



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI GENOVA**

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN PEDIATRIA

Direttore Prof. Mohamad Maghnie

**NEUTROPENIA ATIPICA PER DURATA ED ETÀ DI
ESORDIO, PROBABILE EPIFENOMENO DI
IMMUNODISREGOLAZIONE**

Relatore: Prof. Mohamad Maghnie

Correlatore: dott.ssa Francesca Fioredda

Candidato: dott. Pietro Casartelli

Anno accademico 2021/2022

Indice

1. Introduzione	2
1.1. Definizione	2
1.2. Classificazione delle neutropenie	3
1.3. Neutropenia autoimmune	4
1.4. Neutropenia idiopatica	11
1.5. Neutropenia ad esordio tardivo e di lunga durata	15
2. Scopo dello studio.....	18
3. Pazienti e metodi	20
3.1. Criteri di inclusione e definizioni.....	20
3.2. Raccolta dei Dati.....	21
3.3. Metodi statistici	24
4. Risultati.....	25
4.1. Caratteristiche della popolazione.....	25
4.2. Parametri ematologici	26
4.3. Dati clinici.....	28
4.4. Quadro immunologico.....	31
4.5. Analisi genetica.....	34
5. Discussione e conclusioni.....	36
6. Bibliografia	44

1. Introduzione

1.1. Definizione

Con il termine neutropenia si indica una condizione caratterizzata dalla riduzione della conta dei neutrofili circolanti (Absolute Neutrophil Count, ANC) al di sotto dei valori minimi di normalità, variabili in relazione all'etnia ed all'età.

Per i neonati e i lattanti caucasici il limite inferiore è $1.0 \times 10^9/L$ nel primo anno di vita, mentre è $1.5 \times 10^9/L$ dopo l'anno di età fino all'età adulta.

La soglia è inferiore per popolazioni di etnia africana, caraibica e mediorientale, per cui il limite di normalità di ANC è $0.2-0.6 \times 10^9/L$. [1]

Il valore dei neutrofili circolanti è invece superiore durante la prima settimana di vita e nei nati pretermine (28-36 settimane), in cui la soglia di normalità è pari a $2.5 \times 10^9/L$, mentre negli early preterm (<28 settimane) si parla di neutropenia per valori inferiori a $1 \times 10^9/L$. [2]

Sulla base della conta dei neutrofili circolanti, nella popolazione caucasica dopo il primo anno di vita si distinguono differenti gradi di neutropenia:

- Neutropenia lieve, per ANC compresa tra 1.0 e $1.5 \times 10^9/L$
- Neutropenia moderata, per ANC compresa tra 0.5 and $1.0 \times 10^9/L$
- Neutropenia grave, per ANC al di sotto di $0.5 \times 10^9/L$, o molto grave per ANC inferiore a $0.2 \times 10^9/L$.

Si definisce invece neutropenia cronica la riduzione dell'ANC che persiste per oltre tre mesi. [3]

1.2. Classificazione delle neutropenie

La classificazione delle neutropenie prevede innanzitutto una distinzione tra forme congenite e acquisite.

Tra le forme congenite si differenziano forme isolate da forme associate a sintomi ematologici o extra-ematologici di diversa natura (**tabella 1**).

Tra le forme acquisite si annoverano, la neutropenia da farmaci, le forme post-infettive, la neutropenia autoimmune e la neutropenia alloimmune. [4-7]

La diagnosi di neutropenia idiopatica è una diagnosi di esclusione che deve essere periodicamente rivalutata. I nuovi elementi che vengono acquisiti nel corso del follow-up possono infatti caratterizzare meglio il profilo di questa condizione, consentendone spesso una riclassificazione. [8]

Tabella 1. Classificazione delle neutropenie

Neutropenia congenita	Neutropenia acquisita
<i>Isolata</i>	<i>Autoimmune</i>
Neutropenia congenita grave Neutropenia ciclica	Neutropenia autoimmune primitiva Neutropenia autoimmune secondaria
<i>Associata a</i>	<i>Alloimmune</i>
Segni extra-ematologici Insufficienza midollare congenita Immunodeficienza/immunodisregolazione	Neutropenia alloimmune primaria Neutropenia alloimmune secondaria
	<i>Associata a disordini mieloproliferativi</i>
	<i>Associata a insufficienza midollare acquisita</i>
	<i>Neutropenia della gravidanza</i>
	<i>N. postinfettiva</i>
	<i>N. da farmaci</i>
	<i>N. da deficit di nutrienti</i>
	<i>Neutropenia idiopatica</i>

1.3. Neutropenia autoimmune

Si definisce neutropenia autoimmune (Autoimmune Neutropenia, AIN) una riduzione della conta dei neutrofili assoluti associati alla presenza di anticorpi anti-neutrofilo nel siero del paziente. [8]

La neutropenia autoimmune può essere definita primitiva, quando si manifesta in maniera isolata, o secondaria, quando si manifesta nel contesto di un altro disordine autoimmune o altre patologie (neoplasie, trapianto di midollo).

Anticorpi anti-neutrofilo

I diversi tipi di neutropenia immunomediata (autoimmune o alloimmune) sono causati dalla presenza di anticorpi diretti contro gli antigeni di superficie dei neutrofili. Sono state descritte cinque classi di antigeni di superficie dei neutrofili (Human Neutrophil Antigens, HNA), espressi con frequenza variabile nelle diverse popolazioni. [9-11]

Nella maggior parte dei pazienti affetti da neutropenia immunomediata gli anticorpi sono diretti contro antigeni localizzati sul recettore FcγRIIB, ma sono state identificate anche altre regioni target.

Gli anticorpi diretti contro i neutrofili provocano tramite il riconoscimento anticorpale e l'attivazione del complemento un aumento della fagocitosi periferica e un'inibizione della proliferazione midollare, causando in questo modo una riduzione dei neutrofili circolanti. [12-14] Gli stessi anticorpi hanno inoltre un effetto qualitativo sull'azione dei neutrofili. La loro presenza determina infatti una riduzione della produzione di CO₂ e di radicali liberi, interferendo con i meccanismi di aggregazione-disaggregazione dei neutrofili e con la loro motilità.

Metodi di identificazione degli anticorpi anti-neutrofilo

Il metodo attualmente più utilizzato per l'identificazione di neutropenia autoimmune è la ricerca di anticorpi anti-neutrofilo liberi nel siero del paziente (test indiretto, indirect granulocyte immunofluorescence test, I-GIFT). Nello specifico, neutrofili di donatore eterologo vengono incubati con il siero del paziente per permettere agli anticorpi reattivi di legare gli epitopi antigenici; successivamente

i neutrofili vengono lavati e incubati con una miscela reagente di globuline IgG, IgM marcate a fluorescenza. La presenza di anticorpi legati alla superficie dei neutrofili viene quindi evidenziata mediante citometria a flusso o con microscopio a fluorescenza.

Un altro test piuttosto semplice in termini di semplicità di applicazione è il test di agglutinazione granulocitaria (Granulocyte agglutination test, GAT), che consiste nel cimentare il siero del paziente con un supporto contenente l'antigene, verificando poi se avviene agglutinazione, mediante lettura diretta dell'intensità della flocculazione.

Secondo le indicazioni dell'ultimo workshop sui test per definire le tecniche di identificazione degli anticorpi anti-neutrofilo, l'associazione di GAT e GIFT rappresenta il gold standard. [15] Tuttavia, il test considerato più fattibile anche su numeri cospicui di pazienti e che conferisce un risultato affidabile è la GIFT. [16]

Sono disponibili altre metodiche di tipo indiretto (monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigens, MAIGA; flow cytometric white blood cell immunofluorescence test, Flow-WIFT; microbeads assay LabScreen® Multi), di cui alcune risultano più specifiche (MAIGA) o più sensibili (Flow-IFT) rispetto al I-GIFT. Tuttavia, tali metodiche sono tecnicamente complicate e richiedono tempistiche prolungate, per cui la loro applicabilità nella pratica clinica risulta limitata. [17]

Il test diretto, in grado di rilevare gli anticorpi adesi alla superficie dei neutrofili del paziente, è invece associato ad un alto tasso di falsi positivi. [18]

Il test I-GIFT presenta elevata specificità e valore predittivo positivo (85% e 91.8% rispettivamente), a fronte di una sensibilità limitata al 62.5 %. [19] Tuttavia, ripetendo il test in più occasioni la sensibilità aumenta fino all'82%. [20,21] Per tale motivo, in caso di negatività della prima determinazione e sospetto clinico di AIN, l'esame deve essere ripetuto almeno quattro volte nel corso di 4-6 mesi.

Al contrario, data la rarità dei falsi positivi, la positività o il risultato borderline per IgG o IgM anti-neutrofili in almeno un campione, associata ad un fenotipo clinico compatibile con neutropenia autoimmune, è sufficiente per porre diagnosi di AIN. [1,21-27]

In considerazione della bassa sensibilità dei test indiretti, è possibile che in pazienti con anamnesi, fenotipo clinico ed aspirato midollare suggestivi per neutropenia autoimmune la ricerca indiretta degli anticorpi anti-neutrofilo risulti negativa, anche dopo ripetizione del test. Questi casi vengono classificati come neutropenie idiopatiche.

Neutropenia Autoimmune Primitiva

La neutropenia autoimmune primitiva (pAIN, Primary autoimmune neutropenia) ha tipicamente esordio nella prima infanzia, con uguale incidenza tra maschi e femmine. Gli eventi infettivi gravi sono rari e la maggior parte dei pazienti va incontro a risoluzione spontanea entro i 24-36 mesi dall'esordio. [1]

L'incidenza stimata è di 1/100.000 in bambini di età inferiore ai 10 anni. È tuttavia probabile che tale dato sia una sottostima della reale incidenza, considerato il decorso benigno della malattia e l'elevata frequenza di diagnosi occasionale (8-27%). [28,29]

All'origine della neutropenia vi è la produzione di anticorpi diretti contro i neutrofili, la cui produzione potrebbe essere dovuta alla transitoria modificazione degli antigeni di superficie dei neutrofili dopo l'uso di farmaci, a un meccanismo di molecular mimicry con antigeni microbici, o alla produzione di auto-anticorpi in seguito ad un evento infettivo. Un'ipotesi interessante è che in questi pazienti vi sia un'immaturità del sistema T-suppressor, la cui maturazione completa coinciderebbe con la successiva risoluzione spontanea della neutropenia. [21,30,31]

L'aspirato midollare mostra spesso un rallentamento con shift a sinistra, con prevalenza dei progenitori in stadio di maturazione più precoce, in assenza di un arresto maturativo definito. L'ipoplasia mieloide che si osserva potrebbe essere spiegata dall'effetto degli autoanticorpi sui precursori midollari. [32-34]

Negli ultimi 30 anni, diversi studi hanno descritto coorti di pazienti affetti da neutropenia autoimmune con risultati complessivamente sovrapponibili, riassunti in tabella 2 [19-21, 30, 35-39]

Tabella 2. Caratteristiche di diverse coorti di bambini affetti da pAIN.

Primo Autore	N° pz	Età diagnosi (mesi)	Femmine %	Infezioni gravi	Risoluzione %	Età alla risoluzione/ durata NP (mesi)
Lalezari P 1986	121	8 (3-30)	60%	---	95%	Durata 20
Bux J 1998	240	8 (5-15)	54%	12%	80%	Durata 7-24
Bruin M 1999	21	---	---	No	86%	Durata 30 (16-52)
Chung 2004	24	9	50%	10%	55% a 3 anni	Durata 28.6
Wang L 2008	55	9.8 (4-28)	45%	No	100% (di 24 pz.)	Età 22.5 (13-44) Durata 12,7
Sella R 2010	72	10 (0-42)	37%	15%	100 % (di 53 pz.)	Durata 4.4 (0.5-30)
Audrain M 2011	116	16 (3-59)	48%	---	---	---
Farruggia P 2015	157	8 (0-54):	36%	9.6%	90% a 5 anni	Età 25.7 Durata 15.6

In sintesi, i diversi studi che hanno cercato di caratterizzare la popolazione affetta da neutropenia autoimmune hanno evidenziato caratteristiche comuni alla maggior parte dei pazienti: la giovane età di esordio (7-8 mesi), la risoluzione della quasi totalità (80-90 %) dei casi entro i 36 mesi dalla diagnosi, un fenotipo clinico lieve caratterizzato dalla bassa incidenza di infezioni gravi (circa 10-15%).

Neutropenia autoimmune secondaria

La neutropenia autoimmune secondaria (secondary Autoimmune Neutropenia, sAIN) si manifesta solitamente nella tarda infanzia o nell'adolescenza, in misura maggiore in soggetti di sesso femminile. Può essere associata ad infezioni, immunodeficienza, neoplasie, somministrazione di farmaci, trapianto di staminali emopoietiche, altre patologie autoimmuni (es. sindrome di Evans, tiroidite autoimmune, lupus eritematoso sistemico e molte altre). [8]

I dati riguardanti la neutropenia autoimmune secondaria in età pediatrica sono piuttosto scarsi. Un recente studio italiano ha analizzato una piccola casistica tratta dal Registro Italiano delle Neutropenie, confrontando le caratteristiche all'esordio ed il decorso di 26 pazienti affetti da neutropenia autoimmune secondaria (sAIN) con una coorte di 263 pazienti affetti da pAIN. [40] Lo studio ha mostrato significative differenze tra neutropenia primitiva e secondaria, riassunte in **tabella 3**.

Tabella 3. Confronto tra una coorte di pAIN ed una di sAIN. Tratto da Farruggia et al, 2017[40]

	pAIN (263)	sAIN (26)	p
Sesso (F%)	41%	61%	0.049
Età all'esordio (mediana)	0.77	10.07	< 0.01
Età alla diagnosi (anni, mediana)	1.09	10.98	< 0.01
G-CSF	6.9%	23.1%	< 0.01
Infezioni gravi	11.8%	40.0%	< 0.01
Risoluzione spontanea	74.9%	7.7%	< 0.01
Età alla risoluzione (mediana)	2.14	14.11	< 0.01
Leucociti (mediana) all'esordio	$5.93 \times 10^9/L$	$2.48 \times 10^9/L$	< 0.01
Linfociti (mediana) all'esordio	$4.36 \times 10^9/L$	$1.58 \times 10^9/L$	< 0.01
Monociti (mediana) all'esordio	$0.62 \times 10^9/L$	$0.34 \times 10^9/L$	< 0.01
ANC (mediana) all'esordio	$0.45 \times 10^9/L$	$0.63 \times 10^9/L$	0.035

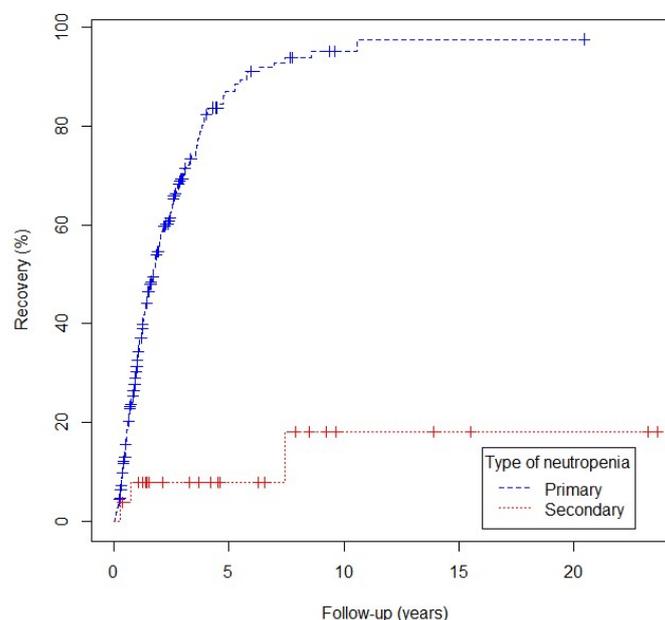
L'età mediana all'esordio della neutropenia era di 0.77 anni per la pAIN e di 10.07 anni per la sAIN. Tra i pazienti con pAIN vi era una quota maggiore di ex-pretermine. Tale dato risulta interessante poiché in accordo con l'ipotesi che la pAIN sia legata alla presenza di sistema T-suppressor ancora immaturo.

Il valore medio dei neutrofili all'esordio è significativamente minore nella pAIN ($0.45 \times 10^9/L$ vs $0.63 \times 10^9/L$), mentre nella sAIN è presente linfopenia, assente nella pAIN (1.58 linfociti $\times 10^9/L$ nella sAIN vs $4.36 \times 10^9/L$ nella pAIN). Altre differenze sono la maggior frequenza di infezioni gravi e di leucopenia nella sAIN, e di monocitosi nella pAIN.

Nei casi descritti di sAIN la neutropenia si associava a: sindrome di Evans, tiroidite autoimmune, celiachia, deficit di GH, diabete, lupus eritematoso sistemico, epatite, encefalite autoimmune. Nel 42.3% dei pazienti sAIN i sintomi di autoimmunità sono comparsi contemporaneamente alla neutropenia, nel 30.7% la hanno preceduta e nel 26.9% la hanno seguita.

Rispetto alla pAIN la neutropenia secondaria tende a risolversi in una minoranza dei casi (7.7% dei pazienti). Questa caratteristica qualifica la neutropenia secondaria come una patologia con maggiore tendenza alla cronicizzazione, come evidenziato dalla curva in **figura 1**.

Figura 1. Curva di risoluzione secondo Kaplan-Meier nei pazienti con pAIN e sAIN nello studio di registro AIEOP. Tratto da Farruggia et al,2017[40]



Nella popolazione adulta, la neutropenia autoimmune secondaria è più frequente di quella primitiva, in associazione ad infezioni, somministrazione di farmaci, immunodeficienza, neoplasie, trapianto di staminali emopoietiche, altre patologie autoimmuni. Le malattie autoimmuni associate a sAIN includono la sindrome di Evans, la tiroidite autoimmune, il lupus eritematoso sistemico, la sindrome di Sjögren, l'artrite reumatoide, la sindrome di Felty, l'epatite autoimmune e la sclerosi multipla. [41]

La neutropenia secondaria in età pediatrica ha alcune caratteristiche in comune con la neutropenia autoimmune dell'adulto: la prevalenza del sesso femminile (60% nella sAIN pediatrica, 70% nell'adulto), la bassa frequenza di risoluzione spontanea (10% circa), la frequenza di leucopenia e monocitosi all'esordio, la frequenza delle infezioni gravi e la necessità di terapia con G-CSF.

Questi dati suggeriscono che la neutropenia autoimmune secondaria in età pediatrica e la neutropenia autoimmune dell'adulto, primitiva e secondaria, siano in realtà la stessa patologia, con esordio più o meno precoce.

1.4. Neutropenia idiopatica

Si definisce neutropenia idiopatica (Idiopathic Neutropenia, IN) una neutropenia cronica non attribuita a causa genetica, infettiva, infiammatoria, autoimmune o maligna. Si tratta quindi di una diagnosi di esclusione. Considerata la scarsa sensibilità dei metodi di rilevazione degli anticorpi anti-neutrofilo vi è un overlap tra le forme di neutropenia autoimmune e quella idiopatica. [42]

Nell'ambito della neutropenia idiopatica si può distinguere la neutropenia idiopatica dell'infanzia, fenotipicamente simile alla neutropenia autoimmune primitiva, dalla neutropenia idiopatica dell'adulto (Chronic Idiopathic Neutropenia, CIN). [1]

Neutropenia idiopatica dell'infanzia

La diagnosi di neutropenia idiopatica è una diagnosi di esclusione, che può essere posta solo in pazienti con neutropenia persistente in cui non sia possibile identificare la presenza di anticorpi contro i neutrofili dopo ripetute determinazioni (almeno 3-4), l'aspirato midollare sia nella norma e siano state escluse le cause di neutropenia secondaria o congenita. In questi pazienti è comunque indicata la prosecuzione del follow-up, per una eventuale ridefinizione diagnostica alla luce dell'acquisizione di nuovi elementi clinici. [1,25,27,43,44,]

La più ampia casistica finora analizzata è stata descritta in un lavoro italiano pubblicato nel 2019, che ha riportato le caratteristiche ed il decorso di 85 bambini affetti da neutropenia idiopatica, arruolati nel registro italiano delle neutropenie e confrontati con la coorte di pAIN del Registro. [6]

L'analisi ha messo in evidenza molteplici elementi di sovrapposizione tra AIN e neutropenia idiopatica nell'infanzia (**Tabella 4**).

Tabella 4. Confronto tra una coorte di IN e una di pAIN. *Tratto da Farruggia et al, 2019 [6]*

	pAIN (336)	IN (85)	p
Sesso (M%)	56.8%	50.6%	0.29
Età al riscontro di neutropenia (anni, mediana)	0.8	1.2	<0.001
Età alla diagnosi (anni, mediana)	1.1	2.0	<0.001
ANC (mediana) all'esordio	0.45 x 10 ⁹ /L	0.38 x 10 ⁹ /L	0.47
Severità NP (grave-moderata-lieve)	55.2%-37.6%-7.2%	60.0%-29.4%-10.6%	0.28
Conta leucocitaria (mediana) all'esordio	6.1 x 10 ⁹ /L	5.7 x 10 ⁹ /L	0.60
Leucopenia all'esordio	35.9%	42.4%	0.27
Conta monocitaria (mediana) all'esordio	0.62 x 10 ⁹ /L	0.61 x 10 ⁹ /L	0.87
Monocitosi all'esordio	20.0%	29.3%	0.08
Conta linfocitaria (mediana) all'esordio	4.5 x 10 ⁹ /L	4.3 x 10 ⁹ /L	0.16
Trombocitosi all'esordio	11.1%	20%	0.06
Aumento delle IgG all'esordio	6.6%	5.9%	0.83
Deficit isolato di IgA	3.1%	3.0%	0.97
Test di Coombs diretto positivo	4.4%	3.1%	0.74
Esecuzione aspirato midollare	31.6%	49.4%	.003
Infezioni gravi	11.9%	11.8%	0.97
Trattamento con G-CSF	7.5%	2.8%	0.29

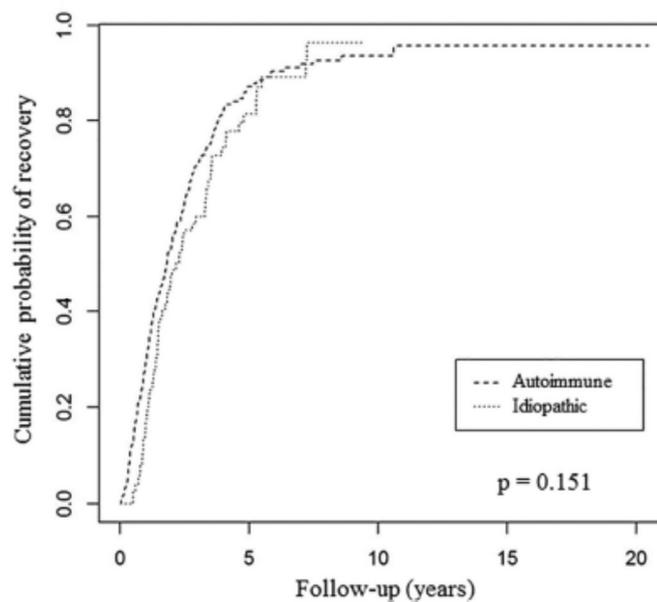
I due gruppi sono infatti risultati simili per quanto concerne la presentazione clinica, tipo e numero delle infezioni, fattori prognostici, tempo e modalità di risoluzione.

Vi sono state invece differenze significative per quanto riguarda l'età di esordio (0.8 anni nella pAIN vs 1.2 anni nell'idiopatica) e l'età alla diagnosi (1.1. anni vs 2 anni, rispettivamente). Non sono state evidenziate differenze significative per quanto concerne valori di leucociti e linfociti, leucopenia per età, ANC, severità della neutropenia, monocitosi, sottopopolazioni linfocitarie, presenza di piastrinosi, incidenza di infezioni gravi, ipergammaglobulinemia o positività del test di Coombs diretto.

Infine, come illustrato in **Figura 2**, non è stata osservata una differenza significativa nella tendenza dei due gruppi alla risoluzione spontanea, pari all'87.12% dopo 5 anni di follow-up per le pAIN e al 81.28% per le IN.

In entrambi i gruppi, inoltre, la minore età alla diagnosi e l'assenza di leucopenia e monocitosi correlano con la risoluzione precoce.

Figura 2: Curva di risoluzione secondo Kaplan-Meier di una coorte di pAIN e di IN. Tratto da Farruggia et al, 2019 [6]



Alla luce delle evidenti somiglianze tra pAIN e IN, gli autori concludono, in accordo con precedenti dati di letteratura, che sia probabile che la maggior parte dei casi di neutropenia idiopatica dell'infanzia siano in realtà neutropenie immuno-mediate, in cui non è possibile identificare gli anticorpi anti-neutrofilo a causa della bassa sensibilità delle tecniche diagnostiche attualmente in uso. [6,19,21,23,30,45,46] Il bambino affetto da neutropenia idiopatica con caratteristiche fenotipiche simili alla neutropenia autoimmune deve pertanto essere gestito come una pAIN.

Neutropenia idiopatica cronica dell'adulto

Nel paziente adulto la neutropenia cronica idiopatica (Chronic Idiopathic Neutropenia, CIN) viene definita per valori di ANC $<1.8 \times 10^9/L$ persistenti per almeno tre mesi, in assenza di altre cause di neutropenia e in assenza di positività degli anticorpi anti-neutrofilo. [47]

La CIN è distinta dalle altre forme di neutropenia cronica dell'adulto per il carattere acquisito, l'assenza di variazioni cicliche del numero di neutrofili, l'assenza di evidenza clinica e laboratoristica di una patologia sistemica (incluse le mielodisplasie) che potrebbe causare la neutropenia e l'esclusione di altre forme di neutropenia. Colpisce principalmente donne di mezza età ed è caratterizzata da una bassa incidenza di infezioni e una prognosi favorevole, con rara trasformazione leucemica. [48-50]

Dall'analisi di popolazioni di pazienti affetti da CIN, sono emersi dati che supportano l'ipotesi che anche questa, come la neutropenia autoimmune, abbia una patogenesi immunomediata. [51-52]

Ci sono crescenti evidenze che in questi pazienti la neutropenia sia dovuta all'accelerazione della morte per apoptosi dei progenitori mieloidi, nel contesto di un microambiente midollare caratterizzato dall'eccesso di citochine pro-infiammatorie (IL-6, interferone γ e TGF β 1) e di mediatori pro-apoptotici (TNF- α e IL-1 β). [52-55]

Lo studio dei progenitori midollari di questi pazienti ha dimostrato un'accelerata apoptosi delle cellule CD34+/CD33+, ma non delle più primitive CD34+/CD33-. Sulle stesse cellule CD34+/CD33+ è stata dimostrata una significativa up-regulation del recettore FAS rispetto alle cellule più primitive CD34+/CD33-. Si ipotizza quindi che FAS sia coinvolto nella deplezione delle cellule progenitrici CD34+/CD33+ mediante il meccanismo di apoptosi.

Analogamente ad altre patologie autoimmuni, la CIN è associata a linfopenia, dovuta alla riduzione parallela sia dei CD4+ che dei CD8+, ma non dei CD19+. [56]

Un'approfondita analisi del fenotipo T linfocitario in questa categoria di pazienti ha evidenziato la riduzione della popolazione di linfociti T naïve (CD45RA+) rispetto ai controlli, l'aumento della percentuale di CD8+ attivati con possibile azione mielosoppressiva, la riduzione dei livelli di IL7 sierica e midollare. L'ipotesi degli autori

è che all'origine della linfopenia osservata nelle CIN vi sia un'espansione aberrante di cellule T che ne determina l'apoptosi, associata a inadeguata maturazione timica, in parte a causa di bassi livelli di IL7. [57]

Rispetto ai controlli sani in questi pazienti sono stati inoltre rilevati livelli inferiori di IgA ed IgG. L'analisi delle sottoclassi IgG mostra una riduzione di IgG1, IgG3 e IgG4, ma non di IgG2. È stato inoltre descritto l'aumento delle IgM, associato ad una proporzione maggiore di cellule B naïve (IgD+/CD27-) ed una quota minore di B di memoria (class-switched memory, IgD-/CD27+). [58]

Infine, nei pazienti affetti da CIN è stata segnalata una concentrazione di monociti totali ridotta rispetto ai controlli, e una concorde riduzione di unità formanti colonie granulo-monocitarie (GM-CFU) a livello midollare.

È stata inoltre descritta una correlazione inversa fra ANC e conta monocitaria nei pazienti con CIN. Ciò potrebbe essere dovuto ad un effetto compensatorio della proliferazione monocitaria a livello midollare, in risposta alla neutropenia. [59]

Questa approfondita caratterizzazione della popolazione di adulti affetti da CIN suggerisce che tale condizione non sia, in effetti, idiopatica, bensì a genesi autoimmune, o comunque immunomediata.

1.5. Neutropenia ad esordio tardivo e di lunga durata

Nella pratica clinica quotidiana, sono stati osservati diversi casi di neutropenia autoimmune che non hanno tutte le caratteristiche tipiche né della neutropenia autoimmune primitiva, né della neutropenia secondaria. Si tratta di casi che non esordiscono nella prima infanzia, o che non vanno incontro a risoluzione spontanea.

Recentemente è stato pubblicato uno studio che ha tratto i dati dal registro italiano delle neutropenie e caratterizzato questi due tipi peculiari di neutropenia, comparandoli alla coorte di pazienti affetti da pAIN [60]. In questo studio veniva data una definizione di neutropenia autoimmune ad esordio tardivo (Late Onset Neutropenia, LO-Np) nei casi neutropenia autoimmune esordita oltre i 3 anni di vita, e di neutropenia autoimmune di lunga durata (Long Lasting Neutropenia, LL-Np) nei casi di neutropenia

autoimmune con esordio entro i 3 anni di vita ma di durata superiore a 36 mesi. I principali risultati di questo studio sono illustrati in **tabella 4**.

Tabella 4. Confronto tra pAIN, Late Onset Neutropenia (LO-Np) e Long Lasting Neutropenia (LL-Np). *Tratto da Fioredda et al, 2020 [60]*

	pAIN = 135 pts	LO-Np =31pts	LL-Np = 48 pts	p
Sesso (F)	41/135 (30%)	16/31 (52%)	25/48 (52%)	0.001
Età diagnosi (anni) [mediana (IQR)]	0.6 (0.3-1.3)	11.5(7.6-14.6)	1.18 (0.6-2.2)	<0.001
Durata neutropenia (anni) [mediana (IQR)]	1.03 (0.54-1.7)	2.1 (1.4-4.4)	4.5 (3.5-7.09)	<0.001
Risoluzione	135/135 (100%)	4/31 (13%)	28/48 (58%)	<0.001
ANC/mmc all'esordio [mediana (IQR)]	430 (230-716)	649 (430-970)	552 (350-790)	<0.001
Leucociti/mmc all'esordio [mediana (IQR)]	6125 (5010-7920)	3180 (2670-3710)	5030 (3440-6900)	<0.001
Linfociti x 10⁹/L all'esordio [mediana (IQR)]	4740 (3500-5880)	1680 (1240-1900)	2370 (1920-3400)	<0.001
Monocitosi all'esordio	15/120 (12.5%)	5/26 (19%)	10/38 (26%)	ns
Riduzione CD3	7/72 (10%)	2/24 (8%)	11/39 (28%)	0.02
Riduzione CD4	8/72 (11%)	4/25 (16%)	11/38 (29%)	0.06
Riduzione CD8	11/71 (15%)	4/25 (16%)	7/40 (17,5%)	ns
Riduzione CD19	6/64 (9%)	12/25 (48%)	13/37 (35%)	<0.001
Riduzione NK	10/62 (16%)	9/23 (39%)	10/34 (29%)	0.06
Deplezione di Immunoglobuline	7/113 (6%)	4/26 (15%)	3/44 (7%)	ns
Episodi infettivi	65/130 (50%)	14/29 (48%)	18/47 (38%)	0.4
Infezioni gravi	16/65 (25%)	3/14 (21%)	3/18 (17%)	0.2
Terapia con G-CSF	7/135 (5%)	3/21 (14%)	7/42 (17%)	0.04
Malattie autoimmuni/marker di autoimmunità	2/135 (1%)	16/29 (55%)	8/48 (17%)	<0.001

I dati di questo studio riportano un valore mediano di ANC significativamente più elevato nelle LO-Np e LL-Np rispetto alla pAIN, ed una maggior frequenza di neutropenia grave in quest'ultima (pAIN 58%, vs LL-Np 37% e LO-Np 32%).

La leucopenia era più frequente nelle LO-Np (73%) rispetto alle LL-Np (26%) ed alla pAIN (11%). L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie ha mostrato una deplezione dei CD19+ nella LO-Np (48% dei casi) e nella LL-Np (35% dei casi), non evidente nella pAIN. Una situazione analoga è stata evidenziata per le cellule natural killer.

Non vi sono state differenze significative tra i tre gruppi in merito alla frequenza di infezioni gravi o ricorrenti ed al tipo di infezioni. Tuttavia, nelle LO-Np e LL-Np la terapia con G-CSF è stata effettuata più frequentemente rispetto alla pAIN.

Rispetto alla LL-Np, la LO-Np ha una minore tendenza alla risoluzione spontanea, conta linfocitaria e leucocitaria inferiore ed è più frequentemente associata a patologie e marker autoimmuni (55% vs 17%).

La significativa differenza nel tasso di risoluzione (100% nelle pAIN vs 58% nelle LL-Np vs 13% nelle LO-Np), induce gli autori a ipotizzare che almeno una parte dei pazienti con LL-Np abbia una probabilità residua di risoluzione spontanea che può verificarsi più tardivamente, qualificando la loro condizione come vera pAIN. [40, 61]

In un piccolo sottogruppo di pazienti con LO-Np e LL-Np è stata eseguita l'analisi di un pannello di 162 geni con tecnica NGS. In 3/10 pazienti con LO-Np e in 1/5 pazienti con LL-Np sono state riscontrate varianti a carico dei geni TACI, TNF2, e LRBA, notoriamente associati a immunodeficienza monogenica o a telomeropatie che possono coinvolgere anche il sistema immunitario. [62-65]

Questi dati suggeriscono che all'origine di queste due tipologie vi possa essere una disregolazione immunitaria più complessa di quanto accade nella pAIN classica, di cui la neutropenia potrebbe rappresentare un epifenomeno che anticipa un'evoluzione verso altre forme di immunodisregolazione anziché essere un evento isolato.

2. Scopo dello studio

La neutropenia autoimmune primaria e la neutropenia idiopatica rappresentano i due tipi di neutropenia cronica (durata oltre i tre mesi) in età pediatrica. Entrambe le forme esordiscono tipicamente nella prima infanzia e sono caratterizzate da segni clinici lievi/moderati, con una frequenza di infezioni gravi in meno del 10% dei pazienti affetti. [20,21]

Le neutropenie autoimmuni o idiopatiche che persistono oltre la classica età di risoluzione o che esordiscono in età più avanzata (tarda infanzia/adolescenza) sono difficilmente classificabili come pAIN o IN, in quanto presentano rispetto a queste forme delle differenze marcate. Nell'ambito della sola neutropenia autoimmune queste differenze sono state ampiamente descritte in uno studio di Fioredda et. al. [60]

In questo studio è stato effettuato un confronto tra pazienti affetti da neutropenia autoimmune primaria e neutropenia autoimmune di lunga durata o ad esordio tardivo. Queste due forme di neutropenia hanno mostrato la presenza di alcune peculiari caratteristiche che le differenziano dalla classica pAIN dal punto di vista ematologico ed immunologico: presenza di leucopenia e linfopenia, con valori inferiori in particolare di linfociti di classe B e cellule Natural Killer (NK), maggior probabilità di essere sottoposti a terapia con G-CSF, maggior frequenza di comparsa di segni di autoimmunità durante il follow up. [60]

L'analisi genetica effettuata ha inoltre identificato in un sottogruppo di questi pazienti la presenza di varianti in geni correlati ad immunodisregolazione, permettendo di definire alcune di queste forme di neutropenia come un epifenomeno di immunodisregolazione più che come una patologia di per sé.

Ad oggi, non sono presenti in letteratura dati riguardo a pazienti con neutropenia LL o LO in assenza di positività anticorpale (neutropenia idiopatica). A fronte delle analogie cliniche tra neutropenie autoimmuni e idiopatiche, il presente studio si propone di estendere quest'ultima analisi, finora limitata alle neutropenie autoimmuni, a tutti i casi di neutropenia ad esordio tardivo o a lunga persistenza, indipendentemente dalla presenza di anticorpi anti-neutrofilo nel siero.

Nello specifico si cercherà di valutare eventuali differenze in termini di assetto immunologico, pattern infettivo, evoluzione verso altre forme di autoimmunità e assetto genetico. I risultati di questo studio potrebbero permettere in questo modo di delineare un profilo peculiare per una precoce identificazione di soggetti che potrebbero essere predisposti ad un'immunodisregolazione complessa.

3. Pazienti e metodi

3.1. Criteri di inclusione e definizioni

I pazienti selezionati per il presente studio sono stati selezionati tra quelli registrati nello Studio Retrospettivo Prospettico Italiano delle Neutropenie Croniche, nato nel 2004 e con sede l'unità di Ematologia dell'Istituto Giannina Gaslini. Tale studio prevede la registrazione di tutti i pazienti affetti da neutropenia cronica, definita come valore di ANC inferiore a 1500 /mmc) in almeno 3 determinazioni e di durata superiore a 3 mesi. Di questi pazienti vengono raccolti dati clinici e genetici, previo consenso informato.

Sono stati considerati elegibili per la presente analisi i pazienti registrati entro il 31 marzo 2022 appartenenti alle seguenti categorie:

- pazienti con neutropenia esordita prima del compimento dei 3 anni di età e persistente per almeno 3 anni (Long Lasting Neutropenia);
- pazienti con neutropenia esordita dopo il compimento dei 3 anni di età e prima del compimento dei 25 anni di età e di durata superiore a 12 mesi (Late Onset Neutropenia);

Sono stati esclusi pazienti con almeno una delle seguenti caratteristiche:

- presenza di altra citopenia all'esordio;
- presenza di altra patologia autoimmune o immunodeficienza all'esordio della neutropenia;
- presenza di neoplasia all'esordio della neutropenia;
- storia personale di trapianto di midollo osseo;
- neutropenia associata alla somministrazione di farmaci;
- neutropenia etnica.

La diagnosi di neutropenia autoimmune è stata definita in base alla positività della ricerca di anticorpi anti-neutrofilo tramite test indiretto (I-GIFT).

La diagnosi di neutropenia idiopatica è stata effettuata in presenza di almeno tre

determinazioni di anticorpi anti-neutrofilo risultate negative.

I pazienti con anticorpi negativi in meno di tre determinazioni sono stati considerati eleggibili ma non sono stati esclusi dall'analisi comparativa tra neutropenia idiopatica ed autoimmune.

3.2. Raccolta dei Dati

I dati dei pazienti sono stati estratti dal database relativo allo Studio Retrospectivo Prospettico Italiano delle Neutropenie Croniche, in seguito a firma del consenso informato da parte dei pazienti o dei loro tutori.

I dati raccolti alla diagnosi e/o nel corso del follow up sono:

- dati anagrafici e anamnesi familiare per ricercare la ricorrenza di patologie ematologiche e/o malattie autoimmuni;
- anamnesi infettivologica dettagliata: numero e tipo di infezioni (afte, gengiviti, periodontiti, infezioni cutanee, ascessi, sinusiti, faringiti, bronchiti, otiti, polmoniti, batteriemie, ascessi epatici, infezioni delle vie urinarie, altro);
- presenza di stimmate cliniche (dismorfismi facciali, cardiopatie, malformazioni, epatomegalia, anomalie cutanee, anomalie scheletriche, sintomi neurologici, anomalie immunologiche) e segni di attivazione immunitaria quali linfadenomegalia e splenomegalia riconducibili a patologie autoimmuni;
- conta delle cellule ematopoietiche circolanti: esame emocromocitometrico e formula leucocitaria all'esordio della patologia e nel corso del follow-up, di cui sono stati considerati ai fini dell'analisi i valori all'esordio, il valore all'ultimo follow up e il valore mediano (n.b. i valori mediani relativi a leucociti, linfociti e neutrofili sono stati calcolati escludendo gli emocromi effettuati in corso di episodi infettivi);
- dosaggio anticorpi anti-neutrofilo indiretti rivolti verso gli antigeni di membrana dei neutrofili, identificati tramite GIFT indiretto con lettura in citofluorimetria;
- dosaggio immunoglobuline e sottoclassi delle immunoglobuline G (IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)

- markers di autoimmunità e significativi pattern autoimmuni (acquisiti sia alla diagnosi che nel corso del follow-up): ANA, ENA, anticorpi anti-cardiolipina, anti-fosfolipidi, anti-ds-DNA, RA-test, p-ANCA, c-ANCA, anti-transglutaminasi, anti-endomisio, test di Coombs diretto e indiretto;
- dati riguardo al trattamento con fattore di crescita dei neutrofilii (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) o altre terapie;
- analisi delle sottopopolazioni linfocitarie, effettuata tramite citometria a flusso, comprensiva di analisi estensiva della filiera maturativa delle cellule B. Nel determinare l'eventuale riduzione/aumento dei valori delle specifiche sottoclassi di linfociti sono stati utilizzati valori di riferimento per età in termini di valori assoluti (cellule/mmc) per le principali classi di linfociti (linfociti T, T helper, T citotossici, B, NK). [66, 67] Per la filiera maturativa B e le sottoclassi minori di linfociti T sono stati invece considerati i valori percentuali. [68, 69] Nello specifico le sottopopolazioni di linfociti analizzate e i rispettivi marcatori cellulari sono state: linfociti T (CD3+), linfociti T Helper (CD3+ CD4+), linfociti T citotossici (CD3+ CD8+), linfociti B (CD19+), linfociti Natural Killer (NK) (CD3- CD56+ CD16+), linfociti T Naïve (CD3+ CD45RA+), linfociti T Memory (CD3+ CD45RO+), linfociti T regolatori (CD3+ CD4+ CD25br CD45RA+), linfociti T Gamma-Delta (CD3+ TCR $\gamma\delta$ +), linfociti T attivati (CD3+ HLADR+), linfociti B memory (CD19+ CD27+), linfociti B Transitional (CD27- CD10++ CD38++), linfociti B Naïve (CD27- CD10+- CD38+- IgD+), linfociti B Marginal zone (CD27+ IgD+ IgM+), linfociti B Switched memory (CD27+ IgD- IgM-), linfociti B pre-switched memory (CD27+ IgD- IgM+), linfociti B IgD Memory (CD27+ IgD+ IgM-), linfociti B doppi negativi (CD27- IgD-);
- analisi genetica mediante tecnica Next Generation Sequencing (NGS) tramite un pannello comprendente in prima istanza 58 geni (effettuato in 9 pazienti), e successivamente un pannello più ampio comprendente 160 geni causativi di neutropenia, insufficienza midollare o immunodeficienza, effettuato nella maggioranza dei pazienti. Le varianti riscontrate sono poi state confermate con tecnica di Sanger PCR. La patogenicità delle varianti riscontrate è stata definita secondo i criteri dell'American College of Medical Genetics and Genomics. [70]

I geni facenti parte del pannello utilizzato sono: AIRE, CARD11, CASP10, CASP8, CD19, CD20, CD40, CD40L, CD70, CTLA4, CTPS1, DCLRE1C, FADD, FAS, CECR1/ADA2, FASL, FOXP3, GATA2, GBA, GORASP1, IKZF1, IL10, IL10RA, IL10RB, IL2RA, ITK, KRAS, LRBA, NCKAP1L/ HEM1, NEMO, NFKB1, NRAS, PIK3CB, PIK3CD, PIK3R1, PRKCD, RAG1, RAG2, RASGRP1, SOCS1, STAT1, STAT3, STAT5B, MPL, TLR8, TNFRSF13B, TNFRSF13C, MAGT1, ACD/TPP1, CTC1, DKC1, MYSM1, NAF1, NHP2, NOP10, PARN, POT1, RPL11, RPL15, RPL26, RPL27, RPL35A, RPL5, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS28, RPS29, RPS7, RTEL1, STN1, TERC, TERT, TINF2, TSR2, WRAP53/TCAB1, RPS14, ERCC6L2, SRP72, TP53, C16orf57/USB1, DNAJC21, EFL1, SBDS, SRP54, ATM, BLM/RECQL3, LIG4, NBN, NHEJ1, AP3B1, BLOC1S6, CD27, LYST, PRF1, SH2D1A, SLC7A7, STX11, STXBP2, UNC13-D, XIAP/BIRC4, ANKRD26, ASXL1, ATG2B, CD79B, DDX3X, DDX41, EOMES, ERAP1, GATA3, GSKIP, IL13, MKL1, MYD88, PVT1, RBBP6, REL, TCF3, ETV6, ACKR1/DARC, AK2, AK3, CLPB, CSF3R, CXCR2, CXCR4, DNM2, EIF2, ELA2, G6PC3, GF11, HAX1, JAGN1, LAMTOR2, RAC2, RMRP, SEC61A1, SLC37A4, SMARCAL1, SMARCD2, STK4, TAZ, TCIRG1, TCN2, VPS13B, VPS45, WAS, WIPF1, RAB27A, GATA1, ADAR1, CBL, CEBPA, MECOM, NPM1, RUNX1, SAMD9, SAMD9L.

In caso di riscontro di varianti genetiche possibilmente patogeniche di alcuni geni specifici, sono stati effettuati:

- analisi della lunghezza dei telomeri (eseguita solo in pazienti in cui sono state riscontrate varianti genetiche di geni coinvolti nella regolazione della lunghezza dei telomeri);
- analisi dell'apoptosi FAS-mediata (eseguita in pazienti in cui sono state riscontrate varianti genetiche in geni coinvolti nella regolazione del meccanismo di apoptosi FAS-mediata).

3.3. Metodi statistici

È stata effettuata un'analisi descrittiva dei dati relativi alla coorte in studio riportando le variabili qualitative in termini di valori assoluti e percentuali e le variabili quantitative in termini di mediana con interquartile range (IQR).

E' stata applicata un'analisi bivariata per effettuare i confronti tra il gruppo di pazienti con neutropenia AIN verso il gruppo di pazienti con neutropenia IN e tra il gruppo di pazienti con neutropenia LL verso il gruppo di pazienti con neutropenia LO rispetto alle variabili di interesse. Per valutare l'associazione tra le variabili qualitative è stato utilizzato il test Chi quadrato di Pearson o il test esatto di Fisher in caso di frequenze attese inferiori a 5, mentre per le variabili quantitative è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney.

Al fine di valutare eventuali differenze tra l'esordio e l'ultima visita nelle distribuzioni delle variabili quantitative di interesse, è stato applicato il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati. Le distribuzioni delle variabili quantitative di interesse sono state riportate graficamente in relazione ai tempi dell'esordio, durante il follow-up e dell'ultima visita attraverso il diagramma a scatola e baffi (box-plot).

È stato applicato il metodo di Kaplan-Meier per la stima del rischio cumulativo di sviluppare i sintomi clinici/autoimmuni dall'esordio all'ultima visita. Il rischio cumulativo è stato riportato in percentuale con relativo intervallo di confidenza al 95%.

Tutti i test effettuati erano a due code e un p value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state descritte utilizzando Stata (StataCorp. Stata Statistical Software, Release 16.1 College Station, TX, Stata Corporation, 2019).

4. Risultati

4.1 Caratteristiche della popolazione

Dal 1° gennaio 2005 al 30 settembre 2022 sono stati arruolati 63 pazienti, con una distribuzione omogenea tra maschi e femmine (M 49% vs. F 51%).

I pazienti con neutropenia autoimmune sono 32/63 pazienti (49%), quelli con neutropenia idiopatica 25/63 (40%). In 6 pazienti la diagnosi è ancora in corso di definizione per numero insufficiente di test negativi. I pazienti con neutropenia LO e LL sono rispettivamente il 71% (45/63) e il 29% (18/63).

L'età mediana di esordio è stata di 9,2 anni (IQR 2 – 15,6 anni) ed il follow up mediano di 5,2 anni (IQR 4 – 8,2 anni).

Tabella 5. Caratteristiche della coorte

Caratteristiche	Totale 63
Femmine	31 (49%)
Maschi	32 (51%)
Neutropenia autoimmune	32 (49%)
Neutropenia idiopatica	25 (40%)
Late onset	45 (71%)
Long lasting	18 (29%)
Età mediana di insorgenza (IQR)	9.2 (2.0-15.6) anni
Età mediana alla diagnosi (IQR)	12.9 (5.2-19.2) anni
Durata mediana del follow up (IQR)	5.2 (4.0-8.2) anni

4.2 Parametri ematologici

Il valore mediano dei leucociti totali è inferiore alla norma già al primo riscontro di neutropenia, e rimane stabilmente inferiore ai valori soglia per età nel corso del follow up. Il valore mediano all'esordio è di $3.15 \times 10^9/L$ e all'ultimo follow up $3.23 \times 10^9/L$ ($p=0.099$).

Il valore dei neutrofili ha una tendenza all'aumento da un valore mediano all'esordio di $0.73 \times 10^9/L$ (IQR 0.30-1.07) ad un valore mediano all'ultimo controllo di $1.03 \times 10^9/L$ ($p<0.05$).

Al contrario, il numero assoluto dei linfociti diminuisce progressivamente, passando da un valore mediano all'esordio di $1.71 \times 10^9/L$ ad un valore mediano all'ultimo follow up di $1.54 \times 10^9/L$ ($p<0.05$).

La **tabella** sotto riportata mostra il valore mediano all'esordio, lungo il follow up, e all'ultima visita di leucociti, neutrofili e linfociti.

Tabella 6. Variazione dei parametri ematologici nel corso del follow up

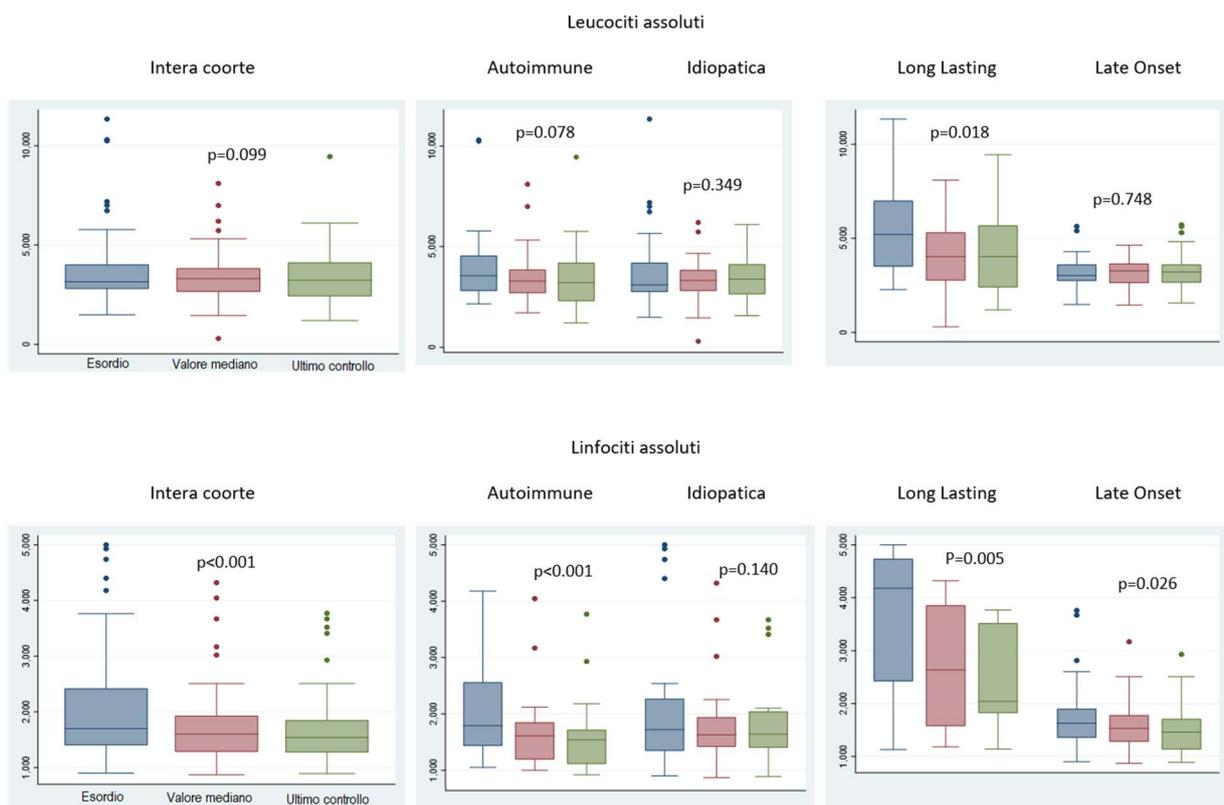
	Esordio	Mediana follow up	Ultimo controllo	p*
Leucociti $\times 10^9/L$ (mediana, IQR)	3.15 (2.80-4.03)	3.31 (2.65-3.83)	3.23 (2.43-4.13)	0.099
Neutrofili $\times 10^9/L$ (mediana, IQR)	0.73 (0.30-1.07)	0.91 (0.51-1.25)	1.03 (0.45-1.46)	<0.05
Linfociti $\times 10^9/L$ (mediana, IQR)	1.71 (1.40-2.54)	1.64 (1.33-1.93)	1.54 (1.14-1.85)	<0.05

*confronto tra esordio e ultimo controllo

L'analisi per sottotipi di neutropenia (autoimmune vs idiopatica) (**figura 3**) mostra un trend in calo della conta dei leucociti assoluti nella neutropenia autoimmune, che non raggiunge però la significatività statistica ($p=0.078$). Un calo statisticamente significativo dei valori di leucociti si evidenzia invece nel gruppo della neutropenia LL, con un valore mediano all'esordio di $5.20 \times 10^9/L$ e all'ultimo follow up di $4.04 \times 10^9/L$ ($p=0.018$).

Il calo progressivo della conta dei linfociti assoluti è invece presente nelle neutropenie autoimmuni ($p < 0.05$) ma non nelle idiopatiche ($p = 0.140$). Si conferma invece il calo dei valori di linfociti nel tempo sia nelle neutropenie LL che in quelle LO ($p < 0.05$).

Figura 3. Variazioni nel tempo dei valori di leucociti e linfociti per sottogruppi



4.3 Dati clinici

Pattern infettivo

Il 74% dei pazienti (45/63) ha avuto almeno un episodio infettivo nel corso del follow up. Le tipologie di infezioni più frequenti sono state: infezioni delle vie aeree superiori (avvenute nel 60% dei pazienti che abbiano avuto almeno un episodio infettivo), infezioni del cavo orale (stomatiti aftose/gengiviti/periodontiti, 49% dei pazienti), infezioni cutanee (29% dei pazienti), otiti (24% dei pazienti), polmoniti (18% dei pazienti) e infezioni delle vie urinarie (IVU, 13% dei pazienti).

Tabella 7. Tipo e frequenza degli episodi infettivi nell'intera coorte

Tipo di infezione tra i pazienti con almeno un episodio infettivo (45/63 = 74%), n (%)		Pazienti con episodi ricorrenti (%)
Infezioni delle vie respiratore superiori	27 (60)	18/27 (67)
Infezioni del cavo orale (afte, gengiviti, periodontiti)	22 (49)	19/22 (86)
Febbre di origine sconosciuta (FUO)	16 (36)	11/16 (69)
Infezioni cutanee	13 (29)	8/13 (61)
Otiti	11 (24)	7/11 (64)
Polmoniti	8 (18)	2/8 (25)
Infezioni delle vie urinarie	6 (13)	1/6 (17)
Infezioni gravi	9 (20)	
Sepsi/batteriemia	3	
Meningite	1	
Polmoniti ricorrenti	2	
Infezioni opportunistiche (Campylobacter, Herpes Zoster ricorrente)	3	

Tra le infezioni ricorrenti (definite come infezioni avvenute >1 episodio nel singolo paziente) le più frequenti sono state le infezioni del cavo orale (ricorrenti nell'86% dei casi) seguite dalle febbri di origine sconosciuta e dalle infezioni delle alte vie respiratorie (ricorrenti rispettivamente nel 69% e 67% dei casi).

Nel 20% dei è stato documentato un episodio grave (definito come la presenza di uno tra: sepsi, meningite, infezione opportunistica, polmoniti ricorrenti). Considerando l'intera popolazione di studio, i pazienti con storia di infezioni gravi corrispondono al 14%.

Le infezioni considerate "opportunistiche" (infezioni recidivanti da VZV e gastroenterite da *Campylobacter Jejuni*) non hanno mostrato alcuna correlazione con linfopenia, deficit di immunoglobuline, e bassi valori di linfociti T Helper (CD4+).

In merito alla frequenza generale degli eventi infettivi non sono state riscontrate differenze significative tra il gruppo delle neutropenie autoimmuni e di quelle idiopatiche, né tra le LL e LO.

Tra i diversi tipi di infezioni non è stata riscontrata una differenza significativa nella prevalenza di infezioni del cavo orale tra pazienti con neutropenia autoimmune e idiopatica. Per quanto riguarda le otiti è stata invece evidenziata una maggior frequenza di episodi nelle neutropenie a lunga durata (9/11, 82%) rispetto a quelle ad esordio tardivo (12/52, 23%) ($p < 0.05$).

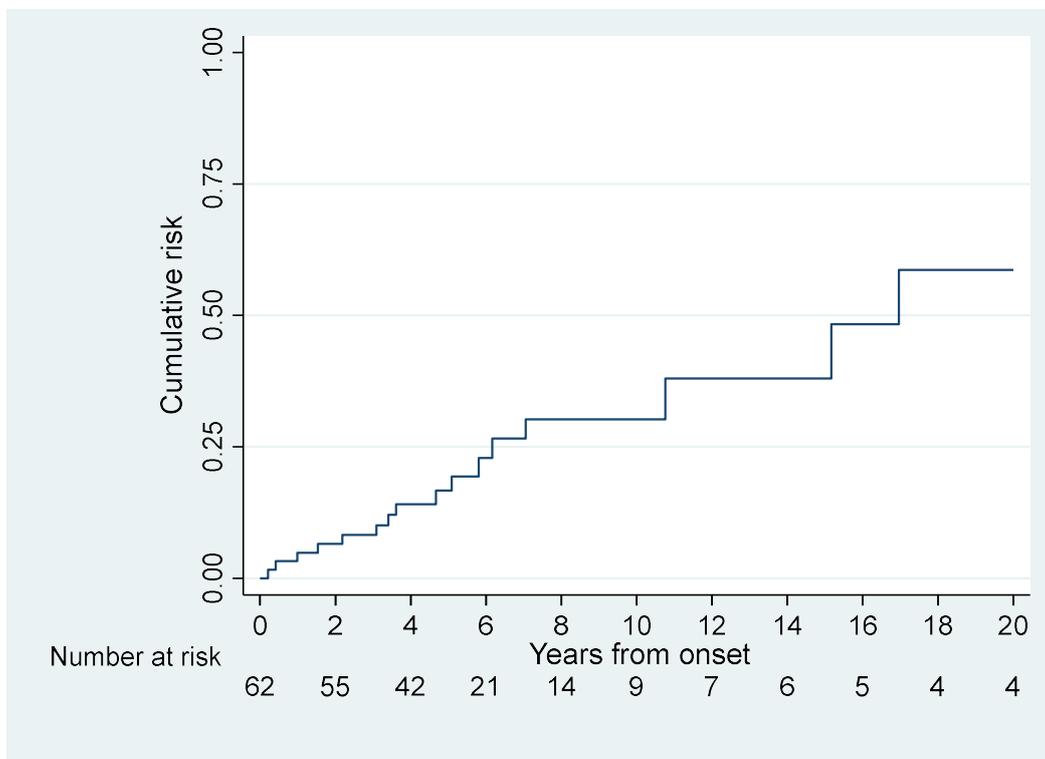
La terapia con G-CSF è stata effettuata in 9/63 pazienti (14%). In tutti i casi il fattore di crescita è stato utilizzato on-demand in corso di episodi infettivi e non in maniera continuativa. Non è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra l'utilizzo di G-CSF e il tipo di neutropenia (AIN vs IN; LL vs LO). Non è stata inoltre riscontrata alcuna correlazione tra l'utilizzo di G-CSF e la presenza di linfopenia o riduzione dei livelli di immunoglobuline.

Segni e sintomi di autoimmunità

Nel corso del follow up 19 pazienti (30%) hanno presentato segni e/o sintomi di autoimmunità. I più frequenti sintomi e segni di autoimmunità sono stati: tiroidite, celiachia, ALPS, positività ANA, positività ENA, artrite, dolore osseo, astenia cronica.

L'incidenza cumulativa di segni e sintomi di autoimmunità apparsi dopo l'esordio della neutropenia è del 23% (CI 12.9–38.5%) a 6 anni dall'esordio, e del 38% (CI 21.9–60.3%) a 12 anni di follow up, mostrando una progressione anche negli anni successivi. Segni e sintomi di autoimmunità sono risultati più frequenti nel gruppo delle neutropenie autoimmuni rispetto a quelle idiopatiche, con un'incidenza cumulativa rispettivamente del 25% (CI 12.6-45.9) vs 16.7% (95%CI 5.2-46%) a 6 anni, ma senza una differenza statisticamente significativa ($p=ns$). Più alta è risultata l'incidenza cumulativa a 6 anni di follow up nelle neutropenie Late Onset rispetto alle Long lasting, pari al 50% (CI 29.1%-75.2%) nelle LO vs 9% (CI 1.3-49.2%) nelle LL, senza però raggiungere la significatività statistica ($p=ns$).

Figura 4. Rischio cumulativo di comparsa di segni e/o sintomi di autoimmunità



4.4 Quadro immunologico

Il quadro immunologico comprensivo di studio delle sottopopolazioni linfocitarie, del dosaggio delle immunoglobuline e loro sottoclassi (IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) è stato effettuato in una quota rilevante della coorte.

Nella maggior parte dei pazienti i valori di IgG, IgM e IgA sono risultati nella norma per età (rispettivamente nel 94%, 85.5% e 90% dei pazienti).

In una piccola quota di pazienti, pari al 11.5% dei pazienti, il valore di IgM è risultato superiore ai limiti di normalità. Di questi pazienti, il 60% ha una neutropenia idiopatica, mentre il 40% ha una neutropenia autoimmune. Tutti i pazienti con elevato valore di IgM fanno parte del gruppo di neutropenia LO.

Tabella 8. Valori di immunoglobuline G, A e M nella coorte

	Valore inferiore al range di normalità	Valore nella norma	Valore superiore al limite di normalità
IgG	2 (3 %)	58 (94%)	2 (3 %)
IgM	2 (3%)	53 (85.5%)	7 (11.5%)
IgA	5 (8 %)	56 (90 %)	1 (2%)

La valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie è mostrata in **tabella 9**. Il valore di linfociti B (CD19+) è risultato inferiore alla norma in un quarto dei pazienti (25%), così come i linfociti T citotossici (CD8+, inferiori alla norma nel 25% dei pazienti) e i linfociti Natural Killer (NK, inferiori alla norma nel 27% dei pazienti).

Nel contesto delle sottopopolazioni di linfociti T, le cellule T Naïve (CD3+ CD45RA+) sono risultate al di sopra dei limiti di normalità in quasi la metà dei pazienti (27/60, 45%). I linfociti T regolatori sono risultati invece inferiori alla norma nella maggior parte dei pazienti (40/60, 67%).

Le popolazioni di linfociti T attivati, corrispondenti ai linfociti T gamma/delta e linfociti T HLA-DR+, sono risultati aumentati in gran parte dei pazienti, rispettivamente nel 62% (37/60) e nel 45% (27/60).

Le cellule B memory sono risultate al di sotto del limite di normalità nel 38% dei pazienti (23/60).

Uno studio più dettagliato del profilo B è stato eseguito in 38 pazienti (60% della popolazione), e ha mostrato in generale un frequente incremento della popolazione dei linfociti B Marginal Zone, presente in 14 pazienti su 38 (40%) e una riduzione dei linfociti B Switched Memory, presente nel 60% dei soggetti studiati (21/38). Il valore di linfociti B doppi negativi è risultato al di sopra dei limiti di normalità in 20 dei 38 pazienti (57%).

Tabella 9. Sottopopolazioni linfocitarie

	Ridotti (<-2DS) n (%)	Normali n (%)	Elevati (>2DS) n (%)
Sottopopolazioni principali			
Linfociti T (CD3+)	12 (19)	50 (79)	1 (2)
Linfociti T Helper (CD3+ CD4+)	13 (21)	50 (79)	0
Linfociti T citotossici (CD3+ CD8+)	16 (25)	47 (75)	0
Linfociti B (CD19+)	16 (25)	45 (71)	2 (4)
Natural Killer (NK) (CD3- CD56+ CD16+)	14(27)	46(73)	0
Sottoclassi linfociti T			
Linfociti T Naïve (CD3+ CD45RA+)	10 (17)	23 (38)	27 (45)
Linfociti T Memory (CD3+ CD45RO+)	20 (33)	22 (37)	18 (30)
Linfociti T regolatori (CD3+ CD4+ CD25br CD45RA+)	40 (67)	15 (25)	5 (8)
Linfociti T Gamma-Delta (CD3+ TCRγδ+)	3 (5)	20 (33)	37 (62)
Linfociti T attivati (CD3+ HLADR+)	10 (17)	23 (38)	27 (45)
Profilo di maturazione B esteso*			
B memory (CD19+ CD27+)	23 (38)	37 (62)	0
B Transitional (CD27- CD10++ CD38++) *	11 (32)	18 (51)	6 (17)
B Naïve (CD27- CD10+- CD38+- IgD+) *	12 (34)	12 (34)	11 (32)
B Marginal zone (CD27+ IgD+ IgM+) *	7 (20)	14 (40)	14 (40)
B Switched memory (CD27+ IgD- IgM-) *	21 (60)	9 (25)	5 (15)
B pre-switched memory (CD27+ IgD- IgM+) *	0	30 (85)	5 (15)
B IgD Memory (CD27+ IgD+ IgM-) *	0	33 (94)	2 (6)
B doppi negativi (CD27- IgD-) *	0	15 (43)	20 (57)

*eseguito in 35/63 pazienti

Non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda il confronto tra sottopopolazioni linfocitarie tra neutropenia autoimmune e neutropenia idiopatica. Al contrario, è stata riscontrata una differenza tra neutropenia ad esordio tardivo e neutropenia a lunga durata. I linfociti T assoluti sono risultati più frequentemente inferiori alla norma nel gruppo della neutropenia LL rispetto ai LO (6/18, 33% vs 6/45, 13%) ($p < 0.05$). Valori inferiori alla normalità sono stati riscontrati più frequentemente nella neutropenia LL anche per quanto riguarda i linfociti B, ridotti nel 39% dei casi (7/18) contro il 20% dei casi nelle neutropenie LO (9/45) ($p < 0.05$). Statisticamente significativa è risultata anche la differenza nella frequenza di aumento dei linfociti B Marginal Zone, con valori elevati nel 26% (2/9) delle LL e nel 48% (12/25) delle LO ($p < 0.05$).

4.5 Analisi genetica

L'analisi genetica tramite pannello NGS è stata eseguita nell'86% dei pazienti (54/63). Di questi, in 9 pazienti è stato eseguito il pannello con 58 geni, mentre nei rimanenti 45 quello a 160 geni.

Tra i pazienti sottoposti ad analisi genetica, il 57% (31/54) è risultato negativo per la presenza di varianti significative nei geni analizzati. Nei restanti 23 pazienti, corrispondenti al 43% dei pazienti analizzati, sono state riscontrate 27 differenti varianti non presenti nella popolazione generali, suddivise in base a quanto riportato nei principali database genetici tra varianti patogeniche (P), probabilmente patogeniche (likely pathogenic, LP), varianti di incerto significato (VUS), e varianti benigne (B) o probabilmente benigne (likely benign, LB). In 4 pazienti sono state riscontrate 2 differenti varianti (doppia eterozigotà). I dati riguardo alle varianti riscontrate sono esposti in dettaglio nella **tabella 10**.

Tabella 10. Varianti genetiche riscontrate all'interno della coorte

Paziente	Gene	Variante	Ereditarietà	Varsome	Frequenza allelica
1	CASP10	p.Tyr446Cys	AD	B	0.0296
2	CARD11	p.Tyr393_Ser394delinsPheLeu	AD/AR	VUS	-
3	TERT	p.Glu441del	AD	LB	0.00231
	TNFRSF13B	p.Leu69Thrfs*12	AD/AR	LP	0.000309
4	PIK3CD	p.Ser764Asn	AD	VUS	-
5	CASP10	p.Val410Ile	AD	B	0.0419
6	TNFRSF13B	p.Cys193Ter	AD/AR	P	0.0000459
7	TINF2	p.Ser245Tyr	AD	LB	0.00112
8	CASP10	p.Ile406Leu	AD	B	0.0037
	CASP10	p.Ile406Leu	AD	B	0.0037
9	CASP10	p.Ile406Leu	AD	B	0.0037
	CASP10	p.Val410Ile	AD	B	0.0037
10	TSR2	p.Ile543Val	XL	VUS	-
11	TNFRSF13B	p.Ile87Asn	AD/AR	P	0.068
12	CARD11	p.Met1Ile	AD/AR	P	-
13	DDX41	p.Leu277Val	AD	VUS	-
14	RUNX1	p.Pro345Arg	AD	VUS	0.0032
15	TNFRSF13B	p.Trp40Arg	AD/AR	VUS	0.0044
	RTEL1	p.Gln421Glu	AD/AR	VUS	0.059
16	SAMD9L	p.Asp169His	AD	VUS	0.0099
17	TNFRSF13B	p.Ala181Glu	AD/AR	P	0.00486
18	DNM2	p.His727Tyr	AD	VUS	0.026
19	CASP10	p.Ile406Leu	AD	B	0.00373
20	CARD11	p.Ser439Phe	AD/AR	VUS	0.0000279
21	FASL	Del 1→4 Ch	AD	VUS	-
22	TINF2	p.Ser245Tyr	AD	LB	0.00112
23	LYST	p.Arg 3412His	AD	LB	0.069
	LYST	p.Ile 580Phe	AD	LB	-

All'interno della popolazione studiata sono state riscontrate 5 varianti P/LP in 5 differenti pazienti, di cui 4 sul gene TNFRSF13B (TACI) e 1 sul gene CARD11. Le VUS documentate sono state 11, su 10 soggetti (un soggetto portatore di 2 VUS). I geni su cui sono state riscontrate VUS sono stati: CARD11 (2), DDX41 (1), SAMD9L (1), PIK3CD (1), TSR2 (1), DNM2 (1), TNFRSF13B (1), RTEL1 (1), RUNX1 (1) e una delezione a carico del gene FASL.

Le varianti rare classificate come B/LB sono state 11, in 9 pazienti. La maggior parte di queste sono state riscontrate a carico del gene CASP10 (6 varianti in 5 pazienti), mentre le rimanenti a carico del gene TERT (1), TNF2 (2) e LYST (2 sullo stesso paziente).

Non sono state rilevate differenze di frequenza delle varianti di qualsiasi tipo nelle due categorie autoimmuni ed idiopatiche.

5. Discussione e conclusioni

Il presente lavoro descrive il pattern clinico, immunologico e genetico di una coorte di pazienti affetti da neutropenia cronica che non presenta le caratteristiche classiche della neutropenia autoimmune o idiopatica per via della lunga durata o per la tardiva età di esordio. [20,21,60]

In questa popolazione di pazienti, il dato più rilevante dal punto di vista ematologico è la presenza alla diagnosi di neutropenia di grado lieve/moderato, accompagnata da leucopenia e da linfopenia progressiva nel corso del follow up. Queste caratteristiche sono presenti sia nel gruppo delle neutropenie idiopatiche che in quelle autoimmuni.

La neutropenia all'esordio è nella maggior parte dei casi di tipo moderato (ANC 500-1000 /mmc), e la conta dei neutrofili assoluti tende ad aumentare nel corso del follow up. Tale riscontro è probabilmente determinato dal fatto che una piccola quota di pazienti ha necessitato di terapia con G-CSF, la quale ha determinato un aumento dei neutrofili.

La presenza di neutropenia non si associa ad un'elevata frequenza di infezioni gravi. La percentuale di pazienti con infezioni gravi è del 14%, simile a quella del 12% riportata in 2 studi con elevata numerosità effettuati su popolazioni di pazienti affetti da neutropenia autoimmune primitiva. [20,21]

Le infezioni più frequentemente riportate sono state le infezioni delle alte vie aeree (60%), seguite da infezioni del cavo orale (45%), febbre di origine sconosciuta (36%), infezioni cutanee (29%) e otiti (24%). Le infezioni del cavo orale sono quelle con il maggior tasso di ricorrenza (86%), seguite dalla febbre di origine sconosciuta (69%).

L'incidenza di infezioni gravi non è risultata correlata alla presenza di fattori concomitanti come bassi valori di immunoglobuline, linfopenia o riduzione dei valori assoluti di linfociti T helper (CD3+ CD4+) ($p = ns$).

Nel complesso le manifestazioni infettive risultano nella maggior parte dei casi paucisintomatiche o totalmente assenti (26% dei pazienti non ha presentato infezioni durante il follow up e 60% infezioni considerate non gravi). Considerato il fenotipo lieve

che si delinea è probabile che la neutropenia rimanga a lungo non diagnosticata, e che venga in molti casi riscontrata tardivamente rispetto alla sua insorgenza.

Per ciò che concerne i sintomi autoimmuni, assenti all'esordio della neutropenia, si rendono manifesti nel corso del follow up in una cospicua percentuale di soggetti, con una incidenza cumulativa del 23% dopo 8 anni di follow up e del 58% a 20 anni di follow up. Quest'ultimo dato è probabilmente influenzato dal numero esiguo di pazienti con un follow up prolungato (4 pazienti seguiti per oltre 15 anni) e necessita perciò di conferme future.

Questi risultati delineano da una parte un fenotipo lieve, caratterizzato da un basso rischio infettivo, e dall'altra una tendenza a sviluppare nel tempo manifestazioni di tipo autoimmune. In questo contesto il riscontro di leuco-neutropenia e di linfocitopenia ingravescente, seppur in pazienti con una sintomatologia poco significativa, potrebbero essere considerati segnali anticipatori di insorgenza di manifestazioni autoimmuni.

Lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie ha consentito, in una parte di pazienti, di delineare un pattern caratteristico già parzialmente identificato in un precedente lavoro del nostro gruppo, che descriveva una popolazione di pazienti con neutropenia autoimmune "atipica". [60] Si rileva nella presente coorte, una quota di linfociti B (CD19+) ed NK (CD3- CD16+ CD56+) ridotta rispetto ai range di riferimento, dato più evidente e statisticamente significativo nei pazienti con neutropenia LL rispetto alla LO ($p=0.017$). Non vi sono invece differenze significative nella percentuale di pazienti con linfociti B o NK ridotti tra neutropenie autoimmuni e idiopatiche.

Per ciò che concerne il profilo di maturazione delle cellule B, effettuato nel 56% dei pazienti, si osserva un aumento delle cellule B marginali (CD27+ IgD+ IgM+), una riduzione dei B Memory (CD19+ CD27+) e switched memory (CD27+ IgD- IgM-) associato ad un aumento dei linfociti B doppi negativi (CD27- IgD-).

Le sottoclassi di linfociti T analizzate mostrano invece in una quota rilevante dei pazienti un aumento dei linfociti T gamma-delta (CD3+ TCR $\gamma\delta$ +) e linfociti T attivati (HLA-DR+) e una riduzione dei T regolatori (CD3+ CD4+ CD25br CD45RA+).

Un pattern immunologico simile è stato descritto anche in pazienti affetti da alcune patologie autoimmuni, come la sindrome di Sjögren [72], l'artrite reumatoide [73,74] e il lupus eritematoso sistemico (LES). [75] Gli elementi comuni ad altre patologie autoimmuni emersi anche nella nostra popolazione sono: una riduzione dei linfociti B memory (CD19+ CD27+), un aumento dei linfociti B marginali (CD27+ IgD+ IgM+) e un aumento dei linfociti B doppi negativi (CD27- IgD-).

Per ciò che concerne i linfociti T, è stato osservato in pazienti affetti da sindrome di Sjögren un pattern di attivazione, caratterizzato da un aumento dei linfociti HLA DR+ e dei linfociti T gamma-delta, e una riduzione dei linfociti T regolatori [76], caratteristiche riscontrate anche in buona parte della nostra coorte.

Alcune caratteristiche immunologiche della nostra popolazione sono inoltre comparabili a quelle descritte in una coorte di pazienti affetti da citopenie autoimmuni, inclusa la neutropenia autoimmune, in cui è stata descritta una riduzione di linfociti B switched memory (CD19+ CD27+ IgD-), linfociti T CD4+ naïve, recent thymic emigrants (RTEs), CD8 naïve e linfociti T regolatori. [77]

I dati esposti contribuiscono a sostenere sempre di più l'ipotesi che le alterazioni immunologiche siano causate, almeno in una buona parte, da malattie congenite da immunodisregolazione. Tale concetto viene ribadito nel suddetto lavoro sulle citopenie immunologiche, e trova solido fondamento anche grazie ai risultati del presente studio.

Di fatto, nella nostra coorte, l'analisi genetica effettuata tramite un pannello NGS comprensivo di 160 geni di immunodisregolazione ed insufficienza midollare, ha evidenziato che nel 10% dei casi sono presenti malattie congenite dell'immunità (immunodisregolazioni primarie, PIRD) a tipo per lo più di immunodeficienza comune variabile (CVID).

Inoltre, in una porzione rilevante del nostro campione (19%) sono presenti varianti di significato incerto, per le quali non si può escludere al momento un possibile ruolo nella genesi della neutropenia.

Tra le mutazioni patogeniche, quelle a carico del gene TNFSRF13 sono le più comuni. La neutropenia in questo ambito è sostenuta dalla ridotta tolleranza centrale delle cellule B con il conseguente mancato riconoscimento degli antigeni self. In questi casi la citopenia, che si esprime come neutropenia ab initio, può evolvere in citopenia multilineare refrattaria anche dopo molti anni, come già descritto da alcuni autori [78], sottolineando come le varianti di TNFSRF13 siano causative di un processo di esaurimento della riserva B cellulare che può richiedere anche decenni.

La variante patogenica del gene CARD11 (p.Met1Ile) riscontrata nel paziente n.12 è una mutazione germinale Loss of Function (LOF) che determina una ridotta espressione di una proteina chiave per il segnale della via NFκB. La sua ipoespressione determina la comparsa di autoimmunità per inibizione del dominio deputato al controllo del self, di cui nel nostro caso specifico la neutropenia autoimmune ne è segno tangibile. [79]

Nella nostra coorte, oltre a quella patogenica, sono state riscontrate altre due varianti del gene CARD11 (pazienti n.2 e 20 in tabella 10) classificate come VUS, rispettivamente: p.Tyr393_Ser394delinsPheLeu e p.Ser439Phe. Nonostante siano VUS, entrambe sono presenti in una zona del gene definita "hotspot", a livello della quale è riportata un'elevata probabilità per le varianti riportate di causare una perdita di funzione. [79] Il quadro immunologico dei due pazienti è di fatto molto simile a quello del paziente n.12 (deficit di linfociti T regolatori e di B memory). Questi due elementi fanno ipotizzare che ci possa essere un ruolo patogenico anche nei soggetti portatori di queste VUS.

Tra le varianti riscontrate classificate come non patogeniche (VUS/LB/B) un discorso a parte meritano quelle relative ai geni del telomero, identificate in quattro soggetti.

Nei pazienti n.7 e n.22 è stata rilevata la stessa variante del gene TINF2 p.Ser245Tyr, riportata come VUS/LB a seconda dei database di riferimento. In uno dei soggetti (n.22) l'analisi della lunghezza dei telomeri (tramite tecnica flow_FISH) ha rilevato dei telomeri corti [80], mentre nell'altro paziente (n.7) è risultata nella norma.

Tale variante è stata inoltre descritta in letteratura come in casi di pazienti affetti da aplasia midollare. [81,82] Per tali motivi il suo ruolo rimane in discussione.

Nei pazienti n.3 e 15 sono presenti rispettivamente una variante del gene TERT (p.Glu441del) e una di RTEL1 (p.Gln421Glu), in entrambi i casi in doppia eterozigosi con varianti del gene TNFSRF13. Per ciò che concerne RTEL1 è noto che alcune sue varianti possono risultare patogenetiche anche in assenza di un accorciamento dei telomeri, come risultato nel pz 15. [83]

Quello che si può ipotizzare è che i quadri fenotipici legati a varianti non francamente patogeniche potrebbero essere lievi e determinare “solo” immunodisregolazione, anziché provocare quadro clinico tipicamente associato a malattie del telomero (caratterizzato da insufficienza midollare e multipli danni d'organo). Questi disturbi dell'immunità possono però promuovere l'insorgenza di fenomeni autoreattivi che sono espressione della disregolazione immunitaria, come appunto la neutropenia.

Preme inoltre commentare il ruolo delle varianti del gene CASP10, presenti nei pazienti n. 1, 5,8,9 (doppia) e 19. Tali varianti, seppur classificate come benigne ed in alcuni casi definite addirittura dei polimorfismi a causa dell'elevata frequenza nella popolazione, potrebbero avere un ruolo predisponente a disimmunità, come descritto da uno studio precedente del nostro gruppo. [84]

La variante CASP10 p.Val410Ile (pazienti n.5 e 9), inizialmente considerata come patogena e successivamente come polimorfismo (3-5% della popolazione) ha un ruolo discusso per il rilievo di un difetto della via dell'apoptosi riscontrato tramite un test funzionale eseguito su alcuni pazienti affetti. [84-87]

Simile è il caso della variante p.Tyr446Cys, presente nel paziente n.1. Benché presente nell' 1-6% dei soggetti caucasici questa variante è stata dimostrata responsabile di una trasmissione difettiva del segnale di apoptosi. [87]

Infine, per ciò che concerne la variante p.Ile406Leu presente nei pz n. 8, 9 e 19, è stata descritta inizialmente come patogena, a causa di un effetto dominante negativo esercitato dalla proteina mutata, anche se non tutti gli individui con la variante sembrano mostrare alterazioni a livello funzionale. [85,86,88]

Il gene CASP10 codifica per un enzima (caspasi 10) coinvolto nella via dell'apoptosi. Un'alterazione del processo di apoptosi può favorire la comparsa di fenomeni autoimmuni, tra i quali si annovera la neutropenia autoimmune ed idiopatica, come mostrato in tutti i nostri pazienti.

Nel paziente n.4 è stata sul gene PIK3CD, il quale codifica una chinasi espressa selettivamente sui linfociti. Le mutazioni di tipo gain-of-function di questo gene causano la sindrome da attivazione di PI3K δ (APDS), caratterizzata dalla presenza di cellule T senescenti, linfadenopatia ed immunodeficit. Anche le mutazioni loss-of-function di PIK3CD sono associate ad immunodeficienze, sebbene con meccanismi diversi. [89] La variante riscontrata nel nostro paziente (p.Ser764Asn) non è descritta in letteratura e potrebbe essere una nuova mutazione. Il suo potenziale patogenetico deve pertanto essere definitivamente dimostrato.

Infine, nel paziente n.16 è stata riscontrata una variante del gene SAMD9L (p.Asp169His) che causa una mutazione missenso. La via di SAMD9/SAMD9L ha funzione antiproliferativa, e mutazioni dei geni coinvolti in questa via possono essere legate ad un fenotipo ematologico caratterizzato da pancitopenia o mielodisplasia con predisposizione neoplastica. [90,91] La variante riportata nel nostro paziente non è riportata in letteratura in associazione ad immunodeficit. Il potenziale patogenetico rimane dunque dubbio.

In conclusione, dal nostro studio, seppur con le limitazioni determinate dall'analisi retrospettiva e quindi per alcuni aspetti non disponibile nella sua interezza, emerge che la neutropenia di lunga durata e ad insorgenza tardiva in presenza o meno degli anticorpi anti-neutrofilo, costituisce una categoria peculiare. In questo ambito il rilievo degli anticorpi anti-neutrofilo sembra essere di secondaria importanza, essendo le due categorie autoimmune ed idiopatica praticamente comparabili per gli aspetti biochimici, immunologici, clinici ed anche genetici. Questa neutropenia "atipica", considerata ab initio come "neutropenia acquisita", merita invece forse la dizione di "verosimilmente acquisita", poiché l'approfondimento genetico è sicuramente indicato a definire una causa sottostante e legata ad una variante genetica, discostandosi un po' dal concetto che congenita assuma sempre un connotato di manifestazione grave e precoce. [92] Nell'ambito delle CVID è noto che il fenotipo può essere lieve all'esordio e progressivamente peggiorare. Similmente nella presente coorte, alcuni elementi cambiano nel corso del tempo: ovvero la riduzione dei linfociti e la progressiva comparsa di autoimmunità. Alcuni segni ematologici ed immunologici come la leucopenia, la linfocitopenia ingravescente, e l'esaurimento progressivo delle cellule B potrebbero essere segni anticipatori e che sottendono una disregolazione immunitaria.

In questo contesto, l'interpretazione del ruolo delle varianti genetiche, soprattutto delle VUS, è dinamica. Si rende necessario, infatti, un continuo aggiornamento rispetto ai data base esistenti. Inoltre, l'applicazione di test funzionali ad hoc, dove possibile, può essere di aiuto per l'interpretazione più dettagliata del ruolo delle stesse.

È inoltre possibile che in una parte dei pazienti in cui l'analisi genetica è risultata negativa, possano essere presenti varianti patogeniche in geni non compresi nel pannello utilizzato, che potrebbe essere troppo "ristretto" e non comprendere alcuni geni implicati. In questo contesto indagini allargate sulla stessa coorte con metodiche più estese (WES o WGS) potrebbero rendere l'analisi più esaustiva e suggerire ulteriori varianti responsabili di questo fenomeno.

In sintesi, le neutropenie autoimmuni e idiopatiche di lunga durata e ad insorgenza tardiva con o senza anticorpi anti-neutrofilo costituiscono una patologia spesso paucisintomatica e caratterizzata da stimate ematologiche e immunologiche che le rendono piuttosto riconoscibili fin dal loro esordio. In tali soggetti indagini genetiche per riconoscere malattie genetiche da immunoregolazione sono indicate nell'ottica di "disegnare" follow up appropriati al fine di anticipare la diagnosi di eventuali patologie autoimmuni e di garantire la miglior cura attraverso terapie target.

6. Bibliografia

1. Dinauer MC. The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. In Nathan and Oshi's hematology of infancy and childhood. Philadelphia. In: Nathan DG, Orkin SH, editors. WBS saunders Company, 2003. 923–1010.
2. Christensen RD, Henry E, Jopling J, Wiedmeier SE. The CBC: reference ranges for neonates. *Semin Perinatol.* Feb 2009; 33:3-11.
3. www.severe-chronic-neutropenia.org. Severe Congenital Neutropenia International Registry. [Online]
4. Newburger PE. Autoimmune and other acquired neutropenias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;(1):38–42.
5. Feuille EJ, Anooshiravani N, Sullivan KE, Fuleihan RL, Cunningham-Rundles C. Autoimmune Cytopenias and Associated Conditions in COVID: a Report From the USIDNET Registry. *J Clin Immunol.* Jan 2018;38(1):28-34.
6. Farruggia P, Fioredda F, et al. Idiopathic neutropenia of infancy: Data from the Italian Neutropenia Registry. *Am J Hematol.* Feb 2019;94(2):216-222.
7. Fioredda F, Onofrillo D, Farruggia P, et al. Diagnosis and management of neutropenia in children: The approach of the Study Group on Neutropenia and Marrow Failure Syndromes of the Pediatric Italian Hemato-Oncology Association (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica - AIEOP). *Pediatr Blood Cancer.* 2022;69:e2959
8. Fioredda F, Calvillo M, et al. Congenital and acquired neutropenia consensus guidelines on diagnosis from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *Pediatr Blood Cancer.* Jul 2011;57(1):10-7.
9. Porretti et al. Implementation and outcomes of a transfusion-related acute lung injury surveillance programme and study of HLA/HNA alloimmunisation in blood donors. *Blood Transfus.* Jul 2012;10(3):351-9.
10. Hauck B, Philipp A, Eckstein R, Ott S, Zimmermann R, Dengler T, Zingsem J. Human neutrophil alloantigen genotype frequencies among blood donors with Turkish and German descent. *Tissue Antigens.* Dec 2011; 78(6):416-20.
11. Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion.* Oct 1996; 36(10):895-9.
12. Simpson DM, Ross R. Effects of heterologous antineutrophil serum in guinea pigs. Hematologic and ultrastructural observations. *Am J Pathol.* Oct 1971; 65(1):79-102. PMID: 5096371; PMCID: PMC2047518.
13. Rustagi PK, Currie MS, Logue GL. Activation of human complement by immunoglobulin G antigranulocyte antibody. *J Clin Invest.* Dec 1982; 70(6):1137-47.

14. Shastri KA, Logue GL. Autoimmune neutropenia. *Blood*. Apr 1993; 15;81(8):1984-95. PMID: 8471760.
15. Fioredda, F., Dufour, C., Höglund, P., Papadaki, H. A., & Palmblad, J. (2022). Autoimmune Neutropenias: Update on Clinical and Biological Features in Children and Adults. *HemaSphere*, 7(1), e814.
16. Lucas G, Rogers S deHaas M, Porcelijn L, Bux J. Report on the Fourth Granulocyte Immunology Workshop: progress toward quality assessment. *Transfusion*. 2002;42:462-468.
17. Heinzl, M.W., Schönbacher, M., Dauber, E.-M., Panzer, S., Mayr, W.R. and Körmöczy, G.F. (2015), Detection of granulocyte-reactive antibodies: a comparison of different methods. *Vox Sang*, 108: 287-293.
18. Porretti L, Farruggia P, Colombo FS, et al. Diagnostic value of cell bound and circulating neutrophil antibody detection in pediatric neutropenia. *Pediatr Blood Cancer*. Apr 2018; 65(4).
19. Sella R, Flomenblit L, Goldstein I, Kaplinsky C. Detection of anti-neutrophil antibodies in autoimmune neutropenia of infancy: a multicenter study. *Isr Med Assoc J*. Feb 2010; 12(2):91-6. PMID: 20550032.
20. Farruggia P, Fioredda F, Puccio G et al. Autoimmune neutropenia of infancy: Data from the Italian neutropenia registry. *Am J Hematol*. 2015;90:E221-2.
21. Bux J, Behrens G, Jaeger G, Welte K. Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases. *Blood*. Jan 1998; 91(1):181-6. PMID: 9414283.
22. Lalezari P, Jiang AF, Yegen L, et al. Chronic autoimmune neutropenia due to anti-HNA2 antibody. *N Engl J Med*. 1975;293:744-747.
23. Boxer LA, Dale DC. Neutropenia: Causes and consequences. *Semin Haematol*. 2002; 39:75-81.
24. Boxer LA. Chronic autoimmune neutropenia due to anti-HNA2 antibody. *N Engl J Med*. 1975;293:744.
25. Kyono W, Coates TD. A practical approach to neutrophil disorders. *Pediatr Clin North Am*. 2002;49:929-971.
26. Bux J, Jung KD, Kauth T, Mueller-Eckhardt C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfus Med*. 1992;2:143-149.
27. Palmblad JE, von dem Borne AE. Idiopathic, immune, infectious, and idiosyncratic neutropenias. *Semin Hematol*. 2002;39:113-120.
28. Lyall, E., Lucas, G. and Eden, O. (1992) Autoimmune neutropenia of infancy. *J Clin Pathol* 45: 431-434.
29. Farruggia P, Dufour C. Diagnosis and management of primary autoimmune neutropenia in children: insights for clinicians. *Therapeutic advances in hematology*. Feb 2015;6(1):15-24.
30. Audrain M, Martin J, Fromont P, Prié N, Thomas C, Muller EJ. Autoimmune neutropenia in children: analysis of 116 cases. *Pediatr Allergy Immunol*. Aug 2011;22(5):494-6

31. Fioredda F, Calvillo M, Burlando O, Riccardi F, Caviglia I, Tucci F, Bonanomi S, Ghilardi R, Martire B, Farruggia P, Mastrodicasa E, Barone A, Castagnola E, Dufour C. Infectious complications in children with severe congenital, autoimmune or idiopathic neutropenia: a retrospective study from the Italian Neutropenia Registry. *Pediatr Infect Dis J.* Apr 2013; 32(4):410-2.
32. Papadaki HA, Gibson FM, Rizzo S, Gordon-Smith EC, Marsh JC. Assessment of bone marrow stem cell reserve and function and stromal cell function in patients with autoimmune cytopenias. *Blood.* 2000;96:3272-3275.
33. Currie MS, Weinberg JB, Rustagi PK, Logue GL. Antibodies to granulocyte precursors in selective myeloid hypoplasia and other suspected autoimmune neutropenias: use of HL-60 cells as targets. *Blood.* 1987;69:529-536.
34. Hartman KR, La Russa VF, Rothwell SW, Atolagbe TO, Ward FT, Klipple G. Antibodies to myeloid precursor cells in autoimmune neutropenia. *Blood.* 1994;84:625-631.
35. Bruin MC, von dem Borne AE, Tamminga RY, Kleijer M, Buddelmeijer L, de Haas M. Neutrophil antibody specificity in different types of childhood autoimmune neutropenia. *Blood.* Sep 1999;1;94(5):1797-802. PMID: 10477706.
36. Chung BH, Chan GC, Lee T, Kwok JS, Chiang AK, Ho HK, Ha SY, Lau YL. Chronic benign neutropenia among Chinese children. *Hong Kong Med J.* Aug 2004; 10(4):231-6. PMID: 15299167.
37. Lalezari P, Khorshidi M, Petrosova M. Autoimmune neutropenia of infancy. *J Pediatr.* Nov 1986;109(5):764-9.
38. Bruin M, Dassen A, et al. Primary autoimmune neutropenia in children: a study of neutrophil antibodies and clinical course. *Vox Sang.* 2005;88(1):52-59.
39. Wang LY, Wang CL, Chu CC, Lee HL, Ho HT, Liang DC, Liu HC, Lin M. Primary autoimmune neutropenia in children in Taiwan. *Transfusion.* 2009; 49(5):1003-6.
40. Farruggia P, Puccio G et al. Autoimmune neutropenia of childhood secondary to other autoimmune disorders: Data from the Italian neutropenia registry. *Am J Hematol.* Sep 2017;92(9):E546-E549.
41. Farruggia P. Immune neutropenias of infancy and childhood. *World J Pediatr.* May 2016;12(2):142-8.
42. Dale, D. C., & Bolyard, A. A. (2017). An update on the diagnosis and treatment of chronic idiopathic neutropenia. *Current opinion in hematology*, 24(1), 46–53.
43. Lehrnbecher T. Haematopoietic growth factors in children with neutropenia. *Brit J Hematol.* 2002;116:28-56.
44. Berliner N, Horwitz M, Loughran TP Jr. Congenital and acquired neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004;63-79.
45. Lindqvist H, Carlsson G, Moell J, Winiarski J, Sundin M. Neutropenia in childhood: a 5-year experience at a tertiary center. *Eur J Pediatr.* 2015;174:801-807.

46. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol.* 2001;54:7-19.
47. Palmblad J, Dufour C, Papadaki HA. How we diagnose neutropenia in the adult and elderly patient. *Haematologica.* 2014;99:1130-3.
48. Auner HW, Klitschar M et al. Two case studies of chronic idiopathic neutropenia preceding acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 1999;105:431-3.
49. Papadaki HA, Kosteas T, et al. Two patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults developing acute myeloid leukemia with aberrant phenotype and complex karyotype but no mutations in granulocyte colony stimulating factor receptor. *Ann Hematol.* 2002;81:50-4.
50. Megalaki A, Mitsouli C, et al. Chronic idiopathic neutropenia preceding polymyalgia rheumatica and acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2004;83:791-2.
51. Papadaki HA, Eliopoulos GD, Coulocheri SA, et al. Increased frequency of HLA-DRB1*1302 haplotype in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults. *Blood.* 2001;15(97):580-581.
52. Papadaki HA, Eliopoulos AG, Kosteas T, et al. Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood.* 2003;101:2591-2600.
53. Koumaki V, Damianaki A, et al. Pro-inflammatory bone marrow milieu in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with impaired local production of interleukin-10. *Br J Haematol.* 2006;135:570-3.
54. Papadaki HA, Giouremou K, Eliopoulos GD. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased production of TGF-beta1 by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol.* 1999;63:154-62.
55. Eliopoulos DG, Mavroudi I, et al. The -509C/T polymorphism of transforming growth factor-beta1 is associated with increased risk for development of chronic idiopathic neutropenia. *Eur J Haematol.* 2009;83:535-40.
56. Spanoudakis M, Koutala H, et al. T-cell receptor Vbeta repertoire analysis in patients with chronic idiopathic neutropenia demonstrates the presence of aberrant T-cell expansions. *Clin Immunol.* 2010;137:384-95.
57. Gemetzi C, Mavroudi I, et al. Lymphopenia in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with decreased number of T-lymphocytes containing T-cell receptor excision circle. *Eur J Haematol.* Mar 2012;88(3):210-23.
58. Mavroudi I, Eliopoulos A.G., et al. Immunoglobulin and B-cell disturbances in patients with chronic idiopathic neutropenia. *Clinical Immunology*, 2017;183:75-81. ISSN 1521-6616
59. Bizymi N, Velegraki M, Damianaki A et al. Altered Monocyte Subsets in patients with Chronic Idiopathic Neutropenia. *J Clin Immunol.* 2019;39,852-854.

60. Fioredda F, Rotulo GA et al. Late-onset and long-lasting autoimmune neutropenia: an analysis from the Italian Neutropenia Registry. *Blood Adv.* Nov 2020;24;4(22):5644-5649.
61. Capsoni F, Sarzi P, Puttini P, Zanella A. Primary and secondary autoimmune neutropenia. *Arthritis Research & Therapy.* 2005;7:208-214.
62. Walne AJ, Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Dokal I. TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood.* 2008;112(9):3594-3600.
63. Gamez-Diaz L, August D, Stepensky P, et al. The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):223-230.
64. Zhang L, Radigan L, Salzer U, et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5):1178-1185.
65. Salzer U, Chapel HM, Webster ADB, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet.* 2005;37(8):820-828.
66. Shearer, W. T., Rosenblatt, H. M., Gelman, R. S., Oyomopito, R., Plaeger, S., Stiehm, E. R., Wara, D. W., Douglas, S. D., Luzuriaga, K., McFarland, E. J., Yogev, R., Rathore, M. H., Levy, W., Graham, B. L., Spector, S. A., & Pediatric AIDS Clinical Trials Group (2003). Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112(5), 973–980.
67. Bisset, L. R., Lung, T. L., Kaelin, M., Ludwig, E., & Dubs, R. W. (2004). Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *European journal of haematology*, 72(3), 203–212.
68. Nathan and Oskis's hematology of infancy and childhood. Philadelphia. WBS Saunders Company, 2003.
69. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol.* Nov 2010;162(2):271-9.
70. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Reh, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424.
71. Cornec, D., Devauchelle-Pensec, V., Tobón, G. J., Pers, J. O., Jousse-Joulin, S., & Saraux, A. (2012). B cells in Sjögren's syndrome: from pathophysiology to diagnosis and treatment. *Journal of autoimmunity*, 39(3), 161–167.

72. Simon, Q., Pers, J. O., Cornec, D., Le Pottier, L., Mageed, R. A., & Hillion, S. (2016). In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(5), 1577–1584.e10.
73. Kawashiri, S. Y., Kawakami, A., Okada, A., Koga, T., Tamai, M., Yamasaki, S., Nakamura, H., Origuchi, T., Ida, H., & Eguchi, K. (2011). CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 38(12), 2517–2521.
74. Chalan, P., Bijzet, J., Kroesen, B. J., Boots, A. M., & Brouwer, E. (2016). Altered Natural Killer Cell Subsets in Seropositive Arthralgia and Early Rheumatoid Arthritis Are Associated with Autoantibody Status. *The Journal of rheumatology*, 43(6), 1008–1016.
75. Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E. H., Milner, E. C., & Sanz, I. (2007). A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(10), 6624–6633.
76. Mingueneau, M., Boudaoud, S., Haskett, S., Reynolds, T. L., Nocturne, G., Norton, E., Zhang, X., Constant, M., Park, D., Wang, W., Lazure, T., Le Pajolec, C., Ergun, A., & Mariette, X. (2016). Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(6), 1809–1821.e12.
77. Schiavo, E., Martini, B., Attardi, E., Consonni, F., Ciullini Mannurita, S., Coniglio, M. L., Tellini, M., Chiocca, E., Fotzi, I., Luti, L., D'Alba, I., Veltroni, M., Favre, C., & Gambineri, E. (2022). Autoimmune Cytopenias and Dysregulated Immunophenotype Act as Warning Signs of Inborn Errors of Immunity: Results From a Prospective Study. *Frontiers in immunology*, 12, 790455.
78. Bergman, P., Broliden, P. A., Ratcliffe, P., Lourda, M., Flesch, B., Höglund, P., & Palmblad, J. (2022). Mutation in the TACI gene and autoimmune neutropenia: A case report. *American journal of hematology*, 97(6), E207–E210.
79. Dorjbal, B., Stinson, J. R., Ma, C. A., Weinreich, M. A., Miraghazadeh, B., Hartberger, J. M., Frey-Jakobs, S., Weidinger, S., Moebus, L., Franke, A., Schäffer, A. A., Bulashevskaya, A., Fuchs, S., Ehl, S., Limaye, S., Arkwright, P. D., Briggs, T. A., Langley, C., Bethune, C., Whyte, A. F., ... Snow, A. L. (2019). Hypomorphic caspase activation and recruitment domain 11 (CARD11) mutations associated with diverse immunologic phenotypes with or without atopic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 143(4), 1482–1495. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.013>
80. Chianucci, B., Grossi, A., Dell'Orso, G., Palmisani, E., Lanciotti, M., Terranova, P., Pierri, F., Lupia, M., Arcuri, L., Laurino, M., Ceccherini, I., Beier, F., Dufour, C., Fioredda, F., & Miano, M. (2022). Autoimmune Neutropenia and Immune-Dysregulation in a Patient Carrying a TINF2 Variant. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 14535.
81. Miano, M., Lanciotti, M., Giardino, S., & Dufour, C. (2015). Ser245Tyr TINF2 mutation in a long-term survivor after a second myeloablative SCT following late graft failure for Aplastic Anaemia. *Blood cells, molecules & diseases*, 55(2), 187–188.

82. Walne, A. J., Vulliamy, T., Beswick, R., Kirwan, M., & Dokal, I. (2008). TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood*, 112(9), 3594–3600.
83. Marsh, J. C. W., Gutierrez-Rodrigues, F., Cooper, J., Jiang, J., Gandhi, S., Kajigaya, S., Feng, X., Ibanez, M. D. P. F., Donaires, F. S., Lopes da Silva, J. P., Li, Z., Das, S., Ibanez, M., Smith, A. E., Lea, N., Best, S., Ireland, R., Kulasekararaj, A. G., McLoman, D. P., Pagliuca, A., ... Mufti, G. J. (2018). Heterozygous RTEL1 variants in bone marrow failure and myeloid neoplasms. *Blood advances*, 2(1), 36–48.
84. Miano, M., Cappelli, E., Pezzulla, A., Venè, R., Grossi, A., Terranova, P., Palmisani, E., Maggiore, R., Guardo, D., Lanza, T., Calvillo, M., Micalizzi, C., Pierri, F., Vernarecci, C., Beccaria, A., Corsolini, F., Lanciotti, M., Russo, G., Ceccherini, I., Dufour, C., ... Fioredda, F. (2019). FAS-mediated apoptosis impairment in patients with ALPS/ALPS-like phenotype carrying variants on CASP10 gene. *British journal of haematology*, 187(4), 502–508.
85. Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F. K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J. M., Straus, S. E., & Lenardo, M. J. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, 98(1), 47–58.
86. Zhu, S., Hsu, A. P., Vacek, M. M., Zheng, L., Schäffer, A. A., Dale, J. K., Davis, J., Fischer, R. E., Straus, S. E., Boruchov, D., Saulsbury, F. T., Lenardo, M. J., & Puck, J. M. (2006). Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Human genetics*, 119(3), 284–294.
87. Zhu, S., Jin, J., Gokhale, S., Lu, A. M., Shan, H., Feng, J., & Xie, P. (2018). Genetic Alterations of TRAF Proteins in Human Cancers. *Frontiers in immunology*, 9, 2111.
88. Tripodi SI, Mazza C, Moratto D, Ramenghi U et al. Atypical presentation of autoimmune lymphoproliferative syndrome due to CASP10 mutation. *Immunology Letters*. 2016;177, 22–24.
89. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3K δ and primary immunodeficiencies. *Nature reviews. Immunology*. 2016;16(11), 702–714.
90. Davidsson J, Puschmann A, e al. SAMD9 and SAMD9L in inherited predisposition to ataxia, pancytopenia, and myeloid malignancies. *Leukemia*. May 2018;32(5):1106-1115.
91. Galaverna F, Ruggeri A, Locatelli F. Myelodysplastic syndromes in children. *Current Opinion in Oncology*. 2018;30(6),402-408.
92. Walter, J. E., Ayala, I. A., & Milojevic, D. (2019). Autoimmunity as a continuum in primary immunodeficiency. *Current opinion in pediatrics*, 31(6), 851–862.