpi anti-IgA, che possono determinare la comparsa di una reazione anafilattica in caso di trasfusione di emoderivati contenenti tracce di immunoglobulina A (58,82,83). Gli anticorpi anti-IgA sono più comunemente presenti nei pazienti con difetto totale. In uno studio di Ferreira e coll. (84), il 39% dei pazienti con SIgAD possedeva immunoglobuline anti-IgA(84). Gli anticorpi anti-IgA in grado di determinare una reazione di ipersensibilità di tipo I sono le immunoglobuline di isotipo E (IgE), perciò la determinazione dei livelli di IgE anti-IgA potrebbe essere utile

nel predire la possibilità di una reazione anafilattica a seguito di emotrasfusioni in pazienti con deficit selettivo di IgA. Tale test, tuttavia, nella maggior parte dei laboratori non è disponibile; in alternativa è possibile dosare le eventuali IgG anti-IgA e tale metodica potrebbe essere utilizzata come indagine di screening (11). La reazione anafilattica da IgA, comunque è un evento raro, che si verifica con una incidenza variabile da 1:20.000 a 1:47.000 trasfusioni nei pazienti con SigAD e, secondo alcuni studi, non sempre sembrerebbe correlata alla presenza di anticorpi anti-IgA(58) . Nei casi in cui si renda necessaria la somministrazione di emoderivati nei soggetti con deficit selettivo di IgA, bisogna ricorrere a preparati privi o a basso contenuto di IgA(62).

Sebbene la relazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità sia chiara, non sono ancora certe le cause di tale associazione. L'aumentato rischio di manifestazioni autoimmuni nei pazienti affetti da SIgAD ha diverse spiegazioni possibili (85). In primis, poiché le IgA secretorie giocano un ruolo importante nella protezione delle superfici mucose, la loro carenza facilita il superamento della barriera mucosa da parte di antigeni ambientali, che possono portare alla formazione di autoanticorpi mediante meccanismi di mimetismo molecolare e di cross-reazione con antigeni-self (15). Una seconda ipotesi prevede un possibile ruolo di fattori genetici comuni, ad esempio alcuni aplotipi HLA, che predisporrebbero il paziente affetto allo sviluppo sia di immunodeficienza che di autoimmunità; anche l'associazione familiare è indicativa di una forte influenza genetica(86). L'aplotipo più comunemente identificato nei pazienti con SIgAD è l'aplotipo 8.1 (in particolare HLA-A1, B8, DR3, DQ2), presente nel 45% dei soggetti affetti da deficit selettivo di IgA e solo nel 16% della popolazione generale (87). Tali aplotipi sono di comune riscontro anche in caso di varie malattie autoimmuni, note per essere

fortemente associate con il deficit selettivo di IgA, quali tiroidite autoimmune, LES, malattia celiaca, artrite reumatoide, diabete di tipo 1 e miastenia gravis (88,89). Oltre all' aplotipo, sono state rilevate altre associazioni genetiche con geni non-MHC che consentirebbero di spiegare la relazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità. Tra i geni identificati, quelli meglio definiti sono *interferon-induced helicase-1* (IFIH1) e *C-type lectin domain family 16, member A* (CLEC16A) (90). IFIH1 codifica per una RNA-elicasi interferone-indotta che partecipa al riconoscimento del genoma virale, svolgendo così un ruolo nella risposta immunitaria anti-virale. Studi di associazione genomica hanno rilevato una associazione tra un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel locus genico rs1990960 del gene IFIH1 e il SIgAD. Il nesso con l'autoimmunità deriva dal fatto che polimorfismi a singolo nucleotide su tale gene sono stati individuati anche in patologie autoimmuni, come il diabete di tipo 1. L'associazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità è stata anche correlata a una mutazione a carico del gene CLEC16A, codificante per una lectina di tipo C, sebbene tale osservazione necessiti di ulteriori conferme (21). Una ulteriore ipotesi per spiegare l'aumentato rischio di manifestazioni autoimmuni è che nel SIgAD vi sia una compromissione dei meccanismi di tolleranza(91) (92). In alcuni studi, infatti, vi è il rilievo di una riduzione del numero di linfociti T regolatori(93) . Jacob e coll. (75) formularono una ipotesi che potrebbe spiegare l'alta prevalenza delle malattie autoimmuni nel deficit di IgA. Essi proposero che l'interazione della immunoglobulina A con il suo recettore Fc α RI determinasse una parziale fosforilazione di FcR γ associato a Fc α RI, in particolare a livello del cosiddetto “*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*” (ITAM). I motivi ITAM sono importanti per la trasduzione del segnale a livello delle cellule del sistema immunitario. La parziale fosforilazione determina il reclutamento della tirosin-fosfatasi SHP-1. Ciò

porta alla inattivazione di diversi *pathways* di attivazione del sistema immune, inclusi sia i recettori che contengono i motivi ITAM che quelli ITAM-indipendenti. In tal modo le IgA preverrebbero le reazioni infiammatorie e autoimmuni. Ne consegue, dunque, che bassi livelli di IgA favorirebbero lo sviluppo di patologie autoimmuni (75). Il ruolo anti-infiammatorio delle IgA era già stato osservato da Russell e coll.(34) in uno studio in cui si evidenziava la *downregulation* da parte delle IgA delle risposte cellulo-mediate alla chemotassi e della fagocitosi IgG-mediata. Dal momento che le IgA secretorie contribuiscono alla clearance dei patogeni, in caso di SIgAD tale clearance è compromessa, portando alla deposizione di immunocomplessi nei tessuti infiammati di vari organi (34). Sono stati proposti ulteriori meccanismi patogenetici; tra questi vi è l'ipotesi che i disordini autoimmuni siano correlati alla presenza di anticorpi anti-bovino. In uno studio di Cunningham-Rundles e coll. (73) il 60% dei pazienti possedeva anticorpi contro le proteine del latte vaccino, con livelli più elevati nei pazienti più giovani. Titoli anticorpali elevati di immunoglobuline anti-bovino sembrerebbero correlati alla positività di test serologici volti ad identificare una condizione di autoimmunità. Il significato di tale osservazione non è noto, ma questa condizione potrebbe giocare un ruolo nell'associazione tra ridotti livelli di IgA e malattie infiammatorie intestinali, come la celiachia (73). In un altro studio, condotto da Wells(94) su 60 soggetti affetti da deficit selettivo di IgA, anticorpi anti-IgM umane e anticorpi anti-collagene umano nativo erano riscontrabili rispettivamente nel 35% e nel 34% dei casi, in confronto all'1,6% e al 2% della popolazione controllo; tuttavia il loro significato clinico e il ruolo esercitato nella patofisiologia del SIgAD o delle malattie autoimmuni non è noto (94). La letteratura scientifica, inoltre, riporta anche l'associazione tra manifestazioni autoimmuni e elevati livelli della sottoclasse IgG4(95) oppure con ridotti livelli di IgG2(85).

Celiachia

La malattia celiaca è un disordine infiammatorio cronico del tratto intestinale, caratterizzata da atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiammazione a carico dell'intestino tenue. Le cause necessarie allo sviluppo di malattia sono la predisposizione genetica, tra cui la presenza dei geni HLA DQ2 e/o DQ8, e l'assunzione di glutine (frazione proteica di frumento, orzo e segale) con la dieta. La patogenesi della celiachia è legata a una complessa reazione immunitaria innescata dal glutine a livello della mucosa intestinale, in cui sono implicati sia meccanismi adattativi che innati (96).

È stato dimostrato che l'incidenza del deficit selettivo di IgA è più elevato nei pazienti con malattia celiaca rispetto alla popolazione generale, variando tra 1:39 a 1:57. A sua volta, la prevalenza di malattia celiaca è più elevata nei pazienti con SIgAD, in cui interessa il 10-30% dei pazienti (74), rispetto all'1% della popolazione generale (96). Questi dati suggeriscono l'importanza dello screening per malattia celiachia in caso di deficit selettivo di IgA. La diagnosi di celiachia è spesso affidata alla identificazione di autoanticorpi specifici: IgA anti-transglutaminasi (IgA anti-tTG), IgA anti-endomisio (EMA) e, in alcuni casi, IgA anti-gliadina (AGA). Data l'elevata associazione tra celiachia e deficit di IgA, si rende necessario, dunque un contestuale dosaggio delle IgA totali; in caso di deficit di tale isotipo immunoglobulinico, le indagini serologiche per la diagnosi di celiachia si dovrebbero basare sulla ricerca delle IgG specifiche, in modo da garantire adeguate sensibilità e specificità, riducendo il rischio di falsi negativi (97,98). La conferma diagnostica di celiachia può avvalersi di indagini biotiche (99). Nonostante l'incidenza più elevata di malattia celiachia nei pazienti con SIgAD rispetto alla popolazione generale, la prognosi dopo adeguata dieta priva di glutine è la stessa (57).

Patologie tiroidee autoimmuni

Il morbo di Basedow-Graves è tra i più frequenti disordini autoimmuni della tiroide (100), con una incidenza che raggiunge 29-30:100.000 abitanti/anno nella popolazione caucasica(101) e 14:100.000 in Cina(102). Tale tireopatia è caratterizzata da infiltrato linfocitario della ghiandola tiroide e dalla produzione di anticorpi anti-recettore del TSH (TRAb) che determinano ipertiroidismo (103) . Una associazione tra morbo di Basedow-Graves e deficit selettivo di IgA è stata evidenziata in vari case-report (104,105) e alcuni Autori hanno mostrato come il SIgAD sia più frequente nei pazienti con tireopatia di Basedow-Graves (90). Uno studio condotto sulle popolazioni del Nord-Europa ha evidenziato una associazione tra la presenza di TRAb e il deficit selettivo di IgA (1:60), suggerendo una associazione significativa tra tale immunodeficit e il morbo di Basedow-Graves(88) . Una associazione con tiroidite autoimmune è stata riportata persino in regioni dove l'incidenza di deficit selettivo di IgA è molto bassa, come in Giappone (105).

Diabete mellito di tipo 1

Il diabete mellito di tipo 1 (DM1) è un disordine cronico autoimmune caratterizzato dalla distruzione delle cellule β pancreatiche, che esita in una ridotta o assente produzione insulinica. Il danno insulare è causato soprattutto da una risposta cellulo-mediata, in cui il ruolo principale è svolto dai linfociti T citotossici (CD8⁺). L'eziopatogenesi della malattia è legata sia a fattori genetici, in cui fondamentale importanza rivestono geni MHC (soprattutto HLA-DR3, DQ2, DR4, DQ8) (106), sebbene anche geni non-MHC siano implicati (107), che ambientali, comprendenti infezioni, nutrizione e livello socio-economico(108–110) . Il diabete mellito di tipo 1 interessa circa lo 0,4%

della popolazione di origine europea (111), ma l'incidenza è estremamente variabile a seconda della regione geografica considerata, andando da 0,6 casi ogni 100.000 abitanti in Corea (112) a 40,2:100.000 in Finlandia(113) .

Nei pazienti con DM1 è stata riportata una incidenza di deficit selettivo di IgA variabile, a seconda degli Autori, da 1:27(114) a 1:261 (115), quindi aumentata rispetto alla popolazione generale. In uno studio del 2011 in cui venivano dosati i livelli serici di IgA in adulti e bambini con DM1, italiani e svedesi, si riscontrava una prevalenza di 1:114 in Svezia e di 1:122 in Italia, con una prevalenza complessiva di deficit di IgA 1:100 nella popolazione caucasica affetta da DM1 (all'incirca 5 volte più alta rispetto alla popolazione generale) (90).

Lupus eritematoso sistemico

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è una malattia autoimmune ad interessamento sistemico caratterizzata dalla presenza di vari autoanticorpi, deposizione di immunocomplessi, attivazione del complemento e danno tissutale, sotto l'influenza di molteplici fattori genetici (sia geni MHC, come HLA-DR, che non MHC) e ambientali. Nella popolazione generale colpisce soprattutto le donne (nove volte più degli uomini) in età fertile. La prevalenza di LES varia a seconda del gruppo etnico, oscillando da 7 a 71 casi ogni 100.000 abitanti nelle popolazioni di origine europea (116) e da 31 a 70: 100.000 abitanti nella popolazione cinese (117); nelle popolazioni di origine africana, invece, la prevalenza supera i 200 casi ogni 100.000 abitanti (118). Diversi studi riportano una aumentata incidenza di deficit selettivo di IgA nei pazienti con lupus eritematoso sistemico, con valori che vanno da 1:130 in Spagna (119) , a 1:19 in USA (120) e 1:17 in Brasile (121). Inoltre in

letteratura vi sono parecchi case-report sull'associazione tra LES e SIgAD (122–124). Un recente studio condotto da Wang e coll. (90) ha valutato la frequenza di deficit selettivo di IgA in 3388 pazienti in Svezia, Regno Unito, USA e Cina. L'immunodeficit è stato dimostrato in un totale di 44 pazienti, con una frequenza globale di 1:67 nei Caucasici e di 1:121 nei pazienti cinesi. È interessante notare come la prevalenza di SIgAD nei soggetti cinesi affetti da lupus eritematoso sistemico sia da 20 a 40 volte superiore quella della popolazione generale (da 1:2600 a 1:5300)(18) .

Artrite reumatoide e artrite idiopatica giovanile

L'artrite reumatoide è una infiammazione cronica, prevalentemente a carico delle articolazioni sinoviali. In molti pazienti vi sono livelli aumentati di fattore reumatoide e di anticorpi anti-peptidi citrullinati (125). Tra i maggiori fattori di rischio genetico, la presenza di alplotipo HLA DR4, , ma anche B27, DR1, B8, DR3 (126,127). La prevalenze di artrite reumatoide a livello mondiale è di circa l'1% (125) .

L'artrite idiopatica giovanile (JIA) interessa bambini dai 6 mesi ai 16 anni di età e comprende un gruppo eterogeneo di malattie infiammatorie articolari croniche, a eziologia ignota (128) . Tra le popolazioni europee, la prevalenza di JRA è tra le più basse; sono stati riportati valori 0.04% in Spagna (129) , 0,1% in Finlandia ed altri Paesi Nordici (130). Valori simili si osservano anche nelle popolazioni del Nord-America. Le prime segnalazioni di un'associazione tra artrite idiopatica giovanile e SIgAD emersero a partire da metà degli anni '60 da diverse fonti (131–133). Studi condotti su 5724 pazienti affetti da artrite reumatoide o da artrite idiopatica giovanile, hanno mostrato la presenza di deficit selettivo di IgA in 74 di questi pazienti, con una frequenza totale di

1:77. Nello specifico, dei 2030 pazienti con JIA, 55 presentavano SIgAD (1:37); tra i 3.694 pazienti con artrite reumatoide, invece, 19 erano affetti da deficit selettivo di IgA (1:194). Quindi il forte incremento del SIgAD nei disordini reumatologici è legato soprattutto alla sua aumentata prevalenza nell'artrite idiopatica giovanile (134). Complessivamente, sembra che circa il 2-4% dei pazienti con artrite idiopatica giovanile abbia anche un DIgA (135). È stata anche riportata un'associazione tra artrite idiopatica giovanile poliarticolare e SIgAD in 13 pazienti con la sindrome da microdelezione 22q11 (sindrome di DiGeorge). La prevalenza complessiva di DIgA di questi pazienti era del 31%, di molto superiore alla prevalenza osservata in una di queste due condizioni (JIA o delezione 22q11) considerate singolarmente, in cui raggiunge valori compresi tra 2 e 4%(136) .

1.4.5 Patologie neoplastiche

L'associazione tra deficit selettivo di IgA e tumori maligni è stata riportata in casi sporadici, soprattutto in età più avanzata. Tale associazione potrebbe riflettere soltanto l'elevata prevalenza del SIgAD nella popolazione caucasica. Tuttavia il SIgAD è associato ad un aumentato rischio di alcuni tumori, come l'adenocarcinoma gastrico(137) e del colon e malattie linfoproliferative (6,138) .

1.5 Diagnosi e indagini di laboratorio

Il deficit selettivo di IgA andrebbe preso in considerazione in pazienti con infezioni ricorrenti del tratto respiratorio e/o gastro-intestinale, allergie e disordini autoimmuni (139,140) . Una valutazione immunologica per SIgAD è giustificata anche in caso di reazione anafilattica a seguito di trasfusione di emoderivati, malattia celiaca e storia familiare di SIgAD o di immunodeficienza comune variabile. Importante è escludere cause di ipogammaglobulinemia secondaria, in particolare farmaci e agenti infettivi che possono determinare riduzione dei livelli serici di IgA (vedi Tab.1). L'inquadramento diagnostico di un sospetto deficit selettivo di IgA dovrebbe comprendere un esame emocromocitometrico completo, la determinazione dei livelli serici di immunoglobuline e di sottoclassi IgG, la tipizzazione linfocitaria (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56) e la valutazione della risposta anticorpale specifica ad agenti proteici e polisaccaridici (es. risposta anticorpale ai vaccini). Secondo i criteri ESID 2015 e PAGID 2015 si fa diagnosi di deficit selettivo di IgA in soggetti di sesso maschile e femminile di almeno 4 anni di età con livelli serici di IgA < 7 mg/dL, ma in presenza di livelli serici di IgM e IgG nella norma per età e di normale risposta IgG ai vaccini, dopo aver escluso cause di ipogammaglobulinemia secondaria. I criteri ESID aggiornati al luglio 2016 aggiungono alla definizione anche l'esclusione di difetti a carico delle cellule T e la necessità di normali livelli per età di immunoglobuline M e G in almeno 2 determinazioni. Si parla invece di SIgAD probabile in caso di valori di IgA inferiori a 2DS ma superiori a 7 mg/dL.

I criteri diagnostici ESID 2016, inoltre, identificano la condizione di “deficit di IgA associato deficit di sottoclassi IgG”, la cui diagnosi si basa sulla presenza di infezioni ricorrenti o gravi (batteriche), IgA seriche indosabili (< 0,7 mg/dL),

in presenza di normali livelli di IgM, livelli di IgG normali / ridotti e livelli ridotti (inferiori al 5° percentile per età) di aumento una sottoclasse IgG (riscontrata in almeno due determinazioni). La risposta vaccinale IgG ad alcuni vaccini è normale e sono esclusi difetti delle cellule T.

Oltre alle indagini finalizzate alla definizione dell'immunodeficit, andrebbero eseguiti test laboratoristici volti alla valutazione delle condizioni cliniche associate, cioè infezioni ricorrenti, allergie, malattie autoimmuni. A questo proposito, il Gruppo di lavoro sulle immunodeficienze italiano raccomanda il dosaggio alla diagnosi di anticorpi transglutaminasi di isotipo G per lo screening della celiachia, la ricerca di ANA, anticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi e il dosaggio delle IgE totali. In assenza di anomalie o di variazioni dell'andamento clinico che suggeriscano la comparsa di problemi autoimmuni o allergici, tali indagini andrebbero ripetute ogni 3 anni durante il follow-up.

1.6 Trattamento

Non esiste terapia specifica per pazienti con deficit selettivo di IgA. In caso di diagnosi accidentale e/o assenza di sintomatologia, non è necessario alcun trattamento. La terapia, infatti, si identifica con quella delle condizioni patologiche associate, dalla cui gravità dipende anche la prognosi. Morgan e Levinsky (141) hanno riportato che più del 50% dei bambini con infezioni ricorrenti diventano asintomatici con la crescita. Malattie autoimmuni, enteropatie e neoplasie rispondono al trattamento come nei soggetti senza immunodeficit associati; tra le malattie allergiche, l'asma bronchiale si

dimostra spesso resistente al trattamento, con prognosi meno favorevole rispetto a quella di soggetti asmatici con normali livelli immunoglobulinici (62). Per quanto riguarda la somministrazione dei vaccini raccomandati nell'età evolutiva, non esiste alcuna controindicazione, anzi il paziente potrà trarne beneficio (56). Nel SIgAD non è indicata la terapia sostitutiva con Immunoglobuline endovena (IVIG) o sottocutanee; il loro utilizzo, tuttavia è suggerito nei rari casi di soggetti con associato deficit della sottoclasse IgG2, qualora presentino infezioni gravi e ricorrenti (142,143). I preparati IVIG contengono vari titoli di IgA, ma preparati IgA-depleti sono facilmente disponibili e sono usualmente ben tollerati, anche in pazienti con alti titoli anticorpali di IgA (62,64).

L'incidenza delle reazioni anafilittiche mediate da autoanticorpi anti-IgA durante trasfusioni di sangue è un evento raro, che si verifica con una incidenza variabile da 1:20.000 a 1:47.000 trasfusioni nei pazienti con SigAD (58) ; secondo altri Autori, tale incidenza è stimata a 1,3 x milione di unità di sangue trasfuso (56). Pertanto, tutti i soggetti con deficit assoluto di IgA devono essere informati sul rischio di reazioni avverse in caso di trasfusione di emoderivati. La loro somministrazione dovrebbe avvenire con cautela e sotto sorveglianza medica, utilizzando preparati a basso contenuto di IgA (11,56) .

Infine, per i bambini con SIgAD e infezioni respiratorie ricorrenti e gravi va presa in considerazione la fisiochinesi respiratoria, nonché una pronta ed adeguata antibiotico-terapia; nei casi sintomatici più gravi può essere indicata profilassi antibiotica continuativa (56).

1.7 Prognosi

Nei pazienti in cui il deficit selettivo di IgA non è associato a patologie clinicamente significative, la prognosi è buona. Essa, infatti, si identifica con quella della patologia eventualmente associata. Mentre il difetto totale di IgA rimane tale per tutta la vita, il difetto parziale si associa frequentemente ad una normalizzazione dei livelli serici di IgA entro i 15 anni di età (62). L'aspettativa di vita è eccellente anche per i soggetti con difetto totale di IgA (62), ma in ogni caso la scoperta casuale di SIgAD in un bambino apparentemente sano impone una valutazione nel tempo. In tali casi bisogna innanzitutto valutare se coesiste un difetto di sottoclassi IgG, predisposizione atopica, malattie gastrointestinale o patologia autoimmune (56). Alcuni Autori hanno riportato che più del 50% dei bambini con infezioni ricorrenti, diventano asintomatici con la crescita (141). Alcuni pazienti con SIgAD, tuttavia, sono predisposti a sviluppare immunodeficienze più severe, come la CVID (in circa il 5% dei casi), che si presenta con il diminuire della produzione di IgM e IgG ed un difetto parziale di immunità cellulo-mediata: proprio per evidenziare tale condizione è consigliato eseguire periodicamente il dosaggio delle immunoglobuline seriche. In rari casi, il deficit selettivo di IgA può rivelare patologie molto severe, come l'atassia-teleangeectasia.

La prognosi del difetto selettivo di IgA è in genere molto buona, purché vengano adottate misure efficienti soprattutto per la prevenzione delle infezioni ricorrenti (57).

1.8 Patogenesi

Nei pazienti con deficit di IgA è di comune riscontro un difetto maturativo delle cellule B (15). Tale difetto sembra coinvolgere le cellule staminali, dato che può essere trasmesso a seguito del trapianto di midollo osseo. Nel SIgAD i linfociti B producono IgA, tuttavia esse hanno un fenotipo immaturo con la coespressione di IgM e IgD e non sono in grado di svilupparsi completamente in plasmacellule IgA-secernenti (144,145). Lo switch isotipico delle cellule B IgM+IgD+ a IgG, IgA e IgE coinvolge una ricombinazione con delezione tra regioni collocate a monte del gene della catena pesante delle immunoglobuline di isotipo M ($C\mu$) e i geni della catena pesante $C\gamma$, $C\alpha$ e $C\epsilon$. Questa ricombinazione richiede due tipi di segnali, il primo fornito dalle citochine e il secondo da membri della famiglia recettoriale dei *Tumor Necrosis Factor Receptors* (TNFRs) espressi sulle cellule B e comprendenti CD40, *Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor* (TACI), *B cell Maturation factor* (BCMA) e *B cell-Activating Factor of the tumor necrosis factor Family* (BAFF-R) (146–148). I due tipi di segnali, citochinico e non, sinergizzano e determinano l'espressione dell'enzima *Activation-Induced cytidine Deaminase* (AID), cruciale per la ricombinazione isotipica. Ligandi per il TACI sono il ligando inducente la proliferazione (APRIL) e il *B-Cell Activating Factor* (BAFF), espressi principalmente da monociti e cellule dendritiche (149,150). APRIL e BAFF legano anche il recettore BCMA, antigene di maturazione dei linfociti B, altro membro della famiglia dei recettori del TNF espresso dalle cellule B. Inoltre BAFF si lega anch' al recettore BAFF-R, espresso anche dalle cellule T (149). I recettori TACI, BAFF-R e BCMA sono espressi principalmente dai linfociti B maturi, e la loro espressione varia in rapporto alla maturazione dei linfociti B (BCMA è stato osservato sulle plasmacellule).

Topi con deficit di BAFF e BAFF-R vanno incontro ad una severa alterazione della differenziazione cellulare e hanno livelli di immunoglobuline seriche molto bassi (151,152). Topi con deficit di APRIL e TACI sono affetti da deficit selettivo di IgA con risposta anticorpale compromessa verso antigeni T-indipendenti (153) (154) (155). L'interazione TACI/ APRIL, specifica delle cellule B, sembra quindi particolarmente implicata nello switch isotipico verso l'isotipo immunoglobulinico A e nella risposta T-indipendente, come schematizzato in figura 5.

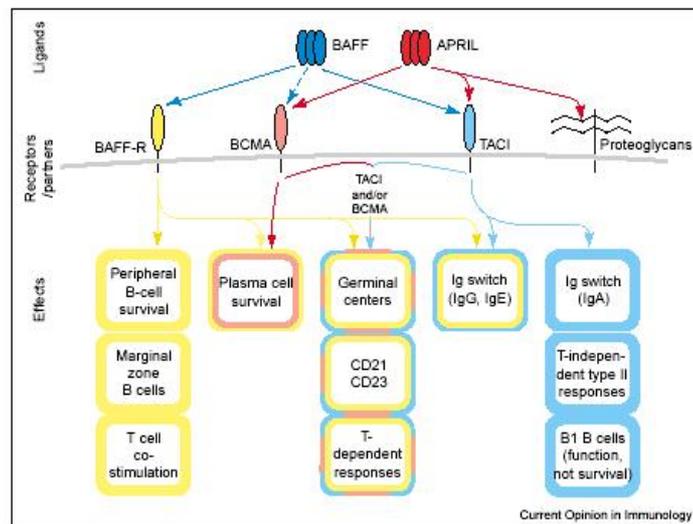


Illustrazione 5: Ligandi specifici (BAFF e APRIL) e funzioni assegnate ai loro recettori (BAFF-R, BCMA e TACI) della cellula B. Le interazioni di BAFF e APRIL con i propri recettori sono mostrati nella parte superiore dell'immagine. Gli "outcome" fenotipici e funzionali dei segnali di BAFF e/o APRIL sono elencati nella parte inferiore della figura (da Mackay & Kalled, 2002)(149)

Alla luce del fatto che APRIL e BAFF inducono lo switch da IgM a IgG e IgA in cellule B umane e murine (149,155), in soggetti con SIGAD e CVID diventa ragionevole la ricerca di varianti genetiche del TACI ed eventualmente dei suoi ligandi.

Castigli e coll (156) , del gruppo di Raif Geha dell'Harvard Medical School di Boston, hanno identificato per la prima volta mutazioni a carico di TACI in soggetti con SIgAD e CVID. I soggetti affetti possono essere eterozigoti, omozigoti o eterozigoti composti; mutazioni in eterozigosi sono presenti anche in individui sani (157) .

Numerosi studi condotti su diverse popolazioni di CVID e SIgAD in Europa e in USA {Formatting Citation} (158,159) hanno confermato che mutazioni in eterozigosi del gene TACI rappresentano un fattore di rischio nello sviluppo di CVID e, sebbene con un ruolo di minor importanza, anche nello sviluppo di SIgAD .

Nel deficit selettivo di IgA, oltre a un difetto intrinseco delle cellule B, sono state osservate disfunzioni delle cellule T helper e delle cellule T regolatorie. Un ruolo nella patogenesi, inoltre, potrebbe essere rivestito da alterazioni dell'ambiente citochinico, in particolare la mancanza di IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TGF- β , IL-21(15) (160) (161) (162) . Borte e coll (162), in uno studio del 2009, hanno evidenziato che la stimolazione con IL-21 induce switch isotipico a IgG e IgA e la differenziazione delle cellule B in plasmacellule IgA e IgG-secerenti, con il ripristino *ex vivo* della produzione immunoglobulinica in pazienti con SIgAD e CVID .

1.8.1 Ereditarietà e genetica

Nel deficit selettivo di IgA non vi è una ben definita suscettibilità genetica e i difetti base che portano allo sviluppo di tale immunodeficit sono ancora oggetto di studio. Nella maggior parte dei casi, il SIgAD sembra essere sporadico; tuttavia alcuni studi evidenziano l'esistenza di casi (7,5-20%) a trasmissione familiare (sia con modalità autosomica dominante che recessiva). I geni

costanti $\alpha 1$ e $\alpha 2$ sono generalmente normali eccetto che in rari casi di catene pesanti con delezioni geniche coinvolgenti vari segmenti sul cromosoma 14 (163). Questo potrebbe essere il caso di pazienti con SIgAD sporadico con associazione di deficit di IgG2, IgG4 e IgE (164) (165). Numerosi studi hanno evidenziato la presenza di alterazioni geniche in comune alla immunodeficienza comune variabile (CVID) (1); tuttavia il ruolo patogenetico di tali alterazioni è ancora da chiarire. In considerazione dei variabili modelli di ereditarietà e della mancata identificazione di un difetto genetico primario, è probabile che il deficit selettivo di IgA sia l'espressione di un gruppo eterogeneo di anomalie genetiche, similmente alla CVID. Esiste una correlazione tra SIgAD e CVID: entrambe queste immunodeficienze possono colpire membri differenti dello stesso albero genealogico, suggerendo che in alcuni casi queste forme rappresentino due estremi di difetti genetici comuni (166). In rari casi si osservano famiglie con trasmissione dominante CVID/SIgAD che presentano frequentemente genitori con CVID e discendenti affetti da SIgAD (167). L'immunodeficienza comune variabile, inoltre, può essere l'evoluzione di un deficit selettivo di IgA (59,60,166,168,169). In entrambi i casi sono state rilevate mutazioni del gene TNFRSF13B, codificante per il recettore TACI, implicato nello switch isotipico delle cellule B (156). Inoltre, nei casi di SIgAD o CVID in individui appartenenti alla stessa famiglia, sarebbe presente la stessa mutazione di TACI. Tuttavia, il ruolo di TNFRSF13B nella patogenesi di SIgAD e CVID rimane da chiarire ed è tuttora oggetto di studio (159) (170). Recentemente è stata evidenziata anche una associazione di SIgAD e CVID con le proteine ICOS (*Inducible T-cell Co-stimulator*) e CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4*). ICOS è fondamentale per lo switch isotipico, mentre CTLA-4 controlla l'attivazione T-cellulare, regolandola negativamente. In particolare, sia in caso di SIgAD che di CVID, vi sarebbe una aumentata

espressione di CTLA-4 e una riduzione dell'espressione di ICOS. Tali alterazioni, inoltre, sarebbero associate anche alla malattia celiaca, come confermato dai dati di numerosi studi europei (171) .

Diversi Autori hanno rilevato l'esistenza di associazione tra SIgAD e alcuni HLA del sistema MHC. Wilton e coll. (172) hanno studiato gli HLA di 17 soggetti appartenenti a 13 famiglie australiane con SIgAD totale o parziale, riscontrando un aumento nella frequenza di HLA-A1, HLA-B8 e HLA-DR3 (172) . La prevalenza di donatori di sangue con SIgAD totale presentanti alplotipi HLA-B8 , DR3 o SC01 è significativamente maggiore (range: 13-37%) rispetto a quella osservata nei non-portatori o nella popolazione di controllo. Si osserva un incremento della frequenza di DIgA solo negli individui omozigoti (13%), al contrario degli eterozigoti (1,7%) o dei non portatori (1,6%), suggerendo quindi una espressione recessiva (167). Studi dimostrano che la frequenza di HLA B8 è più elevata anche nei soggetti con patologie autoimmuni, dato che in parte spiegherebbe l'associazione di tali condizioni con il deficit selettivo di IgA. Uno studio di Hammarström e coll. (173) comprendente numerose famiglie con casi multipli di SIgAD, supporta la presenza di un locus predisponente nella regione MHC della classe II e III (173). Uno studio recente ha mostrato che il deficit selettivo di IgA non sarebbe associato a un distinto alplotipo; piuttosto il rischio verrebbe conferito dall'alplotipo esteso 8.1 (HLA A1, B8, DR3 e DQ2) (87). Altra ipotesi è che l'MHC materno possa influenzare la trasmissione del SIgAD alla prole (173). Il rischio è infatti correlato col genere dei genitori che trasmettono il difetto: esiste una più alta frequenza di ereditarietà madre-figlio, rispetto a quella padre-figlio (174) (175). Uno studio di Vorechovsky e coll. (176) in cui sono state analizzate 101 famiglie con casi multipli di SIgAD e CVID evidenziava che 75 bambini con SIgAD avevano la madre affetta, mentre solo 30 bambini

con SIgAD avevano il padre affetto. Una spiegazione è il possibile passaggio trans-placentare degli anticorpi anti-IgA, che si possono rilevare in bambini con deficit selettivo di IgA (176) .

Tra le altre associazioni riportate dalla letteratura scientifica, vi sono dati a sostegno del ruolo di una sostituzione geneticamente determinata in posizione 57 a carico di HLA-DQ nell'indurre suscettibilità per SIgAD (177). Recentemente, inoltre, è stata dimostrata l'associazione tra SIgAD e una variante aminoacidica del gene IFIH1 (già associato al diabete di tipo 1 e al lupus eritematoso sistemico). IFIH1 codifica per una RNA elicasi indotta da IFN-1 e funziona come un sensore degli acidi nucleici virali, in grado di attivare una risposta innata antivirale mediata dal *Toll-like receptor 3* (TLR-3) (178).

1.9 Il sistema immunitario

(179–181)

L'immunità viene definita come risposta dell'organismo alle sostanze estranee, in particolare agli agenti infettivi.

Il sistema immunitario è costituito dall'insieme di tessuti, cellule e molecole che mediano la resistenza alle infezioni ed è proprio la risposta coordinata di questi elementi contro gli agenti infettivi a determinare la risposta immunitaria.

Il sistema immune riveste molteplici ruoli, sia per le funzioni di difesa nei confronti di infezioni e malattie neoplastiche, sia, per contro, per l'implicazione nella patogenesi delle malattie autoimmuni e nel rigetto di trapianti.

È dunque un sistema complesso che si articola su più livelli. Una prima distinzione da fare è quella tra immunità innata (responsabile della protezione iniziale contro le infezioni) ed immunità adattativa (fase più tardiva ma anche più specifica ed efficace della risposta immunitaria). Le risposte immunitarie innata e adattativa sono parte di un sistema integrato di meccanismi di difesa a cui cooperano numerose cellule e molecole. I meccanismi dell'immunità innata favoriscono una difesa efficace contro le infezioni. Tuttavia, molti agenti patogeni si sono evoluti per resistere all'immunità innata e la loro eliminazione richiede l'intervento dei potenti meccanismi dell'immunità adattativa.

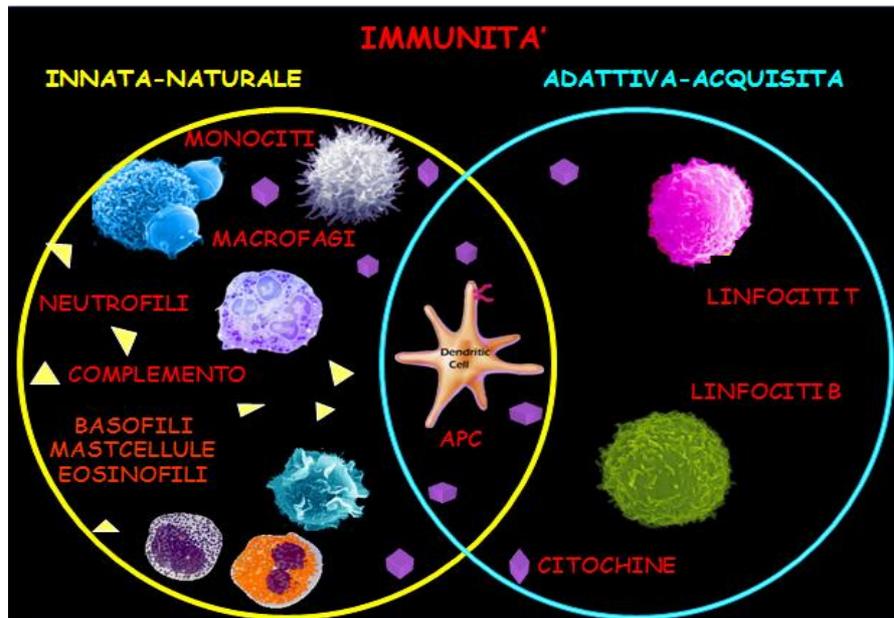


Illustrazione 6: Immunità innata e adattativa

The principal mechanisms of innate and adaptive immunity.

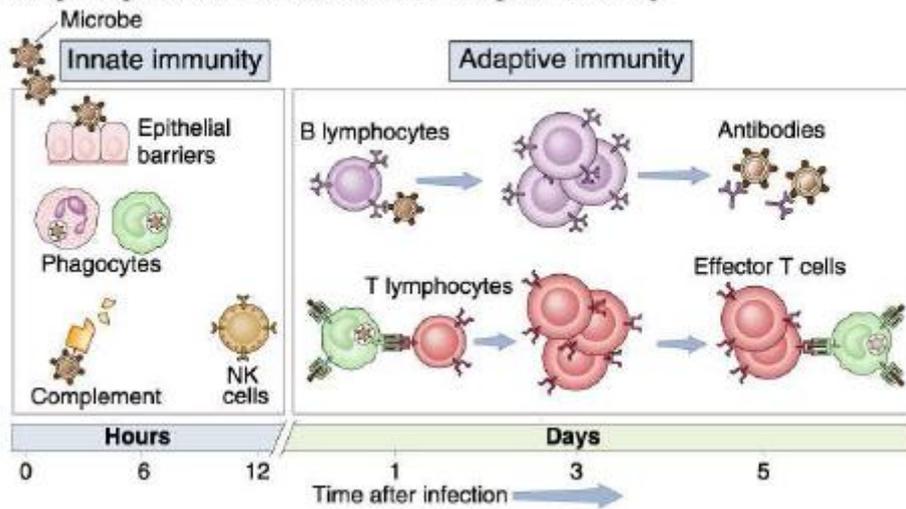


Illustrazione 7: Principali meccanismi dell'immunità innata e adattativa

1.9.1 Immunità innata

L'immunità innata (naturale o aspecifica) è la prima linea di difesa contro i microrganismi. Ha azione immediata (0-4 ore) ed è costituita da tutti quei meccanismi che sono preesistenti e indipendenti dall'esposizione all'agente microbico o a macromolecole estranee (il cui incontro, inoltre, non ne potenzia l'attività). Questo tipo di difesa è universale, filogeneticamente conservato ed è sempre operativo nei soggetti sani, rappresentando un meccanismo potente e precoce, in grado di prevenire, controllare o addirittura di eradicare le infezioni, prima ancora dell'intervento della immunità acquisita (che, peraltro, contribuisce a potenziare). I costituenti dell'immunità innata sono riportati in Tab.3.

COMPONENTI		RUOLO
Barriere epiteliali	Strati epiteliali Peptidi antimicrobici (defensine e catelecidine) Linfociti intraepiteliali Linfociti B1	Prima barriera contro le infezioni: l'integrità delle barriere epiteliali previene l'infezione
Cellule effettrici circolanti	Macrofagi Granulociti (neutrofili, eosinofili e basofili) Cellule NK	Eliminazione dei microrganismi che hanno superato la barriera epiteliale
Proteine effettrici circolanti	Fattori del complemento Lectina legante il mannosio Proteina C reattiva Citochine	

Tabella 3: Componenti dell'immunità innata

Alcuni componenti dell'immunità innata sono costantemente in funzione; ad esempio le superfici epiteliali di cute e mucose (soprattutto di tratto gastrointestinale e vie respiratorie) costituiscono barriere fisiche attive contro

l'ingresso dei microrganismi. Altri sono normalmente inattivi, ma pronti a rispondere rapidamente alla presenza dei microbi, ad esempio i fagociti ed il sistema del complemento.

Barriere epiteliali : le comuni porte di ingresso dei microbi nell'ospite sono costituite da cute, tratto gastro-intestinale e apparato respiratorio. Esse sono protette da un epitelio continuo che, se integro, funge da barriera fisica e chimica (le cellule epiteliali producono peptidi con attività antimicrobica quali defensine e catelecidine) contro le infezioni.

Inoltre gli epiteli contengono i *linfociti intraepiteliali*, appartenenti alla linea linfocitaria T ma esprimono recettori di superficie scarsamente differenziati (di tipo $\gamma\delta$), in grado di riconoscere lipidi, ligandi caratteristici del tessuto in cui risiedono (epiteli), ma espressi solo in seguito ad un'infezione (es. heat shock proteins) ed altre strutture microbiche condivise da microrganismi dello stesso tipo. A differenza dei recettori delle cellule T (TCR) sono molto poco variabili.

A livello della cavità pleurica e peritoneale, inoltre, sono particolarmente rappresentati i linfociti B1. Essi producono immunoglobuline di classe M senza ulteriori segnali costimolatori, ma non sviluppano alcuna forma di memoria immunologica.

Cellule effettrici circolanti : sono soprattutto cellule di derivazione mieloide come i fagociti (monociti-macrofagi, neutrofili), ma comprendono anche alcuni stipiti di tipo linfoide come le cellule NK e i mastociti. Queste cellule esprimono diversi tipi di recettori codificati in linea germinale per riconoscere

microbi, prodotti microbici e sostanze prodotte dall'ospite durante le infezioni:

- *Toll like receptors* (TLR), recettori a singolo segmento transmembrana, espressi da numerose specie cellulari, specifici per il riconoscimento di pattern molecolari stereotipati.
- *Recettori scavenger*
- *Recettori di tipo NOD* (NLR)
- *Recettori per il mannosio*
- *Integrine*: per il legame con le selectine espresse a livello endoteliale e diapedesi a livello tissutale
- *Recettori per il frammento cristallizzabile (invariante) delle immunoglobuline* (*FcγR*, *FcεR*): potenziano la specificità e l'ampiezza del riconoscimento antigenico delle cellule dell'immunità innata, grazie al legame ad anticorpi opsonizzanti specifici. Ovviamente questo meccanismo non funziona come prima linea di difesa, a meno che un soggetto non sia già stato esposto ad un antigene e sia quindi già dotato di immunoglobuline specifiche.
- *Recettori per il complemento* (CR)

Neutrofili e monociti circolanti migrano nella sede extravascolare di infezione in seguito al legame con molecole di adesione espresse dall'endotelio (E-selectina e P-selectina) in risposta a citochine (IL-1 e TNF) e fattori chemotattici prodotti localmente dai macrofagi residenti a seguito dell'incontro con il microrganismo. Il riconoscimento dei microbi da parte dei fagociti ne determina la fagocitosi e l'uccisione a livello intracellulare attraverso la produzione di ROS, monossido di azoto ed enzimi litici.

Altri granulociti: oltre ai neutrofili, vanno considerati costituenti dell'immunità innata anche i granulociti eosinofili (controllano reazioni immunitarie IgE-mediate come infezioni elmintiche o allergie) e basofili (svolgono funzioni simili ai mastociti e con le medesime modalità di attivazione; sono presenti in numero molto esiguo rispetto alle altre popolazioni cellulari).

Cellule natural killer (NK): sono una classe linfocitaria che riconosce le cellule dell'ospite alterate in seguito a infezione microbica e che risponde ai microrganismi intracellulari con l'uccisione delle cellule infette (meccanismi citotossici che culminano nell'induzione di apoptosi) e con la produzione di IFN- γ che attiva le funzioni microbicide dei macrofagi.

Il riconoscimento delle cellule infettate da parte delle cellule NK è regolato da una combinazione di:

- *recettori attivatori*: riconoscono molecole della superficie cellulare, espresse dalle cellule infettate da microrganismi intracellulari o dai fagociti che li albergano;
- *recettori inibitori*: riconoscono le cellule normali dell'ospite mediante il legame con vari alleli delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I, proteine self espresse sulla superficie delle cellule nucleate di ciascun individuo.
 - *Recettori omologhi alle lectine di tipo C*, costituenti il complesso del recettore NK (NKC).
 - *Recettori con domini immunoglobulinici* (KIR: Killer cells Immunoglobulinic Receptors).

Le cellule NK esprimono inoltre recettori per la Fc di alcune sottoclassi delle IgG e utilizzano questi recettori per legare le cellule opsonizzate dalle immunoglobuline: di fatto l'anticorpo fa da ponte tra NK e la cellula che deve uccidere.

Mastociti: cellule di derivazione mieloide residenti nei tessuti connettivi e dotate di granuli di istamina, eparina e numerosi altri fattori infiammatori. Questi granuli vengono rilasciati in grande quantità in risposta a stimoli immunogenici riconosciuti da TLR o da FcεR (questi ultimi fondamentali per le reazioni di tipo allergico). Si ritiene che i mastociti siano spesso il trigger iniziale dell'infiammazione.

Proteine effettrici circolanti : fattori del complemento, lectina legante il mannosio, proteina C reattiva e mediatori solubili (citochine di derivazione macrofagica).

Il sistema del complemento è costituito da numerose proteine circolanti e di membrana attivate dai microrganismi. Molte di queste proteine sono enzimi proteolitici e l'attivazione del complemento ne comporta l'attivazione sequenziale, dando origine ad una cascata enzimatica. I prodotti di attivazione del complemento promuovono la fagocitosi e l'uccisione dei microbi e inducono una risposta infiammatoria. Si riconoscono tre vie: via alternativa e via lectinica, più propriamente di pertinenza dell'immunità innata; la via classica, invece, di competenza dell'immunità adattativa.

- *Alternativa* : si attiva quando alcune proteine del complemento sono attivate sulla superficie microbica.

- *Lectinica*: si attiva quando la lectina legante il mannosio (proteina plasmatica) si lega a residui terminali di mannosio sui glicoproteine della superficie batterica.
- *Classica*: è attivata a seguito del legame di anticorpi ad antigeni, perciò costituisce una componente della immunità acquisita di tipo umorale.

Le citochine dell'immunità innata mediano molte delle reazioni cellulari dell'immunità innata, in particolare reclutano e attivano i leucociti (IL-1, TNF) provocando anche alterazioni sistemiche, quali l'aumento della sintesi di cellule effettrici e la produzione di proteine che potenziano la risposta antimicrobica. Nell'immunità innata, le principali fonti di citochine sono i macrofagi attivati a seguito al riconoscimento di microrganismi.

Tutti i meccanismi dell'immunità innata reagiscono solo ai microbi e non a sostanze non infettive e tale risposta è sostanzialmente identica per infezioni ripetute (a differenza del sistema adattativo che risponde in maniera sempre più efficiente ad ogni successivo contatto con lo stesso patogeno). Caratteristica fondamentale dell'immunità innata è, infatti, è la capacità di rispondere immediatamente ad un vasto numero di agenti patogeni, grazie al riconoscimento di un limitato numero di strutture molecolari condivise da varie classi di microbi, ma che sono assenti sulle cellule dell'ospite (distinzione tra self e non self). Si parla di “profili molecolari associati ai patogeni” (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, **PAMPS**) e i recettori che legano tali strutture sono definiti “recettori per il riconoscimento dei profili” (*Pattern Recognition Receptors*, **PRR**), in particolare i Toll-like Receptors, TLR. I PAMPS sono estremamente diffusi in natura (come lipopolisaccaride batterico

-LPS-, glicani ricchi in mannosio, molecole di RNA a doppio filamento, sequenze CpG non metilate etc.) e spesso essenziali per la sopravvivenza e virulenza del microrganismo stesso: un microbo, pertanto, non può eludere i meccanismi dell'immunità innata semplicemente mutando o non esprimendo i suoi bersagli di riconoscimento poiché ciò ne comprometterebbe la sopravvivenza o comunque la capacità di infettare e colonizzare l'ospite.

La rapidità di riconoscimento e di risposta difensiva propria dell'immunità naturale è legata al fatto che i recettori coinvolti nei meccanismi di riconoscimento sono presenti uniformemente su tutti i suoi componenti e sono completamente codificati geneticamente e non prodotti mediante processi maturativi di tipo epigenetico (ricombinazione somatica), a differenza della immunità adattativa. Tuttavia il prezzo da pagare per tale velocità e semplicità è costituito da una *efficacia non sempre ottimale nella eliminazione di numerosi agenti patogeni* (dotati, ad esempio, di profili molecolari leggermente diversi da quelli verso cui si è evoluta l'immunità innata) e dall'*incapacità di adattarsi ai meccanismi sviluppati dai microrganismi per eludere tale difesa*. Comunque, oltre a fornire una precoce difesa contro le infezioni, le risposte immunitarie innate forniscono anche “secondi segnali” necessari per l'attivazione dei linfociti T e B (immunità adattativa). Questi secondi segnali assicurano che l'immunità acquisita sia evocata da agenti infettivi e non da sostanze non infettive.

1.9.2 Immunità adattativa

L'immunità adattativa (o acquisita o aspecifica), a differenza di quella innata, è stimolata dagli agenti infettivi che invadono l'ospite e viene quindi “acquisita” solo a seguito dell'incontro con essi.

La maturazione dell'immunità specifica si svolge prevalentemente durante il primo anno di vita, anche se in realtà prosegue per tutta la vita dell'individuo. È caratterizzata da elevata specificità (capacità di riconoscere e rispondere a molti microrganismi di diversa natura) e specializzazione (le risposte sono ottimizzate per la difesa da un dato tipo di patogeno). Mentre i meccanismi dell'immunità innata riconoscono strutture condivise da diverse classi di microbi, le cellule dell'immunità adattativa (linfociti) esprimono recettori che riconoscono specificamente sia diverse sostanze di origine microbica che molecole non infettive e che prendono il nome di *antigeni*.

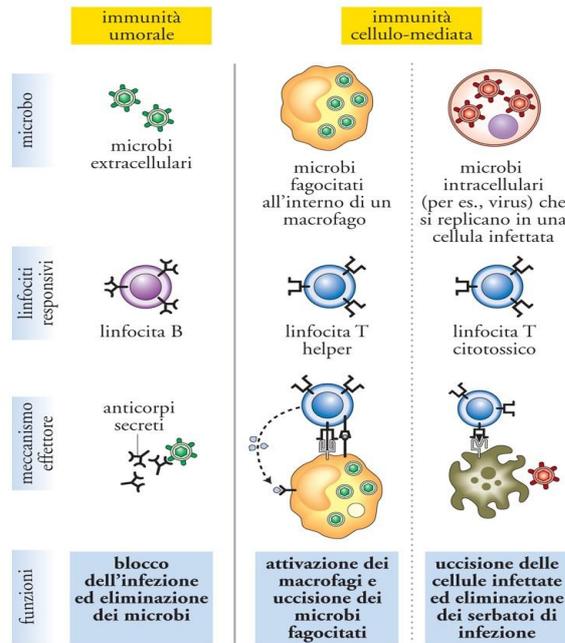
La risposta adattativa, inoltre, aumenta di intensità, rapidità ed efficacia ad ogni successivo contatto con lo stesso patogeno (memoria). Altre caratteristiche peculiari sono la possibilità di una espansione clonale (che consente di fronteggiare la veloce proliferazione microbica) e la non reattività verso antigeni autologhi. Il sistema immunitario deve poter essere "istruito" a riconoscere il self dal non self per rendere più efficace la risposta alle aggressioni e prevenire l'autoimmunità (sebbene alcune reazioni autoimmuni controllate siano parte della fisiologia della risposta immunitaria stessa). I fenomeni di controllo dell'autoimmunità vengono definiti *tolleranza* e si svolgono negli organi linfoidi primari (*tolleranza centrale*) durante la maturazione delle cellule del sistema immunitario e in periferia al termine di questo processo (*tolleranza periferica*). La risposta immunitaria acquisita spesso utilizza meccanismi dell'immunità innata per eliminare gli agenti infettivi.

L'immunità adattativa è distinguibile in due branche principali:

- **immunità umorale** : è mediata da molecole presenti nel sangue e nelle secrezioni mucosali, chiamate anticorpi, prodotte dai linfociti B. I

linfociti B (attivati a plasmacellule) secernono anticorpi che prevencono le infezioni ed eliminano i microorganismi extracellulari. Gli anticorpi sono inoltre diretti contro tossine e antigeni polisaccaridici: essi, infatti, sono in grado di riconoscere tipi differenti di molecole, tra cui proteine carboidrati e lipidi.

- **immunità cellulare** (o cellulo-mediata): è mediata dai linfociti T. I linfociti T helper (CD4+) attivano i fagociti a uccidere i microorganismi fagocitati; i linfociti T citotossici (CD8+) o CTL uccidono direttamente le cellule che albergano l'agente infettivo. Le cellule T, inoltre stimolano la secrezione di tutta una serie di citochine, che influenzano la funzionalità delle altre cellule coinvolte nelle risposte immunitarie specifiche e naturali. È quindi la branca dell'immunità adattativa che entra in gioco per contrastare i microorganismi intracellulari (es. virus, batteri intracellulari o microorganismi fagocitati) ma anche cellule tumorali che esprimono antigeni tumorali. I linfociti T, a differenza dei linfociti B e degli anticorpi, riconoscono solo antigeni proteici.



Paul 2003: Fundamental immunology, 5. ed., edited by William E. Paul, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2003

Illustrazione 8: Immunità adattativa

L'immunità adattativa può essere indotta in un individuo mediante infezione o vaccinazione (immunità attiva) oppure attraverso il trasferimento di anticorpi o linfociti da un individuo attivamente immunizzato (immunità passiva).

Cellule del sistema immunitario adattativo

Le cellule dell'immunità acquisita appartengono soprattutto alla linea linfoide (linfociti T e B); oltre a queste vi sono le cellule accessorie o cellule che presentano l'antigene (APC "antigen presenting cell") e le cellule effettrici che eliminano i microrganismi (macrofagi, granulociti ma anche gli stessi linfociti)

Linfociti

I linfociti sono le uniche cellule dotate di recettori specifici per l'antigene e rappresentano la componente centrale della immunità adattativa.

Attualmente vengono differenziati sulla base dell'espressione di proteine di superficie (“CD” cioè cluster differenziativo) che possono essere identificate tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali.

Tutti i linfociti originano da cellule staminali presenti nel midollo osseo e vanno incontro al processo maturativo a livello degli organi linfoidi primari (germinativi o centrali, cioè midollo osseo e timo): i linfociti B nel midollo osseo; i linfociti T nel timo. I linfociti maturi, detti a questo punto “naïve” (o vergini), entrano in circolo e negli organi linfoidi secondari o periferici (linfonodi, milza, tessuto linfoide associato a cute e mucose), che rendono possibile la concentrazione in un unico sito degli antigeni, delle APC e dei linfociti, in modo da ottimizzarne le interazioni.

All'interno degli organi linfoidi secondari, i linfociti T e B sono segregati in diversi compartimenti anatomici

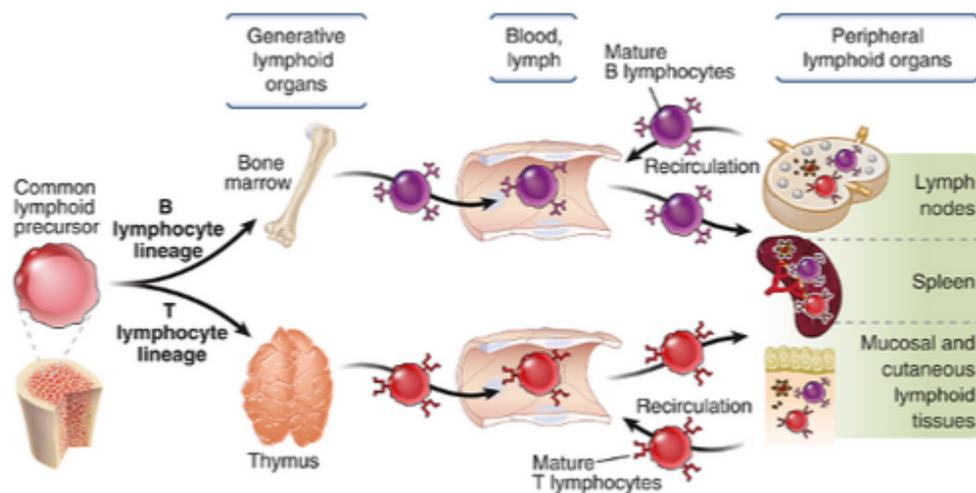
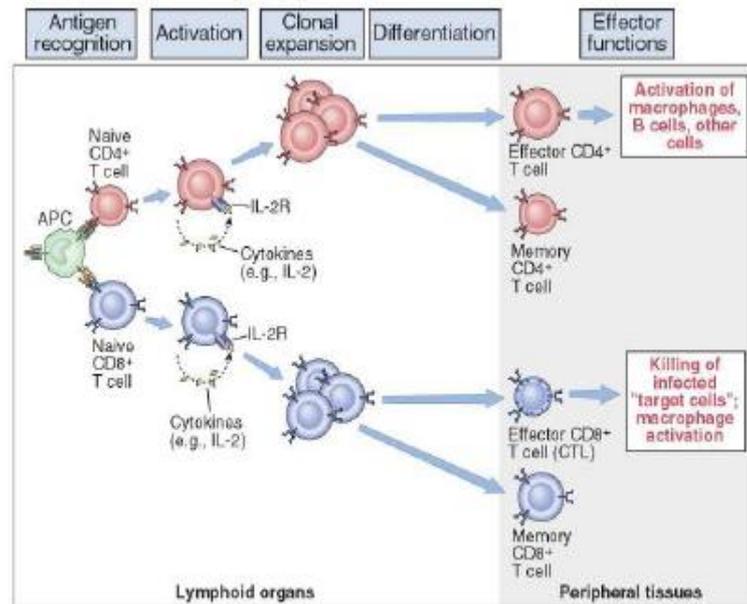


Illustrazione 9: Linfociti

- I *linfociti T* sono le cellule che entrano in gioco nella immunità cellulo-mediata. Si formano nel timo a partire da precursori midollari immaturi. A livello del timo avviene la loro maturazione e l'eliminazione

dei cloni reattivi contro gli antigeni self. I T naïve raggiungono gli organi linfoidi secondari, distribuendosi in determinati compartimenti anatomici, separati dai linfociti B: area paracorticale linfonodale e zona paracorticale splenica.

È a livello degli organi linfoidi secondari che avviene l'incontro con l'antigene. Il riconoscimento avviene mediante il TCR, recettore in grado di riconoscere esclusivamente frammenti peptidici delle proteine antigeniche. Essi sono legati alle MHC (molecole del complesso maggiore di istocompatibilità), molecole espresse sulla superficie delle APC, cellule specializzate nella presentazione dell'antigene. L'attivazione del linfocita T (Fig. 10) avviene grazie al legame TCR-antigene, all'interazione tra MHC di classe I o II e, rispettivamente CD8 o CD4 e l'interazione tra i corecettori dei linfociti T (CD28 e CD40L) con i costimolatori (B7-1 o CD80, B7-2 o CD86; CD40) espressi dalle APC. Tali interazioni portano all'attivazione della trascrizione genica, con proliferazione linfocitaria dei linfociti antigene-specifici (espansione clonale) e differenziazione della loro progenie in cellule effettrici e cellule della memoria.



W.B. Saunders Company items and derived items copyright © 2002 by W.B. Saunders Company.

Illustrazione 10: Attivazione dei linfociti T

I linfociti T *effettori* sono in grado di eliminare i microrganismi (direttamente o mediante attivazione di altre popolazioni cellulari, come macrofagi e linfociti B). Una quota di essi rimane a livello linfonodale, dove oltre ad eliminare eventuali cellule infettate in tale sede può anche fornire segnali costimolatori ai linfociti B per promuovere una risposta umorale; altri entrano nel torrente circolatorio e migrano nei focolai di infezione.

I linfociti T *della memoria* sono cellule funzionalmente inattive che possono sopravvivere a lungo (mesi o anni) in circolo, nei tessuti linfoidei e nelle barriere epiteliali delle mucose, pronti a rispondere tempestivamente in caso di reinfezione. Un sottogruppo detto “cellule della memoria centrali” albergano nei tessuti linfoidei e sono responsabili della rapida espansione clonale dopo riesposizione all'antigene; un altro sottogruppo, le “cellule effettrici della memoria” è localizzato a livello del

tessuto mucoso e media la rapida attivazione delle funzioni effettrici in caso di reintroduzione dell'antigene in tali siti.

Una volta eliminato l'agente patogeno si verifica la morte del clone espanso, poiché vengono eliminati tutti quegli stimoli che hanno determinato espansione e differenziazione dei linfociti T

In base al meccanismo d'azione e della funzione svolta è possibile distinguere le principali sottopopolazioni linfocitarie T:

- *Linfociti T CD4⁺ o helper*: sono linfociti ristretti per MHC II (che esprime peptidi derivati da proteine extracellulari processate da APC con proteolisi endolisomiale). Le cellule effettrici T CD4⁺ rispondono all'antigene producendo molecole di superficie e citochine che agiscono principalmente attivando macrofagi e linfociti B. A seconda dell'ambiente citochinico, inoltre, si viene a determinare una diversa risposta, che consente di far fronte in maniera differenziata a diversi microrganismi. Esistono infatti diversi fenotipi di linfociti T helper:
 - T_H1: se un linfocita T CD4⁺ incontra l'antigene in presenza di IL-12 (prodotta dalle APC) esso diventerà una cellula di tipo 1. I T_H1 producono principalmente IFN- γ e stimolano i fagociti a eliminare i microbi intracellulari. Inoltre stimolano la produzione di anticorpi opsonizzanti (cioè anticorpi che si fissano alla superficie microbica per favorirne la fagocitosi) e leganti il complemento.
 - T_H2: il linfocita T helper si differenzia in T di tipo 2 quando lo stimolo antigenico si verifica in assenza di IL-12. In tal caso il

linfocita T produce IL-4 e si differenzia in T_H2 mediante stimolazione autocrina. I linfociti T_H2 producono soprattutto IL-4 che stimola la produzione di IgE e IL-5 che attiva gli eosinofili. Quindi stimolano una risposta immunitaria mediata dagli eosinofili (ma anche mastociti e basofili) e indipendente dai fagociti, particolarmente efficace contro le infezioni da elminti ed implicata nelle risposte allergiche. Le cellule T_H2 , inoltre, inibiscono i meccanismi di difesa intracellulare grazie alla produzione di IL-4, IL-10, IL-13 che inibiscono i macrofagi e sopprimono l'immunità cellulare mediata dai T_H1 .

- T_H17 : devono il nome alla produzione di IL-17. Il loro principale induttore è IL-23. L'interleuchina 17 induce il reclutamento e l'attivazione dei neutrofili. Le cellule T_H17 intervengono nella risposta immunitaria verso batteri (soprattutto extracellulari) e funghi. Recentemente è stato dimostrato che le cellule $CD4+$ produttrici di IL-17 rivestono un ruolo importante anche nella complessa risposta immunitaria anti-micobatterica. Hanno inoltre un ruolo fondamentale nella patogenesi di alcune malattie infiammatorie croniche, come l'asma allergico, e sembrerebbe anche nel danno cellulo-mediato di alcune malattie autoimmuni, fra cui psoriasi, granulomatosi di Wegner, artrite reumatoide, sclerosi multipla, LES, sindrome di Sjogren, morbo di Crohn e colite ulcerosa (182).
- *Linfociti T $CD8^+$* o citotossici (CTL): riconoscono peptidi derivati da antigeni proteici intracellulari e presentati da MHC I (espresse da tutte le cellule nucleate del nostro organismo). La funzione di CTL è

quella di uccidere le cellule infettate, mediante esocitosi di granuli contenenti perforina (che forma pori sulle membrane delle cellule bersaglio) e granzimi (enzimi che penetrano nella cellula mediante i pori formati dalle perforine e attivano le caspasi citoplasmatiche e quindi la cascata apoptotica). Altro meccanismo con cui i CTL inducono l'apoptosi della cellula infetta è l'espressione del Fas ligando (FasL) che interagisce con il recettore Fas espresso sulla superficie della cellula bersaglio. Le cellule morte per apoptosi sono poi rapidamente fagocitate ed eliminate: i linfociti T CD8+, infatti, secernono anche IFN- γ , che potenzia l'azione macrofagica e stimola il richiamo di ulteriori leucociti.

- *T regolatrici* o *T suppressor* : sono coinvolte nei processi di regolazione e di spegnimento della risposta immunitaria, contribuendo alla tolleranza periferica al self. Producono citochine come IL-10 e TGF- β , che inibiscono la funzione macrofagica e delle APC. Tale regolazione è alterata nei processi autoimmuni; al contrario è sfruttata dalle cellule tumorali per eludere il sistema immunitario. La maggior parte dei linfociti T regolatori è costituita da linfociti T CD4+ che esprimono elevati livelli di CD25.
- *Linfociti B*: sono le uniche cellule in grado di produrre anticorpi, pertanto rappresentano la componente cellulare centrale della risposta umorale. Esprimono sulla superficie cellulare il recettore BCR e le immunoglobuline (IgM e/o IgD a seconda dello stadio maturativo).

Originano da precursori midollari (Linfociti B immaturi: IgM+ e IgD-) e maturano nel midollo osseo per poi migrare come linfociti B naïve (IgM+

e IgD+) a livello degli organi linfoidi secondari, dove si localizzano in specifici compartimenti anatomici: i follicoli a livello della zona periferica (o corticale) del linfonodo o nella milza. Se i linfociti B presenti in un follicolo hanno risposto recentemente ad una stimolazione antigenica, all'interno del follicolo è distinguibile una regione nota come “*centro germinativo*”. A livello del follicolo sono presenti le cellule dendritiche follicolari (APC), coinvolte, appunto nella attivazione dei linfociti B grazie alla presentazione dell'antigene e nella loro segregazione in tali sedi, mediante la produzione di chemochine.

I linfociti B naïve riconoscono gli antigeni, ma non secernono anticorpi. In seguito alla stimolazione antigenica, si ha l'espansione clonale delle cellule antigene-specifiche e la loro differenziazione in cellule effettrici: *plasmacellule* (che secernono attivamente anticorpi) e *linfociti B della memoria*. In questo processo di attivazione del linfocita B, oltre alla stimolazione antigenica, intervengono altri segnali stimolatori (“secondo segnale”, spesso prodotto durante le reazioni dell'immunità innata) e, in caso di antigeni proteici, anche l'interazione con i T helper (risposta “T-dipendente”). Polisaccaridi, lipidi e altri antigeni non proteici sono invece chiamati “T-indipendenti”, in quanto inducono risposta anticorpale senza l'aiuto dei linfociti T.

La risposta di tipo umorale dei linfociti B, infatti, può essere distinta in *T-dipendente*, diretta verso gli antigeni proteici, e *T-indipendente*, rivolta verso gli antigeni non-proteici (polisaccaridici, lipidici etc.).

Nella risposta *T-indipendente* antigeni non proteici determinano una risposta anticorpale senza l'interazione tra linfociti B e linfociti T-helper. Tali antigeni, infatti, contengono epitopi identici che sono ripetuti e che sono in grado di formare un legame crociato con molti

recettori Ig, fornendo segnali che sono sufficienti ad attivare linfociti B anche in assenza dei T helper. La popolazione cellulare B che si attiva in questo caso è una popolazione linfocitaria specifica, nota come B-1, localizzata nella zona marginale della milza o derivante da cellule staminali che incontrano l'antigene a livello di peritoneo e mucose.

Nella *risposta T-dipendente*, linfociti B e linfociti T helper specifici per un dato antigene devono incontrarsi all'interno degli organi linfoidei (ai margini del follicolo) e interagire per stimolare la proliferazione e la differenziazione delle cellule B. I linfociti T helper CD4⁺, una volta attivati e differenziati in cellule effettrici a seguito della interazione con le APC, in parte entrano in circolo e incontrano gli antigeni in sede periferica ed eliminano i microrganismi tramite i meccanismi dell'immunità cellulo mediata; altri migrano verso i margini dei follicoli linfoidei. Contemporaneamente, i linfociti B, anch'essi stimolati dall'antigene, iniziano a migrare verso il margine esterno del follicolo. Tale migrazione delle cellule T e B l'una verso l'altra dipende dalla variazione nell'espressione di recettori per le chemochine sulla superficie dei linfociti attivati e dalla produzione delle chemochine leganti tali recettori a livello di follicoli e zone T-dipendenti del linfonodo.

I linfociti B si comportano da APC nei confronti degli antigeni che riconoscono, cioè legano l'antigene proteico tramite il loro recettore, lo fagocitano, lo processano all'interno di vacuoli endosomiali e lo presentano sulle molecole MHC di classe II ai linfociti T helper CD4⁺. Linfociti T e B, quindi, riconoscono diversi epitopi della stessa proteina antigenica, garantendo una risposta antigene-specifica. I linfociti B, inoltre, possono esprimere anche molecole costimolatorie (es. molecole B7 che si legano al CD28 espresso dalle cellule T) che stimolano i

linfociti T helper cui hanno presentato l'antigene . A loro volta, tali linfociti T helper attivano i linfociti B con cui interagiscono mediante la secrezione di citochine e l'espressione del CD40L, cioè il ligando del CD40 espresso dai linfociti B; tale legame stimola sia l'espansione clonale dei linfociti B che sintesi, scambio isotipico, maturazione dell'affinità e secrezione delle immunoglobuline. Tali effetti sono incrementati anche dal legame tra le citochine prodotte dai linfociti T helper e i loro recettori espressi dai linfociti B.

Una volta attivati i linfociti B ritornano nel follicolo, dove, in seguito alla reazione del centro germinativo, si ha la produzione di plasmacellule e cellule della memoria.

La *plasmacellula* (o plasmocita) è un linfocita B effetore deputato alla secrezione anticorpale. Essa si differenzia a partire dalla cellula B a seguito della stimolazione antigenica.

Gli anticorpi secreti dalle plasmacellule sono inizialmente IgM e possiedono la stessa affinità del recettore di membrana che ha riconosciuto originariamente l'antigene. Durante la loro differenziazione, alcune cellule B possono dare inizio alla produzione di diverse classi (o isotipi) anticorpali, che mediano le diverse azioni effettrici e sono specializzati nel combattere i diversi tipi di microrganismi. Inoltre, l'esposizione ripetuta a un dato antigene (soprattutto proteico) porta alla produzione di anticorpi con aumentata affinità (“maturazione dell'affinità”). Nei processi di scambio isotipico e maturazione dell'affinità gioca un ruolo fondamentale l'interazione dei linfociti B con i T helper, per cui sono entrambi relativamente scarsi nelle risposte anticorpali T-indipendenti.

I *linfociti B della memoria* originano durante la risposta anticorpale primaria (cioè alla prima infezione da parte di un dato microrganismo). Il primo contatto tra un linfocita B maturo e l'antigene è seguito nelle successive 48-72 ore da uno stadio di raccolta delle informazioni necessarie alla sintesi dell'adeguato anticorpo (periodo induttivo). Una volta trascorso questo lasso di tempo, il linfocita B maturo si divide per mitosi, producendo una plasmacellula ed una cellula della memoria. La plasmacellula secerne una grande quantità di anticorpi, ma muore dopo circa 7 giorni. La cellula della memoria invece ha la capacità di sopravvivere anche per tutta la vita. Esse non secernono anticorpi, ma circolano e sopravvivono per mesi o anni in assenza di una esposizione all'antigene e sono invece pronte a rispondere rapidamente in caso di nuovo contatto (risposta anticorpale secondaria). Nella risposta anticorpale secondaria, i linfociti B della memoria sono attivati per produrre grandi quantità di anticorpi, in numero superiore rispetto alle risposte primarie, spesso (in caso di antigeni proteici) manifestando fenomeni di scambio isotipico e maturazione dell'affinità. Quindi le risposte primarie e secondarie differiscono quantitativamente e qualitativamente tra loro (Fig 11).

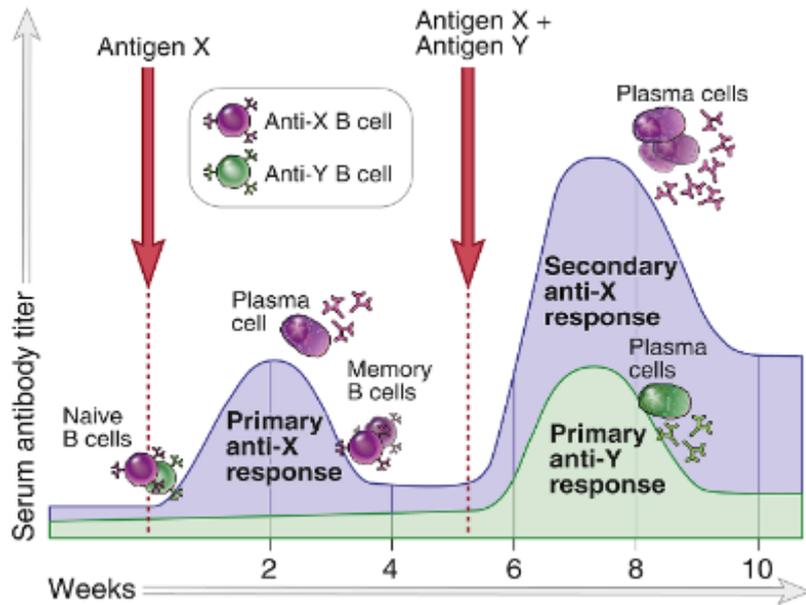


Illustrazione 11: Risposta anticorpale primaria e secondaria

APC

Sono cellule specializzate nella cattura degli antigeni penetrati attraverso cute, tratto gastro-intestinale e tratto respiratorio, nel loro trasporto ai tessuti linfoidi secondari e nella presentazione ai linfociti T.

A livello degli organi linfoidi secondari i frammenti antigenici vengono esposti sulla membrana delle APC, consentendone il riconoscimento da parte dei linfociti T. A seguito di tale incontro (“primo segnale”), le APC professionali, attivate dai microrganismi, forniscono “secondi segnali” (espressione di proteine di membrana costimolatorie e secrezione di citochine) necessari a stimolare proliferazione e differenziazione dei linfociti T. Ciò consente l’attivazione dei linfociti T solo in risposta ad antigeni microbici e non a sostanze innocue.

Vi sono sia APC localizzate a livello di epitelii e mucose che residenti nei linfonodi e nella milza.

Le APC cosiddette “professionali” sono in primis cellule dendritiche, ma anche macrofagi, cellule dendritiche follicolari e linfociti B.

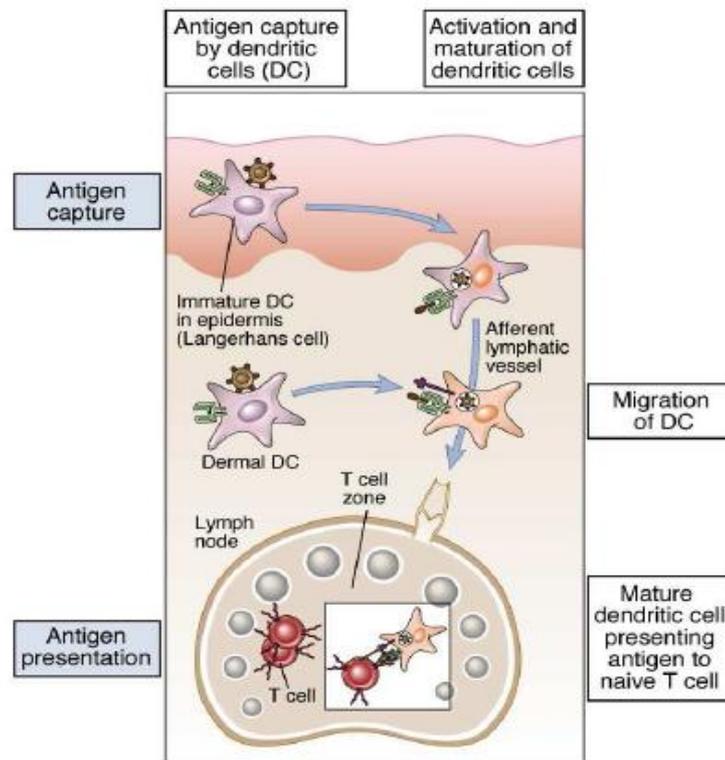


Illustrazione 12: Cattura e presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche

Le *cellule dendritiche* originano nel midollo osseo, colonizzano i tessuti in cui risiedono dove svolgono attività di fagocitosi mediata da numerosi recettori: catturano le proteine antigeniche e le degradano per proteolisi. A livello degli organi linfoidi secondari, i frammenti antigenici derivati dalla digestione delle sostanze fagocitate vengono legati a molecole MHC di classe II e con esse esposte a livello della membrana cellulare, consentendo il riconoscimento da

parte dei linfociti T (primo segnale). Contemporaneamente, l'attivazione delle cellule dendritiche da parte dei microrganismi porta ad una aumentata produzione ed espressione delle molecole MHC-II, di citochine e di altre molecole costimolatorie di membrana (secondo segnale).

Se l'antigene viene riconosciuto dal TCR, il legame viene dapprima rinsaldato grazie al recettore CD4 e successivamente dal dall'interazione tra il costimolatore CD28 sulla membrana del linfocita T e la molecola B7 sulla cellula dendritica. A seguire, nel linfocita T si innescano i processi di attivazione, primo fra tutti la produzione di interleuchina 2 (IL-2), che ne amplifica l'attivazione e ne determina la proliferazione. Inoltre si verifica anche la produzione di CTLA-4 (CD152), ligando del B7, con affinità maggiore di CD28, ma con attività inibitoria. Un linfocita T che interagisce con una APC, ma che non riconosce l'antigene, non viene stimolato e uscirà dal linfonodo per rientrare in circolo, così come un linfocita T che riconosce un antigene su una APC non attivata (cioè priva di molecole costimolatorie) riceve solo un segnale inibitorio dal CTLA-4.

Le cellule follicolari dendritiche presentano antigeni ai linfociti B presenti nei centri germinativi nelle risposte umorali. Nel corso della risposta immunitaria, selezionano i linfociti B dotati di maggiore affinità.

I *macrofagi*, con processi analoghi a quelli delle cellule dendritiche, ma con minor efficienza, sono molto attivi nel presentare antigeni di tipo batterico.

I *linfociti B*, invece, grazie alle immunoglobuline di membrana, captano antigeni solubili (es. tossine) e li processano per endocitosi legandoli agli MHC-II. L'antigene viene quindi presentato ai linfociti T helper, che vengono

attivati grazie all'espressione di molecole costimolatorie (es B7) da parte delle stesse cellule B.

Le APC rappresentano un punto in comune tra immunità innata e immunità adattativa, determinando l'attivazione di entrambe le vie una volta entrate in contatto con l'antigene.

Le immunoglobuline

Le immunoglobuline (anticorpi) sono molecole glicoproteiche prodotte dalle plasmacellule che svolgono un ruolo centrale nella immunità specifica umorale. Possono esistere come recettori di membrana sulla superficie dei linfociti B o come proteine secrete, presenti nel sangue e nelle secrezioni mucose.

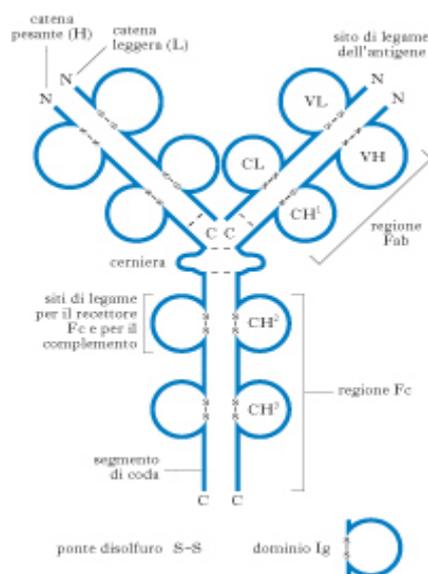


Illustrazione 13: Struttura immunoglobulinica

Una molecola anticorpale è costituita da quattro catene polipeptidiche: due catene pesanti (H) identiche tra loro e due catene leggere (L) anch'esse identiche tra loro. Le quattro catene sono assemblate simmetricamente a formare una struttura a forma di "Y", cioè con un gambo centrale (rappresentato da una porzione delle due catene pesanti, le quali non sono legate tra di loro) e due bracci laterali (costituiti ciascuno da una catena leggera legata con ponti disolfuro covalenti ad un'altra porzione di catena pesante).

Ciascuna catena contiene una regione variabile (V) aminotermine e una regione costante (C) carbossiterminale: una catena leggera è costituita da un dominio C (C_L) e un dominio V (V_L); nelle catene pesanti, invece, vi sono tre o quattro domini C ($C_{H1,2,3,4}$) e un solo dominio V (V_H).

Le regioni V_H e V_L formano il sito di legame per l'antigene ed è proprio tale possibilità di variabilità a rendere specifico il legame con l'antigene. Ciascuna regione variabile, sia della catena pesante che della catena leggera, inoltre, contiene tre regioni cosiddette ipervariabili (CDR, "regioni determinanti la complementarità"), cioè tratti della catena polipeptidica in cui si riscontrano le maggiori variabilità aminoacidiche e che pertanto svolgono un ruolo chiave nel conferire a ciascun anticorpo la specificità unica verso un antigene. Vi sono complessivamente sei regioni ipervariabili per ogni braccio immunoglobulinico, numerate a partire dall'estremità N-terminale di ogni dominio (V_H e V_L) in CDR1, CDR2 e CDR3. Tra queste, quella dotata di maggior variabilità è la CDR3, collocata tra le regioni C e V; essa rappresenta la porzione di molecola anticorpale che più contribuisce al legame antigenico.

Le regioni costanti non partecipano al riconoscimento dell'antigene, ma sono implicate nelle funzioni effettrici anticorpali.

Sulla base dei frammenti che si generano mediante proteolisi parziale con papaina, si possono distinguere tre porzioni:

- Due regioni identiche denominate *FAB* (Fragment antigen binding, frammento legante l'antigene): ciascun frammento proteolitico contiene una catena leggera completa (con i suoi domini C e V) legata al dominio V e al primo dominio C di una catena pesante. Le due regioni FAB costituiscono i due bracci della molecola anticorpale.
- Una regione *Fc* (“frammento cristallizzabile”, poiché tende ad aggregarsi e cristallizzare in soluzione): è costituita dalle rimanenti porzioni costanti (C_{H2} e C_{H3}) delle catene pesanti. Essa è responsabile della maggior parte delle attività biologiche e delle funzioni effettrici degli anticorpi.

L'uso della pepsina, invece, genera un solo frammento $F(ab')_2$ costituito dai due FAB legati insieme. La restante parte dell'immunoglobulina non genera un Fc, ma piccoli frammenti peptidici.

Nella maggior parte di molecole anticorpali, tra Fab e Fc (compresa fra i domini C_{H1} e C_{H2}), è situata una regione flessibile denominata *regione cerniera*, che conferisce un certo grado di mobilità e consente un diverso orientamento (fino a 90°) alle molecole Fab, consentendo loro di legare simultaneamente epitopi antigenici separati tra loro da distanze variabili.

Le immunoglobuline possono essere secrete o legate alla membrana dei linfociti B. Queste due forme si differenziano a livello della regione C-terminale della catena pesante: nella forma legata alla membrana sono presenti una regione idrofobica ad α -elica (che costituisce la porzione transmembrana) e una regione carica positivamente (situata all'interno della cellula); viceversa se l'anticorpo è prodotto come proteina secreta, terminerà

con una coda priva di ancoraggio.

Le catene leggere, invece, non sono mai legate alle membrane dei linfociti B. Esistono due tipi di catene leggere, denominate κ e λ : esse differiscono nelle regioni C, ma non nella loro funzione.

Al contrario, differenze aminoacidiche nelle regioni C delle catene pesanti determinano una distinzione delle immunoglobuline in diverse classi o *isotipi*. Esistono cinque tipi di catene pesanti, denominate μ , δ , γ , ϵ e α , cui corrispondono i rispettivi isotipi (indipendentemente dalla classe delle catene leggere): IgM, IgD, IgG, IgE, IgA. I diversi isotipi anticorpali differiscono nelle proprietà fisiche e biologiche e nelle loro funzioni effettrici (vedi Tab.4)

Isotipo anticorpale	Funzione isotipo-specifica
IgA	<p>Immunità delle mucose: neutralizzano i patogeni intraluminari, soprattutto a livello di tratto respiratorio e gastro-intestinale</p> <p>Immunità passiva neonatale (sono presenti in grandi quantità nel latte materno)</p> <p>Attivazione via lectinica e alternativa del complemento</p>
IgG	<p>Opsonizzazione (rivestimento della superficie dei patogeni) per facilitare la fagocitosi</p> <p>Attivazione via classica del complemento</p> <p>Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC)</p> <p>Sono l'unica classe anticorpale efficace contro le tossine batteriche</p> <p>Immunità neonatale (le IgG sono in grado di attraversare la barriera placentare e sono presenti nel latte materno)</p> <p>Inibizione a feedback dei linfociti B</p>
IgM	<p>Recettore per l'antigene dei linfociti B naive</p> <p>Attivazione via classica del complemento</p>
IgD	<p>Recettore per l'antigene dei linfociti B naive</p> <p>Nel siero è presente in tracce</p>
IgE	<p>Attivazione dei mastociti (e basofili). Sono dunque coinvolti nelle reazioni allergiche</p> <p>Cooperano con gli eosinofili nelle risposte ai parassiti, in particolare agli elminti.</p>

Tabella 4: Funzioni dei diversi isotipi immunoglobulinici

Per gli isotipi IgA e IgG è possibile distinguere ulteriori sottoclassi.

Per quanto riguarda le IgA, le catene α possono essere prodotte in due diversi sottotipi, $\alpha 1$ ed $\alpha 2$, per cui esistono due sottoclassi, le IgA1 e le IgA2, con struttura e funzioni analoghe.

Per quanto riguarda le IgG, invece, le catene g possono essere prodotte in quattro sottotipi diversi ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ e $\gamma 4$) che differiscono a livello della regione cerniera della catena H. Le immunoglobuline G, pertanto, si distinguono in altrettante sottoclassi: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

- IgG1: rappresentano il 60-66% di tutte le IgG. La loro carenza si evidenzia pertanto come una ipogammaglobulinemia all'elettroforesi proteica.
- IgG2: sono il 20-30% di tutte le immunoglobuline G. Sono anticorpi deputati alla difesa contro batteri capsulati e hanno un ruolo prevalente nella risposta umorale contro gli antigeni polisaccaridici. Un loro deficit determina una maggior suscettibilità a infezioni invasive da parte di *H.Influenzae*, *N.Meningitidis* e *S.Pneumoniae*. Il deficit di IgG2 può anche essere associato ad alcune malattie autoimmuni come le citopenie autoimmuni. In circa il 20% dei pazienti con deficit di IgA si associa anche un deficit della sottoclasse G2.
- IgG3: costituiscono il 4-8% delle IgG presenti nel siero. . In vitro le IgG3 si legano avidamente ai macrofagi alveolari indicando un possibile beneficio degli anticorpi IgG3 nella fagocitosi dei patogeni anticorpo-mediata (183) . Gli anticorpi IgG3 sono stati chiamati in causa nella risposta ai virus e particolarmente al Virus Respiratorio Sinciziale, nella risposta alla *Moraxella Catarrhalis* (184) ed alla proteina M dello *S. Pyogenes* (185) .

- IgG4: 3% di tutte le IgG. Il deficit selettivo di IgG4 sembra non avere alcuna rilevanza clinica ed è riscontrabile nel 5-6% della popolazione sana.

Switch isotipico

Lo switch o scambio isotipico delle catene pesanti è il processo attraverso cui, durante il progredire della risposta umorale, cambia l'isotipo, ma non la specificità, degli anticorpi prodotti in risposta all'antigene. L'importanza dello scambio isotipico è quella di permettere alla risposta immunitaria umorale di adattarsi in modo da combattere in maniera ottimale i diversi microrganismi (ad esempio IgE per gli elminti). Tutti i linfociti B naïve specifici per i vari microrganismi, infatti, esprimono un recettore identico sotto il profilo isotipico, rappresentato da molecole IgM e IgD. Lo scambio isotipico si avvia grazie alle cellule T, che, per mezzo del CD40L, stimola la progenie dei linfociti B IgM+IgD+ a produrre anticorpi con diversi isotipi di catene pesanti; citochine diverse inducono il passaggio a isotipi differenti.

I meccanismi molecolari dello scambio isotipico sono riassunti in Fig. 14

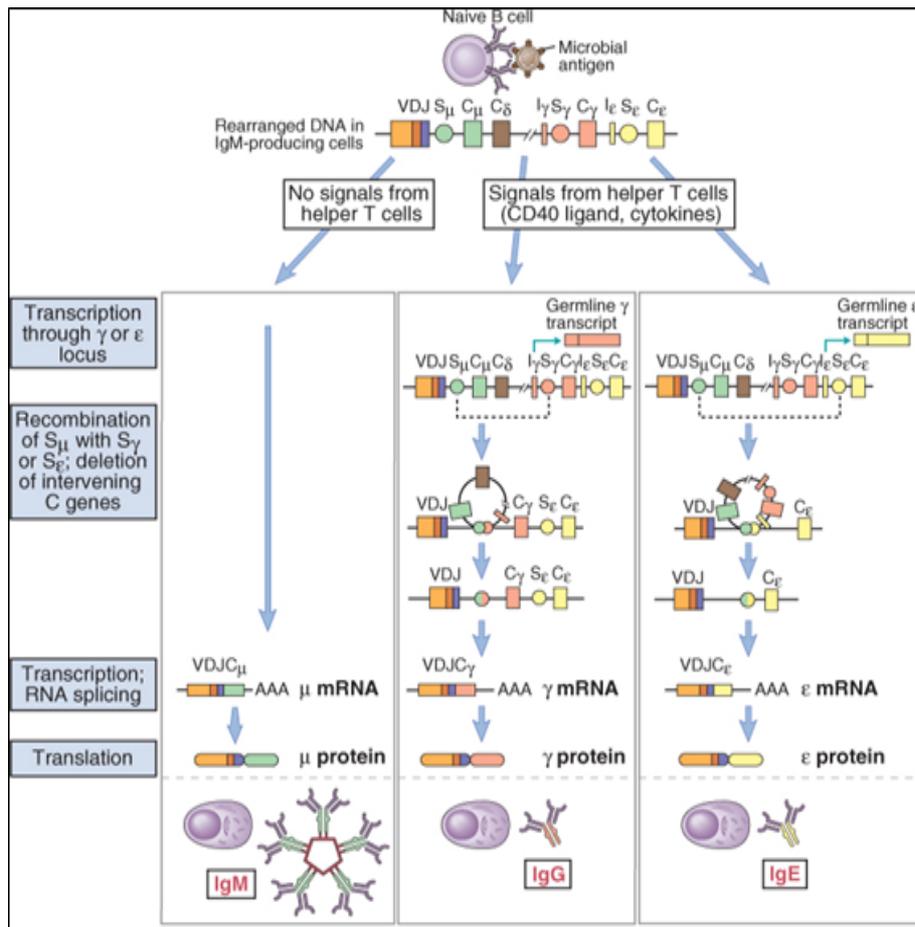


Illustrazione 14: Meccanismi molecolari di scambio isotipico. In un linfocita B che secerne IgM, a carico del trascritto primario si genera uno splicing del gene VDJ riarrangiato con l'RNA del gene C μ , dal momento che il gene μ è il più vicino al gene VDJ. Ne consegue la produzione di una catena μ e di anticorpi IgM. I segnali che provengono dai linfociti T (legame con CD40L e citochine) possono indurre la ricombinazione delle regioni di scambio (S) in modo tale che il gene VDJ si unisce a un gene C a valle di C μ . La regione di DNA interposta viene eliminata. La cellula B inizia quindi a produrre una nuova classe di catene pesanti (che determinano l'isotipo), mantenendo però la stessa specificità della cellula B originale (determinata dalla sequenza VDJ, che rimane inalterata).

Le citochine prodotte dai linfociti T helper determinano quale tipo di catena debba essere prodotto, identificando il gene della regione costante delle catene pesanti che deve partecipare allo scambio isotipico. In particolare, IFN γ induce

la produzione di IgG (IgG1, IgG3), mentre IL-4 porta alla secrezione di IgE; nel primo caso si ha così la promozione della fagocitosi e la stimolazione dell'attività microbica dei fagociti, nel secondo si attiva la risposta verso gli elminti, mediata dall'attivazione degli eosinofili. Un riassunto dell'influenza citochinica sullo switch isotipico è schematizzato in Fig. 15.

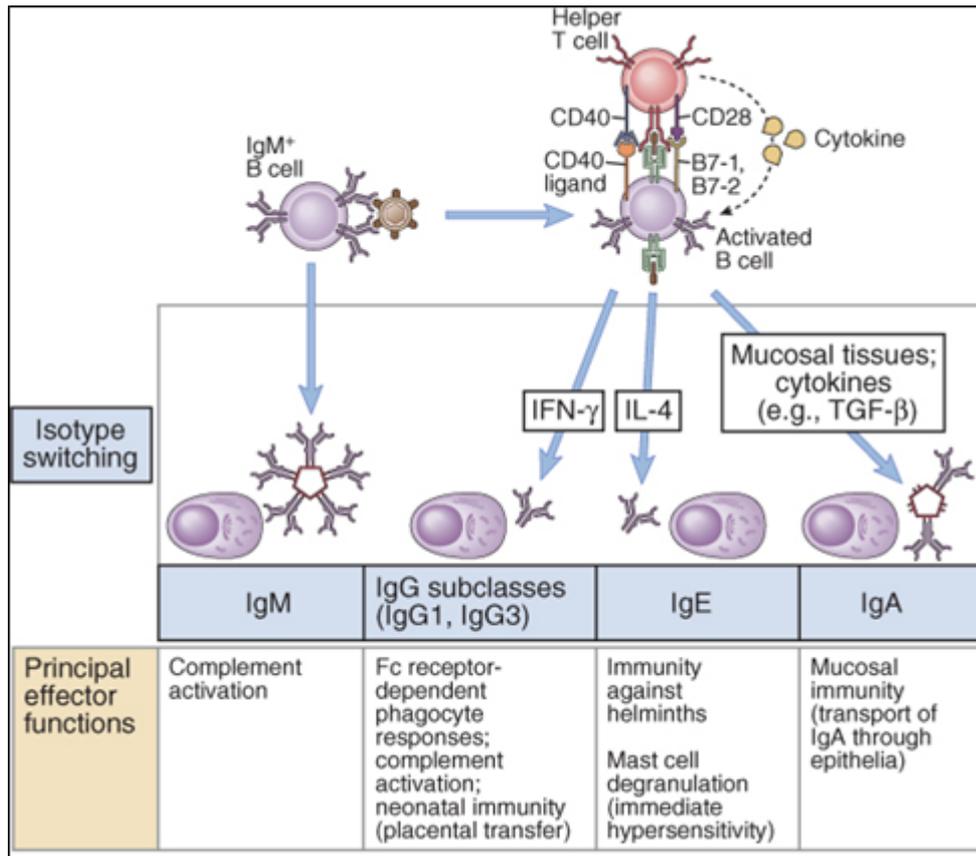


Illustrazione 15: Influenza citochinica nello scambio isotipico

La natura stessa della risposta T helper (T_{H1} , con secrezione di $IFN\gamma$ e T_{H2} , caratterizzate da produzione di IL-4) ai diversi microrganismi condiziona la successiva risposta anticorpale. Infine, il tipo di anticorpi prodotti è influenzato anche dalla sede anatomica della risposta immunitaria; le IgA, ad esempio rappresentano il principale isotipo prodotto nei tessuti linfoide associati alle mucose. Probabilmente ciò avviene perché a livello di questi

tessuti vi è un elevato numero di cellule B in grado di effettuare lo switch isotipico verso l'isotipo A e, contemporaneamente, di cellule T le cui citochine (ad es. TGF β) stimolano tale scambio.

Maturazione dell'affinità

La maturazione dell'affinità è il processo attraverso il quale l'affinità di un anticorpo per gli antigeni proteici aumenta con l'esposizione prolungata o ripetuta agli antigeni. Grazie a questo processo, la capacità degli anticorpi di legare un microrganismo o un antigene di origine microbica aumenta se l'infezione è persistente o ricorrente. Tale incremento è dovuto a mutazioni puntiformi nelle regioni V, in particolare nelle regioni ipervariabili di legame con l'antigene. I linfociti T helper rappresentano degli elementi critici in questo processo, il che spiega il perché la maturazione dell'affinità si realizzi esclusivamente per gli Ag proteici, che sono, appunto, T-dipendenti.

La maturazione dell'affinità avviene a seguito della migrazione dei linfociti B attivati nei follicoli linfoidi, dove formano i centri germinativi, ed è il risultato dell'*ipermutazione somatica* dei geni delle immunoglobuline nelle cellule B in rapida proliferazione, seguita dalla selezione dei linfociti B ad alta affinità da parte dell'antigene presentato dalle cellule follicolari dendritiche (FDC).

Durante la rapida duplicazione a livello dei centri germinativi, infatti, i geni delle immunoglobuline divengono suscettibili a mutazioni puntiformi a causa di un processo che coinvolge l'enzima *deaminasi*, indotto dall'attivazione cellulare. Si ritiene che la frequenza di mutazioni ad ogni divisione sia 1 ogni 10^3 coppie basi per cellula, valore mille volte superiore alla frequenza di mutazioni nella maggior parte dei geni (motivo per cui si parla di

“ipermutazione”). Questo processo conduce alla generazione di molti cloni diversi, le cui Ig possono legarsi con affinità molto variabile all'antigene che ha dato inizio alla risposta. I linfociti B del centro germinativo muoiono per apoptosi a meno che non vengano salvati dal riconoscimento dell'antigene, esposto dalle cellule follicolari dendritiche. Con l'aumentare della produzione anticorpale, la quota di antigene disponibile si riduce, per cui i linfociti B devono essere in grado di legare l'antigene a concentrazioni sempre più basse; in tal modo vengono selezionate cellule i cui recettori possiedono un'affinità sempre maggiore. Le cellule dendritiche follicolari esprimono CD40L e i centri germinativi contengono poche cellule T, anch'esse CD40L+. Il CD40L è verosimilmente la molecola che trasmette i segnali di sopravvivenza ai linfociti B che riconoscono l'antigene sulle FDC. I linfociti B selezionati abbandonano poi il centro germinativo e divengono cellule B secernenti anticorpi ad alta affinità.

I meccanismi di tolleranza

In condizioni fisiologiche, una delle principali caratteristiche del sistema immunitario è quella di riconoscere una enorme varietà di antigeni, senza tuttavia reagire verso gli antigeni propri (*self*). Alla base di tale peculiarità, vi sono una serie di processi che portano alla selezione delle cellule dotate di tale capacità e, viceversa, alla “selezione negativa” di quelle responsive nei confronti dei componenti dell'organismo.

La mancata responsività verso gli antigeni *self* è definita tolleranza immunologica: essa è generata proprio a seguito dell'esposizione dei linfociti agli antigeni stessi in condizioni particolari. Quando vengono prodotti BCR e TCR, infatti, questi possono rispondere sia al *self* che al non *self* fino a che non incontrano un antigene. Nel momento in cui il linfocita incontra l'antigene per cui esprime il recettore, si possono innescare tre distinti processi:

1. Attivazione del linfocita e innesco della risposta immunitaria (gli antigeni che determinano tale risposta sono definiti *immunogeni*);
2. Attuazione del fenomeno della tolleranza verso particolari antigeni (detti *tollerogenici*): il linfocita diviene funzionalmente inattivo (anergia funzionale) o viene eliminato attraverso morte per apoptosi (delezione);
3. Fenomeno della “ignoranza”: in particolari situazioni il linfocita ignora la presenza dell'antigene, per cui non reagisce in alcun modo, pur mantenendo la capacità di rispondere allo stesso antigene se presentato successivamente in forma immunogenica.

La scelta tra attivazione, tolleranza e ignoranza dipende da diversi fattori, tra cui le caratteristiche di antigene e dei linfociti antigene-specifici e dalle modalità di interazione tra antigene e sistema immune.

Durante i processi di maturazione, sia i linfociti B sia i linfociti T vengono sottoposti a eventi selettivi al fine di eliminare i cloni autoreattivi. A seconda del sito in cui si realizza e dello stadio maturativo linfocitario, si distinguono due tipi di tolleranza: tolleranza centrale e tolleranza periferica.

La *tolleranza centrale* viene indotta mediante l'eliminazione dei linfociti immaturi che riconoscono gli antigeni self a livello degli organi linfoidi primari. La *tolleranza periferica*, invece, si verifica a seguito del riconoscimento di antigeni self da parte di linfociti maturi negli organi linfoidi secondari.

Tali meccanismi si differenziano per le due popolazioni linfocitarie T e B.

Meccanismi di tolleranza dei linfociti T

Tolleranza centrale: i linfociti T immaturi che riconoscono gli antigeni self per cui sono specifici a livello degli organi linfoidi primari (timo) vengono eliminati (selezione negativa o delezione). Quando un timocita interagisce con un antigene self presentato da una MHC su una APC self, questi recettori trasducono segnali che inducono l'apoptosi della cellula prima della sua maturazione. Affinchè l'apoptosi si verifichi, l'antigene deve essere presente nel timo ad elevate concentrazioni (in effetti nel timo sono fortemente rappresentate varie proteine diffuse in tutto l'organismo) e il linfocita deve esprimere recettori ad elevata affinità per l'antigene. In tale processo è implicato il fattore di trascrizione AIRE (AutoImmune Regulator) che sembrerebbe responsabile della presenza di molti degli antigeni proteici self a livello timico. I linfociti T che vanno incontro al processo di selezione negativa

nel timo sono sia linfociti doppio positivi (CD4+ CD8+), presenti nella corticale, che singoli positivi (CD4+ o CD8+) appena generati nella midollare. Le cellule T che sopravvivono proseguono la loro maturazione. Alcune delle cellule T CD4+ autoreattive, tuttavia, non vanno incontro a delezione, bensì si differenziano in *linfociti T regolatori* e migrano nei tessuti periferici, dove regolano l'attivazione e le funzioni effettrici di altri linfociti T. Non è noto cosa determini la possibilità che l'antigene self induca selezione negativa piuttosto che lo sviluppo di cellule T regolatorie.

Tolleranza periferica: è il meccanismo con il quale le cellule T mature, che riconoscono l'antigene self a livello periferico, diventano incapaci di rispondervi in caso di successivi incontri poiché subiscono una inattivazione funzionale (anergia) oppure vanno incontro ad apoptosi (delezione). Tale riconoscimento può anche indurre la generazione di linfociti T regolatori (soppressione). La tolleranza periferica è indispensabile per prevenire risposte autoimmuni nei confronti di antigeni self scarsamente rappresentati o assenti nel timo, ma presenti nei tessuti periferici. Consente, inoltre, il mantenimento della tolleranza anche qualora i meccanismi di tolleranza centrale siano stati elusi.

L'anergia si verifica quando l'incontro con l'antigene avviene in mancanza di adeguati livelli di segnali costimolatori sulla superficie delle APC, necessari per la completa attivazione del linfocita T. In condizioni fisiologiche, infatti, le APC presenti a livello dei tessuti periferici e negli organi linfoidi secondari sono mantenute in uno stato di quiescenza in cui non esprimono o esprimono livelli estremamente bassi di molecole costimolatorie (la cui espressione è invece aumentata nelle APC attivate dalla presenza di microrganismi patogeni). Altro meccanismo con cui si instaura l'inattivazione funzionale del linfocita T autoreattivo è attraverso l'espressione di recettori a funzione

inibitoria (CTLA-4) da parte delle stesse cellule T , in grado di legare ad elevata affinità le molecole B7 espresse dalle APC. Va ricordato che il principale recettore per B7 è la molecola CD28, anch'essa espressa dai T, con trasduzione di segnali attivatori. Probabilmente le APC quiescenti esprimono livelli di B7 così bassi da riuscire ad essere legati dai recettori inibitori ma non da quelli attivatori.

La *delezione* si verifica in caso di attivazione continuativa dei linfociti T maturi da parte di antigeni self in assenza di secondi segnali. Tale processo è definito “morte cellulare indotta da attivazione” ed è mediato sia dall'espressione simultanea di Fas e del suo ligando (FasL) nel contesto dello stesso linfocita o in linfociti adiacenti che dalla produzione nel linfocita T di proteine proapoptotiche.

Nel processo di *soppressione*, invece, alcune cellule T autoreattive differenziate in T regolatorie, prevengono o sopprimono l'attivazione di altri linfociti autoreattivi.

Meccanismi di tolleranza dei linfociti B

Tolleranza centrale: nei linfociti B immaturi la tolleranza centrale viene indotta dal riconoscimento con elevata affinità di antigeni self nel midollo osseo. Essi possono essere eliminati (selezione negativa) oppure essere modificati nella loro specificità recettoriale (editing del recettore). Nel processo di editing recettoriale si ha la riattivazione del processo di ricombinazione dei geni che codificano per le Ig con espressione di una nuova catena leggera, che può associarsi alla catena pesante preesistente generando un nuovo recettore non più specifico per l'antigene self.

Tolleranza periferica: è indotta quando i linfociti B maturi riconoscono antigeni self negli organi linfoidi secondari in assenza di cooperazione da parte dei linfociti T (ad esempio perché assenti o tolleranti). In tal caso, i linfociti B divengono anergici e abbandonano i follicoli linfoidi senza più poter rientrare al loro interno. È probabile che essi muoiano poi rapidamente, poiché non ricevono più gli stimoli necessari alla loro sopravvivenza. Per quanto riguarda gli antigeni T-indipendenti (non proteici: polisaccardi, lipidi, acidi nucleici), è probabile che essi siano in grado di attivare i linfociti B in assenza di cooperazione da parte dei T solo quando presenti in grandi concentrazioni.

Qualora i meccanismi di tolleranza siano deficitari, il sistema immunitario reagisce contro le cellule e i tessuti dell'organismo, dando luogo al fenomeno dell'autoimmunità.

1.10 Immunodeficienze primitive

Le immunodeficienze primitive (PID) costituiscono un gruppo di malattie geneticamente eterogenee, che colpiscono diversi componenti di immunità innata o adattativa, con compromissione del loro differenziamento e/o funzione. L'incidenza delle PID varia da 1:300 a 1:500.000.

Le immunodeficienze primitive vanno distinte dalle forme secondarie, acquisite ad esempio a seguito di infezioni, neoplasie linfo-reticolari, malnutrizione, radiazioni, terapie immunosoppressive o citostatiche.

Negli ultimi decenni vi è stata una rapida evoluzione delle conoscenze in questo campo e di conseguenza ciò ha portato alla ridefinizione nosografica delle diverse forme. In particolare, è stato identificato un considerevole numero di nuove forme, ben definite sia dal punto di vista del quadro clinico che dell'alterazione genetica e del corrispondente meccanismo molecolare sotteso. Come conseguenza di tale progresso nelle conoscenze, in poco più di venti anni il numero delle PID conosciute è passato da poco più di dieci malattie note negli anni '80 alle oltre 250 nosograficamente distinte ad oggi descritte (186,187), con più di 150 geni coinvolti. Tale progresso è stato favorito dalla maggiore attenzione clinica e dall'applicazione alle problematiche cliniche delle avanzate tecnologie di genetica ed immunologia molecolare.

In tabella 5 sono riportati i principali gruppi in cui vengono classificate le varie forme di immunodeficienza primitiva

IMMUNODEFICIENZE PRIMITIVE
Immunodeficienze B e T cellulari
Immunodeficienze prevalentemente umorali (anticorpali)
Sindromi ben definite associate a immunodeficienza
Difetti dell'immunità innata
Malattie da disregolazione immune
Difetti congeniti dei fagociti (numero, funzione, entrambi)
Malattie autoinfiammatorie
Difetti del complemento

Tabella 5: Classificazione immunodeficienze primitive

Da sempre è stata sottolineata l'importanza di definire in maniera puntuale i campanelli di allarme e i segni di presentazione delle diverse forme in modo da coglierne precocemente l'esordio (Tab. 6)

I 10 campanelli d'allarme per le immunodeficienze primitive
1- ≥ 4 otitit in un anno
2- ≥ 2 sinusiti severe in un anno
3- ≥ 2 polmoniti in un anno
4- Ascessi ricorrenti, cutanei profondi o d'organo
5- Candidosi orale persistente o micosi cutanea
6- ≥ 2 infezioni profonde, inclusa setticemia
7- ≥ 2 mesi di antibioticoterapia con scarso beneficio
8- Necessità di antibiotico EV per eradicare infezione
9- Difficoltà di accrescimento ponderale o di crescita regolare
10- Anamnesi familiare positiva per immunodeficienza primitiva

Tabella 6: Campanelli d'allarme per le immunodeficienze primitive

Dal punto di vista clinico, le alterazioni del sistema immunitario sono state storicamente associate ad una aumentata suscettibilità a contrarre infezioni

gravi, non selettive, frequentemente a localizzazione multipla e sostenute da germi opportunistici o non comuni. Inoltre, le immunodeficienze più gravi sono state considerate in passato ad esordio precoce nei primi due anni di vita, con sintomi tipici quali arresto di crescita, diarrea intrattabile, infezioni severe ricorrenti e resistenti al trattamento, ascessi di organo e cutanei ricorrenti, a seconda delle forme. Attualmente, accanto a forme tipiche in cui l'immunodeficienza cellulare, umorale o combinata si presenta clinicamente con un quadro classicamente indicativo di una risposta immune deficitaria, sono stati descritti casi clinici atipici, in cui i segni di presentazione sono meno suggestivi di un immunodeficit di base. In passato il concetto di immunodeficienza era indissolubilmente ed esclusivamente legato a quello di difetto di risposta verso i patogeni e infezione, diversamente dalle malattie autoimmuni, allergiche e infiammatorie, che erano invece considerate come eccessi dell'immunità. Le PID, inoltre, venivano considerate condizioni rare, familiari e monogeniche, con modalità di trasmissione autosomica recessiva e compromissione di sviluppo e funzione di una o più subset leucocitari. L'identificazione di fenotipi nuovi, caratterizzati da infezioni selettive in bambini altrimenti sani, esordio tardivo, autoimmunità, allergie, lesioni granulomatose, ha notevolmente ampliato il range dei segni clinici di presentazione e radicalmente modificato il paradigma di immunodeficienza primitiva. Attualmente, infatti, è noto che le PID includono anche patologie comuni, che possono essere sporadiche o con trasmissione dominante. Il difetto genetico alla base, inoltre, può vedere implicati più geni (poligeniche) e la loro patogenesi può coinvolgere cellule non ematopoietiche .

Le nuove conoscenze fanno attualmente parlare di “vecchie” e “nuove” immunodeficienze, descritte da Casanova e coll. (188) e distinte tra loro per numerosi aspetti, riassunti in Tab.7 .

Caratteristiche generali	Vecchie (<i>Coventional</i>)	Nuove (<i>Novel</i>)
Epidemiologia		
<i>Frequenza</i>	Rare	Comuni
<i>Trasmissione</i>	Familiare	Sporadico
<i>Età all'esordio</i>	Infanzia	Adulto
<i>Evoluzione</i>	Progressivo peggioramento	Miglioramento spontaneo
Fenotipo		
<i>Fenotipo clinico caratterizzante</i>	Infezioni opportunistiche, di gravità variabile	Altre infezioni, spesso molto gravi e fenotipi non infettivi (autoimmunità, allergie, neoplasie indotte da virus oncogeni, angioedema, granulomi, autoinfiammazione, etc)
<i>Suscettibilità infettiva</i>	Molti patogeni	Pochi patogeni (persino unico)
<i>Numero di episodi</i>	Elevato (infezioni ricorrenti)	Pochi (anche singolo)
<i>Cellule coinvolte</i>	Ematopoietiche	Non ematopoietiche
Genotipo		
<i>Modelli di ereditarietà</i>	Autosomico recessivo X-recessivo	Autosomico dominante
<i>Penetranza clinica</i>	Completa	Incompleta
<i>Geni implicati</i>	Uno (monogeniche, mendeliane)	>1 (oligogeniche)
<i>Mutazioni</i>	Ereditate da genoma dei genitori	Ereditate dai genitori per mutazione <i>de novo</i> nella linea germinale oppure Somatiche

Tabella 7: Principali differenze tra "vecchie" e "nuove" immunodeficienze (modificato da Casanova e coll., 2008)(188)

1.10.1 Immunodeficienze e autoimmunità

Immunodeficienza e autoimmunità sembrerebbero i due estremi opposti dello spettro dei disordini immunitari. In realtà, queste due condizioni sono spesso correlate, rappresentando la manifestazione di una “disregolazione” del sistema immunitario. In effetti, anche il primo caso di immunodeficienza primitiva riportato in letteratura da Bruton (189) era associato ad una artrite autoimmune. Molteplici sindromi da immunodeficienza sono associate a patologie autoimmuni; generalmente tale condizione si verifica più frequentemente in caso di deficit dell'immunità umorale, rispetto ai difetti della risposta cellulo-mediata. Tra le principali immunodeficienze associate ad autoimmunità si ritrovano la ipogammaglobulinemia X-linked, il deficit selettivo di IgA, la CVID, la sindrome di DiGeorge, la sindrome da IperIgM, difetti del complemento, la sindrome di Wiskott-Aldrich e la malattia granulomatosa cronica. Solitamente, le principali manifestazioni autoimmuni sono ematologiche, rappresentate soprattutto da trombocitopenia e anemia emolitica; tuttavia sono state descritte molteplici altre patologie autoimmuni(78).

Dal punto di vista patogenetico, è chiaro che la grande varietà di difetti genetici che possono predisporre un individuo allo sviluppo di autoimmunità implica che tale associazione sia multifattoriale, con meccanismi che possono più o meno prevalere a seconda del tipo di immunodeficienza primitiva (Fig. 16).

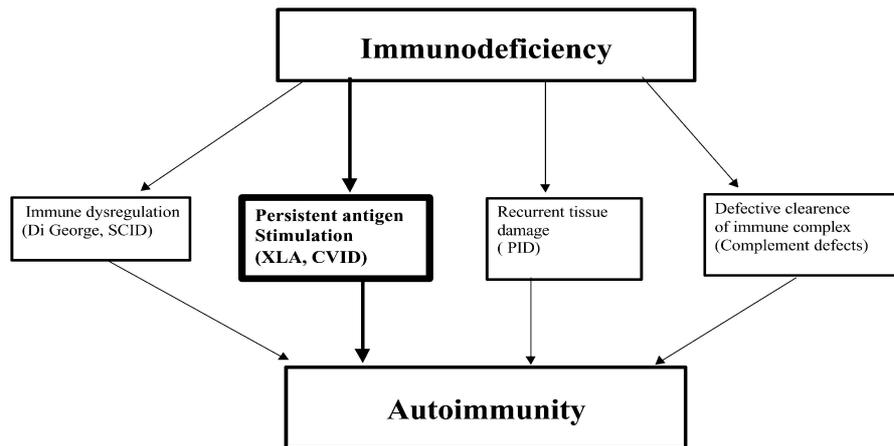


Illustrazione 16: Principali meccanismi con cui una condizione di immunodeficienza può portare allo sviluppo di autoimmunità

Il principale meccanismo patogenetico alla base dello sviluppo di autoimmunità in corso di immunodeficienza è la stimolazione continua da parte di antigeni estranei (virali, batterici), data l'incapacità del sistema immune di eradicare i microrganismi patogeni. Ne consegue una risposta infiammatoria cronica compensatoria, spesso esagerata, che può portare a danno tissutale e sviluppo di autoimmunità (190). In altri casi, il meccanismo principale sembrerebbe la disfunzione immune. La produzione di IgA, per esempio, è strettamente T-dipendente; la disfunzione T-cellulare può essere responsabile sia del SIgAD che dell'aumento delle manifestazioni autoimmuni osservate in questi pazienti. Nella sindrome di Di George, l'alterato sviluppo T-cellulare in un timo ipoplasico potrebbe spiegare l'elevata incidenza di autoimmunità; tale fenomeno si spiega considerando il ruolo fondamentale esercitato dal timo nella delezione delle cellule T autoreattive.

Condotti e coll. (191) hanno recentemente evidenziato le complesse funzioni di molti componenti del sistema immune, che spesso giocano un duplice ruolo, sia positivo che negativo, nella regolazione della risposta immunitaria. Un esempio è costituito dal gene *foxp3*; mutazioni a carico di tale gene inducono, sia nell'uomo che nel topo un grave disordine autoimmune, caratterizzato da

poliendocrinopatia ed enteropatia (192) . D'altra parte, la sovraespressione di foxp3 nel topo determina una severa immunodeficienza (193). In considerazione di queste osservazioni, non deve sorprendere che immunodeficienza e autoimmunità vadano di pari passo.

Autoimmunità e deficit selettivo di IgA

Le malattie autoimmuni sono tra le più importanti manifestazioni cliniche del deficit selettivo di IgA. La prevalenza dei disordini autoimmuni varia dal 7 al 36% a seconda della popolazione considerata (78). In letteratura è stata riportata una grande varietà di disordini autoimmuni associati, tra cui tiroiditi autoimmuni, artropatia cronica, anemia emolitica, porpora trombotica trombocitopenica, lupus eritematoso sistemico (LES), artrite idiopatica giovanile, colangite sclerosante, malattia celiaca, vitiligo, psoriasi, colite ulcerosa, sindrome di Sjogren, poliarterite nodosa, sarcoidosi, epatite cronica autoimmune, malattia di Kawasaki e malattia di Bechet (21) In uno studio del 2004, Edwards e coll. (6) evidenziavano come l'autoimmunità fosse la seconda più comune associazione con il deficit selettivo di IgA (28%) dopo le infezioni ricorrenti (50%) (6). La maggior prevalenza di malattia autoimmune si osservava negli adulti (età mediana di 29 anni) e nel sesso femminile. La condizione più comunemente riscontrata era la porpora trombocitopenica autoimmune, seguita dall'anemia emolitica, artrite reumatoide giovanile, tiroiditi, LES, diabete e presenza di vari anticorpi. In una popolazione più giovane, malattie autoimmuni, come tiroiditi, celiachia, artropatia, anemia emolitica autoimmune e LES, venivano riscontrate nel 19% dei pazienti. Inoltre, le malattie autoimmuni erano anche più frequenti nei parenti dei pazienti affetti da deficit selettivo di IgA; il 10% dei parenti di primo grado

aveva manifestazioni autoimmuni, quindi una prevalenza più elevata rispetto alla popolazione generale (5%). Nei pazienti con diagnosi di SIgAD vi è dunque una aumentata prevalenza di malattie autoimmuni; analogamente, nei soggetti inizialmente giunti all'attenzione clinica per disordini autoimmuni, è aumentata l'incidenza di deficit selettivo di IgA (21). Sebbene la relazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità sia chiara, non sono ancora certe le cause di tale associazione. L'aumentato rischio di manifestazioni autoimmuni nei pazienti affetti da SIgAD ha diverse spiegazioni possibili (85). In primis, poiché le IgA secretorie giocano un ruolo importante nella protezione delle superfici mucose, la loro carenza facilita il superamento della barriera mucosa da parte di antigeni ambientali, che possono portare alla formazione di autoanticorpi mediante meccanismi di mimetismo molecolare e di cross-reazione con antigeni-self (15). Una seconda ipotesi prevede un possibile ruolo di fattori genetici comuni, ad esempio alcuni aplotipi HLA, che predisporrebbero il paziente affetto sia allo sviluppo di immunodeficienza che di autoimmunità; anche l'associazione familiare è indicativa di una forte influenza genetica (86). L'aplotipo più comunemente identificato nei pazienti con SIgAD è l'aplotipo 8.1 (in particolare HLA-A1, B8, DR3, DQ2), presente nel 45% dei soggetti affetti da deficit selettivo di IgA e solo nel 16% della popolazione generale(87)]. Tali aplotipi sono di comune riscontro anche in caso di varie malattie autoimmuni, note per essere fortemente associate con il deficit selettivo di IgA, quali tiroidite autoimmune, LES, malattia celiaca, artrite reumatoide, diabete di tipo 1 e miastenia gravis (88,89). Oltre all'aplotipo, sono state rilevate altre associazioni genetiche con geni non-MHC, che consentirebbero di spiegare la relazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità. Tra i geni identificati, quelli meglio definiti sono *interferon-induced helicase-1* (IFIH1) e *C-type lectin domain family 16, member A*

(CLEC16A) (90). IFIH1 codifica per una RNA-elicasi interferone-indotta che partecipa al riconoscimento del genoma virale, svolgendo così un ruolo nella risposta immunitaria anti-virale. Studi di associazione genomica hanno rilevato una associazione tra un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel locus genico rs1990960 del gene IFIH1 e il SIgAD. Il nesso deriva dal fatto che polimorfismi a singolo nucleotide su tale gene sono stati individuati anche in patologie autoimmuni, come il diabete di tipo 1. L'associazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità è stata anche correlata a una mutazione a carico del gene CLEC16A, codificante per una lectina di tipo C, sebbene tale osservazione necessiti di ulteriori conferme (21). Una ulteriore ipotesi per spiegare l'aumentato rischio di manifestazioni autoimmuni è che nel SIgAD vi sia una compromissione dei meccanismi di tolleranza (91,92). In alcuni studi, infatti, vi è il rilievo di una riduzione del numero di linfociti T regolatori (93). Jacob e coll. (75) formularono una ipotesi che potrebbe spiegare l'alta prevalenza delle malattie autoimmuni nel deficit di IgA. Essi proposero che l'interazione della immunoglobulina A con il suo recettore Fc α RI determinasse una parziale fosforilazione di FcR γ associato a Fc α RI, in particolare a livello del cosiddetto “*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*” (ITAM). I motivi ITAM sono importanti per la trasduzione del segnale a livello delle cellule del sistema immunitario. La parziale fosforilazione determina il reclutamento della tirosin-fosfatasi SHP-1. Ciò porta alla inattivazione di diversi *pathways* di attivazione del sistema immune, inclusi sia i recettori che contengono i motivi ITAM che quelli ITAM-indipendenti. In tal modo le IgA preverrebbero le reazioni infiammatorie e autoimmuni. Ne consegue, dunque, che bassi livelli di IgA favorirebbero lo sviluppo di patologie autoimmuni (75). Inoltre, poiché le IgA secretorie contribuiscono alla clearance dei patogeni, in caso di SIgAD tale clearance è compromessa, portando alla deposizione di

immunocomplessi nei tessuti infiammati di vari organi (34). Sono stati proposti ulteriori meccanismi patogenetici; tra questi vi è l'ipotesi che i disordini autoimmuni siano correlati alla presenza di anticorpi anti-bovino. In uno studio di Cunningham-Rundles e coll. (73) il 60% dei pazienti possedeva anticorpi contro le proteine del latte vaccino, con livelli più elevati nei pazienti più giovani. Titoli anticorpali elevati di immunoglobuline anti-bovino sembrerebbero correlati alla positività di test serologici volti ad identificare una condizione di autoimmunità. Il significato di tale osservazione non è noto, ma questa condizione potrebbe giocare un ruolo nell'associazione tra ridotti livelli di IgA e malattie infiammatorie intestinali, come la celiachia (73). In un altro studio, condotto da Wells (94) su 60 soggetti affetti da deficit selettivo di IgA, anticorpi anti-IgM umane e anticorpi anti-collagene umano nativo erano riscontrabili rispettivamente nel 35% e nel 34% dei casi, in confronto all'1,6% e al 2% della popolazione controllo; tuttavia il loro significato clinico e il ruolo esercitato nella patofisiologia del SIgAD o delle malattie autoimmuni non è noto (94).

CAPITOLO 2: SCOPO DELLO STUDIO

Il deficit selettivo di IgA (SIgAD) è la più comune immunodeficienza primitiva (1). La maggior parte degli autori definisce tale immunodeficit come la presenza di livelli di IgA inferiori a 5 (1-3) o a 7 mg/dl (4), in un soggetto di sesso femminile o maschile, in presenza di normali livelli per età di IgM e IgG, quando altre cause di ipogammaglobulinemia siano state escluse.

I criteri della European Society for Immunodeficiency (ESID) e del Pan-American Group for Immunodeficiency (PAGID) per la definizione di SIgAD prevedono la presenza di livelli serici di IgA inferiori a 7 mg/dl, in presenza di normali livelli per età di IgG totali e IgM, in pazienti di sesso maschile o femminile di età superiore ai 4 anni, in cui altre cause di ipogammaglobulinemia siano state escluse. La risposta anticorpale ai vaccini è solitamente normale.

Nella maggior parte dei casi, il deficit selettivo di IgA è una condizione del tutto asintomatica e diagnosticata occasionalmente, a seguito di indagini laboratoristiche effettuate per altri motivi. Nei pazienti sintomatici, tuttavia, lo spettro di manifestazioni cliniche associate è estremamente variegato: infezioni ricorrenti, malattie allergiche, disordini autoimmuni, raramente neoplasie (56). In alcuni soggetti (5%), tale immunodeficit evolve verso una immunodeficienza comune variabile (CVID) (59,60).

Tra le associazioni più frequentemente riportate in letteratura, vi sono le manifestazioni autoimmuni (6,15,75). Pazienti affetti da SIgAD hanno un rischio più elevato di sviluppare patologie autoimmuni (dal 7 al 36%, a seconda degli Autori) rispetto alla popolazione generale (78); anche in assenza di manifestazioni cliniche, è frequente il riscontro di autoanticorpi organo o non-organo specifici (all'incirca nel 40% dei casi) (79,80). L'esatto meccanismo che sottende la relazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità non è ancora completamente chiarito; tuttavia sono numerose le ipotesi a riguardo, in

particolare vi sarebbe un background genetico comune (86, 89), in particolar modo rappresentato dall'aplotipo esteso 8.1 (87), ma anche da geni non-MHC (90).

Obiettivo dello studio è osservare la prevalenza di disordini autoimmuni nel campione di pazienti con SIgAD presi in esame, con l'intento di evidenziarne la potenziale associazione con specifiche caratteristiche cliniche e/o immunologiche riscontrate in tali pazienti.

A tale scopo è stata osservata una coorte di di 25 pazienti (14 femmine e 11 maschi) di età compresa tra 4 e 17 anni afferenti alla U.O. di Pediatria 1 (Direttore Prof. Giuseppe Saggese), presso il servizio di Reumatologia e Immunologia Pediatrica (responsabile Prof.ssa Consolini), del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell' Università di Pisa.

CAPITOLO 3: PAZIENTI E METODI

3.1 Pazienti

Lo studio è stato condotto su 25 pazienti con diagnosi di deficit selettivo di IgA (SIgAD), posta secondo i criteri ESID 2015, afferenti all'unità operativa di Pediatria (Direttore Prof. Giuseppe Saggese) del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell' Università di Pisa.

Le caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti sono descritte in Tabella 8 e 9.

	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3	PAZIENTE 4	PAZIENTE 5
Sesso	F	F	M	F	F
Età attuale	4 aa	8 aa	16 aa	7 aa	5 aa
Età diagnosi SigAD	4 aa	4 aa	8 aa	4 aa	5 aa
Clinica esordio	Episodi febbrili ricorrenti dall'età di un anno.	Dalla nascita 5 episodi infettivi delle vie aeree inferiori	Dall'età di 7 anni episodi febbrili ricorrenti (39°C) con rapida scomparsa spontanea. Faringite streptococcica, tonsillite, gastroenterite virale	Episodi febbrili frequenti riferibili a episodi flogistici delle prime vie aeree con incremento di tali episodi all'ingresso in comunità. Bronchite (1 aa), stomatite aftosa (2 aa), gastroenterite (2,5 aa)	ASINTOMATICO (riscontro occasionale)
Clinica attuale	Fenotipo clinico di morbidità frequente di superficie con persistenza di infezioni ricorrenti (bronchie, tracheite, tonsillite)	Fenotipi clinico di morbidità frequente di superficie	Fenotipo clinico di morbidità frequente di superficie in riduzione + fenotipo atopico (asma)	Fenotipo clinico di morbidità frequente di superficie in progressiva riduzione	Deficit selettivo e assoluto di IgA in paziente asintomatico.
Polmoniti	–	✓	–	✓ (2 episodi)	–
Malattie autoimmuni (età diagnosi)	–	–	–	–	–
Asma (età diagnosi)	–	–	Asma da sforzo (12 anni)	–	–
Allergia (età diagnosi)	–	–	–	✓ Amoxicillina/ Ac.clavulanico	–
Altro	–	Ossuriasi (6 anni)	–	Alvo a impronta diarroica	Accrescimento ponderale <25°centile
Familiarità autoimmunità	–	–	✓ Padre: tireopatia autoimmune	–	–
Familiarità PID	–	–	–	–	–
Familiarità morbidità frequente/ Tonsillectomia	✓ Sorella: morbidità frequente; Padre: bronchiti ricorrenti	–	✓ Fratello minore con morbidità frequente e tonsillectomia.	–	–
Familiarità atopia	–	–	–	–	–
Durata follow-up	0	4 anni	8 anni	3 anni	0

	PAZIENTE 6	PAZIENTE 7	PAZIENTE 8	PAZIENTE 9	PAZIENTE 10
Sesso	F	F	M	M	M
Età attuale	4 aa	12 aa	8 aa	10 aa	12 aa
Età diagnosi	4 aa	4 aa	5 aa	4 aa	8 aa
Clinica esordio	Episodi febbrili a cadenza mensile dall'età di un anno, della durata di circa una settimana, associati a sintomi delle prime vie aeree e talvolta a gastroenterite, presenti anche nel periodo estivo	Morbilità frequente di superficie a carico delle vie aeree superiori (soprattutto tonsilliti essudative) con frequenza di almeno un episodio al mese. Episodio di reazione allergica cutanea ad acido niflumico	Dall'età di 2 anni morbilità di superficie a carico delle vie aeree superiori, soprattutto nella forma di otite media purulenta. Peso al 10° centile	Episodio di pielonefrite da pseudomonas aeruginosa in paziente con megaurtere refluyente sinistro di IV-V grado in profilassi antibiotica. Ulteriori episodi di infezioni delle vie urinarie anche dopo correzione chirurgica. Diatesi allergica con estrinsecazione cutanea	Episodi flogistici a carico delle alte vie respiratorie associate a quadri di broncostruzione con frequenza mensile. Un episodio di polmonite. Paziente con morbo di Basedow noto.
Clinica attuale	Fenotipo clinico di morbilità frequente di superficie	Fenotipo clinico di morbilità frequente di superficie con numerosi episodi flogistici delle prime vie aeree e atopia	Fenotipo clinico di morbilità frequente in riduzione e autoimmunità	Fenotipo clinico di morbilità frequente in riduzione e diatesi allergica	Fenotipo clinico di morbilità frequente di superficie e autoimmune
Polmoniti	–	–	–	–	✓
Malattie autoimmuni (età diagnosi)	–	–	✓ Celiachia (8 aa)	–	✓ Morbo di Basedow (7 aa)
Asma (età diagnosi)	–	✓	–	–	–
Allergia (età diagnosi)	–	✓ Documentata ad acari e graminacee (7 aa) Reazione allergica cutanea ad acido niflumico	–	✓ Diatesi allergica con estrinsecazione cutanea (4 aa)	–
Altro	Pavor nocturnus	Esame <u>parassitologico +</u> per HP (10 aa) Aftosi ricorrenti Teleangectasia al volto Cefalea frontale post-prandiale (8aa) Disturbo d'ansia Iporessia Incertezza di decodifica di lettura	–	–	–
Familiarità autoimmunità	–	✓ Madre: sclerodermia	–	✓ Psoriasi	–
Familiarità PID	–	–	–	–	–
Familiarità morbilità frequente/ Tonsillectomia / Adenoidectomia	✓ Padre: otiti e faringiti ricorrenti; adenectomia e tonsillectomia (4 anni) Sorella maggiore: adenectomia e tonsillectomia per morbilità frequente	–	–	–	–
Familiarità atopia	–	–	✓ Nonno paterno con asma allergico	–	–
Durata follow-up	0	8 anni	3 anni	6 anni	4 anni

	PAZIENTE 11	PAZIENTE 12	PAZIENTE 13	PAZIENTE 14	PAZIENTE 15
Sesso	M	M	M	F	M
Età attuale	6 aa	12 aa	11 aa	16 aa	15 aa
Età diagnosi	4 aa	4 aa	4 aa	14 aa	12 aa
Clinica esordio	Morbilità frequente con episodi convulsivi febbrili. Broncopolmonite con pleurite, gastroenteriti, riniti, faringiti	Diatesi allergica con estrinsecazione cutanea (vistose reazioni a punture di insetto; reazioni allergiche all'uso di antibiotico). Dermatite batterica, varicella impetiginizzata, lesioni cutanee impetiginizzate	Infezioni respiratorie ricorrenti, soprattutto delle alte vie. Un singolo episodio di broncopolmonite .	Paziente con tiroidite autoimmune con riscontro di deficit selettivo di IgA. All'amnesi episodi infettivi ricorrenti soprattutto delle alte vie dall'età di un anno, con cadenza mensile, senza stagionalità. Rari episodi di otite e una bronchite.	Morbilità frequente di superficie fino agli 8 anni, con riduzione a seguito di adenodectomia (russamento e apnee notturne). Celiachia e scarso accrescimento
Clinica attuale	Fenotipo clinico di morbidità frequente con episodi infettivi mensili	Fenotipo clinico di atopìa con frequente morbidità e lesioni cutanee	Fenotipo clinico di morbidità frequente	Fenotipo clinico autoimmune e di morbidità frequente	Fenotipo di morbidità di superficie, autoimmune e atopico
Polmoniti	✓	–	✓	–	–
Malattie autoimmuni (età diagnosi)	–	–	–	✓ Tiroidite autoimmune (7 anni)	✓ Celiachia (6 anni)
Asma (età diagnosi)	–	–	–	–	✓
Allergia (età diagnosi)	–	✓ Diatesi allergica con estrinsecazione cutanea	–	–	–
Altro	Manifestazione orticarioide in corso di infezione alte vie respiratorie Ipovitaminosi D (carenza) e aumento PTH.	Gastroenterite Numerose carie che necessitano di bonifica dentaria	–	–	–
Familiarità autoimmunità	–	–	✓ Madre: tiroidite di Hashimoto	✓ Nonna materna con patologia tiroidea	–
Familiarità PID	–	–	–	–	–
Familiarità morbidità frequente/ Adeno- o Tonsillectomia	–	–	–	–	–
Familiarità atopìa	–	–	–	–	–
Durata follow-up	2 anni	8 anni	7 anni	2 anni	3 anni

	PAZIENTE 16	PAZIENTE 17	PAZIENTE 18	PAZIENTE 19	PAZIENTE 20
Sesso	F	F	F	F	M

	PAZIENTE 16	PAZIENTE 17	PAZIENTE 18	PAZIENTE 19	PAZIENTE 20
Età attuale	13 aa	12 aa	5 aa	13 aa	17 aa
Età diagnosi	10 aa	9 aa	4 aa	10 aa	9 aa
Clinica esordio	Paziente con celiachia e tiroidite autoimmune. Rcontro di deficit di IgA in corso di esami di controllo endocrinologici	Due episodi di broncopolmonite, vari episodi di broncostruzione. Allergia alimentare, Asma, Celiachia.	Paziente con alvo diarroico sottoposta a numerosi screening per celiachia (negativi) con rilievo di SigAD.	Frequenti episodi infettivi delle prime vie aeree con cadenza pressochè mensile. 2 episodi di broncopolmonite. Dermatite atopica; allergia acari.	Morbilità frequente. Parotidite di origine virale, episodi di faringotonsillite. 1 episodio di broncopolmonite virale (7 aa)
Clinica attuale	Fenotipo clinico autoimmune	Fenotipo clinico autoimmune, atopico e di morbilità frequente	Miglioramento quadro clinico	Fenotipo clinico di morbilità frequente e atopia	Fenotipo di morbilità frequente di superficie, attualmente notevolmente ridotta
Polmoniti	–	✓	–	✓	✓
Malattie autoimmuni (età diagnosi)	✓ Celiachia (7 anni) Tiroidite autoimmune (7 anni)	✓ Celiachia (7 anni)	–	–	–
Asma (età diagnosi)	–	✓	–	–	–
Allergia (età diagnosi)	–	✓ Allergia alimentare e a inalanti.	✓ Enterocolite allergica	✓ Dermatite atopica Allergia acari della polvere. Sospetta allergia alle proteine del latte (non dimostrata)	–
Altro	Deficit staturponderale Dislessia e ritardo del linguaggio	Pubertà precoce (8 anni)	Colon irritabile Storia di eruzione eritemato-papulare al volto	Sospetto pubarca precoce	Adenoidectomia (13 aa) Linfoadenite inguinale destra (13 aa)
Familiarità autoimmunità	–	–	–	✓ Madre con tiroidite	✓ Nonna paterna: sindrome da anticorpi antifosfolipidi
Familiarità PID	–	–	–	–	–
Familiarità morbilità frequente/ Adeno- o Tonsillectomia	–	–	–	–	✓
Familiarità atopia	–	✓	–	–	✓
Durata follow-up	3 anni	3 anni	1 anno	3 anni	8 anni

	PAZIENTE 21	PAZIENTE 22	PAZIENTE 23	PAZIENTE 24	PAZIENTE 25
Sesso	M	M	F	F	F
Età attuale	8 aa	9 aa	11 aa	5 aa	15 aa
Età diagnosi	4 aa	6 aa	9 aa	5 aa	14 aa
Clinica esordio	Episodi infettivi ricorrenti delle vie aeree superiori. Storia clinica di broncopolmonite, bronchiolite, onicocriptosi e perionissi (courettage chirurgico). Episodio di adenomesenterite che ha necessitato di trattamento chirurgico	Episodi infettivi ricorrenti dall'età di un anno, inizialmente con cadenza mensile e successiva riduzione. Adenoidectomia e tonsillectomia in assenza di miglioramento clinico.	Morbilità frequente delle alte vie aeree. 2 episodi di broncopolmonite (a 2 e 7 anni) e uno di otite media. A 5 anni infezione da Salmonella tiphy.	Morbilità frequente di superficie	Morbilità frequente alte vie. Ipertrofia tonsillare. 4 episodi di polmonite.
Clinica attuale	Riduzione della morbilità di superficie. Paziente paucisintomatico	Fenotipo clinico di morbilità frequente di superficie.	Fenotipo clinico di morbilità frequente di superficie	Fenotipo clinico di morbilità frequente di superficie	Fenotipo clinico di morbilità frequente a prevalente localizzazione respiratoria
Polmonite	✓	-	✓	-	✓
Malattie autoimmuni (età diagnosi)	-	-	-	-	-
Asma (età diagnosi)	-	-	-	-	-
Allergia (età diagnosi)	-	-	-	-	-
Altro	Dolori addominali saltuari e crampiformi. Alvo tendenzialmente stitico, Deficit vit.D con PTH ai limiti alti della norma per età.	-	-	-	-
Familiarità autoimmunità	-	✓ Padre con tireopatia autoimmune	-	✓ Padre con DM1 diagnosticato a 8 aa	✓ Nonna materna con tiroidite autoimmune.
Familiarità PID	-	✓ Padre con SIgAD Fratello con CVID	-	-	✓ Sorella con CVID
Familiarità morbilità frequente/ Adeno o Tonsillectomia	-	✓ Padre con morbilità frequente in epoca infantile e broncopolmoniti	-	-	✓ Madre con morbilità frequente
Familiarità atopia	-	-	-	-	-
Durata follow-up	4 anni	3 anni	2 anni	0	1 anno

Tabella 8: Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati

Tabella 9: Caratteristiche laboratoristiche dei pazienti arruolati

	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3	PAZIENTE 4	PAZIENTE 5	PAZIENTE 6
Emocromo	Nella norma	Nella norma	Anemia prelatente	Nella norma	Modica piastrinosi e linfocitosi (verosimilmente in concomitanza di episodio infettivo)	Nella norma
IgA (mg/dl)	< 7	<7	<4	<7	<7	< 7
IgG (mg/dl)	1110	1070	1146	1330	1780	1070
IgM (mg/dl)	86	86	63	129	147	82
IgE (UI/ml)	27	5	/	/	/	< 5
IgA salivari (mg/dl)	/	<0,28	<0,7	<0,28	<0,8	/
AutoAc	-	-	-	-	-	-
Sottoclassi IgG (mg/dl)						
IgG1	787	778	998	1040	1360	797
IgG2	380	286	216	246	199	74
IgG3	18	47	41	38	200	18
IgG4	16	9	24	29	31	5
Sottopopolazioni linfocitarie (%)						
CD3+	66,30	71,3	66,4	67,10	73,7	80,80
CD4+	40,10	34,8	35,9	39,8	48,3	43,20
CD8+	25,20	34,5	25,8	26,6	23,7	21,60
CD19+	22,60	16,4	21,2	21,1	17,60	9,70
CD 16/56+	10,40	10,70	10,6	10,80	6,20	8,50

	PAZIENTE 7	PAZIENTE 8	PAZIENTE 9	PAZIENTE 10	PAZIENTE 11	PAZIENTE 12	PAZIENTE 13
Emocromo	Eosinofilia in soggetto atopico	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Eosinofilia	Moderata leucocitosi ed eosinofilia in soggetto atopico	Nella norma
IgA (mg/dl)	<4	<7	<7	<7	<7	<5	<7
IgG (mg/dl)	721	1010	1140	1310	1070	1037	1270
IgM (mg/dl)	97	118	140	125	40	81	86
IgE (UI/ml)	239	30	246	/	53	5140	/
IgA salivari (mg/dl)	< 1	<0,7	<0,7	<0,7	5,4	<0,675	<0,7
AutoAc	-	IgG TGA +	-	TRAB +	-	-	-
Sottoclassi IgG (mg/dl)							
IgG1	640	759	943	888	756	875	/
IgG2	431	207	370	315	286	151	/
IgG3	34	43	71	60	52	77	/
IgG4	41	9	181	28	4	9	/
Sottopopolazioni linfocitarie (%)							
CD3+	59,6	47,1	69,40	70,10	64,5	71,1	/
CD4+	30,30	27,60	38,5	45,10	40,40	34,5	/
CD8+	27,6	18,60	28,8	24,20	22,60	33,8	/
CD19+	19,8	36,60	21,70	13,60	23,20	13,3	/
CD 16/56+	17,7	14,9	7,20	14,7	11,60	14,2	/

	PAZIENTE 14	PAZIENTE 15	PAZIENTE 16	PAZIENTE 17	PAZIENTE 18	PAZIENTE 19
Emocromo	Nella norma	Nella norma	Nella norma. Lieve ↑ eosinofili	Modesta eosinofilia	Nella norma	Nella norma
IgA (mg/dl)	< 7	< 7	< 7	< 7	< 7	1
IgG (mg/dl)	1900 ↑	1250	1710	1090	1270	1302
IgM (mg/dl)	120	60	86	109	92	68
IgE (UI/ml)	/	4800	14	/	7	55
IgA salivari (mg/dl)	< 0,7	< 0,7	< 0,7	4,6	< 0,7	/
AutoAc	Anti-TPO+ e anti-TG +	IgG antiTGA e EMA+	IgG antiTGA e EMA+; Anti-TPO+ e anti-TG +	IgG antiTGA e EMA+	-	-
Sottoclassi IgG (mg/dl)						
IgG1	/	965	1141	773	/	/
IgG2	/	292	372	166	/	/
IgG3	/	69	47	36	/	/
IgG4	/	8	2	245	/	/
Sottopopolazioni linfocitarie (%)						
CD3+	/	77,60	72,3	72,8	/	67,10
CD4+	/	44,8	36,80	36,80	/	38,80
CD8+	/	31,2	31,70	33,6	/	26,60
CD19+	/	15,10	21,9	9,8	/	19,20
CD 16/56+	/	5,90 (↓)	4,80	16,5	/	/

	PAZIENTE 20	PAZIENTE 21	PAZIENTE 22	PAZIENTE 23	PAZIENTE 24	PAZIENTE 25
Emocromo	Nella norma	Nella norma, lieve ↑ MCV	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma
IgA (mg/dl)	< 4	< 7	< 7	< 7	< 7	<7
IgG (mg/dl)	1609	2230	1150	/	1100	/
IgM (mg/dl)	71	111	62	/	100	/
IgE (U/ml)	/	44	/	/	/	/
IgA salivari (mg/dl)	<0,7	<0,7	/	/	<0,7	/
AutoAc	-	p-ANCA+	-	ANA + (1:140)	-	-
Sottoclassi IgG (mg/dl)						
IgG1	1390	882	1000	/	645	/
IgG2	286	422	232	/	397	/
IgG3	96	26	53	/	44	/
IgG4	33	74	34	/	7	/
Sottopopolazioni linfocitarie (%)						
CD3+	71,6	72,10	70,20	/	45,30	/
CD4+	30,10	28,7	36,3	/	27,7	/
CD8+	38,5	42,4	30,80	/	15,9	/
CD19+	9,9	20,10	21,4	/	33,20	/
CD 16/56+	14,6	7,20	6,80	/	19,10	/

3.2 Criteri di esclusione

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che non rispettavano i criteri ESID 2015 per la definizione di deficit selettivo di IgA, quindi in caso di:

- livelli di IgA maggiori di 7 mg/dL
- età inferiore a 4 anni
- anomali livelli per età di IgG totali e/o IgM
- anomala risposta anticorpale ai vaccini

Si parla di difetto parziale di IgA nel caso in cui i livelli di IgA sieriche siano inferiori a 2 deviazioni standard rispetto ai valori normali per età e maggiori di 7 mg/dl, in soggetti di almeno 2 anni di età .

3.3 Metodi

Per ciascun paziente sono stati raccolti dati demografici, anamnesi fisiologica e patologica prossima e remota (con particolare attenzioni alle condizioni cliniche associate al deficit selettivo di IgA: infezioni ricorrenti, allergie, autoimmunità), anamnesi familiare (in particolar modo storia familiare di autoimmunità, di immunodeficienze primitive, morbidità frequente, atopia) e dati laboratoristici.

3.3.1 Esami di laboratorio

Alla diagnosi, per ogni paziente sono stati eseguiti esame emocromocitometrico e indagini immunologiche con dosaggio dei vari isotipi delle immunoglobuline seriche (comprese le IgE), delle sottoclassi IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) e delle sottopopolazioni linfocitarie (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56). Inoltre, è stato effettuato il dosaggio delle IgA secretorie salivari; qualora indosabili ($< 0,7$ mg/dL), abbiamo definito il deficit di IgA “selettivo e assoluto”.

I valori plasmatici di immunoglobuline, sottoclassi e sottopopolazioni sono stati poi valutati sulla base dei valori considerati normali per età, riportati rispettivamente nelle tabelle 10,11,12.

Oltre alla valutazione immunologica, in ciascun paziente è stato effettuato uno screening per l'autoimmunità, in particolar modo mediante il dosaggio di ANA, IgG anti-transglutaminasi e anti-endomisio, funzionalità tiroidea e anticorpi anti-tiroide (anti-tireoperossidasi, anti-tireoglobulina e anti-recettore per il TSH). Tali indagini sono state ripetute periodicamente in corso di follow-up.

Prima infanzia				Seconda Infanzia				Terza Infanzia			
Età mesi	IgG	IgA	IgM	Età anni	IgG	IgA	IgM	Età anni	IgG	IgA	IgM
0	978±202	–	9± 3	2	710±200	53±24	70±28	6	1007±236	123±41	87±27
1	720±150	22±10	38±12	2 ½	770±210	64±25	73±28	6 ½	1005±229	129±45	88±27
2	425±105	29±10	39±11	3	825±230	74±27	77±26	7	1040±223	136±48	90±27
3	480±110	31±11	41±13	3 ½	885±245	85±28	80±26	7 ½	1056±217	143±51	91±28
4	492±110	34±13	43±14	4	941±261	95±21	83±25	8	1075±207	150±55	92±28
5	502±100	34±13	45±15	4 ½	958±255	102±32	84±25	8 ½	1090±203	157±58	93±29
6	522±118	34±13	46±14	5	975±248	109±35	85±26	9	1107±195	164±61	94±29
9	551±135	33±11	50±12	5 ½	992±242	116±38	86±26	9 ½	1109±198	168±62	93±30
12	585±147	36±15	56±18					10	1110±200	172±63	93±31
15	620±162	39±19	61±23					10 ½	1112±202	177±64	93±32
18	655±176	42±23	67±29					11	1113±204	181±65	93±33
21	682±188	48±24	68±28					11 ½	1115±206	185±66	93±33
								12	1116±208	189±67	92±34

Tabella 10: Valori normali Ig per età (mg/dl ± 1DS)

Età	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1 mese	260 - 1060	87 - 410	14 - 55	4 - 56
4 mesi	180 - 670	38 - 210	17 - 70	0,01 - 36
6 mesi	180 - 700	34 - 210	15 - 80	0,01 - 23
1 anno	200 - 770	34 - 230	15 - 97	0,01 - 43
2 anni	250 - 850	38 - 260	15 - 100	0,01 - 79
3 anni	320 - 900	52 - 280	14 - 120	0,01 - 106
4 anni	350 - 940	63 - 300	13 - 126	0,01 - 127
6 anni	370 - 1000	72 - 340	13 - 133	0,01 - 158
9 anni	400-1030	85 - 410	13 - 142	0,01 - 189
12 anni	400 - 1150	98 - 480	15 - 149	3 - 210
18 anni	370 - 1280	106 - 610	18 - 263	4 - 230
> 18 anni	490-1140	150 - 640	20 - 110	8 - 140

Tabella 11: Valori normali per età delle sottoclassi IgG [mg/dl]

Sottopopolazioni linfocitarie	Sangue cordonale	1 giorno – 11 mesi	1 – 6 anni	7-17 anni	18-70 anni
CD3	55 (49-62)	64 (62-69)	64 (62-69)	70 (66-76)	72 (67-76)
CD4	35 (28-42)	41 (38-50)	37 (30- 40)	37 (33-41)	42 (38-46)
CD8	29 (26-33)	21 (18-25)	29 (25-32)	30 (27- 35)	35 (31-40)
CD19	20 (14- 23)	23 (19-31)	24 (21-28)	16 (12-22)	13 (11-16)
CD16+56	20 (14-30)	11 (8-17)	11 (8-15)	12 (9-16)	14 (10-19)

Tabella 12: Valori normali per età delle sottopopolazioni linfocitarie (% e range)

3.3.2 Citofluorimetria a flusso

(194)

Per citometria si intende la misura delle caratteristiche chimico-fisiche delle cellule. La citometria a flusso è una tecnica di laboratorio per la misurazione multiparametrica di caratteristiche chimiche e/o fisiche condotta su cellule o particelle in sospensione all'interno di fluidi di trasporto, che si muovono in flusso laminare (*stream*). Nella camera di flusso, ogni cellula viene investita da un fascio di luce focalizzata, emessa da un laser; l'interazione tra raggio laser e cellula provoca fenomeni di riflessione, rifrazione e diffrazione che consentono al citometro di individuare la singola cellula e analizzarne le caratteristiche fisiche, dipendenti da diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granulosità interna, rugosità di membrana.

Lo strumento diagnostico in uso è detto **citofluorimetro** poiché integra la citometria a flusso con la registrazione e la misurazione della fluorescenza emessa dai fluorocromi con cui le cellule sono state marcate per mezzo di anticorpi monoclonali, diretti contro una larghissima varietà di antigeni di membrana e/o intracellulare, associati tra loro nel cosiddetto “pannello anticorpale”. Utilizzando anticorpi monoclonali coniugati a composti

fluorescenti è possibile identificare le singole cellule analizzate in base a marcatori antigenici di superficie riconosciuti dall'anticorpo. La presenza di uno specifico antigene su una cellula, viene perciò rilevata ed utilizzata sia come indicatore dell'appartenenza di questa ad una data popolazione cellulare che del suo stadio di maturazione. In un campione cellulare, differenti fluorocromi possono essere utilizzati contemporaneamente per identificare diverse popolazioni e sottopopolazioni cellulari. Quindi eventi luminosi ed eventi fluorescenti emessi dalle cellule, che passano attraverso un sistema di specchi e filtri ottici, vengono rilevati da specifici “*detectors*” (fotodiodi e fotomoltiplicatori). I segnali rilevati e amplificati sono convertiti da analogici in digitali e inviati all'analizzatore elettronico che li elabora e li visualizza in tempo reale per mezzo di un grafico su un display. Tutte le informazioni sono salvate in memoria e organizzate in files elettronici.

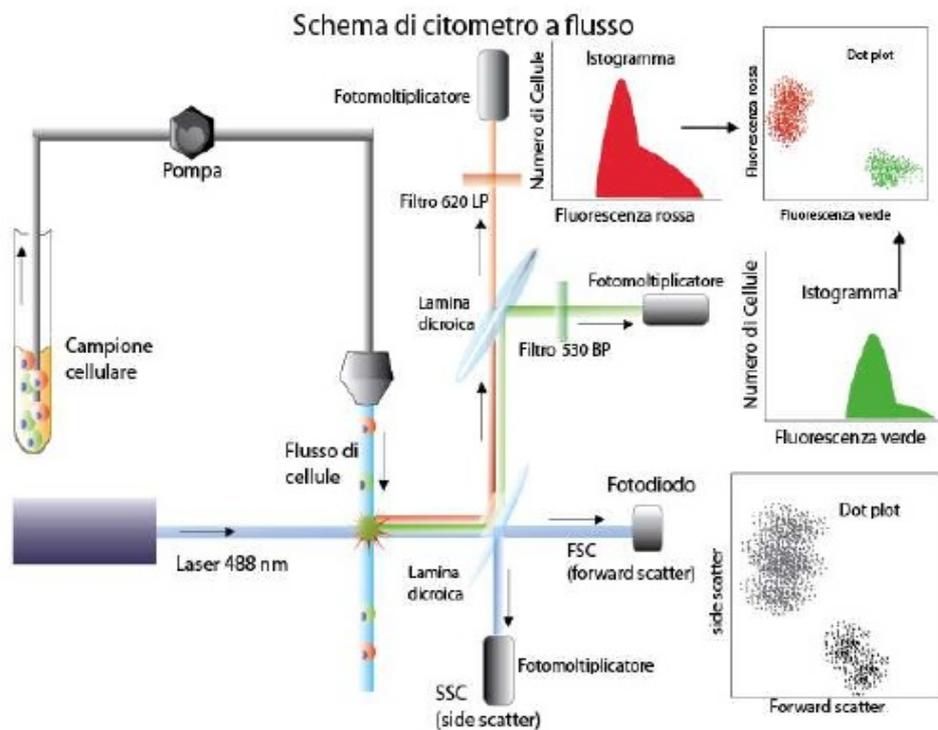


Illustrazione 17: Schema di citometro a flusso

Il sistema fluidico

I campioni analizzabili possono essere costituiti da sangue intero (sangue periferico, aspirato midollare), in genere dopo lisi degli eritrociti, o da sospensione di cellule dopo isolamento, da batteri o anche da agoaspirati di tessuti solidi, previa disgregazione con enzimi proteolitici o sistemi meccanici ad hoc. In genere, per l'analisi citofluorimetrica, è consigliato il prelievo di 3ml di sangue periferico o l'aspirazione di 1-2ml in caso di sangue midollare, per evitare un'eccessiva emodiluizione. Prima di essere analizzati, i campioni sono raccolti in provette contenenti EDTA come anti-coagulante. Possono essere impiegate anche provette con altri anti-coagulanti in base alle necessità (ad esempio, l'eparina sodica nello studio dei markers dei neutrofili). La conservazione dei campioni deve avvenire a temperatura ambiente, sebbene per lo studio delle immunoglobuline di superficie e delle catene leggere, sia consigliata la conservazione a 4° C. Il primo step nella preparazione dei campioni è costituito dalla marcatura delle cellule con anticorpi monoclonali; se devono essere marcati antigeni intracellulari, è necessario attuare tecniche di permeabilizzazione che consentano l'ingresso degli anticorpi specifici. Il secondo step della preparazione dei campioni di sangue intero è la lisi degli eritrociti.

Il campione in esame viene quindi aspirato e convogliato nel sistema fluidico grazie ad una pompa peristaltica. Regolando la pressione applicata al sistema pneumatico, è possibile variare la velocità di aspirazione, e quindi anche la velocità con cui le cellule viaggeranno lungo l'asse di flusso (cioè il *rate*, ossia il numero di "eventi" al secondo, ovvero il numero di cellule che hanno incontrato il raggio laser nell'unità di tempo). È fondamentale che il flusso delle cellule sia laminare, cioè che le cellule scorrano in fila occupando il "core" del flusso: solo così ogni cellula può costituire un singolo evento quando incontrerà il

raggio laser. Il flusso laminare è assicurato dal fenomeno della cosiddetta *focalizzazione idrodinamica* che consiste nell'iniettare la sospensione cellulare nel centro di un flusso che ha inizialmente diametro più elevato ma anche una elevata velocità. In questo modo la sospensione cellulare viene confinata nella parte centrale del flusso (*core flow*) e le cellule potranno scorrere singolarmente in camere di flusso dotate di diametro molto ridotto, mantenendo anche la giusta distanza, fondamentale per evitare che i segnali emessi da due cellule troppo vicine, nell'interazione con il raggio laser, coincidano ("doppietto"). Per questo motivo, se si vuole aumentare il *rate* conviene sempre non eccedere nella concentrazione delle cellule, ma aumentare la velocità dello stream. L'incontro tra lo stream e il fascio laser avviene in un punto critico del sistema noto come "camera di flusso" o "*nozzle*".

Il sistema ottico

Il sistema ottico del citofluorimetro è costituito dal sistema generatore del fascio di luce (*beam*), cioè uno o più laser, e dal sistema di rilevazione dei segnali di diffusione della luce, emessi dalle cellule, e dei segnali di fluorescenza, provenienti dai fluorocromi usati per la marcatura cellulare.

Il citofluorimetro sfrutta una geometria cosiddetta "ortogonale": infatti le direzioni del beam, dello stream (e dell'asse ottico di raccolta della fluorescenza) e l'asse ottico delle lenti che convogliano i fotoni emessi, sono mutuamente perpendicolari. L'interazione tra raggio e cellula modifica la direzione del fotone incidente e produce fenomeni di diffrazione (diffusione in avanti del fotone incidente), riflessione (diffusione del fotone incidente in un'altra direzione) e rifrazione (cambiamento di direzione del fotone incidente quando passa da un mezzo all'altro; nel caso delle cellule, quando passa nel citoplasma) della luce.

I segnali originati sono solitamente:

- *Forward scatter* (FSC o scatter a 0°): origina per il fenomeno di diffrazione, ossia la diffusione in avanti del fotone incidente. Esso è un indice di dimensione/volume cellulare, perché quanto maggiore è la sezione frontale della cellula investita dal fascio laser tanto maggiore sarà la quantità di luce riflessa in avanti.
- *Side scatter* (SSC o scatter a 90°): tale parametro si misura registrando i fotoni riflessi e rifratti a 90°. Il SSC dipende dall'irregolarità della superficie esterna della cellula e dalla sua complessità intracellulare (es. la granulosità, morfologia del nucleo, etc.). Per questo, i granulociti, ad esempio, presentano livelli di SSC molto superiori ai linfociti.

Ogni cellula viene dunque caratterizzata da questi due parametri che dipendono essenzialmente da taglia e complessità della cellula.

Fluorescenza e fluorocromi

La fluorescenza è il segnale originato dall'eccitazione dei fluorocromi, cioè idrocarburi poliaromatici o eterociclici che vengono eccitati da fotoni emessi da sorgenti laser o lampade UV. I fotoni eccitanti, caratterizzati da una specifica lunghezza d'onda e da una determinata energia, sono in grado di destabilizzare il fluorocromo; quando questo ritorna allo stadio iniziale (in un lasso di tempo dell'ordine di nanosecondi) emette fluorescenza, cioè fotoni con una maggior lunghezza d'onda e minor energia. Ciascun fluorocromo è caratterizzato da un determinato spettro di eccitazione e da un determinato spettro di emissione.

I fluorocromi più comunemente utilizzati sono:

- isotiocianato di fluoresceina (FITC): emette un segnale di fluorescenza verde a 520 nm;

- ficoeritrina (PE) che emette un segnale di fluorescenza rosso a 576 nm;
- ficoeritrina cianina (PC5) che emette un segnale di fluorescenza rosso intenso a 675 nm.

Gli spettri condizionano sia il tipo di sorgente luminosa eccitante impiegabile (cioè il laser del citofluorimetro deve emettere fotoni con lunghezza d'onda compresa nello spettro di eccitazione dei fluorocromi utilizzati), sia la modalità di associazione di due o più fluorocromi, perché quando si vogliono utilizzare più fluorocromi, è fondamentale evitare la sovrapposizione del range di emissione, altrimenti non sarà più possibile distinguere i singoli eventi emessi dalle fluorescenze. Nel tempo sono stati messi a punto diversi fluorocromi compatibili fra loro, rendendo possibile associarne sei o più senza rischiare sovrapposizione significativa tra i vari spettri di emissione.

I fluorocromi impiegati in ambito diagnostico-clinico sono legati ad anticorpi monoclonali (o policlonali) che riconoscono antigeni specifici, in modo tale che la fluorescenza sulla cellula target ne indichi la loro presenza. L'intensità di fluorescenza è in stretto rapporto con la densità di antigene (e quindi con la quantità di anticorpo legato alle cellule).

Poiché i fluorocromi posseggono brillantezza diversa e gli antigeni hanno densità differenti sulle cellule, nelle determinazioni multiparametriche è preferibile impiegare i fluorocromi meno brillanti per marcare antigeni ad alta densità, e fluorocromi più brillanti per quelli a bassa densità.

Gli anticorpi

Gli anticorpi legati ai fluorocromi e utilizzati per il riconoscimento antigenico possono essere policlonali o monoclonali (MoAb). Gli anticorpi policlonali sono ottenuti mediante immunizzazione di animali come coniglio, cavallo o topo; i

MoAb, invece, sono ottenuti mediante la tecnologia degli *ibridomi*, cioè l'ibridazione di una cellula produttrice di anticorpi con una cellula mielomatosa di topo. Si crea così una linea immortale e gli anticorpi monoclonali così ottenuti sono stabili e specifici per un antigene umano, sebbene ne riconoscano epitopi diversi. I diversi gruppi cooperativi internazionali hanno concordato che ogni gruppo di MoAb specifici per un antigene faccia parte di un cluster di designazione e differenziazione, definito come CD. Un numero specifica il tipo di antigene riconosciuto da tutti gli anticorpi appartenenti allo stesso cluster. Sono stati definiti più di 200 cluster. Per alcuni antigeni non è stato definito il cluster di appartenenza e, per il momento, questi sono definiti con il termine originario (es. FMC7, ZAP-70, etc.). L'elenco dei clusters viene periodicamente aggiornato in conferenze internazionali. Per eseguire marcature intracellulari è necessario impiegare metodi di permeabilizzazione delle cellule, che permettano non solo l'ingresso degli anticorpi marcati con i fluorocromi, ma anche la conservazione dell'integrità e delle caratteristiche di scatter delle cellule.

Conversione dei segnali, analisi e rappresentazione grafica dei dati

Il sistema ottico del citofluorimetro è collegato ad un processore che rileva, amplifica, elabora e memorizza tutte le informazioni derivanti dall'analisi di ogni evento. Tutti i dati sono registrati in un data file e vengono rappresentati in forma di istogrammi monoparametrici o biparametrici. I diagrammi monoparametrici sono istogrammi che mostrano valori relativi ad un parametro prescelto: sull'ascissa è riportata la distribuzione dei valori del parametro, mentre sull'ordinata vi è il numero degli eventi. L'istogramma mostra molto chiaramente il tipo di distribuzione dei valori registrati (per

esempio: distribuzione normale, a campana, secondo il modello gaussiano; distribuzione bimodale, etc). Comunque, poiché in citometria si eseguono correlazioni tra più parametri, vengono impiegati soprattutto diagrammi bi-parametrici quali dot-plot o, in alternativa, contour-plot o density-plot. Il DOT-PLOT è un tipo di rappresentazione detta bidimensionale a parametri correlati: è un diagramma a dispersione di punti, in cui ogni punto rappresenta un singolo evento caratterizzato da un valore tipico per ciascun parametro riportato sugli assi cartesiani. Il density-plot è un modo alternativo di presentare gli stessi dati di un dot-plot mediante scale di grigio corrispondenti all'intensità di fluorescenza; il color-plot è una alternativa al density-plot, in cui gli eventi si evidenziano come singoli punti e il colore cambia a seconda del numero di eventi con le stesse caratteristiche. Il contour-plot mostra i risultati mediante "linee di contorno": ognuna di queste linee connette punti per i quali i valori ottenuti avvengono con uguale frequenza (Fig. 18)

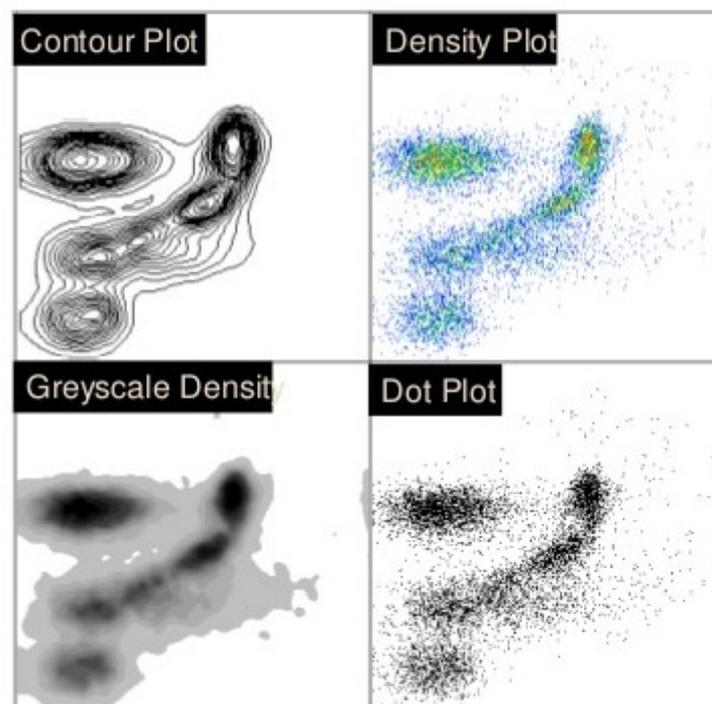


Illustrazione 18: Confronto tra diversi tipi di plot

Il dot-plot o “citogramma” mostra rispettivamente, sui due assi, i valori relativi a due diversi parametri: un tipico esempio è fornito dall’analisi contemporanea dei due parametri fisici FSC e SSC relativi ad una popolazione mista di leucociti (es. sangue periferico). In questa maniera due parametri (nell’esempio, la taglia cellulare e la complessità intracellulare) sono messi in correlazione tra loro, consentendo di identificare sottopopolazioni cellulari con determinate caratteristiche. Per questo motivo, il dot plot è particolarmente utile nell’analisi immunofenotipica delle cellule, quando è impiegato uno specifico pannello anticorpale. La selezione delle cellule da esaminare è detta “*gating*” ed è un’operazione che permette di isolare particolari sottopopolazioni cellulari in base a determinati parametri, per poi valutarne specifiche caratteristiche. Consiste proprio nel disegnare una “finestra elettronica con il mouse”, variamente poligonale, e può essere eseguita sia sui citogrammi che sugli istogrammi. La finestra disegnata prende il nome di “regione” o “gate”; questa consente di isolare una determinata popolazione da tutte le altre cellule e di analizzare i parametri successivi solo all’interno di tale popolazione, dividendola così in ulteriori sub-popolazioni. Di volta in volta, possono essere disegnate più regioni fino ad arrivare al gate desiderato che tiene conto di tutte le caratteristiche esaminate.

Applicazioni

La citofluorimetria consente di analizzare fino a 5000 cellule al secondo, quantificando numerosi parametri per ogni singola cellula. Tra le applicazioni possibili vi sono lo studio della ploidia e della proliferazione cellulare, l’analisi del ciclo cellulare, l’analisi fenotipica multiparametrica, la risposta del sistema immunitario ai vaccini, livelli di apoptosi in patologie associate a deplezione cellulare (es. AIDS) o accumulo cellulare (es. neoplasie).

Una delle principali applicazioni cliniche e sperimentali della citofluorimetria a flusso riguarda l'immunofenotipizzazione linfocitaria che consiste nell'utilizzo di anticorpi specifici diretti verso i marcatori di membrana CD, al fine di differenziare, all'interno di un pool di linfociti, le diverse sottopopolazioni.

Nel nostro studio, ci siamo serviti dell'indagine citofluorimetrica proprio per la valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie. Nelle patologie coinvolgenti il sistema immunitario, infatti, si possono ritrovare caratteristiche alterazioni tra le sottopopolazioni linfocitarie, che possono essere riconosciute grazie alla loro tipizzazione citofluorimetrica.

Il laboratorio di riferimento del nostro centro utilizza in citofluorimetro Epics XL; (Beckman Coulter Ink).

3.3.3 Nefelometria e turbidimetria

Nefelometria e turbidimetria sono metodiche ottiche che permettono di determinare la quantità di sostanza in sospensione in un liquido confrontando la luce diffusa da questa con quella diffusa da una sospensione a titolo noto. Tali metodiche si avvalgono dell'uso di una radiazione monocromatica che irradia un sistema disperso, formato cioè da particelle solide in un mezzo disperdente (sospensioni semplici, soluzioni colloidali).

Quando una radiazione luminosa attraversa una sospensione di particelle finemente disperse, si potranno avere o fenomeni di assorbimento di una parte della radiazione o di diffusione (riflessione, rifrazione, diffrazione). Un raggio luminoso che attraversa un fluido, infatti, subisce degli effetti dovuti

all'interazione tra il raggio stesso e le sostanze disciolte. Tale interazione si traduce per una piccolissima parte in cessione di energia da parte della luce alla materia disciolta, con conseguente riscaldamento di questa, e per la maggior parte in una deviazione del raggio luminoso, ossia una modifica della sua traiettoria. La deviazione è causata non solo dalla presenza di particelle opache, cioè non trasparenti alla luce, ma anche dall'inomogeneità ottica provocata da particelle che, pur essendo trasparenti, hanno un indice di rifrazione diverso da quello del liquido in cui sono sospese. Per un insieme di fenomeni di rifrazione, riflessione e diffrazione, una parte dell'energia luminosa è diffusa in direzioni differenti da quella del raggio incidente. Questa diffusione della luce (*light scattering*) è definita come un processo a causa del quale un raggio di luce, collidendo con una particella, modifica la propria direzione (ma non la sua lunghezza d'onda). Di conseguenza risulta attenuata l'intensità del raggio che procede nella direzione originaria. In definitiva la torbidità, ossia la presenza di particelle sospese, produce due effetti:

- assorbimento di energia luminosa,
- diffusione di energia luminosa.

Affinchè questi fenomeni di diffusione possano essere utilizzati a fini analitici, occorre che si verifichino alcune condizioni necessarie:

- radiazione monocromatica o anche policromatica (intervallo ristretto di 40-50 nm) ;
- sospensioni stabili, senza fenomeni di sedimentazione durante le letture; se ciò non è possibile, si possono aggiungere dei colloidoprotettori alle sospensioni, al fine di stabilizzarle. Il loro meccanismo di azione sfrutta sia fenomeni dovuti alle cariche elettrostatiche che possono essere presenti sulle particelle e che ne impediscono

l'aggregazione, sia un aumento della densità e della viscosità del mezzo liquido disperdente (ad esempio addizionando composti organici come etanolo e glicerina) ;

- dimensioni medie delle particelle sospese controllate e, comunque, dello stesso ordine di grandezza delle lunghezze d'onda delle radiazioni incidenti;
- mezzo disperdente e particelle sospese devono avere indici di rifrazione abbastanza diversi.

Quando la dimensione delle particelle che provocano torbidità è dell'ordine superiore al micrometro, prevalgono i fenomeni di assorbimento, pertanto si ricorre alla misura turbidimetrica, mediante cui si valuta l'entità dell'assorbimento prodotto dalla fase dispersa; viceversa, quando si è in presenza di particelle di più piccole dimensioni (dell'ordine di decine o centinaia di nanometri), si utilizza la nefelometria.

Turbidimetria

La turbidimetria misura l'assorbimento della luce da parte della fase dispersa. È la metodica che si utilizza quando l'assorbimento prevale sul fenomeno di diffusione (l'intensità del raggio emergente è particolarmente attenuata), evenienza che si verifica quando le dimensioni delle particelle in sospensione sono dell'ordine o superano il micrometro. L'effetto della diffusione potrà valutarsi pertanto misurando la trasmittanza (T%) della sospensione o un parametro analogo all'assorbanza, cioè la turbidanza (S) mediante una tecnica analoga alla spettrofotometria

Uno schema semplificato di un turbidimetro è riportato in figura 19.

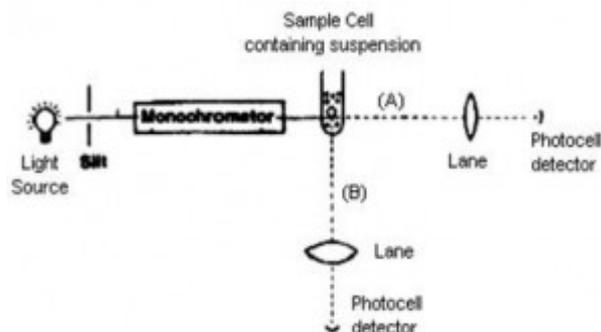


Illustrazione 19: Schema turbidimetro

Esso è costituito da:

1. Sorgente continua
2. Monocromatore
3. Cella porta campione
4. Rivelatore (fototubo)

Le possibili applicazioni di interesse medico sono riportate in Fig. 20

Sostanza	Reazione o materiale utilizzato per l'analisi turbidimetrica
Albumina e altre Plasmaproteine	Complesso antigene-anticorpo
Fibrinogeno	Solfato di ammonio; trombina-fibrina
Proteine dei siero e lipoproteine	Soluzione tamponata di timolo (Mac Lagan); cloruro mercurio in ambiente moderatamente alcalino Takata)
Proteine urine	Acido solfosalicilico, complesso antigene-anticorpo
β -lipoproteine	Eparina + CaCl_2 a bassa forza ionica, complesso antigene-anticorpo
β_2 -microglobulina	Complesso antigene-anticorpo
Lipasi	Emulsione olio oliva
Lisozima	Micrococcus lysodeicticus

Illustrazione 20: Possibili applicazioni turbidimetria

Nefelometria

La nefelometria è la tecnica che si utilizza in presenza di particelle di più piccole dimensioni (decine o centinaia di nanometri); in tal caso, infatti, la diffusione è molto più intensa. L'intensità della radiazione che viene trasmessa nella direzione di incidenza è poco diversa rispetto a quella della radiazione incidente; la diffusione, infatti, non determina una perdita significativa di intensità della radiazione incidente, al punto che le differenze risultano irrilevanti e quindi non suscettibili di misure differenziali. Nella nefelometria, quindi, si misura l'intensità della luce diffusa dalla sospensione in una direzione a 90° (I_d) rispetto a quella della radiazione incidente (I_0). È necessario perciò che il sistema di rivelazione sia posizionato in modo da raccogliere la radiazione diffusa a 90° rispetto al raggio entrante nella cuvetta. L'apparecchiatura deve essere perciò di tipo dedicato, con un'architettura che preveda questo uso. Uno schema semplificato di nefelometro è riportato in Fig. 21

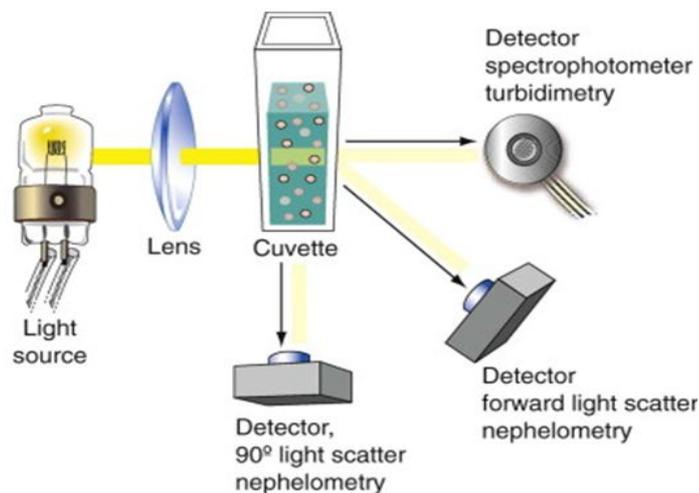


Illustrazione 21: Funzionamento nefelometria

Tale metodica si basa sulla *legge di Rayleigh*:

$$I_d = K \cdot \frac{N \cdot V^2}{r^2 \cdot \lambda^4} \cdot I_0$$

dove I_d è l'intensità della luce diffusa, I_0 l'intensità della luce incidente, λ la lunghezza d'onda della luce, N il numero di particelle disperdenti per unità di volume, V il volume delle particelle, r la distanza del rilevatore dalla cuvetta e k una costante.

Operando ad una lunghezza d'onda fissa e con dimensioni di particelle e intensità di luce incidente costanti, tale formula si semplifica a $I_d = K \cdot N$, quindi l'intensità della luce incidente è funzione lineare della quantità di particelle in sospensione.

Alcune delle applicazioni della nefelometria in medicina sono riassunte in Fig.22

Sostanza determinata	Materiale usato per l'analisi
Lipoproteine	Siero dopo filtrazione per membrana
Frazioni plasmaproteine	Plasma + anticorpo + polietilenglicole
Amilasi	Siero + emulsione di amido
Lipasi	Siero + emulsione olio di oliva
Proteine urinarie	Siero + anticorpi specifici

Illustrazione 22: Applicazioni cliniche della nefelometria

Le procedure nefelometriche possono essere:

- dirette: viene considerata la reazione tra anticorpi ed antigeni;
- indirette: viene misurata la quantità di aptene (farmaco) coniugato con una proteina nel campione.

Gli analizzatori nefelometrici effettuano i dosaggi secondo due modalità:

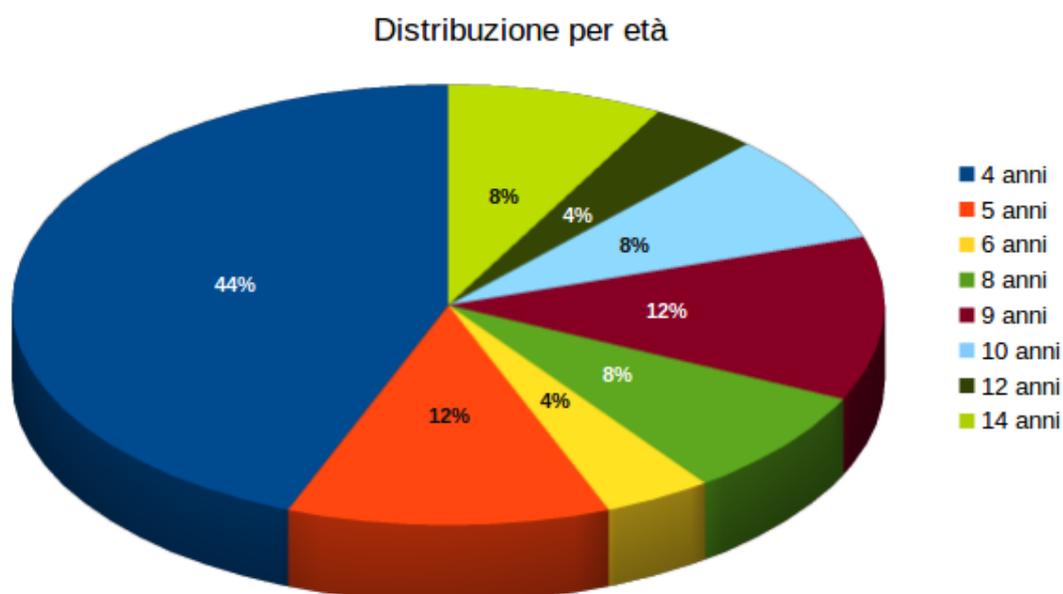
- in *end point*: un'adeguata incubazione consente o meno la formazione in vitro degli immunocomplessi che vengono determinati al punto d'equilibrio;
- in cinetica (o *fixed time*): la miscela di reazione viene monitorata e la velocità di variazione dell'assorbanza in un prefissato intervallo di tempo consente la determinazione della concentrazione analitica.

Nello studio condotto, la nefelometria è stata usata per dosare le immunoglobuline e le sottoclassi di IgG. In questo caso sono stati usati anticorpi specifici per le immunoglobuline contenute nel siero umano, in modo da determinare immunocomplessi formati dalle Ig sieriche e gli anticorpi anti-Ig. Sfruttando il fenomeno della diffrazione della luce provocato da questi immunocomplessi, si è in grado, grazie al nefelometro, di misurare l'intensità della luce diffratta, che risulta direttamente proporzionale alla concentrazione delle IgA, IgG totali (e sottoclassi), o IgM presenti nel campione in esame (proporzionale alla concentrazione ematica). La valutazione avviene per confronto con un calibratore a concentrazione nota.

CAPITOLO 4: RISULTATI

4.1 Caratteristiche della coorte di pazienti arruolati

Lo studio ha preso in considerazione 25 pazienti con deficit selettivo di IgA, 14 femmine e 11 maschi. L'età media in cui è stata posta diagnosi di SIgAD è 6,72 anni. Nella maggior parte dei casi 11/25 (= 44%) il deficit è stato diagnosticato in bambini di 4 anni di età. In media, il periodo di follow-up è stato di 3,44 anni.



Il fenotipo clinico maggiormente associato è quello delle infezioni ricorrenti (22/25 = 88%), in particolar modo con interessamento delle vie aeree superiori. Tuttavia in 11 casi (44% della casistica totale e 50% dei pazienti con fenotipo clinico di morbidità frequente) si è registrato almeno un episodio di polmonite. Coinvolgimento infettivo del tratto gastro-intestinale è stato riscontrato in 7 casi (4 gastro-enteriti virali, un episodio di ossiuriasi, una positività per

Helicobacter Pylori). In altri 3 casi si sono registrati disturbi gastrointestinali: un caso di colon irritabile, un paziente con alvo ad impronta diarroica e un paziente con storia di dolori addominali crampiformi e alvo stitico.

In un caso le manifestazioni infettive erano soprattutto cutanee ed orali; infine si è osservato un caso con infezioni urinarie ricorrenti.

Al secondo posto per prevalenza tra le manifestazioni cliniche associate vi sono le patologie allergiche, presenti in 7 /25 pazienti (28%). A seguire, in 6 casi/ 25 (24%) si riscontrano patologie autoimmuni. In 4 pazienti (16%) si osservava patologia asmatica. Infine, un paziente risultava totalmente asintomatico e giunto alla diagnosi per rilievo occasionale di livelli di IgA inferiori a 7 mg/ dl.

Tra le condizioni osservate, vi sono stati anche un caso di pubertà precoce, uno di sospetto pubarca precoce, 2 ritardi dell'accrescimento staturo-ponderale.

In figura 23 è schematizzata la distribuzione delle varie condizioni cliniche associate.

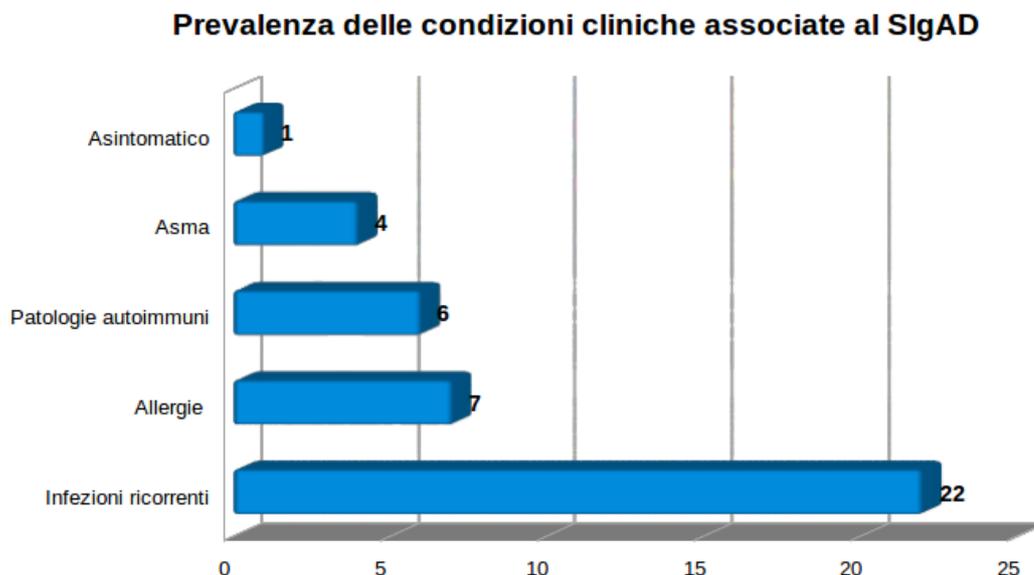


Illustrazione 23: Distribuzione condizioni cliniche associate al SigAD nella coorte di pazienti arruolati

Nel nostro studio, inoltre, abbiamo valutato anche la storia clinica familiare dei pazienti arruolati, in particolare per quanto concerne autoimmunità, immunodeficienze primitive (PID), morbilità frequente e atopia (Fig 24).

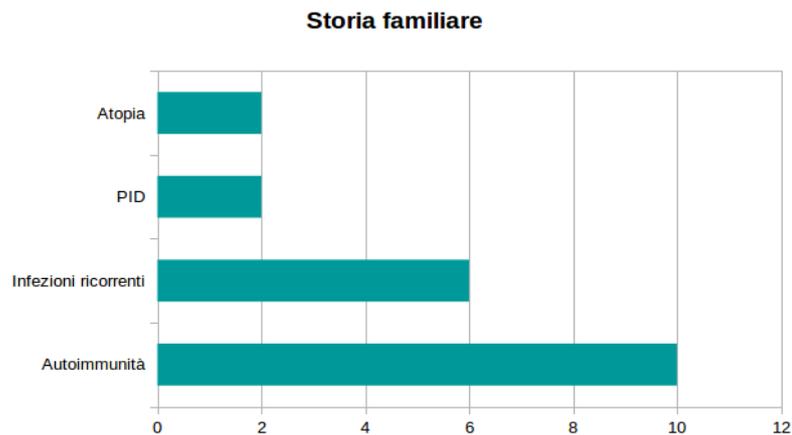


Illustrazione 24: Condizioni cliniche associate nella storia familiare

Familiarità per patologie autoimmuni era presente in 10 pazienti (40%), di cui in un solo caso in un paziente con autoimmunità. In 6 casi si riscontrava familiarità per morbilità frequente. In 2 pazienti vi era familiarità per PID (CVID). Infine in 2 casi si osservava associazione con storia familiare di atopia.

4.2 Caratteristiche dei pazienti con disordini autoimmuni

Nelle tabelle seguenti (Tab.13 e 14) sono riassunte le principali caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti affetti da deficit selettivo di IgA con fenotipo autoimmune.

Pz	Sesso	Età (anni)	Età diagnosi SIgAD (anni)	Disordine autoimmune (età diagnosi)	Asma	Allergia	Morbilità frequente	Polmonite	Familiarità per patologie autoimmuni	Fam PID	Fam. Atopia/ asma	Altro
1	M	8	5	Celiachia (8 anni)	-	-	✓	-	-	-	✓	
2	M	12	8	Morbo di Basedow (7 anni)	-	-	✓	✓	-	-	-	
3	F	16	14	Tiroidite autoimmune (9 aa) FanHep2+ 1:160	-	-	✓	-	Patologia tiroidea (nonna materna)	-	-	
4	M	15	12	Celiachia (6 anni)	✓	-	✓	-	-	-	-	
5	F	13	10	Celiachia + Tiroidite autoimmune (7 anni)	-	-	-	-	-	-	-	Dislessia e ritardo nel linguaggio
6	F	12	9	Celiachia (7 anni)	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	Pubertà precoce (8 anni)

Tabella 13: Caratteristiche cliniche dei pazienti con autoimmunità

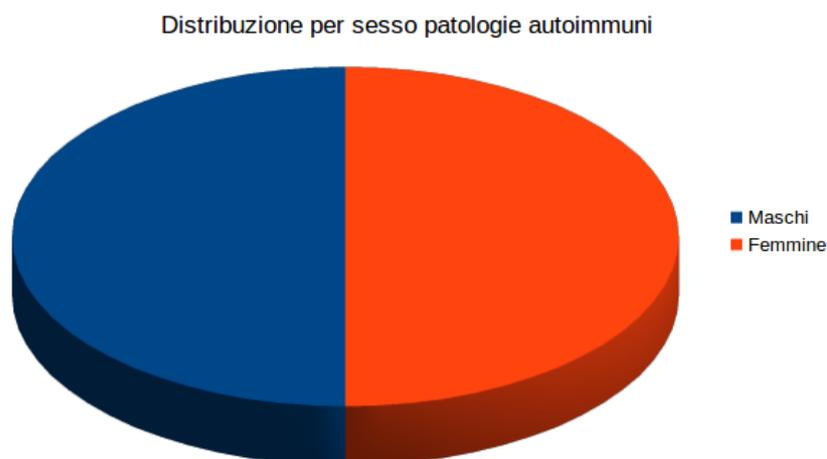
Pz	Sesso	Età (anni)	IgA (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgE (UI/ml)	IgA salivari	Alterazioni sottoclassi IgG	Alterazioni sottopop. linfocitarie	Emocromo
1	M	8	< 7	1010	118	30	<0,7	–	Lieve ↓ CD3+ (47,10%)	Nella norma
2	M	12	< 7	1310	125	–	<0,7	–	↓ CD19+ (13,60%)	Nella norma
3	F	16	< 7	1900	120	–	<0,7	–	–	Nella norma
4	M	15	< 7	1250	60	4800	<0,7	–	↓CD16+56 (5,90 % v.n: 9-16%)	Nella norma
5	F	13	< 7	1710 (†)86	–	14	<0,7	–	↓CD16+56 (4,80 % v.n: 9-16%)	Lieve eosinofilia
6	F	12	< 7	1090	109	–	4,6	↑ IgG4 (245; vn: 3-189)	↑ CD16+56 (16,5% v.n: 9-16%)	Modesta eosinofilia

Tabella 14: Caratteristiche laboratoristiche dei pazienti con autoimmunità

Tra i 25 pazienti arruolati nel nostro studio, 6 presentano associazione con patologia autoimmune, di cui 1 con più di un disordine autoimmune (celiachia e tiroidite autoimmune). Ciò corrisponde ad una prevalenza del 24%, concorde con i dati riportati in letteratura. Inoltre 1 paziente presentava positività per p-ANCA, in assenza di manifestazioni cliniche.

4.2.1 Distribuzione per sesso

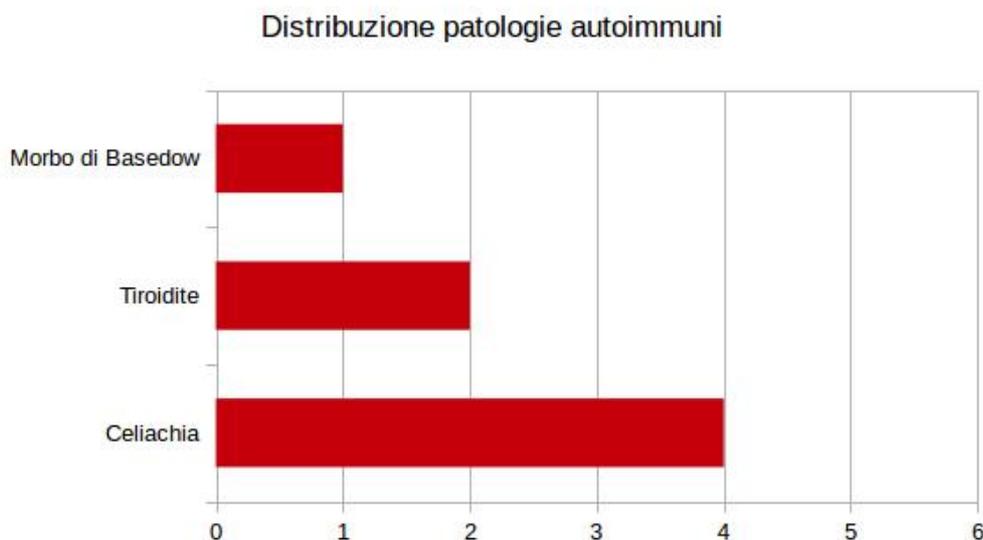
Tra questi 6 pazienti, la distribuzione M:F è del tipo 1:1, come evidenziato dal seguente grafico.



Considerando il totale della popolazione arruolata nello studio, 3/14 (21%) pazienti di sesso femminile e 3/11 (27%) pazienti di sesso maschile hanno mostrato manifestazioni autoimmuni. Sebbene nel nostro studio, quindi, le manifestazioni autoimmuni siano più frequenti nei maschi, tale dato non è statisticamente significativo ($P=1$).

4.2.3 Prevalenza patologie autoimmuni

Le patologie autoimmuni osservate nel nostro studio sono state celiachia e patologie tiroidee.



La celiachia è la condizione autoimmune maggiormente rappresentata, presente in 4 casi su 6, con uguale distribuzione tra i sessi (2 maschi e 2 femmine) con una prevalenza del 67% sul totale dei pazienti con autoimmunità. In un paziente, tale condizione risulta anche associata alla presenza di tiroidite.

Considerando il totale dei 25 pazienti afferenti allo studio, la celiachia ha una prevalenza di 4/25, quindi del 16%.

In 2 casi si osserva, invece, tiroidite, che ha dunque una prevalenza di circa il 33% tra le manifestazioni autoimmuni e dell'8% considerando la totalità dei pazienti osservati. Entrambi i casi di tiroidite interessano soggetti di sesso femminile.

Infine, il morbo di Basedow si osserva in un solo paziente, di sesso maschile,

rappresentando quindi circa il 17% sul totale delle manifestazioni autoimmuni osservate. La prevalenza totale di tale tireopatia nella coorte di 25 pazienti studiati è invece del 4%.

4.2.3 Altre condizioni cliniche associate nei pazienti con autoimmunità

Altre manifestazioni cliniche associate a SIgAD nel paziente con autoimmunità

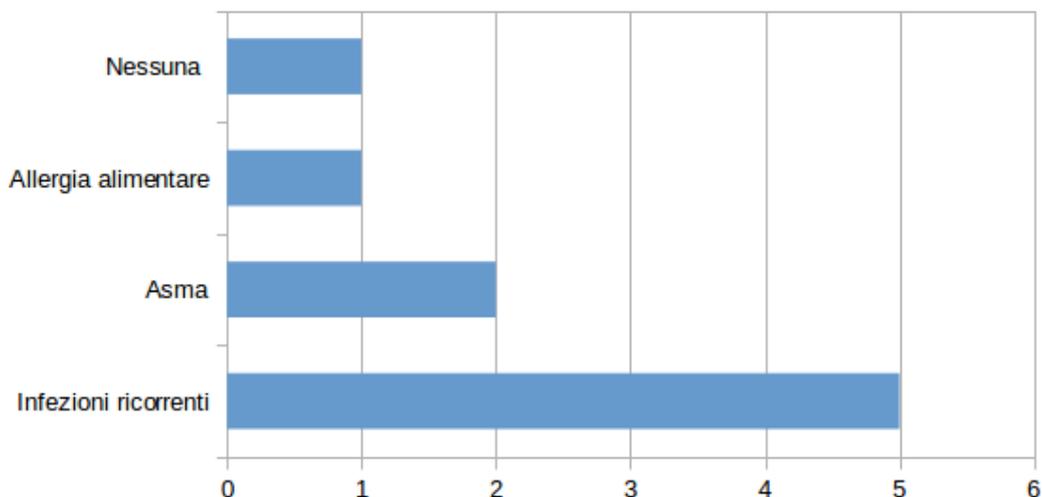


Illustrazione 25: Frequenza altre condizioni associate al SIgAD nel paziente con manifestazioni autoimmuni

Come illustrato in Fig. 25, tra i 6 pazienti con patologia autoimmune, in 5 casi si ha associazione con infezioni ricorrenti e in 2 di questi pazienti vi è anche associazione con atopia (asma allergico e/o allergia alimentare). Soltanto in un paziente il fenotipo clinico è caratterizzato dalla sola presenza di autoimmunità (celiachia e tiroidite autoimmune).

4.2.4 Distribuzione per età

L'età media in cui è stata posta diagnosi di deficit selettivo di IgA è 9,67 anni, quindi più elevata rispetto l'età media di 6,72 anni osservata per l'intera coorte di pazienti arruolati nello studio. La diagnosi di autoimmunità è stata posta in media a 7,33 anni. Nella nostra casistica, infatti, soltanto un caso di autoimmunità (celiachia) è stato riscontrato a seguito della diagnosi di SIgAD, dopo 3 anni di follow-up. Negli altri 5 casi, i pazienti avevano già diagnosi di malattia autoimmune.

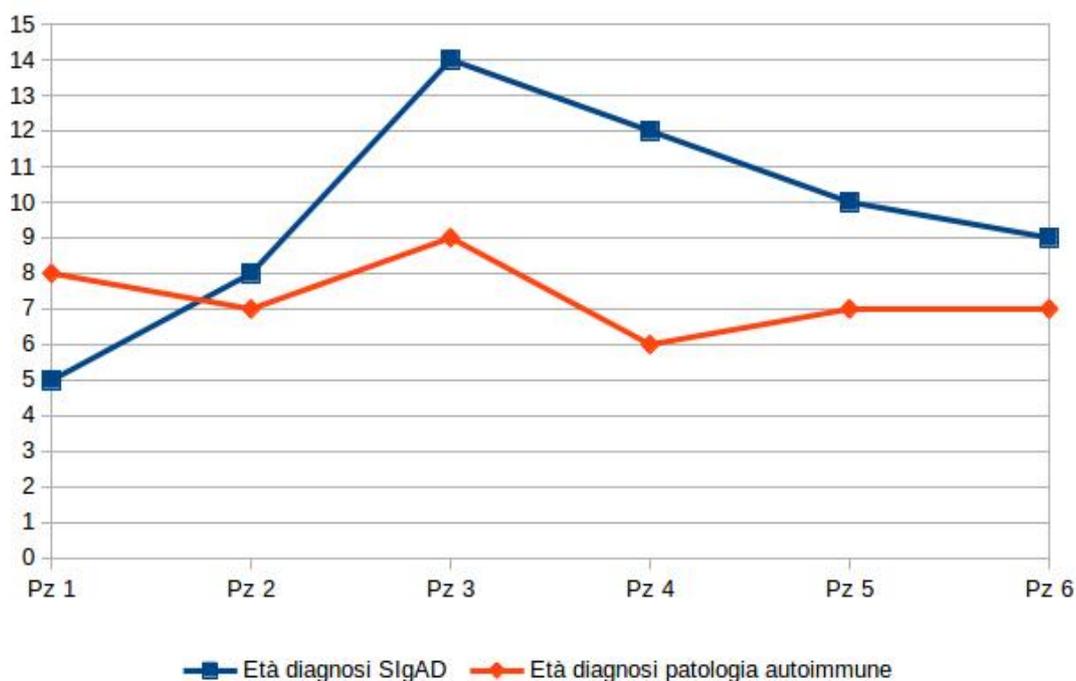


Illustrazione 26: Età diagnosi

4.2.5 Storia familiare

L'anamnesi familiare è positiva per patologia autoimmune in un solo caso (patologia tiroidea nella nonna materna); in 2 casi vi è familiarità per atopia. Negli altri 3 pazienti con patologia autoimmune, l'anamnesi familiare è muta.

4.2.6 Caratteristiche laboratoristiche

Immunoglobuline

La concentrazione di IgA plasmatiche in tutti i pazienti con malattie autoimmuni era in tutti i casi inferiore a 7 mg/dL, condizione necessaria per la definizione di deficit selettivo di IgA secondo i criteri ESID 2015 e pertanto per l'arruolamento nello studio.

La valutazione degli isotipi immunoglobulinici M e G in linea di massima ha mostrato livelli nella norma per età, in accordo con i criteri ESID 2015.

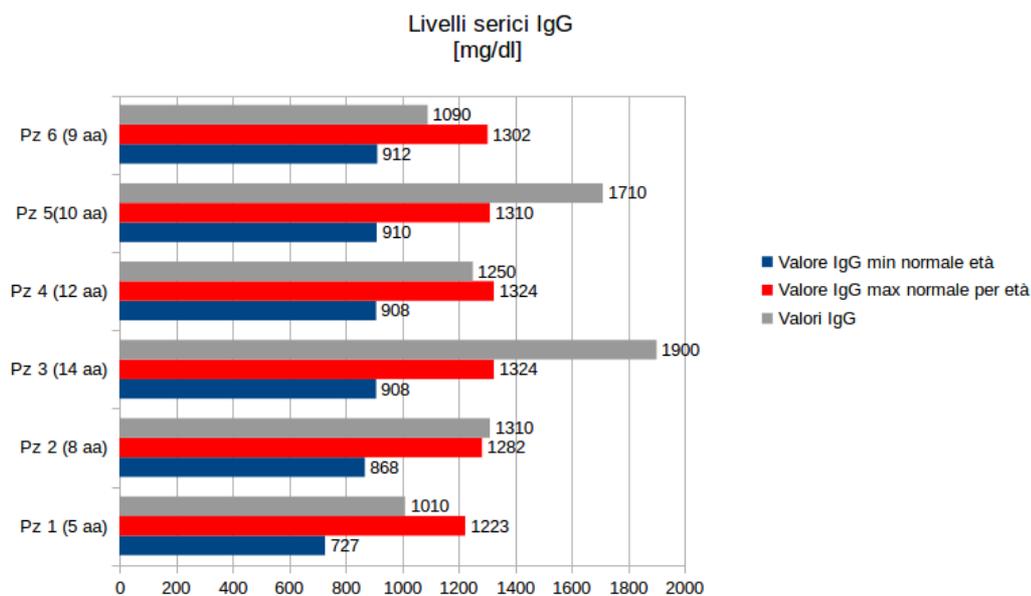


Illustrazione 27: Livelli serici IgG confrontati con i valori normali per età

Il grafico (Fig. 26) mostra in grigio i livelli di IgG dosate nei pazienti con patologia autoimmune. In blu e in rosso sono riportati rispettivamente i valori minimi e massimi considerati nella norma per età. Si può notare che in 3 casi (paziente 2, paziente 3 e paziente 5) vi è un aumento dell'isotipo G, da considerarsi a significato compensatorio.

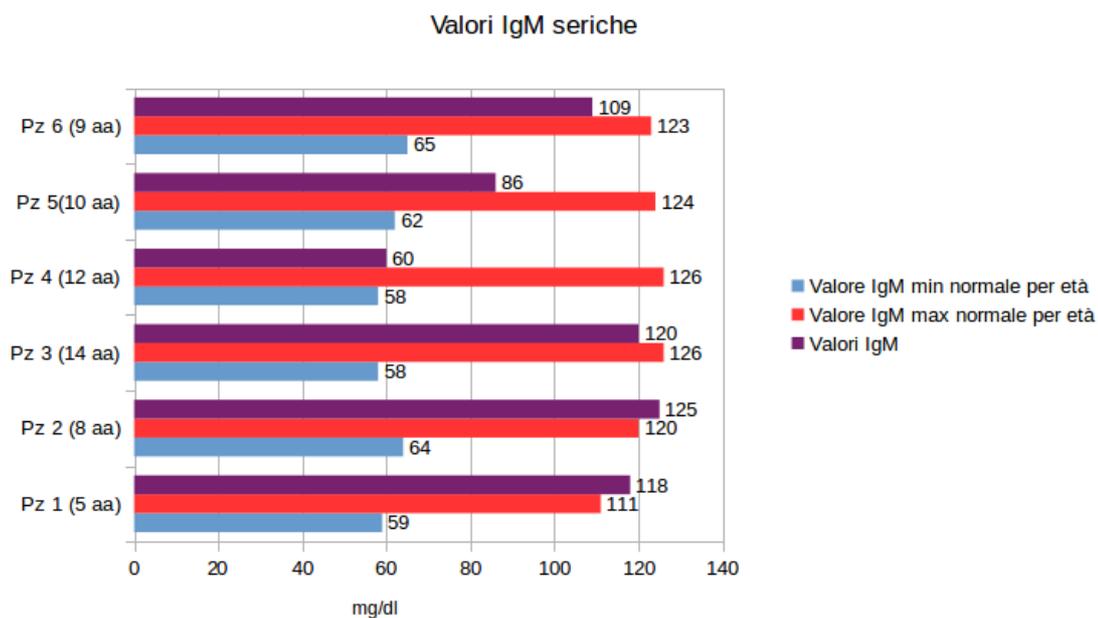


Illustrazione 28: Livelli serici IgM confrontati con i valori normali per età

Come si può osservare in Fig.28 invece, i valori delle IgM risultano sempre nella norma per età.

La valutazione delle IgA salivari ha mostrato livelli inferiori a 0,7 mg/dl (IgA salivari indosabili) in 5 pazienti, configurando un deficit selettivo e assoluto. In un paziente i livelli di IgA salivari mostravano valori di 4,6 mg/dl.

Sottoclassi IgG

La valutazione delle sottoclassi IgG risulta nella norma per età; in un unico caso (paziente 6) si osserva un modico incremento dei livelli di IgG4 (245 mg/dL; valori normali per età: 3-189 mg/dL).

Valutazione quantitativa delle sottopopolazioni linfocitarie

Lo studio ha esteso la valutazione immunologica anche ad analisi quantitative delle sottopopolazioni linfocitarie, comprendendo i linfociti T CD3+, CD4+, CD8+, i linfociti B CD19+ e i T CD16+56, a funzione natural killer.

Nel campione di pazienti con SIgAD e fenotipo clinico autoimmune, si sono osservate alcune modiche alterazioni, riportate nel grafico in Fig.29.

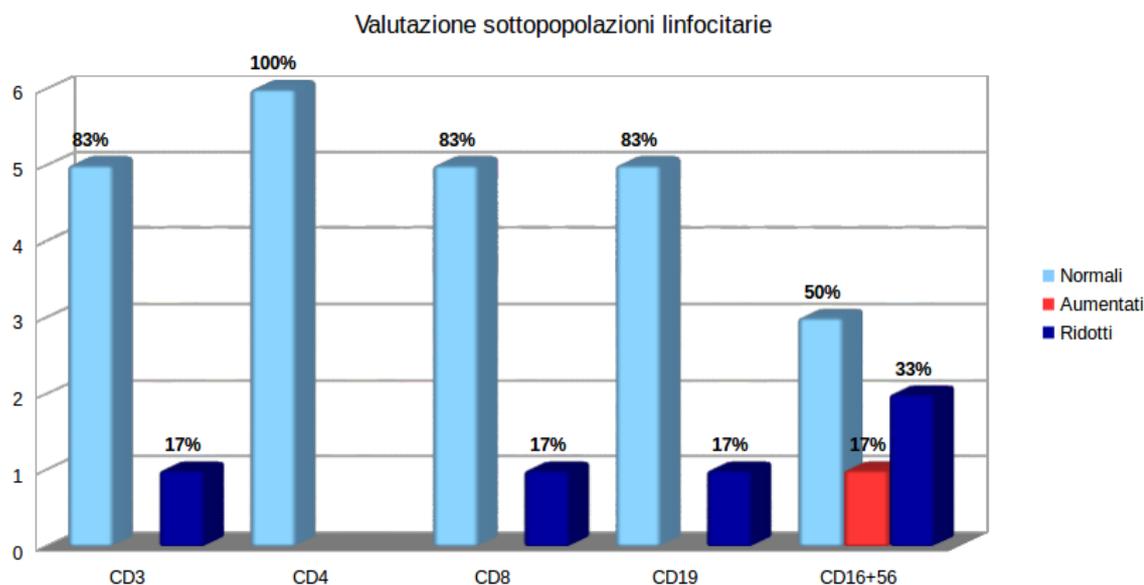


Illustrazione 29: Valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie

Come si evince dal grafico (Fig. 29), i linfociti T CD3+ risultano ridotti in 1 paziente (17%), in cui si osserva anche una lieve riduzione dei linfociti T CD4+ (Paziente 1: 18,25% ; valori normali: 25-32%). I valori dei linfociti T CD8+ sono invece risultati nella norma in tutti i pazienti considerati. I linfociti B CD19+ mostrano una lieve riduzione in un solo paziente (17%). Per quanto riguarda i linfociti a funzione natural killer, si è riscontrata una alterazione rispetto ai valori considerati normali per età in 3 pazienti (50%): 2 pazienti (pazienti 4 e 5), cioè il 33% dei casi, mostravano modesta riduzione, mentre in un paziente (paziente 6), si osservava un lieve aumento.

4.3 Confronto

Il nostro studio, infine, ha confrontato le caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti con fenotipo autoimmune con quelle dei pazienti senza autoimmunità, valutando l'eventuale presenza di particolari associazioni e la loro significatività (mediante test di Fisher a due code, con valori di p significativi quando uguali o inferiori a 0.05).

Caratteristiche	Pazienti totali (N=25)	Con autoimmunità (n=6)	Senza autoimmunità (n=19)	Valore di P
Sesso (M/F)	11/14	3/3	8/11	1
Infezioni ricorrenti N° (%)	22 (88%)	5 (83%)	17 (89%)	1
Polmoniti	11 (44%)	2 (33%)	9 (47%)	0,661
Allergia	7 (28%)	1 (17%)	6 (32%)	0,634
Asma	4 (16%)	2 (33%)	2 (10,5%)	0,234
Familiarità autoimmunità	10 (40%)	1 (17%)	9 (47%)	0,345
Familiarità PID	2 (8%)	0	2 (10,5%)	1
Familiarità atopia	2 (8%)	1 (17%)	1 (5%)	0,43

Tabella 15: Caratteristiche cliniche dei pazienti con SIgAD con o senza autoimmunità

Confrontando le caratteristiche dei pazienti con malattie autoimmuni con quelle dei pazienti senza autoimmunità si notano alcune differenze. In primis, le malattie autoimmuni nella coorte di pazienti osservata sono più frequenti nel sesso maschile, infatti 3/11 (27%) pazienti di sesso maschile e 3/14 (21%) pazienti di sesso femminile hanno mostrato manifestazioni autoimmuni. Questa differenza, tuttavia, non è significativa ($P=1$).

Le infezioni ricorrenti sono presenti in 5/6 pazienti con autoimmunità (83%) e

in 17/19 (89%), una differenza chiaramente non significativa ($p = 1$).

In 2 dei 6 pazienti con autoimmunità vi sono stati episodi di polmonite (33%), mentre nei soggetti senza autoimmunità si sono osservati in 9 /19 casi (47%); anche in questo caso tale differenza non è significativa ($p = 0,661$).

Si osservano differenze anche per quanto riguarda allergie (17% dei pazienti con autoimmunità e 32% dei pazienti senza autoimmunità) e asma, che ha maggior prevalenza nei soggetti con autoimmunità (33%) rispetto a soggetti senza patologie autoimmuni (10,5%); in entrambi i casi non sono differenze significative ($p = 0,634$ e $p=0,234$, rispettivamente).

Inoltre, neanche la storia familiare di autoimmunità o quella di PID risultano predittive per lo sviluppo o meno di un fenotipo clinico autoimmune ($p=0,345$ e $p= 1$, rispettivamente). Abbiamo valutato anche la prevalenza di storia familiare di atopia e morbidità frequente, ancora una volta con differenze statisticamente non significative.

Analogamente, abbiamo proceduto a confrontare anche le caratteristiche laboratoristiche dei due gruppi “con” e “senza” autoimmunità, in particolar modo focalizzando l'attenzione su quelle che nei pazienti autoimmuni erano risultate discostarsi dai valori considerati nella norma per età. Nessuna delle alterazioni (effettivamente di minima entità) riscontrate alla valutazione immunologica è risultata significativa ($p > 0.05$).

Caratteristiche N (%)	Pazienti totali (N=25)	Con autoimmunità (n=6)	Senza autoimmunità (n=19)	Valore di P
Valori IgG aumentati	8 (32%)	3 (50%)	5 (26,3%)	0,344
↑ IgG1	2 (8%)	0	2 (10,5%)	1
↑ IgG2	5 (20%)	0	5 (26,3%)	0,289
↑ IgG3	1 (4%)	0	1 (5%)	1
↑ IgG4	2 (8%)	1 (17%)	1 (5%)	0,430
Alterazioni quantitative CD16/56+	7 (28%)	3 (50 %)	4 (21%)	0,298

CAPITOLO 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il deficit selettivo di IgA (SIgAD) è la più comune immunodeficienza primitiva (1), in particolare nella popolazione caucasica, in cui la prevalenza oscilla tra 1:142 e 1:965 nati vivi (12). Secondo i criteri della European Society for Immunodeficiency (ESID 2015) e quelli del Pan-American Group for Immunodeficiency (PAGID 2015) tale immunodeficit è definito come una riduzione dei livelli di IgA a valori inferiori a 7 mg/dl, in presenza di normali livelli per età degli isotipi immunoglobulinici G ed M, in individui di almeno 4 anni di età, dopo che altre cause di ipogammaglobulinemia siano state escluse. La risposta anticorpale ai vaccini è normale (4).

L'esatta patogenesi del SIgAD è ancora da definire; il principale difetto chiamato in causa sembrerebbe l'incapacità delle cellule B a differenziarsi in plasmacellule IgA secernenti (15, 144, 145), forse per alterazione dell'ambiente citochinico (carenza di IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TGF- β , IL-21) (15, 160–162) o per mutazione del recettore TACI, espresso dai linfociti B maturi (146–148, 155 – 157), implicato anche nella patogenesi della COVID (157). Le basi genetiche non sono completamente chiarite, un ruolo importante sembra svolto dalla presenza dell'aplotipo 8.1 (172), che spiegherebbe anche l'associazione di tale immunodeficit con manifestazioni di tipo autoimmune (88, 89). Tuttavia in considerazione della variazione dei modelli di ereditarietà (autosomica dominante, autosomica recessiva, difetto sporadico) e della mancata identificazione di un difetto genetico primario, è probabile che la carenza di IgA rappresenti un gruppo eterogeneo di anomalie genetiche, come la immunodeficienza comune variabile (CVID).

Nonostante il ruolo chiave svolto dalle IgA nella difesa mucosale (soprattutto a livello di tratto respiratorio e gastro-intestinale), nella maggior parte dei casi i soggetti affetti da SIgAD sono asintomatici e la diagnosi è occasionale (11,15). Nei pazienti sintomatici, tuttavia, lo spettro di manifestazioni cliniche è estremamente vario: infezioni ricorrenti, malattie autoimmuni, allergie e

disturbi del tratto gastro-intestinale (56). In casi rari, in età adulta vi può essere un aumentato rischio di sviluppare neoplasie, in particolare adenocarcinoma gastrico o del colon e malattie linfoproliferative (6, 137, 138). Altra condizione associata è la possibilità di reazione anafilattiche a seguito di trasfusione di emoderivati contenenti tracce di IgA, legata alla presenza in alcuni pazienti di IgE anti-IgA (58). La prognosi è generalmente buona e legata alla gravità delle patologie associate; circa il 5% dei casi evolve verso l'immunodeficienza comune variabile (CVID) (59,60).

Il nostro studio ha preso in considerazione 25 pazienti (11 maschi e 14 femmine) in età pediatrica, giunti all'attenzione dell'ambulatorio di Reumatologia e Immunologia pediatrica (responsabile Prof.ssa Consolini) perché sintomatici (solo in un caso il riscontro è stato casuale in paziente totalmente asintomatico). In particolare, abbiamo valutato la prevalenza dei disordini autoimmuni, con l'intento di evidenziarne la potenziale associazione con specifiche caratteristiche cliniche e/o immunologiche riscontrate in tali pazienti. È infatti ormai chiaro come immunodeficienza e autoimmunità siano strettamente associate e rappresentino due possibili manifestazioni di una stessa "disregolazione" immunitaria.

Nella maggior parte dei casi, il fenotipo clinico, comunque era caratterizzato da infezioni ricorrenti (22/25; prevalenza dell'88%); tale dato è in accordo con altri studi epidemiologici relativi al SIgAD ed è riconducibile alle specifiche funzione di protezione delle barriere mucose svolte dalla immunoglobuline di isotipo A.

La prevalenza di autoimmunità tra i pazienti arruolati nel nostro studio è, invece, del 24% (6/25 pazienti), in accordo con i dati riportati in letteratura (7-36%) (173). In particolare, in uno studio di Cunningham-Rundles del 2004 si osservava una frequenza del 28% (75,78).

Tali valori sono notevolmente più elevati rispetto all'incidenza delle patologie autoimmuni nella popolazione generale (5%).

In letteratura, si osserva la presenza di autoanticorpi organo o non organo-specifici, anche in assenza di manifestazioni cliniche, nel 40% dei casi (57); nel nostro studio soltanto in 2 casi (8%) abbiamo riscontrato positività per la ricerca di autoanticorpi (ANA e p-ANCA), senza tuttavia alcuna rilevanza clinica. Se si considerano anche le condizioni clinicamente manifeste, invece, si riscontrano autoanticorpi in 8/25 pazienti (32%). Il rilievo di autoanticorpi, comunque, non sembrerebbe predittivo di una evoluzione verso una malattia autoimmune (81).

Nel nostro studio, le malattie autoimmuni associate sono state celiachia, presente in 4 casi su 6 (67% dei pazienti con autoimmunità; 16 % di tutti i pazienti con SigAD) e tireopatia autoimmune, presente in 3 casi (50% dei casi di autoimmunità; 12% delle manifestazioni totali nei pazienti con SigAD) : 2 tiroiditi, di cui una in associazione con celiachia, e un caso di Morbo di Basedow. Nel già citato studio di Cunningham-Rundles del 2004, invece, le patologie autoimmuni più frequentemente associate erano di natura ematologica (porpora trombotica trombocitopenica e anemia emolitica) (57), in accordo anche con altri dati riportati in letteratura scientifica (6) .

Per quanto riguarda la malattia celiaca, studi scientifici riportano una prevalenza aumentata nei pazienti con SIgAD, in cui interessa il 10-30% dei soggetti (74) rispetto all'1% della popolazione generale (96); in effetti nello studio da noi condotto la prevalenza di malattia celiaca nei pazienti con SIgAD è del 16%. Questi dati suggeriscono l'importanza dello screening per malattia celiaca in caso di deficit selettivo di IgA. La diagnosi di celiachia è spesso affidata alla identificazione di autoanticorpi specifici: IgA anti-transglutaminasi (IgA anti-tTG), IgA anti-endomisio (EMA) e, in alcuni casi, IgA anti-gliadina (AGA). Data l'elevata associazione tra celiachia e deficit di

IgA, si rende necessario, dunque un contestuale dosaggio delle IgA totali ; in caso di deficit di tale isotipo immunoglobulinico, le indagini serologiche per la diagnosi di celiachia si dovrebbero basare sulla ricerca delle IgG specifiche, in modo da garantire adeguate sensibilità e specificità, riducendo il rischio di falsi negativi (97,98).

In uno studio del 2004, Edwards e coll. (6) evidenziavano come le malattie autoimmuni fossero anche più frequenti nei parenti dei pazienti con deficit selettivo di IgA: il 10% dei parenti di primo grado aveva manifestazioni autoimmuni, quindi una prevalenza più elevata rispetto alla popolazione generale (5%). Nel nostro studio abbiamo valutato anche la storia familiare dei pazienti affetti, riscontrando familiarità per autoimmunità in 10/25 pazienti, con una prevalenza del 40% tra i parenti di primo e secondo grado. Abbiamo osservato la maggior prevalenza di storia familiare di autoimmunità nei pazienti senza manifestazioni cliniche autoimmuni (9 casi: 47%), rispetto ai pazienti con autoimmunità (1 caso: 17%); tali differenze, tuttavia non hanno alcun significato nel predire la presenza di autoimmunità nei pazienti con SIgAD. Allo stesso modo, neanche la storia familiare di immunodeficienza primitiva, morbilità frequente, atopia, si sono dimostrate significativamente associate con l'uno o l'altro gruppo di pazienti.

Tra le altre condizioni cliniche associate al deficit di SIgAD, nella nostra coorte di pazienti si è osservata una maggior prevalenza di allergie nei soggetti senza malattie autoimmuni (32%) rispetto ai pazienti con autoimmunità (17%); viceversa l'asma era più frequente nei pazienti con autoimmunità (33% vs 10,5%). Una minor differenza si osservava, invece, per la storia clinica di polmonite, positiva nel 33% dei pazienti con autoimmunità e nel 47% di quelli senza malattie autoimmuni. Tutte queste differenze, comunque, non si sono rivelate significative.

Nel nostro studio, sebbene la distribuzione maschi: femmine delle malattie

autoimmuni fosse del tipo 1:1, queste ultime si sono dimostrate lievemente più frequenti nel sesso maschile (3/11 =27%) rispetto al sesso femminile (3/14=21%). Tale dato non concorda con la letteratura scientifica, in cui la maggior prevalenza di autoimmunità si osserva nella popolazione femminile (6). La differenza da noi riscontrata, infatti, non è significativa.

Abbiamo osservato anche come l'età media di diagnosi di SIgAD nei pazienti con autoimmunità sia di 9,67 anni, più elevata rispetto all'età media calcolata considerando tutti i pazienti arruolati (6,72 anni) o i soli pazienti senza autoimmunità (5,79 anni). Nella quasi totalità dei casi di malattia autoimmune (5/6), infatti, la diagnosi di immunodeficit è stata posta successivamente rispetto a quella di malattia celiaca o tiroidite (età media alla diagnosi: 7,33 anni). Tale dato suggerisce l'importanza di una valutazione immunologica nei pazienti con autoimmunità, al fine di un corretto inquadramento diagnostico e di una appropriata gestione del paziente.

Alcuni Autori (6), inoltre, hanno evidenziato che la maggior prevalenza di malattia autoimmuni nei soggetti con SIgAD si osservava negli adulti (età mediana di 29 anni), indicando l'importanza nel proseguire oltre l'età pediatrica l'esecuzione di screening periodici per autoimmunità (soprattutto ANA, IgG anti-transglutaminasi, TRAB, anti-TPO e anti-TG).

Sebbene la relazione tra deficit selettivo di IgA e autoimmunità sia chiara, non sono ancora certe le cause di tale associazione. L'aumentato rischio di autoimmunità in pazienti con SIgAD ha diverse spiegazioni possibili. In primis, poiché le IgA secretorie giocano un ruolo importante nella protezione delle superfici mucose, la loro carenza facilita il superamento della barriera mucosa da parte di antigeni ambientali, che possono portare alla formazione di autoanticorpi mediante meccanismi di mimetismo molecolare e di cross-reazione con antigeni-self (15). Una seconda ipotesi prevede un possibile ruolo

di fattori genetici comuni, ad esempio alcuni aplotipi HLA, che predisporrebbero il paziente affetto sia allo sviluppo di immunodeficienza che di autoimmunità; anche l'associazione familiare è indicativa di una forte influenza genetica (86). L'aplotipo più comunemente identificato nei pazienti con SIgAD è l'aplotipo 8.1 (in particolare HLA-A1, B8, DR3, DQ2) presente nel 45% dei soggetti affetti da deficit selettivo di IgA e solo nel 16% della popolazione generale (79,80). Tali aplotipi sono di comune riscontro anche in caso di varie malattie autoimmuni, note per essere fortemente associate con il deficit selettivo di IgA, quali tiroidite autoimmune, LES, malattia celiaca, artrite reumatoide, diabete di tipo 1 e miastenia gravis (88,89). Oltre all'aplotipo, sono state rilevate altre associazioni genetiche con geni non-MHC, come *interferon-induced helicase-1* (IFIH1) e *C-type lectin domain family 16, member A* (CLEC16A), comunque coinvolti nella risposta immunitaria. Una ulteriore ipotesi per spiegare l'aumentato rischio di manifestazioni autoimmuni è che nel SIgAD vi sia una compromissione dei meccanismi di tolleranza (91, 92); in alcuni studi, infatti, si è osservata una riduzione del numero di linfociti T regolatori (93). Nell'ipotesi formulata da Jacob e coll.(75), invece, è stato proposto che alla base dello sviluppo di autoimmunità vi sia la perdita dell'attività anti-infiammatoria svolta dall'immunoglobulina A, normalmente mediata dal legame con il suo recettore Fc α RI. Tale interazione determinerebbe una parziale fosforilazione di FcR γ , associato a Fc α RI, in particolar modo a livello dei motivi ITAM (*"immunoreceptor tyrosine-based activation motif"*) che esita in una inattivazione di diversi pathways di attivazione del sistema immune. In tal modo le IgA preverrebbero le reazioni infiammatorie e autoimmuni; ne consegue che bassi livelli di IgA, per contro, ne favoriscano l'insorgenza (75).

Dal punto di vista laboratoristico, nei pazienti con autoimmunità i livelli di

immunoglobuline di isotipo M e G e delle sottoclassi IgG erano nella norma per età; in unico caso si è osservato un modico incremento dei livelli di IgG4 (245 mg/dL; valori normali per età: 3-189 mg/dL). In effetti, la lettura scientifica riporta l'associazione tra manifestazioni autoimmuni e elevati livelli della sottoclasse IgG4(87) oppure con ridotti livelli di IgG2(95) . Per quanto riguarda la valutazione quantitativa delle sottopopolazioni linfocitarie, si sono osservate solo modiche alterazioni, prive di significato immunopatologico. Interessante è stato notare una modesta alterazione dei livelli dei linfociti a funzione natural killer, riscontrata in 3 dei 6 pazienti con autoimmunità : 2 pazienti mostravano modesta riduzione, mentre in un paziente, si osservava un lieve aumento. Nel nostro studio tale alterazione non è risultata essere significativa, e, inoltre, non è stata effettuata una valutazione qualitativa delle cellule a funzione natural killer. In alcuni studi è stata riportata una riduzione quantitativa e qualitativa delle cellule NK in corso di malattie autoimmuni; in diversi casi è stata evidenziata la riduzione dei linfociti NK circolanti. È stato suggerito che le cellule NK svolgano sia un ruolo promuovente che di controllo nello sviluppo di patologie autoimmuni, sia a seconda della malattia che dal subset cellulare e, secondo alcuni Autori, anche dello stadio della malattia (85,195) .

Il nostro studio non ha evidenziato particolari associazioni tra autoimmunità ed altre caratteristiche clinico-laboratoristiche. Il campione in esame, tuttavia, era piuttosto piccolo, essendo costituito solo da 25 pazienti. Una interessante osservazione è stato il ritardo diagnostico nei pazienti con fenotipo clinico autoimmune, in cui la diagnosi di celiachia e/o tiroidite ha preceduto di alcuni anni (in media 2,34) quella di immunodeficit. Ciò sottolinea l'importanza di una valutazione immunologica nei pazienti con autoimmunità, al fine di un

corretto inquadramento diagnostico e una opportuna presa in carico del paziente, nel quale andrà indagata anche l'eventuale presenza delle altre condizioni cliniche che si associano al SIgAD.

La prognosi del deficit selettivo di IgA è strettamente correlata a quelle delle patologie associate; nel caso di malattia autoimmune accertata, quindi, i pazienti dovranno essere sottoposti alle terapie specifiche per ciascuna patologia. Inoltre il follow-up clinico-laboratoristico deve essere volto ad accertare prontamente le altre condizioni potenzialmente associate, in modo da garantire un precoce trattamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000; 120(2):225–31.
2. Plebani A, Monafo V, Ugazio A, Roberto Burgio G. Clinical heterogeneity and reversibility of selective immunoglobulin a deficiency in 80 children. *Lancet.* 1986;327(8485):829–31.
3. Pignata C, Monaco G, Coccimara F. Heterogeneity of IgA deficiency in childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 1991;2: 38–40.
4. European Society of Immunodeficiency. European Society of Immunodeficiency. <http://esid.org>.
5. Cataldo F, Lio D, Marino V, Scola L, Crivello A, Corazza GR. Plasma cytokine profiles in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14(4):320–4.
6. Edwards E, Razvi S, Cunningham-Rundles C. IgA deficiency: clinical correlates and responses to pneumococcal vaccine. *Clinical Immunology.* 2004; 111:93–97.
7. Ballou MD. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(4):581–91.
8. Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 136(5): 1186–205
9. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ WC. “Clinical Immunology Principles and Practice.” Third Edit. Mosby Elsevier eds. 2008; 513-527 .
10. Truedsson L, Baskin B, Pan Q, Rabbani H, Vorechovsky I, Smith CIE, Hammarström L. Genetics of IgA deficiency. *APMIS.* 1995;103(7-8):833–42.
11. Yel L. Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 2010; 30:10–6.
12. Primary immunodeficiency Diseases. Report of a WHO Scientific Group. *Clin Exp Immunol.* 1997; 159: 6236–41.
13. Pereira LF, Sapina AM, Arroyo J, Viñuelas J, Bardají RM, Prieto L. Prevalence of selective IgA deficiency in Spain: More Than We Thought. *Blood.* 1997; 90:893.
14. Holt PD, Tandy NP, Anstee DJ. Screening of blood donors for IgA deficiency: a study of the donor population of south-west England. *J Clin Pathol.* 1977; 30(11):1007–10.

15. Cunningham-Rundles C. Physiology of Iga and Iga deficiency. *Journal of Clinical Immunology*. 2001; 21: 303–309.
16. Carneiro-Sampaio MM, Carbonare SB, Rozentraub RB, De Araújo MN, Riberiro MA, Porto MH. Frequency of selective IgA deficiency among Brazilian blood donors and healthy pregnant women. *Allergol Immunopathol*. 1989; 17(4): 213–6.
17. Ezeoke AC. Selective IgA deficiency (SIgAD) in Eastern Nigeria. *Afr J Med & Med Sci*. 1988; 17(1): 17–21.
18. Feng L. Epidemiological study of selective IgA deficiency among 6 nationalities in China. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1992; 72(2): 88–90.
19. Kanoh T, Mizumoto T, Yasuda N, Koya M, Ohno Y, Uchino H, et al. Selective IgA deficiency in Japanese blood donors: frequency and statistical analysis. *Vox Sang*. 1986; 50(2): 81–6.
20. Saghafi S, Pourpak Z, Aghamohammadi A, Pourfathollah AA, Samadian A, Farghadan M, Attarchi Z, Zeidi M, Asgaripour F, Rajabi T, Kardar GA, Moin M. Selective immunoglobulin A deficiency in Iranian blood donors: prevalence, laboratory and clinical findings. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2008; 7(3): 157–162.
21. Singh K, Chang C, Gershwin ME. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Review*. 2014; 13(2): 163–177.
22. Grabar P, Williams CA. Method permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures; application to blood serum. *Biochim Biophys Acta*. 1953;10:193–4.
23. Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol*. 1987; 40:153–245.
24. Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J*. 1990; 271(2):285–96.
25. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology*. 2006; 208: 270–82.
26. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* . 2011; 4(6): 590–7.
27. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen F-E, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*. 2008; 1(1): 11–22.
28. Mostov KE, Deitcher DL. Polymeric immunoglobulin receptor expressed in MDCK cells transcytoses IgA. *Cell*. 1986; 46: 613–21.
29. Bonner A, Perrier C, Corthesy B, Perkins SJ. Solution structure of human secretory component and implications for biological function. *J Biol Chem*. 2007; 282: 16969–80.

30. Kaetzel CS. The Polymeric Immunoglobulin Receptor. eLS John Wiley Sons Ltd, Chichester. 2013; <http://www.els.net>
31. Corthésy B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol*. 2007;178:27–32.
32. Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med*. 1990; 171:597–613.
33. Otten MA Van Egmond M. The Fc receptor for IgA (Fc RI, CD89). *Immunol Lett*. 2009; 92: 23–31.
34. Russell MW, Sibley DA, Nikolova EB, Tomana M, Mestecky J. IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity. *Biochem Soc Trans*. 1997; 25:466–70.
35. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immuno-globulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med*. 1987; 106: 892–9.
36. Cerutti, A. Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*. 2008; 28: 740–50.
37. Fagarasan S. Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:170–7.
38. Suzuki K, Fagarsan S. How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol*. 2008; 29: 523–31.
39. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307(5717):1915–20.
40. Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Mestecky J, Kolinska J, Rossmann P, Stepankova R, et al. Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scand J Immunol*. 2005; 62(Suppl 1): 106–13.
41. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*. 2005; 115: 1531–62.
42. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(34): 13780–5.
43. Wold AE, Mestecky J, Tomana M, Kobata A, Ohbayashi H, Endo T, et al. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for Escherichia coli type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun*. 1990; 58(9): 3073–3077.
44. Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, Van Gijlswijk-Janssen D, Redwan E-RM, et al. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J Biol Chem*. 2003; 278(22): 20140–53.

45. Mestecky J, Russell MW. Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA at mucosal surfaces. *Immunology Letters*. 2009; 124: 57–62.
46. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science*. 2002; 298: 1424–7.
47. Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(7): 1981–6.
48. Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ. Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups. *Infect Immun*. 2001; 69(6): 3611–7.
49. Roos A et al. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol*. 2001; 167: 2861–8.
50. Brandtzaeg P, Karlsson G, Hansson G, Petruson B, Björkander J, Hanson LA. The clinical condition of IgA-deficient patients is related to the proportion of IgD- and IgM-producing cells in their nasal mucosa. *Clin Exp Immunol*. 1987; 67: 626–36.
51. Klemola T. Immunohistochemical findings in the intestine of IgA-deficient persons: number of intraepithelial T lymphocytes is increased. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1988; 7:537–43.
52. Mestecky J, Zikan J, Butler W. Immunoglobulin M and secretory immunoglobulin A: presence of a common polypeptide chain different from light chain. *Science* (80-). 1971;171:1163–5.
53. Savilahti E. Immunoglobulin-containing cells in the intestinal mucosa, immunoglobulins in secretions and serum IgA levels. *Clin Exp Immunol*. 1973;13:395–406.
54. Low TL, Liu YS, Putnam FW. Structure, function, and evolutionary relationships of Fc domains of human immunoglobulins A, G, M, and E. *Science*. 1976;191:390–2.
55. Mellander L, Björkander J, Carlsson B, Hanson L. Secretory antibodies in IgA-deficient and immunosuppressed individuals. *J Clin Immunol*. 1986;6:284–91.
56. Gruppo di lavoro immunodeficienze. Associazione italiana di ematologia e oncologia pediatrica. Difetto selettivo di IgA. Raccomandazioni diagnostiche e terapeutiche. 2011
57. Commissione Immunologia SIAIP. Difetto selettivo di IgA. RIAP. 2007;
58. Sandler SG, Mallory D, Malamut D, Eckrich R. IgA anaphylactic transfusion reaction. *Transfus Med Rev* 1995; 9: 1–8.

59. Espanol T, Catala M, Hernandez M, Caragol I, Bertran J. Development of a common variable immunodeficiency in IgA deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: 333–5.
60. Gutierrez MG, Kirkpatrick CH. Progressive immunodeficiency in a patient with IgA deficiency. *Ann Allergy Asthma Allergy* 1997; 79:297–301.
61. Janzi M, Kull I, Sjöberg R, Wan J, Melén E, Bayat N, et al. Selective IgA deficiency in early life: association to infections and allergic diseases during childhood. *Clin Immunol* 2009; 133(1): 78–85.
62. Ugazio AG, Duse M, Notarangelo LD, Plebani A, Porta F. Il bambino immunodepresso: perchè lo è e come va difeso. 2ª edizione, *Casa Editrice Ambrosiana*, Milano; 1995.
63. Rosen FS, Seligmann M. “Immunodeficiencies”. *Harwood academy publisher*; 1993: 81-89.
64. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM. *Clinical Immunology Principles and Practice*. Third Edit. Mosby Elsevier; eds 2008: 513-527 .
65. Chipps BE, Talamo RC, Winkelstein JA. IgA deficiency, recurrent pneumonias, and bronchiectasis. *Chest*. 1978; 73:519–26.
66. Ozkan H, Atlihan F, Genel F, Targan S, Gunvar T. IgA and/or IgG subclass deficiency in children with recurrent respiratory infections and its relationship with chronic pulmonary damage. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005; 15(1):69–74.
67. Zinneman HH, Kaplan AP. The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Am J Dig Dis*. 1972; 17:793–7.
68. Jorgensen GH, Arnlaugsson S, Theodors A, Ludviksson BR. Immunoglobulin A deficiency and oral health status: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(1):1–8.
69. Oxelius VA, Laurell AB, Linqvist B, Golebiowska H, Axelsson U, Bjørkander J e coll. IgG subclasses in selective IgA deficiency. *N Engl J Med*. 1981; 304:1476–7.
70. Bjørkander J, Oxelius VA, Hanson LA. Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3. *N Engl J Med*. 1985; 313:720–4.
71. French MAH, Denis KA, Dawkins R, Peter B. Severity of infections in IgA deficiency: correlation with decreased serum antibodies to pneumococcal polysaccharides and decreased serum IgG2 and/or IgG4. *Clin Exp Immunol*. 1995; 100:47–53.
72. Aghamohammadi, A., Cheraghi, T., Gharagozlou M et al. IgA Deficiency: Correlation Between Clinical and Immunological Phenotypes. *J Clin Immunol*. 2009; 29(1):130–6.
73. Cunningham-Rundles C, Brandeis WE, Pudifin DJ, Day NK, Good RA. Autoimmunity in selective IgA deficiency: relationship to anti-bovine protein antibodies, circulating

- immune complexes and clinical disease. *Clin Exp Immunol*. 1981; 45:299–304.
74. Meini A, Pillan NM, Villanacci V, Monafò V, Ugazio AG, Plebani A. Prevalence and diagnosis of celiac disease in IgA-deficient children. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1996; 77:333–6.
 75. Jacob CM, Pastorino AC, Fahl K, Carneiro-Sampaio M, Monteiro RC. Autoimmunity in IgA deficiency: Revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *Journal of Clinical Immunology*. 2008; 28: S56-61.
 76. Buckley RH. Clinical and immunologic features of selective IgA deficiency. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975; 11:134–42.
 77. Özcan C, Metin A, Erkoçoğlu M, Kocabaş CN. Allergic diseases in children with primary immunodeficiencies. *Turk J Pediatr*. 2014; 56: 41-47
 78. Etzioni A. Immune deficiency and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2003; 2:364–9.
 79. Liblau RS, Bach JF. Selective IgA deficiency and autoimmunity. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992; 99: 16–27.
 80. Barka N, Shen GQ, Shoenfeld Y, Alosachie IJ, Gershwin ME, Reyes H, et al. Multireactive pattern of serum autoantibodies in asymptomatic individuals with immunoglobulin A deficiency. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995; 2(4):469–72.
 81. Gulez N, Karaca NE, Aksu G, Kutukculer N. Increased percentages of autoantibodies in immunoglobulin A-deficient children do not correlate with clinical manifestations. *Autoimmunity*. 2009; 42:74–9.
 82. Pineda AA, Taswell HF. Transfusion reactions associated with anti-IgA antibodies: report of four cases and review of the literature. *Transfusion*. 1975;15:10–5.
 83. Cunningham-Rundles C, Zhou Z, Mankarious S, Courter S. Long-term use of IgA-depleted intravenous immunoglobulin in immunodeficient subjects with anti-IgA antibodies. *J Clin Immunol* 1993;13:272–8.
 84. Ferreira A, Garcia Rodriguez MC, Lopez-Trascasa M, Pascual Salcedo D, Fontan G. Anti-IgA antibodies in selective IgA deficiency and in primary immunodeficient patients treated with gannaglobulin. *Clin Immunol Immunopathol*. 1988; 47(2):199–207.
 85. Abolhassani H, Gharib B, Shahinpour S, Masoom SN, Havaei A, Mirminachi B, Arandi N, Torabi-Sagvand B, Khazaei HA, Mohammadi J, Rezaei N, Aghamohammadi A. Autoimmunity in Patients With Selective IgA Deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015; 25(252):112–9.
 86. Jorgensen G, Thorsteinsdotti I, Gudmundsson S, Hammarstrom L, Ludviksson B. Familial aggregation of IgAD and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2009; 131:233–9.

87. Mohammadi J, Ramanujam R, Jarefors S, Rezaei N, Aghamohammadi A, Gregersen PK, et al. IgA deficiency and the MHC: assessment of relative risk and microheterogeneity within the HLA A1 B8, DR3 (8.1) haplotype. *J Clin Immunol*. 2010; 30:138–43.
88. Jorgensen GH, Ornloufsson AE, Johannesson A, Gudmundsson S, Janzi M, Wang N, et al. Association of immunoglobulin A deficiency and elevated thyrotropin-receptor autoantibodies in two Nordic countries. *Hum Immunol*. 2011; 72:166–72.
89. Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev*. 1999;167:257–74.
90. Wang N, Shen N, Vyse TJ, Anand V, Gunnarson I, Sturfelt G, et al. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1383–96.
91. Vale AM, Schroeder HW Jr. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125:778–87.
92. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet*. 2012; 90:986–1001.
93. Soheili H, Abolhassani H, Arandi N, Khazaei HA, Shahinpour S, Hirbod-Mobarakeh A, et al. Evaluation of natural regulatory T cells in subjects with selective IgA deficiency: from senior idea to novel opportunities. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160:208–14.
94. Wells JV, Michaeli D, Fudenberg HH. Autoimmunity in selective IgA deficiency. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975;11:144–6.
95. Takahashi H, Yamamoto M, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Shinomura Y, et al. The immunobiology and clinical characteristics of IgG4 related diseases. *J Autoimmun*. 2012; 39:93–6.
96. Tavolo tecnico del ministero della Salute. Relazione annuale al parlamento sulla celiachia-anno 2014. *Gazzetta Ufficiale* 16 agosto 2015. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2463_allegato.pdf.
97. McGowan KE, Lyon ME, Butzner JD. Celiac disease and IgA deficiency: Complications of serological testing approaches encountered in the clinic. *Clinical Chemistry*. 2008; 54(7): 1203–9.
98. Harrison E, Li K-K, Petchey M, Nwokolo C, Loft D, Arasaradnam R. Selective measurement of anti-tTG antibodies in coeliac disease and IgA deficiency: an alternative pathway. *Postgrad Med J*. 2013; 89(1047):4–7.
99. Savilahti E, Pelkonen P, Visakorpi JK. IgA deficiency in children. A clinical study with special reference to intestinal findings. *Arch Dis Child*. 1971 ;46:665–70.

100. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997; 84: 223–43.
101. Lantz M, Abraham-Nordling M, Svensson J, Wallin G, Hallengren B. Immigration and the incidence of Graves' thyrotoxicosis, thyrotoxic multinodular goiter and solitary toxic adenoma. *Eur J Endocrinol.* 2009; 160:201–6.
102. Wong GW, Cheng PS. Increasing incidence of childhood Graves' disease in Hong Kong: a follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001; 54:547–50.
103. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev.* 2003;24:802–35.
104. Pariente EA et al. Collagenous colitis, IgA deficiency, Basedow's disease and atrophic gastritis [in French]. *Gastroenterol Clin Biol.* 1985; 9:738–41.
105. Mano T, Kawakubo A, Yamamoto M. Isolated IgA deficiency accompanied by autoimmune thyroid disease. *Intern Med.* 1992; 31:1201–3.
106. Steenkiste A, et al. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on the HLA component of type 1 diabetes. *Tissue Antigens.* 2007;69 (Suppl 1):214–25.
107. Pociot F et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes.* 2010; 59:1561–71.
108. Virtanen SM, Knip M. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:1053–67.
109. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2002; 347:911–20.
110. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and metaanalysis. *Arch Dis Child.* 2008; 93:512–7.
111. Smyth D, et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med.* 2008; 359:2767–77.
112. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia.* 1993;36:883–92.
113. EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet.* 2000; 355:873–6.
114. Cerutti F, et al. Selective IgA deficiency in juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus [in Italian]. *Pediatr Med Chir.* 1988; 10:197–201.
115. Liblau RS, Caillat-Zucman S, Fischer AM, Bach JF, Boitard C. The prevalence of selective IgA deficiency in type 1 diabetes mellitus. *APMIS Acta Pathol Microbiol*

- Immunol Scand.* 1992; 100 (70):9–12.
116. Ståhl-Hallengren C, Jönsen A, Nived O, Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol.* 2000; 27:685–9.
 117. Han JW, et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2009; 41:1234–7.
 118. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England: relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum.* 1995;38:551–8.
 119. Calabozo Raluy M, Gamir Gamir ML, Medina Luezas J, Díaz-Miguel Pérez C, Alonso Ruiz A. Selective deficiency of IgA in autoimmune diseases [in Spanish]. *Rev Clin Esp.* 1990;186:163–5.
 120. Cassidy JT, Kitson RK, Selby CL. Selective IgA deficiency in children and adults with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007;16:647–50.
 121. Mantovani APF, Monclaro MP, Skare TL. Prevalence of IgA deficiency in adult systemic lupus erythematosus and the study of the association with its clinical and autoantibody profiles. *Rev Bras Reum.* 2010;50:273–82.
 122. Bach GL, Pillary VK, Kark RM. Immunoglobulin (IgA) deficiency in systemic lupus erythematosus: report of a case and family studies. *Acta Rheumatol Scand.* 1971;17:63–71.
 123. Cleland LG, Bell DA. The occurrence of systemic lupus erythematosus in two kindreds in association with selective IGA deficiency. *J Rheumatol.* 1978;5:288–93.
 124. Katial R, Hatch R, Baker M. Cardiac tamponade and recurrent upper respiratory tract infections in a 22-year-old woman. *Ann Allergy.* 1994;73:473–7.
 125. Harris ED. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med.* 1990; 322:1277–89.
 126. El-Gabalawy HS, et al. Association of HLA alleles and clinical features in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1696–705.
 127. Roudier J. HLA-DRB1 genes and extraarticular rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:103.
 128. Isenock M, Grosel JM. Juvenile idiopathic arthritis: can you recognize this complex diagnosis? *JAAPA.* 2011; 24:22–7.
 129. Modesto C, et al. Incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Catalonia (Spain). *Scand J Rheumatol.* 2010;39:472–9.

130. Andersson Gäre B. Juvenile arthritis: who gets it, where and when? A review of current data on incidence and prevalence. *Clin Exp Rheumatol*. 1999; 17:367–74.
131. Huntley CC, Thorpe DP, Lyerly AD, Kelsey WM. Rheumatoid arthritis with IgA deficiency. *Am J Dis Child*. 1967; 113(4):411–87.
132. Cassidy JT, Burt A. Selective hypogammaglobulinemia in rheumatoid arthritis. *University of Michigan Medical Center Journal* 1968;241–3.
133. Panush R,S Bianco NE, Stillman JS, Schur PH, Rocklin RE, David JR. Juvenile rheumatoid-arthritis - cellular hypersensitivity and selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol*. 1972; 10(1): 103–6.
134. Wang N, Shen N, Vyse T, Anand V, Gunnarson I, Sturfelt G et al. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med* 2011;17:1383–96.
135. Cassidy JT, Petty RE, Sullivan DB. Abnormalities in distribution of serum immunoglobulin concentrations in juvenile rheumatoid-arthritis. *J Clin Invest*. 1973; 52 (8):1931–6.
136. Davies K, Stiehm ER, Woo P, Murray KJ. Juvenile idiopathic polyarticular arthritis and IgA deficiency in the 22q11 deletion syndrome. *J Rheumatol*. 2001; 28: 2326–34.
137. Quiding-Jarbrink M, Sundstrom P, Lundgren A, et al. Decreased IgA antibody production in the stomach of gastric adenocarcinoma patients. *Clin Immunol* (Orlando, Fla). 2009; 131(3):463–71.
138. Kersey JH, Shapiro RS, Filipovich AH. Relationship of immuno-deficiency to lymphoid malignancy. *Pediatr Infect Dis J*. 1988;7: S10–2.
139. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clinical Immunology* 1999; 93(3): 190–7.
140. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol*. 2015; 35(8): 696–726.
141. Morgan G, Levinsky RJ. Clinical significance of IgA deficiency. *Arch Dis Child* 1988; 63:579–81.
142. Quartier P. Deficits en IgA. *Arch Pediatr*. 2001;8:629–33.
143. Cunningham-Rundles C. Selective IgA deficiency. In “Immunologic disorders in infants and children.” Fifth edition, Stiehm, Ochs, Winkelstein, eds 2004.
144. Lawton AR, Royal SA, Self KS, Cooper MD. IgA determinants on B-lymphocytes in patients with deficiency of circulating IgA. *J Lab Clin Med*. 1972; 80:26–33.

145. Conley ME, Cooper MD. Immature IgA B cells in IgA-deficient patients. *N Engl J Med.* 1981; 305:495–7.
146. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class- switch recombination. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:721–31.
147. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP e coll. TACI e BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med.* 2005;201:35–9.
148. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P e coll. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol.* 2002; 3:822–9.
149. Mackay F, Kalled SL. TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14:783–90.
150. MacLennan I, Vinusea C. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity.* 2002; 17:235–8.
151. Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, Kalled SL, Zandman D, Scott ML. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med.* 2003;198:937–45
152. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M e coll. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001; 293: 2111–14.
153. Von Bülow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science.* 1997; 278:138–41.
154. Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T e coll. Activation and accumulation of B-cells in TACI deficient mice. *Nat Immunol.* 2001;2:638–43.
155. Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK e coll. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:3903–8.
156. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L e coll. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet.* 2005;37:829–34.
157. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L e coll. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2007;39:430–1.
158. Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Sclesier M e coll. Mutation in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet.* 2005; 37:820–28.
159. Pan-Hammarström Q, Salzer U, Likun D, Björkander J, Cunningham-Rundles, C,

- Nelson DL e coll. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2007; 39:429–30.
160. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei K, Koehler G et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 1994; 264:561–3.
 161. Okahashi N, Yamamoto M, Vancott JL, Chatfield Sn, Roberts M, Bluethmann H et al. Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant Salmonella strain or cholera toxin reveals that CD4+ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect Immun.* 1996;64:1516–2.
 162. Borte S, Pan-Hammarström Q, Liu C, Sack U, Borte M, Wagner U et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood.* 2009;114:4089–98.
 163. Suzuki H, Kaneko H, Fukao T, Jin R, Kawamoto N, Asano T et al. Various expression patterns of alpha1 and alpha2 genes in IgA deficiency. *Allergol Int.* 2009; 58:111–7.
 164. Plebani A, Carbonara AO, Bottaro A, Gallina R, Boccazzi C, Crispino P et al. Gene deletion as a cause of associated deficiency of IgA1, IgG2, IgG4 and IgE. *Immunodeficiency.* 1993; 4:245–8.
 165. Levy Y, Nakum A, Segal N, Monselise Y, Danon YL. The association of selective IgA deficiency and IgE hypogammaglobulinemia. *Allergy.* 2005; 60(6):836–8.
 166. Aghamohammadi A, Mohammadi J, Parvaneh N, Rezaei N, Moin M, Espanol T e coll. Progression of Selective IgA Deficiency to Common Variable Immunodeficiency. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;147:87–92.
 167. Alper CA, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Kruskall MS, Eisenbarth GS, Brink SJ e coll. Prospective analysis suggests susceptibility genes for deficiencies of IgA and several other immunoglobulins on the [HLA-B8, SC01, DR3] conserved extended haplotype. *Tissue Antigens.* 2000;56:207–16.
 168. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies: Notarangelo LD, Fisher A and Geha RS: Casanova JL, Chapel H, Conley ML, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary Immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;1161-1178.
 169. Ishizaka A, Nakanishi M, Yamada S, Sakiyama Y, Matsumoto S. Development of hypogammaglobulinemia in patient with common variable immunodeficiency. *Eur J Pediatr.* 1989; 149:175–6.
 170. López-Mejías R, Del Pozo N, Fernández-Arquero M, Ferreira A, García-Rodríguez MC, De la Concha EG et al. Role of polymorphisms in the TNFRSF13B (TACI) gene in

- Spanish patients with immunoglobulin A deficiency. *Tissue Antigens*. 2009;74:42–5.
171. Haimila K, Einarsdottir E, De Kauwe A, Koskinen LL, Pan- Hammarström Q, Kaartinen T et al. The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Genes Immun*. 2009;10:151–61.
 172. Wilton AN, Cobain TJ, Dawkins RL. Family studies of IgA deficiency. *Immunogenetics*. 1985;21:333–42.
 173. Vorechovský I, Webster ADB, Plebani A, Hammarström L. Genetic linkage of IgA deficiency to the major histocompatibility complex: evidence for allele segregation distortion, parent-of-origin penetrance differences, and the role of anti-IgA antibodies in disease predisposition. *Am J Hum Genet* 1999; 64(4):1096–109.
 174. Oen K, Petty RE, Schroeder ML. Immunoglobulin A deficiency in genetic studies. *Tissue Antigens*. 1982;19:174–82.
 175. Koistinen J. Selective IgA deficiency in blood donors. *Vox Sang*. 1975 ;29:192–202.
 176. Vorechovsky I, Cullen M, Carrington M, Hammarström L, Webster A. Fine mapping of IGADI in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families. *J Immunol*. 2000; 164:4408–16.
 177. Olerup O, Smith C, Hammarström L. Different amino acids at position 57 of the HLA-DQ beta chain associated with susceptibility and resistance to IgA deficiency. *Nature*. 1990;347:289–90.
 178. Ferreira RC, Hammarström QP, Graham RR, Gateva V, Fontà G, Lee AT e coll. Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nat Genet*. 2010;42:777–80.
 179. Abbas AK. Le basi dell'immunologia. Seconda edizione ed; *ELSEVIER* 2006.
 180. Abbas, Litchman, Pillai. Immunologia cellulare e molecolare. *ELSEVIER* 2012.
 181. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiologia (3^a edizione). PICCIN, Padova 2007.
 182. Canessa C, Vierucci A, Azzari C. Cellule T_H17 nella patologia umana: buone o cattive? *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 2010;1:19–26.
 183. Naegel G. Receptors for Human IgG subclasses on human alveolar macrophages. 1984
 184. Goldblatt D, Scadding G, Lund V, Wade A, Turner M, Pandey J. Association of Gm allotypes with the antibody response to the outer membrane proteins of a common upper respiratory tract organism, *Moraxella catarrhalis*. *J Immunol*. 1994
 185. Ferrante A, Beard L, Feldman R. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial

- and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*. 1990.
186. 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.
 187. Parvaneh N, Casanova JL, Notarangelo LD et al. Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:314–24.
 188. Casanova JL, Fieschi C, Zhang SY, Abel L. Revisiting human primary immunodeficiencies (Review). *J Intern Med*. 2008; 264: 115–27.
 189. Bruton OC. A-gammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952; 9:722–8.
 190. Fairweather D, Kaya Z, Shellan GR, Lawson CM, Rose NR. From infection to autoimmunity. *J Autoimmune* 2001; 16:341–5.
 191. Condotti F, Notarangelo LD, Visconti R, O'shea J. Molecular aspects of primary immunodeficiencies: lessons from cytokines and other signaling pathways. *J Clin Invest*. 2002; 109:1261–9.
 192. Bennett CL, Brownkow UE, Ziegler SF et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Gen*. 2001; 27:20.
 193. Khattri R, Kasprowicz D, Cox T et al. The amount of scurf protein determines peripheral T-cell number and responsiveness. *J Immunol*. 2001;167:6312–20.
 194. Carulli G. Corso introduttivo alla citofluorimetria. *SEU PISA*, Aprile 2010.
 195. Schleinitz N, Vely F, Harlé JR, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2010; 131: 451–458

Indice delle tabelle

Tabella 1: Cause di deficit di IgA acquisito.....	4
Tabella 2: Numero e percentuale di pazienti con patologie associate a SIgAD (da "Difetto selettivo di IgA", Commissione di Immunologia SIAIP, RIAP 2007) (57)....	14
Tabella 3: Componenti dell'immunità innata.....	39
Tabella 4: Funzioni dei diversi isotipi immunoglobulinici.....	66
Tabella 5: Classificazione immunodeficienze primitive.....	79
Tabella 6: Campanelli d'allarme per le immunodeficienze primitive.....	79
Tabella 7: Principali differenze tra "vecchie" e "nuove" immunodeficienze (modificato da Casanova e coll., 2008)(188).....	81
Tabella 8: Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati.....	97
Tabella 9: Caratteristiche laboratoristiche dei pazienti arruolati.....	98
Tabella 10: Valori normali Ig per età (mg/dl \pm 1DS).....	104
Tabella 11: Valori normali per età delle sottoclassi IgG [mg/dl].....	104
Tabella 12: Valori normali per età delle sottopopolazioni linfocitarie (% e range) .	105
Tabella 13: Caratteristiche cliniche dei pazienti con autoimmunità.....	124
Tabella 14: Caratteristiche laboratoristiche dei pazienti con autoimmunità.....	125
Tabella 15: Caratteristiche cliniche dei pazienti con SIgAD con o senza autoimmunità.....	133

Indice delle illustrazioni

Illustrazione 1: Modelli di IgA monomerica e dimerica.....	7
Illustrazione 2: Struttura delle IgA dimeriche.....	8
Illustrazione 3: pIgR - polymeric immunoglobulin receptor.....	8
Illustrazione 4: Sottoclassi IgA1 e IgA2.....	9
Illustrazione 5: Ligandi specifici (BAFF e APRIL) e funzioni assegnate ai loro recettori (BAFF-R, BCMA e TACI) della cellula B. Le interazioni di BAFF e APRIL con i propri recettori sono mostrati nella parte superiore dell'immagine. Gli "outcome" fenotipici e funzionali dei segnali di BAFF e/o APRIL sono elencati nella parte inferiore della figura (da Mackay & Kalled, 2002)(149).....	32
Illustrazione 6: Immunità innata e adattativa.....	38
Illustrazione 7: Principali meccanismi dell'immunità innata e adattativa.....	38
Illustrazione 8: Immunità adattativa.....	48
Illustrazione 9: Linfociti.....	49
Illustrazione 10: Attivazione dei linfociti T.....	51
Illustrazione 11: Risposta anticorpale primaria e secondaria.....	59
Illustrazione 12: Cattura e presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche.....	60
Illustrazione 13: Struttura immunoglobulinica.....	62
Illustrazione 14: Meccanismi molecolari di scambio isotipico. In un linfocita B che secreta IgM, a carico del trascritto primario si genera uno splicing del genere VDJ riarrangiato con l'RNA del gene C μ , dal momento che il gene μ è il più vicino al gene VDJ. Ne consegue la produzione di una catena μ e di anticorpi IgM. I segnali che provengono dai linfociti T (legame con CD40L e citochine) possono indurre la ricombinazione delle regioni di scambio (S) in modo tale che il gene VDJ si unisce a un gene C a valle di C μ . La regione di DNA interposta viene eliminata. La cellula B inizia quindi a produrre una nuova classe di catene pesanti (che determinano l'isotipo), mantenendo però la stessa specificità della cellula B originale (determinata dalla sequenza VDJ, che rimane inalterata).....	69
Illustrazione 15: Influenza citochinica nello scambio isotipico.....	70
Illustrazione 16: Principali meccanismi con cui una condizione di immunodeficienza può portare allo sviluppo di autoimmunità.....	83
Illustrazione 17: Schema di citometro a flusso.....	106
Illustrazione 18: Confronto tra diversi tipi di plot.....	112
Illustrazione 19: Schema turbidimetro.....	117
Illustrazione 20: Possibili applicazioni turbidimetria.....	117

Illustrazione 21: Funzionamento nefelometria.....	118
Illustrazione 22: Applicazioni cliniche della nefelometria.....	119
Illustrazione 23: Distribuzione condizioni cliniche associate al SigAD nella coorte di pazienti arruolati.....	122
Illustrazione 24: Condizioni cliniche associate nella storia familiare.....	123
Illustrazione 25: Frequenza altre condizioni associate al SIgAD nel paziente con manifestazioni autoimmuni.....	128
Illustrazione 26: Età diagnosi.....	129
Illustrazione 27: Livelli serici IgG confrontati con i valori normali per età.....	130
Illustrazione 28: Livelli serici IgM confrontati con i valori normali per età.....	131
Illustrazione 29: Valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie.....	132