

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

Responsabile del Corso di Laurea: Chiar.mo Prof. Gianluca Damonte



**Università
di Genova**

**SCREENING NEONATALE PER LE IMMUNODEFICIENZE
SEVERE COMBinate: RISULTATI A 5 ANNI DALL'AVVIO IN
LIGURIA**

Relatore:

Prof. Stefano Volpi

Correlatore:

Dott.ssa Serena Palmeri

Tesi di laurea di:

Riccardo Fiumefreddo

Matr. N° 5106608

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

ABSTRAC	6
ABSTRACT INGLESE	7
ABBREVIAZIONI	8
1. INTRODUZIONE	11
1.1 LE IMMUNODEFICIENZE SEVERE COMBinate (SCID)	11
1.2 SCREENING NEONATALI	14
1.3 TEST DI SCREENING PER LE SCID	16
1.4 TERAPIE PER LE SCID	19
2. MATERIALI E METODI	21
2.1 DISEGNO DELLO STUDIO	21
2.2 SAGGIO TREC E KREC E CUT-OFF DIAGNOSTICI	21
2.2.1 ESTRAZIONE DEL DNA	21
2.2.2 ANALISI RT-PCR E VALORI SOGLIA	21
2.3 ALGORITMO DI SCREENING E ITER DIAGNOSTICO PER SOSPETTA SCID	22
2.3.1 NATI A TERMINE (≥ 37 SETTIMANE DI GESTAZIONE)	22
2.3.2 NATI PRETERMINE (< 37 SETTIMANE DI GESTAZIONE)	22
2.3.3 WORK-UP CLINICO-LABORATORISTICO DI II LIVELLO PER SCID	23
2.3.4 GESTIONE CLINICA, ISOLAMENTO E PROFILASSI	23
2.4 ALGORITMO PER DEFICIT ISOLATO DEI KREC (SOSPETTA AGAMMAGLOBULINEMIA)	27
2.5 ANALISI GENETICA	29
2.6 CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE	29
2.7 FOLLOW-UP	30
2.8 ANALISI STATISTICA	30
3. RISULTATI	31

3.1 PROGRAMMI DI SCREENING SCID ATTIVI NEL MONDO	31
3.1.1 TOSCANA	31
3.1.2 REGIONE PAYS DE LA LOIRE	31
3.1.3 SVIZZERA	32
3.1.4 GERMANIA	33
3.1.5 CALIFORNIA	33
3.1.6 RUSSIA	34
3.1.7 SVEZIA	34
3.1.8 NUOVA ZELANDA	34
3.1.9 GIAPPONE	35
3.1.10 UCRAINA	36
3.1.11 BRASILE	36
3.1.12 CATALOGNA.....	37
3.1.13 SINTESI DEL CONFRONTO.....	37
3.2 ANALISI DEL PROGRAMMA LIGURE	39
3.2.1 PAZIENTE 1	40
3.2.2 PAZIENTE 2	42
3.2.3 PAZIENTE 3	44
3.2.4 PAZIENTE 4	47
3.2.5 PAZIENTE 5	47
3.2.6 PAZIENTE 6	50
3.3 ANALISI COSTO BENEFICIO	52
3.3.1 COSTO DEL TEST DI SCREENING	52
3.3.2 ANALISI COSTO EFFICACIA	52
3.3.3 ANALISI COSTO BENEFICIO	53
3.3.4 IL RUOLO DELL'INCIDENZA	53
4 DISCUSSIONE	55
5 CONCLUSIONE.....	63
BIBLIOGRAFIA	66

ABSTRACT

INTRODUZIONE: Gli errori congeniti dell'immunità (IEI) comprendono un ampio gruppo di patologie genetiche che compromettono l'immunità innata, adattiva o la regolazione immunitaria. Tra questi, le immunodeficienze severe combinate (SCID) rappresentano la forma più grave, sono caratterizzate da un deficit quantitativo e/o funzionale dei linfociti T, associato a compromissione variabile di linfociti B e cellule NK. I neonati affetti sono asintomatici alla nascita, ma sviluppano infezioni gravi e potenzialmente fatali in assenza di diagnosi e trattamento precoce. Dal 2005 è stato adottato internazionalmente un test di screening neonatale per le SCID. **OBIETTIVO:** Analizzare i risultati a 5 anni dall'avvio in Liguria del programma di screening neonatale per SCID. **MATERIALI E METODI:** I campioni, raccolti su dried blood spot (DBS), sono stati analizzati mediante reazione a catena della polimerasi quantitativa (RT-PCR), kit Eonis™ SCID-SMA. I test positivi venivano ripetuti e, se confermati, i neonati richiamati per valutazione clinica. **RISULTATI:** Sono stati analizzati 32.289 neonati (adesione 99,8%); 654 inizialmente positivi, 28 hanno richiesto un secondo DBS e 6 sono stati inviati a valutazione clinica (tasso di invio 0,019%; VPP 21,4%). Due erano affetti da ADA-SCID, uno da sindrome di DiGeorge, uno da linfopenia T idiopatica, uno da linfopenia B transitoria e uno da agammaglobulinemia congenita. L'età mediana al richiamo è stata 15 giorni, mediana di tempo trascorso tra richiamo e diagnosi, 20 giorni. Tutti i pazienti sono rimasti in follow-up regolare. **CONCLUSIONE:** I risultati confermano fattibilità e valore clinico del NBS per la SCID in Italia, con implementazione solida, ben accettata e prestazioni in linea con i programmi internazionali. I reperti non SCID confermano l'elevata sensibilità del test. La rapidità del percorso diagnostico-terapeutico è fondamentale, poiché correla con una minor incidenza di infezioni e un'aumentata sopravvivenza.

ABSTRACT INGLESE

BACKGROUND: Inborn errors of immunity (IEIs) comprise a large group of genetic disorders that impair innate, adaptive immunity, or immune regulatory mechanisms. Among these, combined severe immunodeficiencies (SCIDs) represent the most severe form, are characterized by a quantitative and/or functional deficit of T lymphocytes, associated with variable impairment of B lymphocytes and NK cells. Affected infants are asymptomatic at birth but develop serious and potentially fatal infections in the absence of early diagnosis and treatment. Since 2005, a newborn screening test for SCID has been adopted internationally. **OBJECTIVE:** To analyse the results 5 years after the launch of the newborn screening program for SCID in Liguria. **METHODS:** Samples, collected on dried blood spot (DBS), were analysed by quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR), kit Eonis TM SCID-SMA. Positive tests were repeated and, if confirmed, newborns were recalled for clinical evaluation. **RESULTS:** 32,289 newborns were analysed (99.8% adherence); 654 initially positive, 28 retest-positive infants required a second DBS, and 6 were referred for clinical evaluation (referral rate 0.019%; PPV 21.4%). Two infants had ADA-SCID, one had DiGeorge syndrome, one had idiopathic T lymphopenia, one had transient B lymphopenia, and one had congenital agammaglobulinemia. The median age at recall was 15 days, the median time between recall and diagnosis was 20 days. All patients remained on regular follow-up. **CONCLUSION:** The results confirm the feasibility and clinical value of NBS for SCID in Italy, with robust, well-accepted implementation and performance in line with international programs. Non-SCID findings confirm the high sensitivity of the test. The rapidity of the diagnostic-therapeutic protocol is essential, as it correlates with a lower incidence of infections and increased survival.

ABBREVIAZIONI

ADA	→	Adenosina deaminasi
Array-CGH	→	Ibridazione genomica comparativa su microarray
BTK	→	Tirosina chinasi di Bruton
Ct	→	Ciclo-soglia
CMV	→	Citomegalovirus
CQE	→	Controllo qualità esterno
CQI	→	Controllo qualità interno
DBS	→	Dried blood spot
ERT	→	Terapia enzimatica sostitutiva
FISH	→	Ibridazione in situ
GT	→	Terapia genica
HSCT	→	Trapianto di cellule staminali ematopoietiche
IC	→	Intervallo di confidenza
ICER	→	Costo efficacia incrementale
IEI	→	Errori congeniti dell'immunità
IPINET	→	Italian Primary Immunodeficiency Network
IUIS	→	International Union of Immunological Societies
IVIG	→	Immunoglobuline endovena
KREC	→	Kappa-deleting recombination excision circles
LEA	→	Livelli Essenziali di Assistenza
MoM	→	Multiplo della Mediana
NBS	→	Test di screening neonatale
NK	→	Natural killer
PCR	→	Reazione a catena della polimerasi
PIDTC	→	Primary Deficiency Treatment Consortium

PNP	➔	Purina nucleoside fosforilasi
QUALY	➔	Quality-adjusted life-years
REDCap	➔	Research Electronic Data Capture
RT-PCR	➔	Reazione a catena della polimerasi quantitativa
RUSP	➔	Recommended Uniform Screening Panel
SCID	➔	Immunodeficienza severa combinata
SMA	➔	Atrofia muscolare spinale
SNE	➔	Screening neonatale esteso
TCR	➔	Recettore dei linfociti T
TIN	➔	Terapia intensiva neonatale
TREC	➔	T-cell receptor excision circles
USIDNET	➔	United States Immunodeficiency Network
VPP	➔	Valore predittivo positivo
VSL	➔	Value of a statistical life

INTRODUZIONE

1.1 LE IMMUNODEFICIENZE SEVERE COMBinate (SCID)

Gli errori congeniti dell'immunità (IEI) includono un ampio gruppo di patologie genetiche, ad ereditarietà autosomica dominante, autosomica recessiva o legata al cromosoma X, a fenotipo clinico caratterizzato da penetranza completa o incompleta, in cui possono essere compromesse l'immunità innata, adattiva, cellulare non ematopoietica oppure i meccanismi di regolazione immunitaria, portando ad una perdita dei normali meccanismi di tolleranza immunitaria con conseguente autoimmunità, autoinfiammazione e linfoproliferazione, spesso con una suscettibilità alle infezioni meno marcata rispetto alle forme classiche di immunodeficienza.

Considerate singolarmente, le immunodeficienze primitive sono patologie rare, con una prevalenza stimata in Italia intorno a 5,1 casi ogni 100.000 abitanti secondo il registro Italian Primary Immunodeficiency Network (IPINET). Tuttavia, nel loro insieme le IEI rappresentano un gruppo eterogeneo tutt'altro che trascurabile, con stime di prevalenza complessiva che, a seconda della popolazione e della metodologia di rilevazione, raggiungono anche 3,9-5,1 casi ogni 10.000 individui. Tra le IEI, le immunodeficienze severe-combinate (Severe Combined Immunodeficiency, SCID) rappresentano circa il 7% di tutte le diagnosi di immunodeficienza primitiva secondo il registro United States Immunodeficiency Network (USIDNET), con un'incidenza globale stimata in 1 caso su 50.000 nati vivi, con variazioni geografiche significative, da 1:38.500 in Svezia a 1:65.000 in California.(1-5)

Le SCID si definiscono come un insieme di patologie genetiche che, a seconda del fenotipo immunologico, sono caratterizzate da un basso numero o assenza di linfociti T, dall'assenza o da un deficit variabile della funzione dei linfociti B e delle cellule natural killer (NK). (6)

Esse sono il risultato di una mutazione genetica, lasciando i bambini più esposti alla contrazione continua di infezioni da parte di virus, batteri e funghi. La presentazione clinica può essere caratterizzata da diarrea cronica, candidosi orale o rash cutanei non responsivi ai trattamenti standard. Dal punto di vista immunologico si riscontra quasi sempre una grave linfopenia (<3000 cellule/mm³), assenza del timo, ipogammaglobulinemia o agammaglobulinemia rilevabile soprattutto con la graduale riduzione degli anticorpi materni associata all'incapacità di produrre anticorpi specifici dopo le vaccinazioni o le infezioni naturali (Figura I). (7,8)

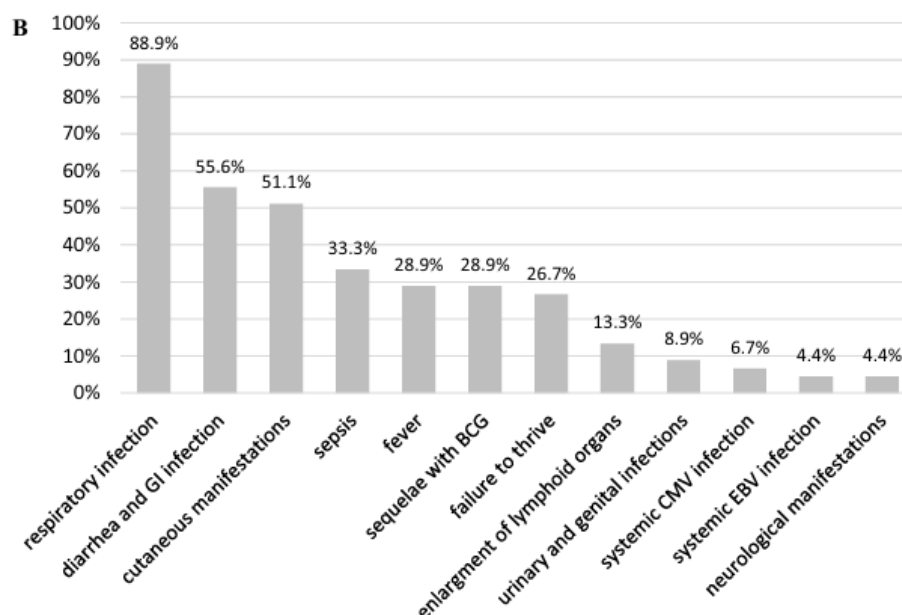


Figura I. Frequenza in percentuale delle manifestazioni cliniche delle SCID. (9)

Da sottolineare è il fatto che i neonati si presentano apparentemente sani alla nascita, per poi contrarre infezioni nei primi sei mesi di vita. In questi pazienti la somministrazione dei vaccini vivi attenuati previsti dal calendario vaccinale pediatrico, in particolare il vaccino antirotavirus, è controindicata, poiché può causare infezione disseminata del ceppo vaccinale, con quadri clinici anche fatali. Da qui si può comprendere come sia fondamentale stabilire una diagnosi precoce in modo da poter intervenire il prima possibile con trattamenti specifici e mirati.(10)

Fino ad oggi sono stati identificati più di venti difetti genetici che causano le SCID. La figura (Figura II) sottostante riporta l'ultimo aggiornamento del 2024 redatto

dalla International Union of Immunological Societies (IUIS) delle principali classificazioni fenotipiche delle SCID.

CD19 NI: SCID T- B+		CD19 ↓: SCID T-B-	
SCID T-B+NK+		SCID T-B+NK-	
IL7Rα. IL7R AR. # 608971 No γ/δ T cells: CD3δ*. CD3D AR # 615617 CD3ε*. CD3E AR # 615615 CD3ζ**. CD3Z AR # 610163 NI γ/δ T cells: CD45* PTPRC AR # 619924 LAT def*. LAT AR. # 602354 Typical SCID or CID. High Ig.		γc def. IL2RG XL, CD 132 def # 300400 JAK-3 def. JAK3 AR, CD 132+ # 600802	
Coronin-1A def*. CORO1A AR. # 615401 Detectable thymus PAX1 def*. PAX1 AR (LOF) # 615560 Omenn's-like syndrome. Tc deficiency not corrected by HSCT despite donor chimerism. NI IgM, ↓ IgA, NI to ↑ IgE. LCP2/SLP76 def**. SLP76 AR (LOF) # 619374 Autoimmunity, ↑ IgM, ↓ IgA. Winged helix def*. FOXP1. AR # 601705 Congenital thymic aplasia. ITPKB def**. ITPKB AR * 147522 Panleukopenia, anemia, thrombocytopenia. NI IgM, IgA; ↓ IgG.			
SCID T-B-NK+		SCID T-B-NK-	
Microcephaly ?			
Yes	No		
Radiation sensitivity - With facial dysmorphism: DNA ligase IV def. LIG4 AR # 606593 CERNUNNOS /XLF def*. NHEJ1 AR. # 611291 - Without facial dysmorphism: DNA PKcs def*. PRKDC AR # 615966 Variable Ig levels	RAG 1/2 def (RAG1/ RAG2) AR # 601457 NUDCD3 def. NUDCD3 AR. Abnormal VDJ recombination + Radiation sensitivity DCLRE1C def DCLRE1C AR (ARTEMIS). # 602450	ADA def. ADA AR # 102700 Chondrosternal dysplasia, cognitive defects, sensorineural deafness, multicentric dermatofibrosarcoma protuberans. Progressive disease. Reticular dysgenesis. AK2 AR # 267500 Neutropenia, deafness. Activated Rac2 defect*. RAC2, AD GOF. # 618986 Lymphoproliferation, neutropenia.	

Figura II. Classificazioni fenotipiche delle SCID in base al difetto genetico.

Dalla classificazione dell'IUIS si può notare come le SCID vengano divise in due macrogruppi principali in base alla presenza o meno dei linfociti B, identificati tramite citofluorimetria dall'espressione del marcatore CD19, che può essere normale o deficitario.

Le SCID caratterizzate da un deficit dei linfociti T e dalla presenza dei linfociti B vengono suddivise in base alla presenza delle cellule natural killer (NK): quelle in cui sono presenti le cellule NK (SCID T-B+NK+) comprendono difetti dei geni IL7Rα, assenza di linfociti T γ/δ (difetti di CD3D, CD3E, CD3Z), linfociti T γ/δ normali (CD45, LAT), difetti di Coronin-1A, PAX1, LCP2, SLP76, FOXP1, ITPKB; quelle in cui vi è un deficit delle NK (SCID T-B+NK-), invece sono caratterizzate da difetti genetici di IL2RG e JAK3.

Analogamente le SCID caratterizzate da un deficit sia dei linfociti T e B vengono suddivise in base alla presenza delle cellule NK e microcefalia: quelle in cui sono entrambi presenti (SCID T-B-NK+ con microcefalia) comprendono difetti dei geni

LIG4, NHEJ1, PRKDC; quelle in cui non si presenta microcefalia (SCID T-B-NK+ senza microcefalia) sono dovute a difetti genetici di RAG1, RAG2, NUDCD3, DCLRE1C (ARTEMIS); invece, quelle in cui non sono nemmeno presenti le cellule natural killer sono causate da difetti dei geni ADA, AK2, RAC2.

1.2 SCREENING NEONATALI

Lo screening è l'identificazione di una patologia, prima che essa si manifesti, in soggetti apparentemente sani, clinicamente asintomatici, mediante l'applicazione di un test eseguibile su larga scala; un risultato positivo non ha un valore diagnostico di per sé, ma identifica una sottopopolazione da indirizzare ad accertamenti specifici per la conferma diagnostica (11). Lo screening neonatale, nello specifico, è un programma di sanità pubblica che applica questo principio alla totalità dei nati di una popolazione, indipendentemente dalla presenza o meno di segni o sintomi alla nascita. L'obiettivo è identificare in fase presintomatica patologie per le quali un intervento terapeutico precoce possa influenzare significativamente l'outcome dei neonati.

Non tutte le patologie, per quanto gravi, si adattano ad un programma di screening. Affinché uno screening sia clinicamente ed eticamente giustificato, deve soddisfare una serie di criteri generali, storicamente codificati da Wilson e Jungner nel 1968 in un documento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e successivamente aggiornati da Andermann et al. nel 2008 alla luce delle nuove tecnologie diagnostiche, tra cui quelle genomiche.

In primo luogo, la patologia oggetto dello screening deve rappresentare un problema di salute rilevante in termini di prevalenza o gravità delle conseguenze cliniche. In secondo luogo, deve essere disponibile un trattamento efficace ed accessibile: lo screening perderebbe di significato se a seguito non fosse possibile modificare il decorso della patologia ricercata.

Per la patologia ricercata deve essere inoltre possibile effettuare diagnosi in fase presintomatica o paucisintomatica, in modo da poterne significativamente modificare l'outcome rispetto ad una diagnosi clinica posta successivamente. Questo

rende necessaria una buona conoscenza della storia naturale della malattia, inclusa l'esistenza di una fase latente o iniziale riconoscibile durante la quale l'intervento terapeutico risulti più efficace.

Il test di screening inoltre deve essere semplice, sicuro e dotato di un'elevata sensibilità dato che viene applicato ad una grossa popolazione asintomatica e con bassa prevalenza della patologia ricercata perciò è più accettabile un maggior numero di falsi positivi, successivamente esclusi tramite test di secondo livello, piuttosto che rischiare falsi negativi.

Infine, requisito imprescindibile per l'applicabilità su larga scala è la sostenibilità economica. Il costo dello screening, comprendendo anche l'eventuale iter di conferma diagnostica e la presa in carico dei casi identificati, deve essere proporzionato al beneficio atteso in termini di salute pubblica. (11)

Le SCID soddisfano a pieno questi criteri: rappresentano una condizione grave, potenzialmente fatale se non trattate; sono disponibili delle terapie efficaci se applicate precocemente (trapianto di cellule staminale ematopoietiche HSCT, terapia genica, terapia enzimatica sostitutiva ERT, immunoglobuline sostitutive); i neonati affetti alla nascita si presentano asintomatici e possono essere identificati tramite un test economico, validato e ad alta sensibilità.

I criteri sopra descritti trovano concreta applicazione nelle scelte legislative dei singoli Stati, che decidono quali patologie inserire nei propri programmi di screening neonatale. In Italia il percorso normativo dello screening neonatale si è sviluppato a partire dalla Legge 104/1992 che ha reso obbligatorio lo screening per fenilchetonuria, ipotiroidismo congenito e fibrosi cistica. Successivamente la Legge 167/2016 e il DPCM 12 gennaio 2017 hanno esteso l'obbligatorietà a circa 40 malattie metaboliche ereditarie e inserito lo Screening Neonatale Esteso (SNE) nei Livelli Essenziali di Assistenza (LEA). La Legge di Bilancio 2019 ha previsto poi la possibilità di ampliare ulteriormente il pannello ad atrofia muscolare spinale (SMA), SCID e malattie da accumulo lisosomiale, in concomitanza della disponibilità di terapie efficaci. Ad oggi, però, queste ultime patologie non fanno ancora parte del pannello obbligatorio su tutto il territorio italiano, ma alcune regioni hanno attivato autonomamente programmi regionali. Tra queste risulta anche la Liguria che con la

Deliberazione di Giunta Regionale n. 249 del 15 maggio 2025, la Regione Liguria ha ufficializzato ed esteso il programma, confermando il Gaslini quale laboratorio regionale di riferimento, con attività di screening per SMA e SCID attivate in fase sperimentale.

1.3 TEST DI SCREENING PER LE SCID

Considerata l'assenza di sintomi o segni specifici nei pazienti affetti da SCID alla nascita, i programmi di screening neonatali sono essenziali per poter fare una diagnosi precoce e intervenire tempestivamente con le cure più opportune. Se così non fosse, come evidenziato da studi effettuati in Paesi in cui i programmi di screening sono già stati avviati, quasi la totalità dei bambini morirebbe entro i primi due anni di vita. (12,13)

Il primo test di screening neonatale (NBS) per le SCID fu sviluppato nel 2005 da Chan e Puck, che definirono un test basato sui T-cell receptor excision circles (TREC). (14) I TREC sono frammenti di DNA circolare a doppio filamento generati durante il riarrangiamento genico del recettore dei linfociti T (TCR), e fungono da marcatori molecolari indicativi di una normale linfopoiesi T (Figura III). I livelli di TREC correlano pertanto direttamente con la produzione di linfociti T naïve poiché le cellule T non naïve sono prive della giunzione del segnale δ Rec- ψ Ja (sequenza di DNA circolare dei TREC). Inoltre, i TREC sono stati considerati un marcatore ideale per la produzione di cellule T naïve, poiché stabili e rimangono extracromosomici nel citoplasma delle cellule T, non replicandosi durante la mitosi. Di conseguenza, i TREC si diluiscono quando la popolazione di cellule T si espande attraverso la divisione cellulare.(15)

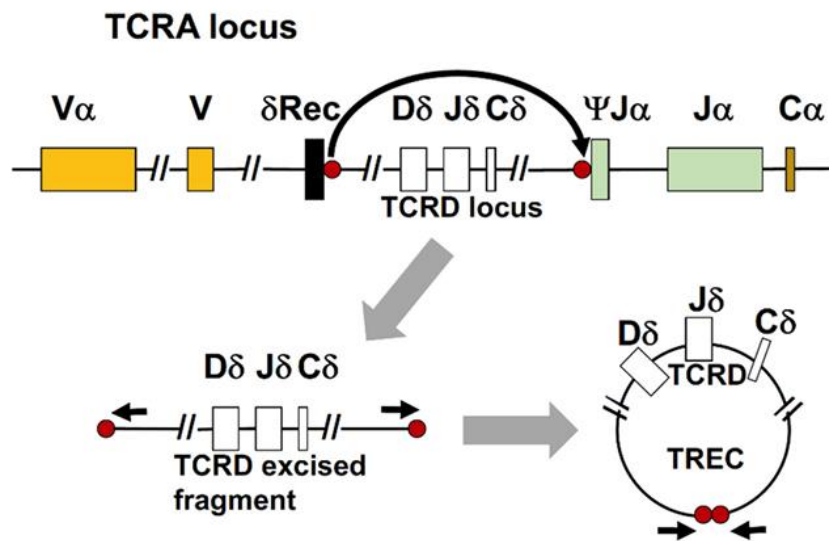


Figura III. T-cell receptor excision circles (TREC): un biomarcatore per il normale sviluppo dei linfociti T. TCRA, T-cell receptor alpha; TCRD, T-cell receptor delta; V, variabile; D, diversità; J, joining; C, regioni costante del gene del recettore dei linfociti T; Rec, sequenza ricombinante per TCRD.(16)

I test di screening neonatale utilizzano la reazione a catena della polimerasi (PCR), metodica che amplifica i frammenti di DNA. I risultati possono essere espressi come numero totale di copie di TREC; come valore di ciclo-soglia (Ct) o come il rapporto tra il risultato di una singola misurazione (numero di copie TREC o valore Ct) e il risultato mediano di tale valore nella popolazione di riferimento, definito Multiplo della Mediana (MoM).

È stato osservato che bassi livelli di TREC si possono individuare sia nei neonati con SCID che nei neonati con cause secondarie di linfopenia T risultando quindi dei marcatori altamente sensibili per la linfopenia T, ma non specifici per le SCID.(17)

Dal 2010 lo screening neonatale per le SCID entrò a far parte del RUSP (Recommended Uniform Screening Panel), un elenco raccomandato dal Dipartimento della Salute degli Stati Uniti. Questo aprì le porte ad altri paesi per condurre studi e implementare i propri test di screening neonatali per le SCID.

Analizzando il contesto europeo, c'è da attenzionare il fatto che l'assistenza sanitaria è sempre stata lasciata alla responsabilità dei singoli paesi. Quindi, l'implementazione dei test di screening per le nuove patologie come la SCID è spesso

un processo decisionale lungo e complesso che tiene conto dei fattori politici ed economici di ogni paese. Inoltre, molti paesi hanno sottolineato che, prima di introdurre dei test di screening nazionali, devono condurre degli studi per essere in linea con le buone pratiche di laboratorio. La revisione di Blom M. et al. ci mostra le differenti implementazioni dello screening neonatale per le SCID in ogni paese Europeo nel 2024 (Figura IV). (18)

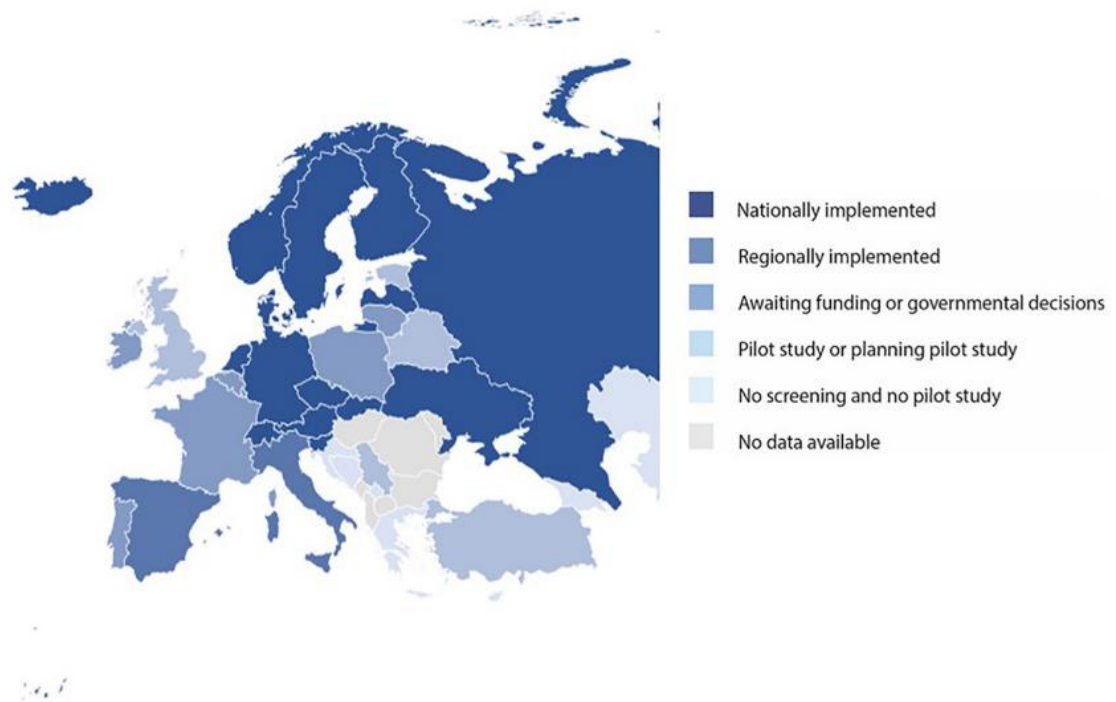


Figura IV. Situazione dello screening neonatale basato sui TREC in Europa, secondo i risultati dell'indagine di aprile 2024. (18)

Grazie alla crescente adozione dei test di screening (NBS) da parte dei paesi europei, la stessa revisione ci mostra come il numero di sottoposti ai NBS per le SCID sia in aumento (Figura V).

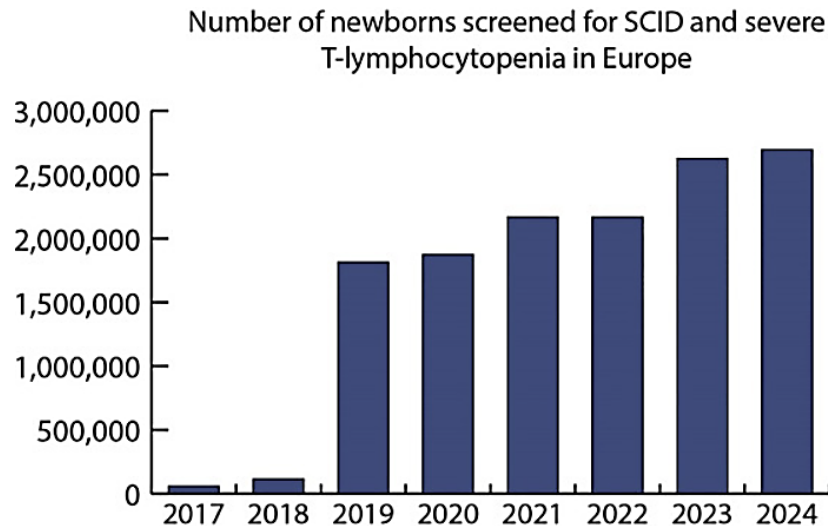


Figura V. Numero di neonati sottoposti ai test di screening per le SCID per anno in Europa. (18)

1.4 TERAPIE PER LE SCID

Il chiaro successo del NBS per le SCID risiede nelle sue capacità di consentire una diagnosi precoce e di avviare tempestivamente le terapie più opportune.

Nel 2009 è stato istituito il Primary Deficiency Treatment Consortium (PIDTC), un consorzio che riunisce centri di immunologia pediatrica e di trapianto di cellule staminali ematopoietiche negli Stati Uniti e in Canada, con lo scopo di favorire la ricerca e migliorare diagnosi e terapia definitiva delle immunodeficienze primitive.(19)

Ad oggi esistono diverse terapie che vanno scelte in base alla forma di SCID diagnosticata, come la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) o la terapia genica (GT). (20)

La terapia enzimatica sostitutiva (ERT) è un'opzione terapeutica di prima linea nel caso delle SCID causate da un difetto dell'enzima adenosina deaminasi (ADA-SCID), forme di immunodeficienza in cui sono presenti deficit dei linfociti T, B e delle cellule NK, dovute a difetti del gene ADA. La ERT consente la detossificazione sistemica dei metaboliti dell'adenina, favorisce la linfopoiesi e riduce le infezioni opportunistiche, tuttavia presenta degli svantaggi come: il costo elevato della terapia, la necessità di iniezioni intramuscolari con frequenza da una a due volte alla

settimana, l'incompleta ricostituzione linfocitaria, la riduzione dell'efficacia nel tempo, autoimmunità e neoplasie. (21–25)

Le recenti linee guida raccomandano di avviare la ERT non appena viene confermata la diagnosi di ADA-SCID, utilizzandola come terapia in attesa della terapia cellulare definitiva (HSCT o GT).(26) È stato tuttavia sollevato il timore che la ERT prima dell'HSCT possa influire negativamente sull'attecchimento cellulare a causa del miglioramento della risposta immunitaria del ricevente.(27)

Il trapianto allogenico delle cellule staminali ematopoietiche (HSCT) è attualmente la terapia più diffusa per le SCID. Se il donatore è un fratello HLA compatibile e il trapianto viene effettuato prima che il neonato abbia delle infezioni in corso, il tasso di sopravvivenza può anche superare il 90%. (28–31) La revisione del 2024 di Goebel GA et al.(32) conferma che la tempestiva esecuzione del trapianto, l'assenza di infezioni in corso e il tipo di donatore (meglio se fratello del ricevente) sono associati a migliori tassi di sopravvivenza, mentre l'età del paziente al momento del trapianto non sembra avere influenze significative sul risultato.

Per alcuni tipi di SCID esiste infine la possibilità di effettuare una terapia genica (GT), che si basa sul trasferimento genico ex vivo utilizzando vettori retrovirali, come i lentivirus, per trasdurre le cellule staminali ematopoietiche CD34+.(33,34) L'impiego di vettori lentivirali e l'adozione di specifici regimi di condizionamento hanno permesso una trasduzione e un attecchimento più efficace delle cellule ematopoietiche, portando alla differenziazione dei linfociti trapiantati (T, B e natural killer) e a una ricostituzione immunitaria duratura.(35,36) Questa terapia viene utilizzata nei pazienti affetti da ADA-SCID, ART-SCID o da SCID X-linked.(37)

Oltre a queste terapie, resta fondamentale l'avvio di nuovi studi che ricerchino trattamenti per le altre forme di SCID.

MATERIALI E METODI

2.1 DISEGNO DELLO STUDIO

Il presente lavoro di tesi si basa su uno studio retrospettivo monocentrico, condotto analizzando i dati derivanti dal programma di screening neonatale (Newborn Screening, NBS) per le SCID congenite della regione Liguria. Il periodo di osservazione considerato va da settembre 2021 ad agosto 2025.

I campioni analizzati sono stati raccolti su cartoncino di Guthrie mediante puntura del tallone, eseguita entro 48-72 ore dalla nascita, secondo il protocollo standard dei programmi di screening neonatale. Nei campioni sono stati quantificati i T-cell Receptor Excision Circles (TREC) e i Kappa-deleting Recombination Excision Circles (KREC) mediante Reazione a Catena della Polimerasi quantitativa (RT-PCR). Raccolta e gestione dei dati clinici sono state effettuate tramite il software REDCap (Research Electronic Data Capture), su cui è stata successivamente condotta l'analisi retrospettiva oggetto di questa tesi.

2.2 SAGGIO TREC E KREC E CUT-OFF DIAGNOSTICI

2.2.1 ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA e la successiva RT-PCR sono state eseguite utilizzando il kit Eonis™ SCID-SMA (Revvity, Wallac Oy, Turku, Finlandia), secondo il protocollo standard fornito dal produttore.

2.2.2 ANALISI RT-PCR E VALORI SOGLIA

La quantificazione è stata eseguita mediante PCR Real-Time multiplex, utilizzando il medesimo kit Eonis SCID-SMA sopra descritto. Come gene costitutivo endogeno di riferimento è stato utilizzato RPP30. I valori soglia (cut-off), derivati dal 1° percentile di una coorte di 3.000 neonati sani, sono stati stabiliti a 223 copie/10⁵

cellule per i TREC (marcatore per SCID) e 108 copie/10⁵ cellule per i KREC. Il controllo qualità interno (CQI) ha previsto il monitoraggio dei valori medi di Ct, mentre il controllo qualità esterno (CQE) è stato garantito dalla partecipazione al programma CDC Newborn Screening Quality Assurance Program (CDC-NSQAP, Atlanta, GA, USA).

2.3 ALGORITMO DI SCREENING E ITER DIAGNOSTICO PER SOSPETTA SCID

Il protocollo del Centro Screening Gaslini in caso di positività (TREC < 223 copie/10⁵ cellule) prevede una seconda analisi sullo stesso DBS e se ancora positiva differenzia il percorso dei neonati a seconda dell'età gestazionale e della gravità del quadro.

2.3.1 NATI A TERMINE ($\geq$ 37 SETTIMANE DI GESTAZIONE)

Se i TREC risultano patologici (< 223 copie) ma rilevabili e i metaboliti dell'adenosina sono negativi, il neonato viene richiamato entro 24-48 ore in Day Hospital per l'esecuzione di un secondo DBS, viene sottoposto a isolamento respiratorio e da contatto e si avvia il work-up diagnostico. Se al contrario i TREC risultano indosabili, oppure < 223 copie, ma con metaboliti dell'adenosina positivi, si procede con il ricovero urgente in U.O. Neonatologia entro 24-48 ore, l'isolamento preventivo e il preallertamento delle équipes di Immunologia, Trapiantologia e Genetica. (Figura VI)

2.3.2 NATI PRETERMINE (< 37 SETTIMANE DI GESTAZIONE)

Per i neonati prematuri, qualora i TREC siano < 223 ma dosabili e i metaboliti dell'adenosina negativi, la condotta varia in base al peso e al ricovero:

- Pretermine con età gestazionale ≥ 34 settimane, peso ≥ 2500 g e non è ricoverato in terapia intensiva neonatale (TIN): isolamento preventivo e ripetizione del DBS entro 24-48 ore.
- Pretermine con età gestazionale < 34 settimane o peso < 2500 g o ricoverato in TIN: isolamento preventivo e ripetizione del DBS a 14 giorni di vita, 30 giorni e mensilmente per i primi 3 mesi di vita (se ripetutamente patologico). Qualora risultassero non dirimenti 2 DBS consecutivi si procede direttamente al prelievo ematico.

Anche per i pretermine, in caso di TREC indosabili o positività per i metaboliti ADA, si adotta il medesimo approccio d'urgenza previsto per i nati a termine. (Figura VII)

2.3.3 WORK-UP CLINICO-LABORATORISTICO DI II LIVELLO PER SCID

Alla prima visita per sospetta SCID, il protocollo diagnostico prevede l'esecuzione immediata di esami ematici su sangue periferico. Tra questi: emocromo, studio esteso delle sottopopolazioni linfocitarie (CD3/CD4/CD8/CD19/CD16/56, con particolare attenzione alle cellule T naïve CD45RA/CD45RO per definire l'entità della linfopenia), dosaggio di IgA, IgG, IgM, IgE, analisi molecolare per CMV e HIV, e test di proliferazione linfocitaria a PHA. In caso di positività per ADA allo screening su spot, si effettua il dosaggio dei metaboliti ADA/BNP su sangue.

2.3.4 GESTIONE CLINICA, ISOLAMENTO E PROFILASSI

A fronte di un sospetto fondato di SCID, i pazienti vengono posti in isolamento per minimizzare l'esposizione ai patogeni. I vaccini a virus vivo attenuato vengono severamente controindicati per il paziente e per i conviventi. Particolare attenzione viene posta alla prevenzione dell'infezione da Citomegalovirus (CMV): l'allattamento materno viene sospeso provvisoriamente introducendo latte artificiale, in attesa della sierologia materna (IgG/IgM). Se la madre risulta IgG positiva, l'allattamento materno rimane sospeso e il neonato è sottoposto a monitoraggio seriato per CMV-DNA (settimanale per 4 settimane). In caso di positività o alto

sospetto clinico viene instaurata tempestivamente la terapia con Valganciclovir. Sotto il profilo immunologico, se confermata una grave linfopenia T ($CD3 < 750/\mu L$, in particolare $CD4 < 300/\mu L$ o $CD8 < 250/\mu L$), viene avviata la terapia sostitutiva con immunoglobuline endovena (IVIG) o sottocute (SCIG) per mantenere livelli target di IgG $> 800 \text{ mg/dL}$. Si impostano inoltre profilassi antimicrobiche con Trimetoprim/Sulfametossazolo (o Pentamidina) per la prevenzione da *Pneumocystis jirovecii*, Fluconazolo per la profilassi fungina e l'anticorpo monoclonale Palivizumab nel periodo epidemico per VRS. In caso di ADA-SCID, si valuta la somministrazione di PEG-ADA (terapia enzimatica sostitutiva).

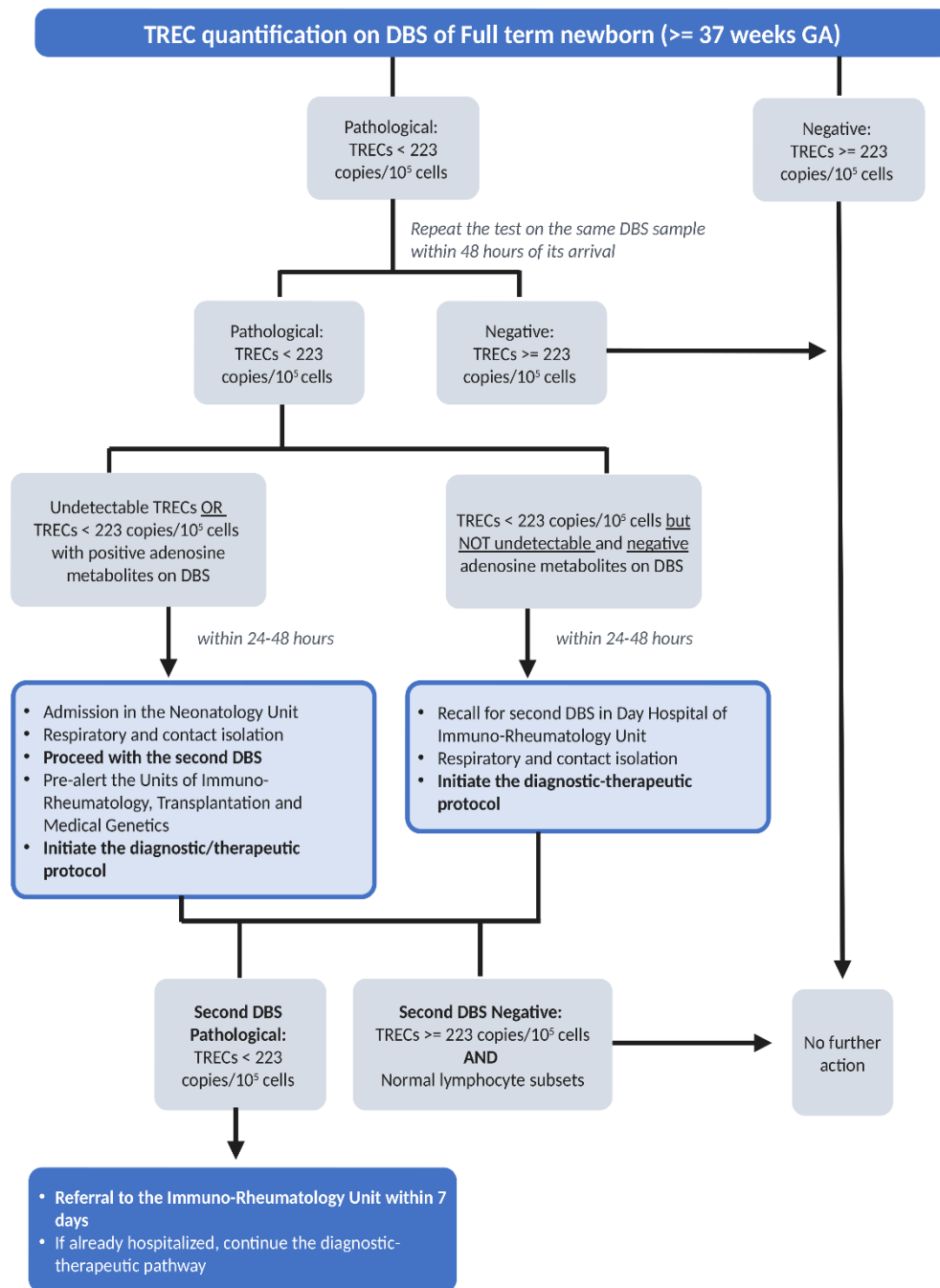


Figura VI: Algoritmo di screening e iter diagnostico per sospetta SCID nei nati a termine (≥ 37 settimane).

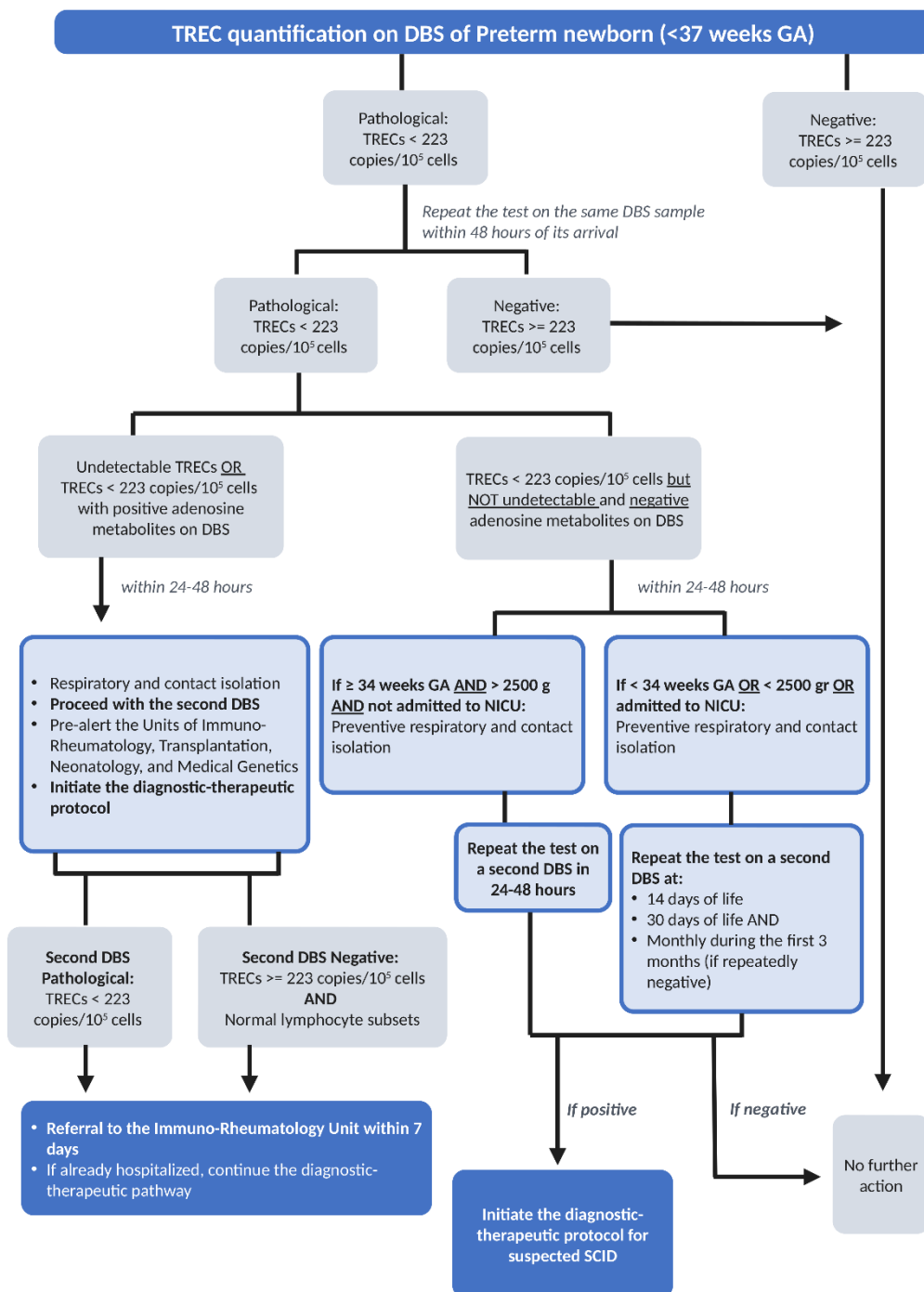


Figura VII: Algoritmo di screening e iter diagnostico per sospetta SCID nei nati pretermine (<37 settimane).

2.4 ALGORITMO PER DEFICIT ISOLATO DEI KREC (SOSPETTA AGAMMAGLOBULINEMIA)

Qualora si riscontri, al momento della nascita, un deficit isolato di KREC al di sotto del cut-off specifico, in presenza di normali livelli di TREC, i neonati vengono sottoposti a un secondo test sul medesimo DBS. Se il valore si conferma patologico, il paziente viene richiamato per un secondo DBS. Qualora l'anomalia persista senza alterazione dei TREC, viene programmata una visita per valutazione clinico-ematochimica approfondita presso il Centro Malattie Autoinfiammatorie e Immunodeficienze (valutazione di emocromo, sottopopolazioni linfocitarie con CD19, immunoglobuline). Per l'analisi delle principali popolazioni linfocitarie è stata impiegata la citofluorimetria a flusso, utilizzando un pannello standard TBNK comprensivo dei marcatori CD45, CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD19, CD16 e CD56. La differenziazione dei linfociti B è stata valutata specificamente mediante i marcatori CD45 e CD19. Nei casi caratterizzati da assenza di KREC, è stata inoltre valutata, ove richiesto, l'espressione della tirosina chinasi di Bruton (BTK). (Figura VIII)

L'acquisizione dei campioni citofluorimetrici è stata effettuata mediante citometro a flusso FACS Lyric (BD Biosciences), mentre l'analisi dei dati è stata condotta con il software FACS Suite (BD Biosciences). In base ai risultati dell'immunofenotipo, sono stati eventualmente condotti ulteriori accertamenti di secondo livello.

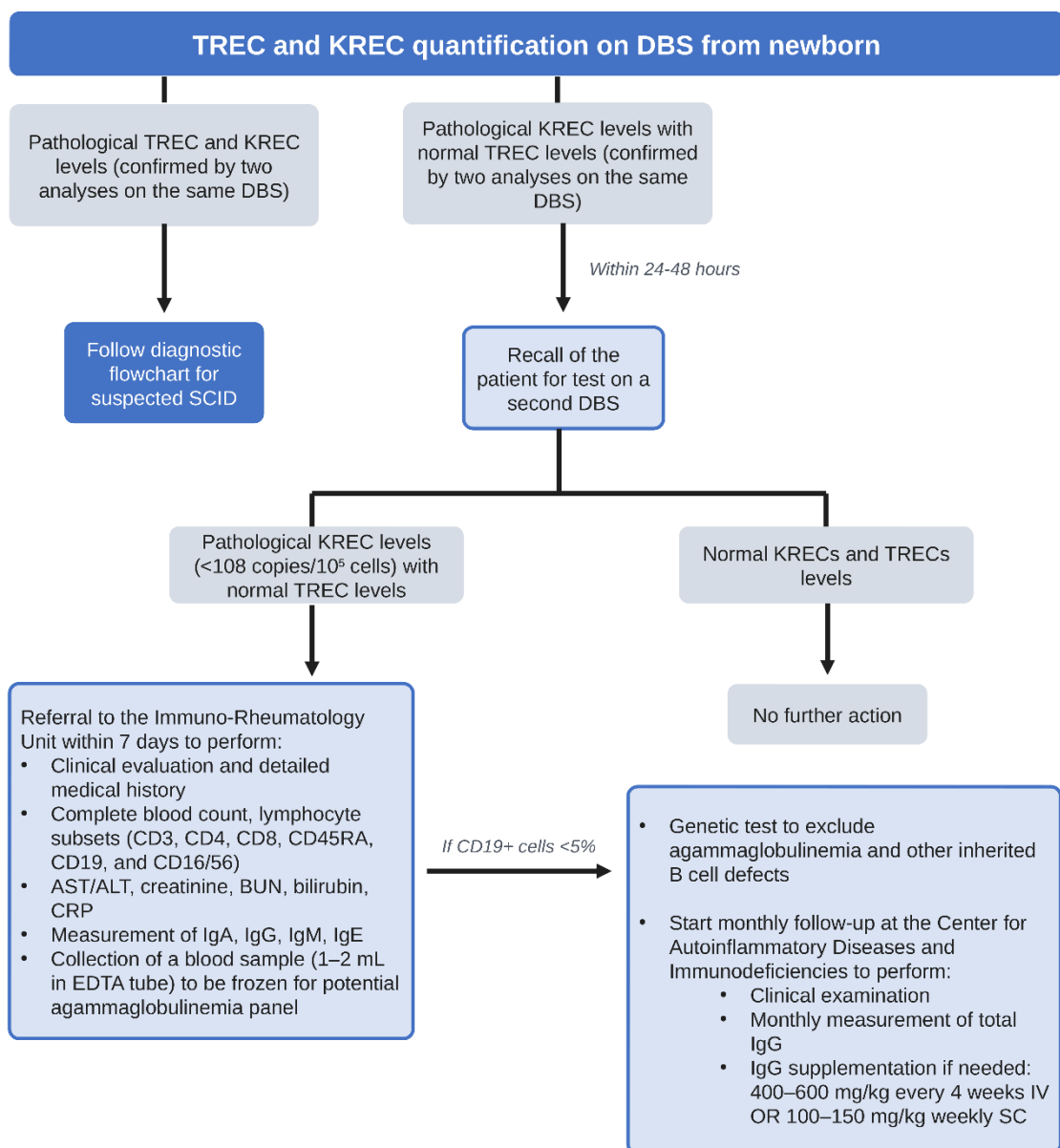


Figura VIII: Algoritmo di screening e iter diagnostico per deficit isolato dei KREC.

2.5 ANALISI GENETICA

Nei casi in cui il risultato dello screening per SCID o difetti B-cellulari venga confermato dall'analisi fenotipica e citofluorimetrica, oppure siano presenti caratteristiche sindromiche già alla prima visita si procede all'esecuzione del test genetico. Nel protocollo SCID, viene attivato un percorso genetico in "Fast Track" mirato all'identificazione tempestiva della mutazione per orientare le scelte terapeutiche (es. idoneità per terapia genica o HSCT). Il sequenziamento viene condotto mediante un pannello di esoma esteso (WES_v2, Sophia Genetics o similari) su piattaforma Illumina NextSeq, basato sull'analisi del trio familiare, per i geni correlati a SCID e a deficit primari degli anticorpi. Vengono eseguiti anche test di secondo livello come l'ibridazione genomica comparativa su array (Array-CGH) o l'ibridazione in situ (FISH) 22q11 ove indicato.

2.6 CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE

Ai fini dell'analisi retrospettiva dei casi, sono stati inclusi nello studio i neonati che soddisfacevano i seguenti criteri diagnostici aggiornati (PIDTC 2022):

Riscontro di valori patologici di TREC e/o KREC al test di screening neonatale confermati al retest.

Conferma immunofenotipica di linfopenia al TBNK periferico compatibile con quadro di sospetta SCID, definita come conta dei linfociti T CD3+ < 300/ μ L oppure cellule T CD3+CD4+ naïve (CD45RA+) < 20%, in associazione a deficit dei TREC, oppure quadro confermato di agammaglobulinemia/linfopenia B.

Assunzione in carico da parte dei centri specializzati regionali per avvio iter terapeutico (profilassi, immunoglobuline, HSCT o terapia genica). Sono stati esclusi dallo studio i casi in cui l'alterazione del DBS si è rivelata un falso positivo risolto fisiologicamente al follow-up a breve termine senza necessità di interventi immunologici specifici, e i neonati esposti a terapia immunosoppressiva materna nota durante la gravidanza.

2.7 FOLLOW-UP

Tutti i neonati con screening positivo confermato (n=6) sono stati sottoposti a follow-up clinico e diagnostico immediato presso l'IRCCS Istituto Giannina Gaslini; nessun paziente è stato perso al follow-up nel corso dei cinque anni di studio. I test molecolari di conferma sono stati eseguiti su un nuovo campione di sangue periferico, anziché sul DBS originalmente utilizzato per lo screening, in modo da garantire l'accuratezza diagnostica. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Liguria (protocollo n. CER Liguria 366/2020) e condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki; il consenso informato scritto è stato acquisito dai genitori o tutori legali di tutti i partecipanti.

2.8 ANALISI STATISTICA

Le analisi statistiche sono state condotte mediante il software SPSS. È stata eseguita un'analisi statistica descrittiva completa, volta a sintetizzare le principali variabili cliniche (tempi di screening, tassi di richiamo, incidenza cumulativa, tempistiche di trapianto) e a fornirne una panoramica distributiva in termini di esito a 5 anni.

RISULTATI

3.1 PROGRAMMI DI SCREENING SCID ATTIVI NEL MONDO

I risultati del programma ligure si inseriscono in un panorama internazionale in cui sono presenti diverse altre esperienze di screening neonatale per le SCID. Tutti i programmi condividono l'impianto metodologico basato sui TREC, ma differiscono per il pannello di patologie incluse, per le soglie diagnostiche e le strategie di conferma.

3.1.1 TOSCANA

Il programma toscano, attivo su base regionale, ha analizzato, tra il 2018 e il 2022, 94.319 neonati utilizzando una strategia estesa con TREC+KREC+metaboliti ADA/BNP tramite spettrometria di massa tandem. Il cut-off diagnostico è stato fissato a un valore di ciclo soglia (Ct) di 35,5, corrispondente a circa 25 copie/ μ L per i TREC e 10 copie/ μ L per i KREC. Nel periodo considerato per 393 neonati, lo 0,42%, è stato necessario ripetere il test di screening a causa di valori anomali di TREC, mentre per 364, lo 0,38%, è stato necessario ripeterlo a causa dei valori di KREC. Il valore predittivo positivo (VPP) complessivo dello screening è stato del 10,5%, mentre se calcolato solo sui TREC il VPP sale al 12,5%. Il tasso di richiamo è stato dello 0,1% e l'incidenza complessiva di IEI è stato 1 caso ogni 9.432 nati. In particolare, i TREC hanno permesso 7 diagnosi su 10 con un'incidenza quindi di 1:13.474. (38)

3.1.2 REGIONE PAYS DE LA LOIRE

In Francia, lo studio NEOSKID condotto nella regione Pays de la Loire ha analizzato dal 2019 al 2023, utilizzando solamente i TREC, 156.892 neonati. Il cut-off era fissato a 11 copie/ μ L per i neonati a termine e 6 copie/ μ L per i pretermine; risultati compresi tra 11 e 17 copie/ μ L erano considerati non conclusivi e comportavano un

secondo prelievo, necessario in 395 casi, 0,25% del totale, rivelatosi positivo in 19 casi su 395. Il tasso di positività al primo test è stato dello 0,046%, il tasso di falsi positivi, neonato con screening positivo e linfopenia non confermata alla consulenza, è stato dello 0,043%. Durante lo studio sono stati inviati a consulenza 92 neonati. Di questi: 3 erano SCID conclamate, con un'incidenza quindi di 1:50.000, sovrapponibile ai dati dello studio nazionale francese precedente (DEPISTREC, 2015-2017), e un VPP del 3,3%; mentre 13 erano linfopenie T clinicamente significative, con un'incidenza di linfopenia T significativa di 1:13.260 nati e un VPP del 14,1%. (39)

3.1.3 SVIZZERA

Il programma svizzero ha sottoposto a screening, utilizzando la combinazione TREC+KREC, dal 2019 al 2023 435.985 neonati riportando un tasso di richiamo complessivo dello 0,09% e un tasso di invio a valutazione specialistica dello 0,025%, più basso rispetto a quello ligure. I cut-off diagnostici utilizzati sono stati rivisti nel corso del programma: dal 2019 al 2020 hanno utilizzato per i TREC <10 copie/punch e per i KREC <6 copie/punch; successivamente sono stati abbassati a <6 copie/punch per i TREC e <4 copie/punch per i KREC. A seguito dell'abbassamento dei cut-off si è registrata una riduzione del tasso di richiamo, senza però una parallela riduzione del tasso di invio a valutazione clinica. Questo mostra come l'inasprimento della soglia diagnostica abbia selettivamente ridotto i falsi positivi, mantenendo la sensibilità del test invariata. Il VPP di un risultato anomalo al primo DBS è stato del 3,2% per SCID/atimia isolate e del 16% per qualsiasi IEI; se si considera invece il VPP calcolato sui soli neonati effettivamente inviati a valutazione clinica, il valore sale rispettivamente al 12% e al 61%. Un salto netto che riflette l'efficacia del processo di retest nel filtrare i falsi positivi prima dell'invio specialistico. Da sottolineare anche il fatto che l'aggiunta dei KREC abbia permesso l'identificazione di 8 casi di agammaglobulinemia e 1 caso di atassia-teleangectasia, patologie che non sarebbero state intercettate usando solamente il test con i TREC. (40)

3.1.4 GERMANIA

In Germania lo screening per le SCID è stato introdotto a livello nazionale nel 2019 e successivamente nel 2021 è stato integrato con SMA e drepanocitosi tramite un saggio PCR quantitativa (RT-PCR) multiplex che analizza simultaneamente TREC, delezione di SMN1 e allele HbS su un'unica piastra. Sono stati analizzati 96.015 neonati identificando 2 casi di SCID. Il cut-off utilizzato per i TREC è stato il 2,5° percentile della popolazione di riferimento, corrispondente a circa 5 copie/punch. Un aspetto metodologico rilevante riguarda il rischio di contaminazione crociata da polvere generata durante la perforazione del cartoncino DBS: su campioni negativi intercalati a campioni positivi, è stata rilevata contaminazione nell'8% dei casi con il metodo qPCR e nel 21% dei casi con il sistema endpoint PCR EnLite, un dato che ha portato alla raccomandazione di ripetere tutti i risultati con Ct >31, anziché fissare un cut-off più permissivo. (41)

3.1.5 CALIFORNIA

Negli Stati Uniti l'esperienza californiana resta il riferimento per ampiezza campionaria: 3.252.156 neonati sottoposti a screening tra il 2010 e il 2017. Durante questo periodo sono stati identificati 50 casi di SCID, con un'incidenza attestata a 1:65.000, intervallo di confidenza (IC) 95% 1:51.000-1:90.000, e un'incidenza di linfopenia T clinicamente significativa di 1:15.300, con una sopravvivenza post-trattamento del 94%. Il cut-off TREC prevedeva tre fasce: risultato normale, >18 copie/uL; risultato positivo urgente, indosabile o <4 copie/uL, che innescava un immediato richiamo per prelievo ematico; e risultato positivo, 4-18 copie/uL. Il VPP per la SCID è stato dell'8,9% che sale al 37,9% se si considerano tutte le linfopenie T clinicamente significative. Il tasso di invio registrato è stato dello 0,017%, con 562 neonati inviati. Da segnalare che i risultati positivi urgenti si sono rivelati particolarmente predittivi: 38/82, 46%, avevano SCID e 21, 26%, una linfopenia T non-SCID; il VPP combinato è quindi del 72%. (42)

3.1.6 RUSSIA

Il programma russo, attivo dal 2023 è il più recente tra quelli analizzati, non ostante questo nei primi due anni ha già analizzato 2.348.872 neonati utilizzando un test combinato TREC+KREC. Il tasso di positività riscontrato al primo livello è stato dello 0,35% mentre il tasso di invio complessivo è stato dello 0,023%. Sono stati diagnosticati 191 casi di IEI severe, l'incidenza complessiva delle IEI si attesta quindi su 1:12.298 (IC 95% 1:10.672-1:14.247). Di questi 191, 37 erano SCID, con un'incidenza quindi di 1:63.483 (IC 95% 1:46.057-1:90.163) e 16 agammaglobulinemia X-linked da difetto di BTK, incidenza 1:146.804. Rilevante il fatto che il 16% dei neonati che hanno poi ricevuto una diagnosi avevano un'anamnesi familiare positiva, spesso con casi non diagnosticati tra fratelli o genitori. Questo sottolinea come lo screening possa anche avere un'influenza sui casi familiari misconosciuti a partire dei neonati analizzati. (43)

3.1.7 SVEZIA

Lo studio svedese analizza il primo anno di introduzione dello screening neonatale su base nazionale, da agosto 2019 ad agosto 2020. Il programma è stato condotto analizzando TREC+KREC su 115.786 neonati e ha portato all'identificazione di 3 casi di SCID, incidenza stimata 1:38.500, e di 21 casi complessivi di linfopenia T clinicamente significativa. Le prestazioni del test di screening riguardo la SCID sono state: sensibilità 100%, specificità 99,94%, VPP 4,11%; per la linfopenia T il VPP saliva a 28,27%. Questi dati confermano la tendenza del VPP a migliorare sensibilmente se si prendono in considerazione tutte le linfopenie T clinicamente significative, evidenziabili con il test di screening, rispetto alla sola SCID, a causa della sua intrinseca rarità come patologia. (44)

3.1.8 NUOVA ZELANDA

Il programma neozelandese è attivo dal dicembre 2017, considerando il periodo fino a novembre 2020 ha analizzato 191.075 neonati utilizzando un test con i TREC. Durante questo periodo sono stati identificati 2 casi di SCID, incidenza 1:95.500, e

19 ulteriori casi di linfopenia non SCID, tra cui un caso di sindrome di DiGeorge. Un aspetto di particolare interesse discusso dagli autori riguarda la marcata eterogeneità di sensibilità, specificità e VPP a seconda della definizione di "test positivo" adottata e del sito di prelievo del test. Particolarmente marcata la differenza tra i test eseguiti in comunità e in terapia intensiva neonatale (TIN), dove i tassi di risultati positivi a seguito del primo test erano 35 volte superiori in TIN. Questo pone l'accento sulla necessità di definizioni uniformi per consentire un reale confronto internazionale, tema ripreso anche dalla revisione europea di Blom et al. già discussa in precedenza. (18,45)

3.1.9 GIAPPONE

Il programma giapponese si è sviluppato a partire dal 2020 su base prefettizia e progressivamente è stato esteso su base nazionale, fino al 2024 quando la copertura è arrivata al 97,7%. Tra il 2020 e il 2025 sono stati sottoposti a screening 1.380.634 neonati con la combinazione TREC+KREC. Il programma giapponese, a causa della decentralizzazione iniziale, mostra una situazione mista per quanto riguarda il protocollo di screening. 30 laboratori hanno analizzato nel complesso 1.348.062 neonati e il loro protocollo prevedeva la ripetizione sistematica del test di screening ad una prima positività. In questi laboratori 3.425 neonati, lo 0,25%, hanno richiesto la ripetizione del test, di questi 687, lo 0,05% sono risultati nuovamente positivi e quindi sono stati inviati a definizione diagnostica. 2 laboratori, invece, non prevedevano un secondo test di conferma, e hanno analizzato 32.572 neonati di cui 182, lo 0,56%, sono risultati positivi e inviati direttamente per la conferma diagnostica. I neonati complessivamente inviati sono quindi 869 e il tasso di invio del programma giapponese risulta quindi dello 0,06%. Il programma ha portato nel complesso a 40 diagnosi: 15 SCID, incidenza 1:92.042; 16 agammaglobulinemia X-linked o altre forme di agammaglobulinemia, incidenza 1:86.290; e 9 linfopenie T severe non-SCID, incidenza 1:153.404. La sopravvivenza globale a un follow-up mediano di 18 mesi è stata del 98%. Gli autori sottolineano come i tassi di invio dei laboratori in cui veniva sistematicamente ripetuto il test di screening in seguito ad una prima positività siano risultati significativamente più

bassi rispetto ai laboratori in cui non si ripeteva il test. Questo conferma l'importanza dell'algoritmo di conferma nel contenere il numero di falsi positivi. (46)

3.1.10 UCRAINA

In Ucraina un progetto pilota condotto nella regione di Ternopil ha analizzato 10.350 neonati con la combinazione TREC+KREC. Lo studio ha anche confrontato due diverse soglie di cut-off, 5.000 e 2.000 copie/10⁶ cellule a causa del tasso di ritest del 7,6% ottenuto usando il cut-off più permissivo e giudicato troppo elevato. Sono stati inviati a valutazione clinica 3 neonati di cui uno affetto da immunodeficienza combinata. Sebbene la ridotta dimensione del campione non permetta stime affidabili sull'incidenza, lo studio è un utile esempio di come i programmi pilota nei paesi ad implementazione più recente calibrino progressivamente le soglie diagnostiche sulla base dell'esperienza sul campo. (47)

3.1.11 BRASILE

Lo studio brasiliano di Barreiros et al., analizzando retrospettivamente 47 pazienti con SCID diagnosticati tra il 2009 e il 2020 sulla base del solo sospetto clinico o anamnestico, offre un paragone estremamente interessante. L'età mediana alla diagnosi è stata di 6,5 mesi e al trattamento di 11,5 mesi: un ritardo diagnostico-terapeutico importante paragonato ai programmi di screening neonatale analizzati che si riflette con una sopravvivenza complessiva di appena 51,1%, sensibilmente inferiore di quella riportata nei vari programmi analizzati. Secondo gli autori, in Brasile, almeno l'80% dei casi di SCID sfugge tutt'ora alla diagnosi. Questo confronto quantifica concretamente il costo in vite umane della diagnosi tardiva, supportando enormemente l'introduzione dei programmi di screening neonatale. (48)

3.1.12 CATALOGNA

Il programma catalano ha analizzato dal 2017 al 2023 420.263 neonati utilizzando i TREC. Il cut-off utilizzato è stato di 20 copie/mL ed ha portato ad un tasso di positività dello 0,02%, avendo individuato 105 neonati. Il tasso di falsi positivi riportati è stato dello 0,008%, 33 casi. Dei 105 neonati positivi allo screening 9 erano casi di SCID e 53 neonati presentavano una linfopenia T non-SCID. L'incidenza della SCID è quindi stata di 1:46.753 mentre l'incidenza della linfopenia T non-SCID di 1:7.939. La sopravvivenza globale a lungo termine è stata dell'88%, l'età mediana alla diagnosi è stata di 9 giorni e l'età mediana di avvio della terapia definitiva di 3 mesi. Le terapie utilizzate sono state: HSCT, terapia genica e trapianto di timo. Interessante notare come i pazienti affetti da linfopenia T idiopatica durante il follow-up nel lungo termine non hanno sviluppato complicanze infettive o autoimmuni significative: un dato rassicurante riguardo la prognosi di questo sottogruppo di pazienti spesso motivo di incertezza gestionale, come discusso anche dalla revisione di Blom et al. (18,49)

3.1.13 SINTESI DEL CONFRONTO

Da questo confronto si osserva che l'incidenza delle SCID si attesta, nella maggior parte dei programmi, in un intervallo compreso tra 1:38.000 e 1:95.000 nati vivi, mentre l'incidenza complessiva delle linfopenie T clinicamente significative, includendo anche le SCID, sia sistematicamente più alta: nell'ordine di 1:9.000-1:15.000. Questo a conferma dell'elevata sensibilità del test basato sui TREC che comporta l'identificazione di un numero più ampio di condizioni rispetto al solo target primario, con ricadute positive in termini di diagnosi precoce anche per altre immunodeficienze e sindromi associate a compromissione timica.

Paese/ Regione	Tipo programma	Periodo	Anni	Metodo	N. screenati	N. test iniziali anomali	N. secondo DBS/retest	N. inviati a conferma	N. SCID confermate	Altre IEI	Referral rate (%)	PPV SCID (%)	SCID/ 100.000	Cutoff TREC	Cutoff KREC	Rif.
Toscana	Regionale	2018-2022	5	TREC + KREC + TMS ADA/PNP	94.319	393 (TREC) +364 (KREC)+4 (ADA/PNP)	idem (coincide con retest)	95	4	6	0,1	4,2	4,24	35,5 Ct (≈25 copie/μL)	35,5 Ct (≈10 copie/μL)	38
Pays de la Loire	Regionale	2019-2023	5	TREC	156.892	73 (I DBS)	395	92	3	10	0,059	3,3	1,91	≤11 copie/μL (a termine); ≤6 (pretermine)	n.a.	39
Svizzera	Nazionale	2019-2023	5	TREC + KREC	435.985	409	~392	103	11	51	0,025	11	2,52	<10 (2019-20) poi <6 (2021-23) copie/punch	<6 (2019-20) poi <4 (2021- 23) copie/punch	40
Germania (Heidelberg)	Multicentrico (pilota)	2021-2022	2	TREC + SMN1 + HBB multiplex	96.015	n.d.	n.d.	n.d.	2	1	n.d.	n.d.	2,08	5 copie/punch (2,5° percentile)	n.a.	41
California	Statale	2010-2017	8	TREC	3.252.156	562	incluso	562	50	163	0,017	8,9	1,54	≤3 (urgente)/4-18 (positivo) copie/μL	n.a.	42
Russia	Nazionale	2023-2025	3	TREC + KREC	2.348.872	8.329 (0,35%)	7.208 (2° liv.)	698	37	154	0,03	5,3 (su inviati)	1,58	100 copie/10 ⁵ cellule	100 copie/10 ⁵ cellule	43
Svezia	Nazionale	2019-2020	2	TREC + KREC + ACTB	115.786	n.d.	n.d.	73	3	18	0,063	4,11	2,59	≤15 - ≤10 copie/pozzetto (retest)	n.d.	44
Nuova Zelanda	Nazionale	2017-2020	4	TREC	191.075	101	34 (risolti)	35	2	21	0,029	5,7	1,05	≤18 copie/μL (urgente ≤5)	n.a.	45
Giappone	Nazionale (decentr.)	2020-2025	6	TREC + KREC	1.380.634	3.607	3.425 (0,25%)	869	15	25	0,06	1,7	1,09	eterogeneo (per laboratorio)	eterogeneo (per laboratorio)	46
Ucraina (Ternopil, pilota)	Pilota monocentrico	2020-2022	3	TREC + KREC	10.350	366 (7,6%, studio 1)	45	3	0	1 (CID)	0,029 (1:3.450)	n.a.	0	5.000 - 2.000 copie/10 ⁵ cellule	5.000 - 2.000 copie/10 ⁵ cellule	47
Catalogna	Regionale (primo in Europa)	2017-2023	7	TREC	420.263	105 (0,02%)	n.d.	105	8 (+1 attimia)	53	0,025	8,6	2,14	20 copie/mL	n.a.	49
Liguria	Regionale	2021-2025	5	TREC + KREC + ADA/PNP	32.289	654 (2%)	28 (0,09%)	6	2	4	0,019	7,1	6,19	223 copie/10 ⁵ cellule	108 copie/10 ⁵ cellule	(studio proprio)

Figura IX. Sintesi del confronto.

3.2 ANALISI DEL PROGRAMMA LIGURE

Nel periodo di osservazione del programma di screening, dal 4 settembre 2021 fino al 31 agosto 2025, sono stati analizzati 32.289 campioni di sangue prelevati su cartoncino di Guthrie (dried blood spot, DBS) da neonati della regione Liguria. Il tasso di adesione è stato del 99,8%. Dei 32.289 neonati sottoposti a screening, 654 (2%) sono risultati positivi al primo test di screening. A seguito della ripetizione del test sul medesimo DBS è stato necessario per 28 neonati (0,087%) richiedere un secondo DBS a causa di risultati borderline o non conclusivi. Di questi, 22 sono risultati negativi dopo il secondo test di screening, gli altri 6 sono invece risultati nuovamente positivi e di conseguenza inviati ad una valutazione clinica. Il valore predittivo positivo (VPP) del test è stato quindi del 21,4%, pertanto la performance della strategia di screening adottata è stata soddisfacente.

I neonati risultati nuovamente positivi e inviati a valutazione clinica hanno poi ricevuto diagnosi di una patologia oggetto dello screening.

- 2 sono risultati affetti da una immunodeficienza combinata grave da deficit di ADA, che rappresenta la principale patologia bersaglio del programma di screening;
- 1 è risultato affetto da linfopenia T idiopatica;
- 1 è risultato affetto da sindrome di DiGeorge;
- 1 è risultato affetto da linfopenia B transitoria;
- 1 è risultato affetto da agammaglobulinemia congenita da deficit di IGLL1.

Nei sei casi di immunodeficienza positivi allo screening i valori di TREC e KREC erano espressione delle loro diagnosi. Il paziente con linfopenia T idiopatica presentava 113 copie di TREC/ 10^5 cellule e 4472 copie di KREC/ 10^5 cellule mentre il paziente con sindrome di DiGeorge presentava 148 TREC/ 10^5 cellule e 3402 KREC/ 10^5 cellule. Dei due casi di ADA-SCID il primo mostrava livelli non rilevabili sia di TREC che di KREC mentre il secondo livelli marcatamente ridotti ma rilevabili: 142 TREC/ 10^5 cellule e 26 KREC/ 10^5 cellule. Il soggetto con linfopenia B transitoria presentava normali valori di TREC, 1397 copie/ 10^5 cellule, e KREC assenti, 0 copie/ 10^5 cellule, mentre il paziente con agammaglobulinemia congenita

da deficit di IGLL1 mostrava valori normali di TREC e KREC assenti, 0 copie/10⁵ cellule.

Tutti i neonati con screening positivo confermato (n=6) sono stati inviati presso l'IRCCS Istituto Giannina Gaslini per essere sottoposti a follow-up diagnostico e clinico. Nessun paziente è stato perso durante il follow-up. Al fine di garantire l'accuratezza diagnostica i test molecolari di conferma sono stati eseguiti su un campione di sangue periferico prelevato ex novo, invece del DBS precedentemente utilizzato per lo screening.

L'età mediana al richiamo clinico è stata di 15 giorni (range 7-30); che scende a 13 giorni (range 7-22) se consideriamo solo i pazienti con deficit T-cellulari. La positività ai test è stata comunicata alle unità cliniche entro 24 ore, riuscendo così a garantire la valutazione clinica entro 24-48 ore dalla comunicazione del referto. Il tempo mediano trascorso tra il richiamo e la diagnosi è stato di 20 giorni per le immunodeficienze (range 12-56), che scende a 14 giorni (range 12-26) se consideriamo solo i difetti T-cellulari. Durante i 5 anni dello studio non sono stati segnalati falsi positivi, definiti come neonati sani inviati alla valutazione clinica, né falsi negativi da parte delle unità cliniche.

3.2.1 PAZIENTE 1

Il primo caso con bassi livelli di TREC, diagnosticato nel marzo 2022, riguardava una neonata a termine (41+3) (P1), dal peso alla nascita di 3000g, primogenita, con anamnesi familiare silente per patologie infettive. È stata richiamata a 22 giorni per la ripetizione del test di screening risultato, poi, nuovamente positivo e per l'esecuzione dell'emocromo e delle sottopopolazioni linfocitarie tramite citofluorimetria a flusso, che risultavano al di sotto dei limiti.

A quattro settimane di vita è stata eseguita una visita di controllo in cui si evidenziava un buon andamento clinico, senza evidenza di processi infettivi significativi e regolare accrescimento. In quell'occasione vengono anche eseguiti gli esami ematici con funzionalità epatica e renale, risultati nei limiti, dosaggio delle immunoglobuline (Ig), tampone multiplex per virus, dosaggio citomegalovirus (CMV) su sangue e

urine tutti negativi. Viene anche verificata la presenza della delezione 22q11.2 tramite ibridazione in situ (FISH) e viene avviato un Next Generation Sequencing (NGS) per SCID: entrambi risultati negativi.

A due mesi di vita è stata eseguita un'ecografia del timo, che ha mostrato un ridotto volume dell'organo, ed è stata avviata una profilassi antibiotica con Bactrim 0,7ml 2 volte al giorno, un giorno a settimana.

Il quinto mese di vita è stato eseguito un nuovo controllo in cui i genitori riferivano un buon andamento clinico, buona crescita staturo-ponderale, salvo la circonferenza cranica (CC) che risultava inferiore al 5° centile e sviluppo psicomotorio conservato. Le sottopopolazioni linfocitarie confermavano il quadro di linfopenia T non severa, con linfociti T CD4+ inferiori a 750/uL, per cui si decide di proseguire la profilassi con Bactrim. In parallelo era anche stata avviata un'analisi genetica la quale aveva evidenziato due duplicazioni parziali nella regione Xp22.33 su un braccio corto di un cromosoma X e una delezione parziale del braccio corto del cromosoma 20 nella regione 20p11.22. A seguito di questi risultati veniva richiesta un'ibridazione genomica comparativa su microarray (CGH-Array) anche dei genitori.

Il referto del CGH-Array dei genitori evidenziava la derivazione paterna di una delle due duplicazioni della regione Xp22.33, mentre l'altra duplicazione della regione Xp22.33 e la delezione della regione 20p11.22 risultavano di derivazione materna. Tuttavia, sulla base dei dati disponibili in letteratura, queste mutazioni risultano di incerto significato.

A tredici mesi di vita sono stati nuovamente eseguiti gli esami ematochimici in cui emergeva una popolazione di granulociti neutrofili ai limi inferiori, mentre i linfociti totali risultavano nella norma. Vengono anche ricercati tramite PCR il virus di Epstein-Barr (EBV) su sangue e il CMV su sangue e urine, ma non si riscontravano positività. Dal punto di vista immunologico si riscontrava un aumento delle IgG, rimanendo però nei limiti per l'età, valori ridotti di IgA, con l'indicazione a monitorarli nel tempo, e normali valori di IgM. Alle sottopopolazioni linfocitarie persisteva la riduzione non severa dei linfociti T, stabile rispetto ai controlli precedenti. Alla luce di questi valori non si dava indicazione per le vaccinazioni con

vaccini vivi attenuati. Considerata l'assenza di infezioni intercorrenti nei primi mesi di vita la profilassi antibiotica veniva sospesa.

A marzo 2024 è stato effettuato l'ultimo controllo in cui veniva confermata la linfopenia con riduzione di tutte le sottopopolazioni linfocitarie e persisteva il deficit parziale di IgA.

Alla luce della stabilità del quadro clinico e laboratoristico e della crescita soddisfacente, si stabiliva di proseguire i controlli con cadenza annuale. Permaneva la controindicazione alla somministrazione di vaccini vivi attenuati.

Al termine del follow-up e del processo diagnostico alla paziente è stata posta diagnosi di linfopenia T idiopatica.

Paziente 1	Valori a 22 giorni di vita	Valori a 3 anni di età
Diagnosi	Linfopenia T idiopatica	Linfopenia T idiopatica
Linfociti totali cellule/uL	3860 (3400-7600)	1800 (2300-5400)
CD3+ cellule/uL	817 (2500-5500)	670 (1400-3700)
CD3+ CD4+ cellule/uL	542 (1600-4000)	385 (700-2200)
CD3+ CD8+ cellule/uL	258 (560-1700)	162 (490-1300)
CD19+ cellule/uL	1974 (300-2000)	686 (390-1300)
CD56+ CD16+ CD3- cellule/uL	1014 (170-1100)	389 (130-720)
IgA mg/dL	9	31
IgM mg/dL	34	86
IgG mg/dL	573	611

Tabella I. Profilo citofluorimetrico della prima paziente affetta da linfopenia T idiopatica.

3.2.2 PAZIENTE 2

A gennaio 2023 una seconda neonata a termine (38+5) (P2), dal peso alla nascita di 3030g, è stata richiamata dopo 17 giorni dallo screening a causa di bassi livelli di TREC.

A ventiquattro giorni di vita è stata eseguita la prima valutazione ambulatoriale, come previsto dal protocollo, in cui la citofluorimetria a flusso ha mostrato una linfopenia CD3.

In una seconda visita, ad 1 mese di vita sono stati eseguiti:

- Next-Generation Sequencing (NGS) fast track SCID: che evidenziava una delezione del gene TBX1 in eterozigosi sul cromosoma 22q11.2 non presente nei genitori e una variante di significato ignoto SP110 c.1531g>A in eterozigosi ereditata dalla madre.
- FISH 22q11: che evidenziava una delezione parziale del braccio lungo di un cromosoma 22 a livello della banda q11.2 compatibile con la sindrome di DiGeorge. La diagnosi è stata posta 26 giorni dopo il richiamo.

A seguito di questi risultati è stata avviata profilassi antibiotica con Bactrimel e sono state eseguite una valutazione cardiologica, che non evidenziava segni di patologia strutturale o funzionale, ortopedica, che evidenziava un metatarso varo bilateralmente e un'ecografia delle anche.

A seguito della diagnosi la paziente è stata presa in carico per il proseguimento dell'iter diagnostico-terapeutico per linfopenia T in sindrome di DiGeorge.

Nella successiva visita di follow-up sono stati effettuati prelievi per esami ematici, in cui si evidenziava un'anemia microcitica ipocromica, già rilevata precedentemente dopo avvio della profilassi con Bactrimel. Alle sottopopolazioni linfocitarie persisteva la linfopenia T CD4+ e CD8+ per cui si dava indicazione a proseguire la profilassi antibiotica invariata.

A otto mesi di vita veniva eseguita una nuova visita di follow-up in cui alla valutazione clinica si segnalavano buone condizioni generali con solamente lieve rinite per cui erano già in atto lavaggi nasali e terapia aereosolica. Gli esami ematochimici mostravano normale assetto marziale e livelli di immunoglobuline nei limiti per età. Le sottopopolazioni linfocitarie confermavano ridotti livelli percentuali sia di linfociti T totali che delle sottoclassi CD4+ e CD8+. Veniva anche eseguita un'ecografia addominale che escludeva malformazioni a carico di reni e vie urinarie.

La paziente rimane regolarmente in follow-up.

Paziente 2		Valori a 1 mese di vita	Valori a 12 mesi di vita
Diagnosi		Sindrome di DiGeorge	Sindrome di DiGeorge
Linfociti	totali	2750 (3400-7600)	3720 (3400-9000)
cellule/uL			
CD3+ cellule/uL		861 (2500-5500)	34,0% (56-77)
CD3+ CD4+ cellule/uL		528 (1600-4000)	20,9% (39-53)
CD3+ CD8+ cellule/uL		292 (560-1700)	8,3% (14-19)
CD19+ cellule/uL		946 (300-2000)	43,6% (17-23)
CD56+ CD16+ CD3- cellule/uL		811 (170-1100)	20,9% (6-8)
IgA mg/dL		49	47
IgM mg/dL		31	29
IgG mg/dL		534	430

Tabella II. Profilo citofluorimetrico della seconda paziente affetta da sindrome di DiGeorge.

3.2.3 PAZIENTE 3

Ad agosto 2023 è stato identificato il terzo caso (P3), una neonata anch'essa a termine (38+4), peso alla nascita 3140g, nata da genitori consanguinei, il cui fratello è deceduto in Moldavia all'età di 3 mesi per una polmonite presumibilmente da CMV. È stata richiamata a 7 giorni di vita dopo che erano stati rilevati livelli di TREC e KREC indosabili e un'elevata presenza di metaboliti dell'adenosina nel DBS: reperti che ponevano il sospetto di ADA-SCID.

Durante la prima visita è stato:

- Ripetuto il test di screening;
- Eseguito: emocromo, funzionalità renale ed epatica, sottopopolazioni linfocitarie, dosaggio IgG, IgA e IgM, CD45RA, indagine genetica fast-track per SCID e viruria per CMV;
- Avviata profilassi con fluconazolo 6 mg/kg ogni 48h per bocca;
- Data indicazione ad eseguire profilassi con aciclovir 12,5 mg/kg due volte al giorno per bocca se in contatto con soggetti con manifestazioni di herpes simplex;

- Avviata terapia sostitutiva con immunoglobuline 400 mg/kg ogni 21 giorni, volta a mantenere i valori di IgG superiori a 800 mg/dl.

Alla consulenza trapiantologica, a causa dell'assenza di un familiare HLA identico, non veniva data indicazione per HSCT, ma veniva proposta la terapia enzimatica sostitutiva in attesa della terapia genica.

I risultati dei test mostravano:

- Elevati livelli di D-adenosina;
- Livelli di adenosina normali;
- Elevati livelli di S-adenosilomocisteina;
- Elevati livelli di S-adenosilmetionina;
- Leucopenia, con spiccata linfopenia;
- IgA indosabili;
- IgM 9 mg/dl;
- IgG 727 mg/dl;
- CD45RA non determinabili a causa dell'assenza di linfociti T CD4+.

I test genetici avevano poi confermato una variante in omozigosi patogenetica per ADA-SCID (c.956_960del, p.Glu319Glyfs3), inoltre il Whole Exome Sequencing (WES) aveva evidenziato una nuova variante in omozigosi di CD3G (c.213dup, p.Trp72Metfs66).

Mutazioni bialleliche di CD3G sono state identificate in pazienti con fenotipo clinico variabile da: infezioni ad esordio precoce e fenomeni autoimmuni; fenomeni autoimmuni senza aumentata suscettibilità alle infezioni; fino ad immunodeficienza comune variabile ad esordio in età adulta. (50)

Tale riscontro evidenzia un raro caso di doppia diagnosi molecolare. Il deficit di ADA è stato considerato il principale determinante metabolico mentre il difetto di CD3G ha verosimilmente contribuito alla gravità della linfopenia T e del quadro clinico complessivo. La terapia enzimatica sostitutiva è stata iniziata il 12° giorno e la paziente è stata poi indirizzata verso una valutazione per intraprendere la terapia genica.

Paziente 3	Valori a 7 giorni di vita
Diagnosi	ADA-SCID
Linfociti totali cellule/uL	140
CD3+ cellule/uL	0
CD3+ CD4+ cellule/uL	0
CD3+ CD8+ cellule/uL	0
CD19+ cellule/uL	13
CD56+ CD16+ CD3- cellule/uL	127
IgA mg/dL	< 4
IgM mg/dL	9
IgG mg/dL	727

Tabella III. Profilo citofluorimetrico del terzo paziente affetto da ADA-SCID

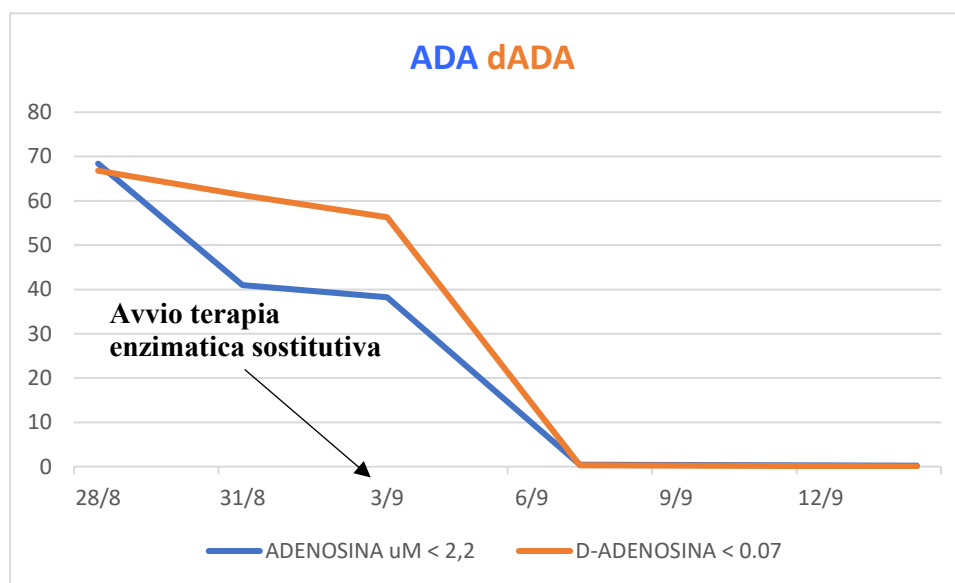


Figura X. Livelli di adenosina e d-adenosina plasmatici del terzo paziente affetto da ADA-SCID.

3.2.4 PAZIENTE 4

A novembre 2023 è stato identificato il quarto caso (P4), un neonato a termine (38+5) con anamnesi familiare silente per infezioni ricorrenti, richiamato a causa di bassi livelli di KREC con normali livelli di TREC.

Alla visita di richiamo venivano eseguiti gli esami ematochimici comprensivi di indagini immunologiche di primo livello. Le sottopopolazioni linfocitarie mostravano un difetto isolato di linfociti B, normalizzatosi poi dopo 3 mesi. Il WES ha evidenziato varianti in eterozigosi in TAPBP e ADA (Tabella IV). Il paziente rimane in follow-up senza aver manifestato infezioni significative.

Paziente 4	Valori alla visita di richiamo
Diagnosi	Linfopenia B transitoria
Linfociti totali cellule/uL	5850 (3400-7600)
CD3+ cellule/uL	5639 (2500-5500)
CD3+ CD4+ cellule/uL	4019 (1600-4000)
CD3+ CD8+ cellule/uL	---
CD19+ cellule/uL	23 (300-2000)
CD56+ CD16+ CD3- cellule/uL	176 (170-1100)
IgA mg/dL	50
IgM mg/dL	47
IgG mg/dL	817

Tabella IV. Profilo citofluorimetrico del quarto paziente affetto da linfopenia B transitoria.

3.2.5 PAZIENTE 5

Ad ottobre 2024 è stato identificato il quinto caso (P5), un neonato a termine (38+5), con un peso alla nascita di 3260g, primogenito, senza familiarità per problematiche infettive o mortalità precoce, richiamato e ricoverato presso il reparto di Malattie Infettive a 10 giorni di vita a causa di bassi livelli di TREC e KREC ed elevati livelli di metaboliti dell'adenosina.

Durante il ricovero è stata avviata la profilassi con Fluconazolo, Bactrim e immunoglobuline endovena (IVIG) come da protocollo. A causa della comparsa di tachi-dispnea con respiro paradossale e rientramenti sottocostali si predisponneva il

ricovero presso il reparto di terapia semintensiva per supporto respiratorio. Veniva anche avviata terapia enzimatica sostitutiva con enzima ricombinante Revcovi 0,2 mg/Kg due volte alla settimana con beneficio sulla dinamica respiratoria: questo ha reso possibile lo svezzamento dall'ossigeno terapia. Durante il ricovero, a causa della riattivazione del CMV, veniva avviata terapia con Ganciclovir endovena.

A otto settimane di vita agli esami ematici venivano riscontrati:

- Aumento dei linfociti totali 3780/uL;
- Piastrinosi 799000/uL;
- Neutropenia 850/uL;
- Modesto aumento delle transaminasi 64/54;
- Ricerca di CMV, EBV e adenovirus su sangue negativa;
- Multiplex virus e batteri negativi;
- Adenosina e suoi metaboliti nella norma.

A due mesi di vita gli esami ematici risultavano stabili eccetto la neutropenia in calo, 610/uL e la viremia per CMV che risultava di 6000 copie. Per cui veniva avviata terapia con Valganciclovir al dosaggio di 1,4 ml per 2 volte al giorno. Discusso il dato riguardante i neutrofili nel team multidisciplinare: in considerazione delle ottime condizioni generali e la normalità della funzionalità midollare per le altre serie, nonché normalità dei metaboliti ADA, si concordava di mantenere controllo clinico e degli esami aggiungendo il dosaggio per gli anticorpi anti-neutrofili, con il limite della terapia con IVIG in corso.

Alla visita di controllo effettuata a tre mesi di vita si riscontravano:

- Linfociti totali 2810/uL;
- Piastrinosi 880000/uL;
- Neutrofili 420/uL;
- Monociti 6/uL;
- Transaminasi 53/68;
- CMV negativo su sangue e urine;
- EBV e adenovirus negativi su sangue;
- Tampone multiplex negativo;

- Proteina C reattiva negativa;
- Anticorpi anti-neutrofili negativi.

Alla luce del peggioramento della neutropenia e della monocitopenia, da probabile tossicità midollare da valganciclovir e della negatività della ricerca virale su sangue e urine, si interrompeva la terapia con valganciclovir.

Ai controlli successivi persistevano buone condizioni cliniche generali e venivano proseguite la terapia enzimatica sostitutiva e la profilassi con Bactrim ed immunoglobuline endovena.

A sei mesi di vita venivano eseguiti gli esami in vista dell'avvio della terapia genica e si riscontrava:

- Buone condizioni generali;
- Conte emocromocitometriche stabili rispetto alle valutazioni precedenti;
- Il noto dato di neutropenia con valori di linfociti nei limiti;
- Valori di immunoglobuline, in terapia sostitutiva, in range per età.

A otto mesi di vita il paziente iniziava la mobilizzazione con Myelostim sottocute 5 ug/Kg ogni 12 ore, continuata fino al 24 giugno. Il 23 giugno veniva anche somministrato Plerixafor 1,9 mg e veniva intrapresa la prima procedura di leucoafèresi. La seconda procedura di leucoafèresi è stata eseguita il giorno successivo previa nuova somministrazione di Plerixafor.

A nove mesi e mezzo di vita veniva poi eseguita la terapia genica.

L'analisi genetica eseguita sul paziente ha rilevato varianti di ADA in eterozigosi composta. La diagnosi di ADA-SCID è stata confermata 14 giorni dopo il richiamo.

Paziente 5		Valori a 10 giorni di vita	Valori a 22 mesi di vita
Diagnosi		ADA-SCID	ADA-SCID
Linfociti	totali	460 (3400-7600)	1350 (3600-8900)
cellule/uL			
CD3+ cellule/uL		266 (2500-5500)	---
CD3+ CD4+ cellule/uL		137 (1600-4000)	---
CD3+ CD8+ cellule/uL		114 (560-1700)	---
CD19+ cellule/uL		19 (300-2000)	---
CD56+ CD16+ CD3- cellule/uL		43 (170-1100)	---
IgA mg/dL		0	21
IgM mg/dL		6	21
IgG mg/dL		667	1043

Tabella V. Profilo citofluorimetrico del quinto paziente affetto da ADA-SCID.

3.2.6 PAZIENTE 6

Ad agosto 2025 è stato identificato il sesto caso (P6), una neonata a termine (38+1), con un peso alla nascita di 2720g, senza familiarità per problematiche infettive o mortalità precoce. La neonata è stata richiamata a seguito di KREC indosabili su DBS.

Alla visita prima ambulatoriale, effettuata ad un mese di vita, si evidenziava un buon accrescimento staturale ponderale, agli esami ematochimici si evidenziava un'ipogammaglobulinemia, con presenza di IgG di origine materna, e riduzione dei linfociti B. Veniva inoltre avviata l'indagine genetica per ipogammaglobulinemia.

A due mesi di vita, alla valutazione immunologica, la bambina si presentava in ottime condizioni cliniche generali e in buon accrescimento staturale ponderale. Veniva data indicazione a rimandare la vaccinazione anti-rotavirus (vaccino con virus attenuato), mentre non c'erano controindicazioni per le vaccinazioni con i virus inattivi.

A quattro mesi di vita, veniva ricoverata per eseguire la prima infusione di immunoglobuline endovena, alla luce dell'iniziale calo delle IgG materne. L'infusione è stata ben tollerata. Durante il ricovero è stato comunicato il referto

dell'indagine genetica che mostrava una mutazione omozigote a carico del gene IGLL1 correlata con ipogammaglobulinemia e ridotti linfociti B, per tanto compatibile con il quadro clinico della paziente. Alla luce della diagnosi veniva confermata la controindicazione all'immunizzazione con vaccini vivi attenuati.

Per quanto riguarda il follow-up veniva comunicato alla famiglia il rischio infettivologico della bambina e la necessità di controlli periodici presso l'IRCCS Istituto Giannina Gaslini, veniva raccomandata la pronta valutazione clinica in caso di sintomatologia suggestiva per un quadro di natura infettiva. È stato infine eseguito un prelievo ematico di entrambi i genitori per lo studio della segregazione della variante riscontrata.

Paziente 6		Valori alla prima visita	Valori a 4 mesi di vita
Diagnosi		Agammaglobulinemia congenita da deficit di IGLL1	Agammaglobulinemia congenita da deficit di IGLL1
Linfociti cellule/uL	totali	5570 (3400-7600)	5470 (3900-9000)
CD19+		< 5%	---
IgA mg/dL		<4	<5
IgM mg/dL		11	56
IgG mg/dL		527	168

Tabella VI. Profilo citofluorimetrico del sesto paziente affetto da agammaglobulinemia congenita da deficit di IGLL1.

3.3 ANALISI COSTO BENEFICIO

3.3.1 COSTO DEL TEST DI SCREENING

Il costo del singolo test TREC, come riportato in letteratura, è piuttosto contenuto. Esso varia principalmente in base al volume di campioni processati e al grado di saturazione della strumentazione utilizzata.

Nello studio francese di Clément et al. del 2015, condotto presso il laboratorio di immunologia dell'ospedale di Nantes, il costo per test variava tra i 4,69€ e i 6,79€ per un volume di 33.800 campioni analizzati all'anno; la variazione di costo dipende dalla condivisione o meno dell'attrezzatura usata per lo screening con altre analisi. La quota dei costi fissi, ovvero della strumentazione, sul totale non superava il 30% e un volume di test inferiore ai 20.000 all'anno comportava un aumento del costo per campione di 2-4 volte a causa del conseguente aumento dei costi fissi. (51)

Dal lavoro di Saavedra-Matiz et al. del 2013, che descrive un metodo di estrazione del DNA da DBS utilizzato per il programma di screening dello Stato di New York, emerge come il costo dell'estrazione del DNA, fase preliminare necessaria per tutti i test su DBS, sia stato stimato a soli 0,10\$ per campione, con un tasso di fallimento dell'amplificazione dello 0,5%. La componente preanalitica, quindi, non rappresenta in nessun modo un ostacolo economico per l'implementazione su larga scala di questi test. (52)

3.3.2 ANALISI COSTO EFFICACIA

Lo studio olandese di Van der Ploeg et al. del 2019, condotto simulando una coorte di 100.000 neonati e utilizzando un modello di analisi decisionale, ha stimato che l'introduzione dello screening per le SCID nei Paesi Bassi ridurrebbe la mortalità per SCID da 0,57 a 0,23 casi ogni 100.000 nati vivi. Il guadagno stimato si attesterebbe quindi su 11,7 quality-adjusted life-years (QUALY) per coorte. Il costo sanitario complessivo, invece, risulterebbe superiore di 390.800€ paragonato allo scenario senza screening. Il costo efficacia incrementale (ICER) sarebbe, quindi, di 33.400€ per QUALY guadagnato: cifra ritenuta accettabile secondo le soglie di disponibilità

adottate in Europa. Gli autori sottolineano, però, un ampio margine di incertezza. (53)

Il modello statunitense di Ding et al. del 2016, applicato allo Stato di Washington su 86.600 nati all'anno ha stimato, basandosi sulle stime più attendibili, un ICER di 35.311\$ per anno di vita guadagnato con 1,19 casi aggiuntivi di SCID identificati in fase preclinica e 0,40 decessi evitati ogni anno grazie allo screening: valore al di sotto della soglia comunemente accettata di 50.000-100.000\$ per anno di vita salvato abitualmente utilizzata nelle valutazioni economiche statunitensi. (54)

3.3.3 ANALISI COSTO BENEFICIO

Lo stesso studio di Ding et al. ha condotto anche un'analisi costo beneficio utilizzando il Value of a Statistical Life (VSL) per quantificare economicamente i decessi evitati.

Con un VSL di 9.000.000\$ il beneficio netto è stato stimato in 3.190.000\$ all'anno, con un rapporto benefici/costi di 5,31: quindi per ogni dollaro speso nello screening se ne risparmiano 5,31 in termini di costi evitati e valore delle vite salvate. (54)

3.3.4 IL RUOLO DELL'INCIDENZA

Dello studio francese di Clément et al. è particolarmente rilevante il dato che emerge riguardo il calcolo dell'incidenza minima di SCID necessaria affinché lo screening si ripaghi in termini economici (breack-even). Il calcolo si è basato sul confronto diretto tra i costi di trattamento precoce e tardivo osservati nella pratica clinica.

Analizzando 30 pazienti trattati presso l'ospedale Necker di Parigi tra il 2006 e il 2010 è stato documentato un costo medio del HSCT eseguito dopo i 3 mesi di vita di 195.776€, a fronte dei 86.179€ per i trapianti eseguiti prima dei 3 mesi di vita. La differenza è quindi considerevolmente a favore della diagnosi precoce. Questo è dovuto alla minore necessità di terapia intensiva e alla minore incidenza di infezione attive al momento del trapianto.

Assumendo un costo per singolo test di 5€ ed una popolazione di 830.000 nati ogni anno, ovvero una dimensione paragonabile a Francia, Regno Unito, Germania e Italia, il costo totale dello screening ammonterebbe a 4.150.000€ all'anno. Dividendo questa cifra per il risparmio potenziale per caso identificato precocemente gli autori calcolano che l'incidenza di pareggio economico si attesterebbe su 1 caso ogni 20.000 nati vivi. Questo valore è superiore all'incidenza reale della SCID, che si attesta su 1 caso ogni 50.000-65.000 nati, il che implicherebbe un costo netto per il sistema sanitario.

Tuttavia, va sottolineato come questo calcolo non tenga conto del beneficio in termini di sopravvivenza; dato, che nelle analisi di Van der Ploeg et al, e Ding et al. risulta determinante nel rendere lo screening costo efficace. (51,53,54)

DISCUSSIONE

L'obiettivo di questa tesi è di analizzare i risultati dello screening neonatale per le immunodeficienze severe combinate a 5 anni dalla sua implementazione nella regione Liguria.

Durante il periodo di svolgimento del programma di screening neonatale per SCID della Regione Liguria, settembre 2021 – agosto 2025, sono stati analizzati 32.289 neonati, con un tasso di adesione del 99,8%. Il programma ha identificato 6 neonati affetti da una patologia target: 2 ADA-SCID, 1 sindrome di DiGeorge, 1 linfopenia T idiopatica, 1 linfopenia B transitoria e 1 agammaglobulinemia congenita da deficit di IGLL1. Le unità cliniche non hanno segnalato falsi positivi. L'età mediana al richiamo clinico è stata di 15 giorni (range 7-30) e la diagnosi per le immunodeficienze è stata posta a una mediana di 20 giorni dal richiamo (range 12-56), che scendono rispettivamente a 13 (range 7-22) e 14 (range 12-26) considerando solo i difetti T-cellulari.

Il tasso di positività al primo test è stato del 2%, 654 test positivi, più alto di quelli riportati in altri programmi in letteratura: queste misure sono però difficili da confrontare a causa dei diversi cut-off adottati. Le soglie diagnostiche liguri derivano dal primo percentile di una coorte di riferimento, per cui una quota di positivi al primo test è attesa a causa della costruzione del test. Anche le unità di misura con cui sono espressi i cut-off variano molto tra i vari programmi: copie/10⁵ cellule, copie/uL, copie/punch, Ct); inoltre i valori assoluti di TREC e KREC dipendono dal laboratorio e dal saggio utilizzato. Il dato che più si presta ad un confronto è la quota di neonati che richiedono un secondo DBS. In Liguria è stato dello 0,09%, al pari della Svizzera (40), e confrontabile allo 0,25% di Giappone e Pays de la Loire (39,46). La ripetizione del test di screening, su medesimo DBS, ha quindi ridotto un'iniziale sovrastima di casi positivi ad un numero di richiami in linea con i programmi più consolidati.

Il tasso di invio a valutazione clinica del programma ligure, 0,019%, si colloca al di sotto dell'intervallo osservato: 0,025% di Svizzera e Catalogna (40,49); 0,059% dei

Pays de la Loire (39); 0,06% del Giappone (46) e lo 0,1% della Toscana (38). Inoltre il confronto tra i laboratori giapponesi con e senza ritest sistematico, 0,05% contro 0,56% (46), conferma l'utilità dell'algoritmo diagnostico adottato in Liguria. Il VPP del 21,4% va letto tenendo presente che la definizione di "positivo" e i denominatori cambiano molto da studio a studio, come discusso dagli autori neozelandesi e dalla revisione europea (18,45). I VPP dei programmi di screening variano dal 3,3% dei Pays de la Loire (39) al 12% della Svizzera (40) se si considerano solo le SCID; salgono, invece, dal 14,1% dei Pays de la Loire (39) al 37,9% del programma californiano (42).

Elemento da considerare per il futuro è la calibrazione dei cut-off utilizzati sui dati reali ottenuti dai primi anni di screening. Svizzera e Ucraina hanno rivisto le loro soglie a causa di un tasso di richiamo e di ritest eccessivo riuscendo, così, a ridurre i richiami senza diminuire gli invii a valutazione clinica (40,47). Occorre tenere in considerazione, però, che ogni abbassamento dei cut-off espone al rischio di falsi negativi, che gli autori del programma francese giudicano inaccettabile (39). Qualsiasi revisione andrebbe quindi valutata a fronte della sensibilità.

I due casi di SCID identificati corrispondono ad un'incidenza di circa 1:16.145 nati vivi, superiore all'intervallo 1:38.000-1:95.000 emerso dal confronto internazionale. Con due soli casi ed una coorte relativamente ridotta la stima è però molto imprecisa: l'intervallo di confidenza al 95% va da 1:4.500 a 1:133.100 e comprende al suo interno l'intero intervallo della letteratura analizzata. Entrambi i casi, inoltre, erano ADA-SCID, patologia che nella casistica californiana rappresentava il 18% delle SCID, di cui uno (P3) è nato da genitori consanguinei. La consanguineità è un fattore già segnalato: in California il 30% delle SCID autosomiche recessive era dovuto ad una variante in omozigosi, il che suggerisce una possibile ascendenza comune dei genitori (42); nella coorte brasiliana, invece, la consanguineità era presente nel 25,5% dei pazienti, a fronte di una media nazionale del 4,8%; in Russia il 16% dei neonati che hanno ricevuto diagnosi aveva un'anamnesi familiare positiva, spesso con familiari mai diagnosticati (43). Anche il caso di ADA-SCID a esordio tardivo del programma toscano presentava genitori consanguinei. L'altro caso di ADA-SCID della coorte ligure (P5) presenta, invece, una variante in eterozigosi composta. La

stima dell'incidenza ligure va quindi considerata descrittiva e non estrapolabile alla popolazione generale.

Le tempistiche del programma ligure sono compatibili con quelle osservate in letteratura. In California l'età mediana alla citofluorimetria nei neonati con anamnesi familiare silente era di 21 giorni, scesa poi a 8 dopo la regionalizzazione del saggio.

La diagnosi precoce è però, probabilmente, il contributo principale dello screening e nel caso della SCID si traduce in terapia precoce e sopravvivenza. Questo perché l'esito del trapianto dipende in larga misura dall'assenza di infezioni al momento del trattamento: la sopravvivenza può superare il 90% se il trapianto da fratello HLA compatibile è eseguito prima della comparsa di infezioni (28–31), mentre scende all'81% nei bambini con infezioni in atto (44). Le tempistiche del programma ligure, per i difetti T-cellulari, sono compatibili con quelli dei programmi più consolidati: in California l'età mediata alla citofluorimetria nei neonati con anamnesi familiare silente era di 21 giorni, scesa poi a 8 dopo la regionalizzazione del saggio (42); mentre in Catalogna l'età mediana alla diagnosi è stata di 9 giorni (49). Le due ADA-SCID liguri sono state richiamate a 7 e 10 giorni di vita, grazie al percorso d'urgenza previsto dal protocollo per TREC indosabili o metaboliti dell'adenosina positivi, analogo alla categoria “positivo urgente” adottata in California, che nella casistica di quel programma ha mostrato un VPP combinato del 72% (42). In entrambi i casi la terapia enzimatica sostitutiva è stata usata come ponte verso la terapia definitiva seguendo le raccomandazioni delle linee guida (26).

Gli esiti dei programmi di screening mostrano quanto la diagnosi precoce sia decisiva. La sopravvivenza dei pazienti con SCID identificati alla nascita è del 94% in California (42) e dell'88% in Catalogna (49). In Giappone la sopravvivenza globale è del 98%, con tutti i 15 pazienti SCID sopravvissuti (46). Il contrasto con l'esperienza brasiliana pre-screening (48) è netto: età mediana alla diagnosi 6,5 mesi; età mediana al trattamento 11,5 mesi; 30 pazienti su 45 sopravvissuti sufficientemente a lungo da poter essere trapiantati e una sopravvivenza complessiva del 51,1%. Questo dato quantifica concretamente il costo in vite umane della diagnosi tardiva, supportando enormemente l'introduzione dei programmi di screening neonatale.

La diagnosi precoce, tuttavia, non azzerava il rischio di patologie infettive e il paziente 5 dello studio ligure lo illustra. Nonostante il richiamo a 10 giorni di vita e l'avvio tempestivo di profilassi, immunoglobuline e terapia enzimatica, il neonato ha sviluppato un distress respiratorio che ha richiesto supporto in terapia semintensiva, durante il ricovero ha anche sviluppato un'infezione da CMV. Il CMV è tra le principali cause di morte nei neonati con SCID: nella casistica californiana due dei tre decessi tra i pazienti trattati erano associati a infezione da CMV, gli autori segnalano che i neonati possono acquisirlo tramite l'allattamento materno, se la madre è sieropositiva (42). Ciò giustifica la sospensione precauzionale dell'allattamento prevista dal protocollo ligure in attesa della sierologia materna e il monitoraggio seriato del CMV-DNA. Il caso mostra anche il compromesso della terapia: il valganciclovir, necessario per controllare la viremia, ha causato una neutropenia con monocitopenia, probabilmente da tossicità midollare.

Il beneficio dello screening non si esaurisce tuttavia all'identificazione delle SCID e i reperti secondari confermano il valore del test come marcatore altamente sensibile di linfopenia T nel suo complesso, non solo di SCID, e grazie ai KREC, di deficit B-cellulari. Tra le linfopenie T non-SCID la sindrome di DiGeorge è la condizione sindromica più frequentemente identificata in California e in Russia (42,43) e nel programma ligure P2 ne è risultato affetto e la diagnosi precoce, permessa da screening e citofluorimetria, ha permesso una sua presa in carico multidisciplinare precoce. Per la linfopenia T idiopatica, P1, il vantaggio pratico dello screening e del successivo follow-up è stato il mantenimento della controindicazione ai vaccini vivi attenuati e la sospensione della profilassi antibiotica in assenza di infezioni. Il suo decorso stabile è coerente con i pazienti sempre affetti da linfopenia T idiopatica ritrovati nel programma catalano, i quali non hanno sviluppato complicanze infettive o autoimmuni significative (49). Questi casi, seppur non SCID, non vanno considerati falsi positivi, ma un beneficio collaterale del programma di screening, come sostengono gli autori toscani e neozelandesi (38,45).

L'aggiunta dei KREC nello studio ligure ha contribuito all'identificazione di una linfopenia B transitoria, P4, e un'agammaglobulinemia congenita da deficit di IGLL1, P6, avendo quindi un impatto contenuto sul carico di richiami. In Toscana i KREC hanno pesato, invece, per il 68% degli invii, nonostante solo 2 dei 65 neonati

inviati a valutazione clinica grazie ai KREC abbiano poi ricevuto una diagnosi di IEI. Il reperto di linfopenia B transitoria è coerente con quanto descritto altrove: in Toscana la linfopenia B transitoria è stata associata spesso al sesso maschile (38), come nel paziente ligure, e in Svizzera all'esposizione materna a immunosoppressori (40). Il caso di P6, con variante omozigote di IGLL1, è coerente con l'esperienza svizzera, dove 7 degli 8 casi di agammaglobulinemia identificati dallo screening erano dovuti a varianti di IGLL1 e solo uno a un difetto di BTK (40). Nel paziente ligure la diagnosi precoce ha avuto riscontri pratici immediati: la vaccinazione anti-rotavirus con vaccino vivo attenuato è stata rinviata e l'infusione di immunoglobuline è stata avviata a quattro mesi, in concomitanza della caduta delle IgG materne. Il percorso è analogo ai casi svizzeri in cui tutti i pazienti, eccetto uno in cui i genitori hanno rifiutato la terapia, hanno avviato le immunoglobuline e nessuno ha contratto infezioni tali da richiedere antibiotico terapia endovena o ricovero. A differenza delle SCID, i difetti dell'immunità umorale rendono meno urgente il tempo che intercorre tra richiamo e diagnosi genetica, avvenuta qui a circa quattro mesi di vita, entro il range svizzero (1–7,5 mesi) (40). L'analisi dei metaboliti dell'adenosina sul DBS affronta invece un limite noto dei TREC. In California due SCID a esordio tardivo con TREC normali alla nascita sono sfuggite allo screening (42), e in Toscana un caso di ADA-SCID a esordio tardivo è stato individuato solo grazie alla spettrometria di massa (38). Nei due casi liguri i TREC erano già bassi o indosabili, ma il dosaggio dei metaboliti permette di riconoscere anche le forme che i soli TREC non intercetterebbero.

Sul piano organizzativo, l'adesione del 99,8% in un programma non ancora obbligatorio e con consenso informato scritto indica un'ottima accettabilità da parte delle famiglie a cui ha verosimilmente contribuito il fatto che lo screening per SCID non comporti alcuna invasività aggiuntiva per il neonato poiché il DBS è lo stesso già prelevato per gli screening obbligatori previsti in Italia, per cui l'adesione al programma ligure si traduce nel solo consenso ad un'analisi aggiuntiva sul medesimo cartoncino. I dati giapponesi mostrano quanto il finanziamento pubblico incida sull'equità di accesso dato che il passaggio da screening a pagamento a pubblico ha portato la copertura dal 77,1% al 97,7% (46). In Italia, le SCID non sono ancora nel pannello nazionale e le regioni Toscana e Liguria in cui sono stati attivati

dei programmi autonomi creano una disomogeneità territoriale che l'inserimento nei LEA potrebbe superare.

Sul piano economico i modelli presenti in letteratura indicano un rapporto costo efficacia favorevole, con ICER di 33.400 €/QUALY (53) e 35.311 \$/anno di vita guadagnato (54).

Con circa 8.000 nati l'anno, il volume ligure è inferiore ai 20.000 test annui sotto i quali il costo per campione può aumentare di 2-4 volte; il saggio multiplex SCID-SMA, che condivide la fase preanalitica ed analitica può attenuare questo effetto. Va inoltre ricordato che il costo del test di screening in sé è modesto e rappresenta una frazione contenuta della spesa sanitaria complessiva; eppure, permette un risparmio economico attraverso la diagnosi precoce, in grado di ridurre sensibilmente i costi dei trattamenti e migliorare gli esiti clinici. Nello studio francese il trapianto eseguito entro i tre mesi di vita costava in media 86.179€, contro i 195.776€ per i trapianti tardivi complicati da infezioni attive (51). L'incertezza del rapporto costo beneficio dipende quindi soprattutto della reale incidenza della patologia, dal costo del trattamento tardivo e dai tassi di sopravvivenza osservati. Nonostante questo, tutti i modelli collocano lo screening SCID entro le soglie costo efficacia accettate dai sistemi sanitari occidentali. (51,53,54)

Tra i punti di forza del presente lavoro va menzionato in primis il tasso di adesione del 99,8%, a testimonianza di un'implementazione completa del programma sul territorio regionale, favorita anche dall'assenza di invasività aggiuntiva per i neonati. A questo si aggiunge l'assenza di perdite di pazienti al follow-up, un risultato non scontato se confrontato con il panorama europeo analizzato nella survey di Blom et al. in cui solo 16 dei 38 paesi europei considerati dispongono attualmente di un database strutturato per il follow-up dei pazienti positivi allo screening (18). Ulteriore elemento di solidità è la gestione multidisciplinare rapida ed integrata tra il laboratorio di screening dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini e le unità cliniche territoriali di Immunologia, Genetica e Trapiantologia, coerente con il modello organizzativo indicato come ottimale dalla letteratura internazionale. Nella survey di Blom et al., solo 11 Paesi su 38 prevedono un team multidisciplinare già alla prima visita, mentre 19 dispongono di linee guida nazionali o regionali per il protocollo di

conferma diagnostica (18). Questo pone la regione Liguria tra le poche realtà europee dotate fin dalle primissime fasi post-screening di un percorso strutturato: determinante per un accesso rapido alla diagnosi genetica e alle terapie definitive, in particolare terapia genica e HSCT.

Lo studio ligure presenta però alcuni limiti che vanno considerati nell'interpretazione dei risultati. In primis si tratta di un'analisi retrospettiva monocentrica su una popolazione di dimensioni contenute e circoscritta al solo territorio ligure, per cui i dati sono limitatamente generalizzabili a contesti nazionali con epidemiologia, organizzazione e risorse diagnostiche differenti. Inoltre, il periodo di osservazione relativamente breve e la rarità delle patologie target, hanno permesso di identificare un numero ridotto di casi, 6 su 32.289 neonati, con soli 2 casi di SCID, per cui le stime dell'incidenza non sono particolarmente significative e non consente un'analisi statistica robusta delle sottopopolazioni identificate. L'assenza di falsi negativi segnalati dalle unità cliniche riflette solo l'assenza di casi tornati all'attenzione dei centri coinvolti nello studio, non una sensibilità del test del 100% perché, in mancanza di un registro che segua l'intera coorte, un caso sfuggito allo screening e diagnosticato altrove, o mai diagnosticato, non verrebbe rilevato. Il limite è condiviso con altri programmi e in California due casi ad esordio tardivo sono emersi solo clinicamente (42). Il panorama internazionale vede studi con durata, saggi, soglie e definizioni di "positivo" diversi, il che ne limita la comparabilità (18,45). Infine, l'assenza di un follow-up a lungo termine non permette di valutare l'evoluzione clinica dei pazienti nel tempo, in particolare per i reperti secondari come la linfopenia T idiopatica, il cui decorso richiede un'osservazione protratta per essere caratterizzato con sicurezza (49). Manca, inoltre, un'analisi economica del programma ligure.

I possibili sviluppi riguardano anzitutto la standardizzazione delle unità di misura utilizzate. Come emerso nel confronto internazionale, i programmi attuali esprimono i risultati con unità di misura eterogenee adottando anche definizioni diverse di "test positivo" al punto che la survey di Blom et al. e lo studio neozelandese (18,45) indicano espressamente questa mancanza come il principale ostacolo ad un confronto realmente affidabile tra i programmi. Un passo avanti sostanziale sarebbe, quindi, l'adozione di un'unità di misura condivisa o, almeno, di fattori di conversione

validati, insieme all'adozione di criteri diagnostici uniformi, auspicabilmente con la creazione di un vero gold standard. Solo con questa base sarebbe possibile alimentare registri nazionali strutturati con dati realmente confrontabili ed interpretabili, permettendo così analisi aggregate multicentriche capaci di stimare con maggiore precisione l'incidenza reale delle singole condizioni, cosa che la scarsa numerosità di studi, come il presente lavoro, non riescono a fare in autonomia.

Altri sviluppi riguardano i test di secondo livello genetici, oggi integrati nel programma nazionale solo in Norvegia (18) e proposti per migliorare le metriche di screening (45), e una gestione dedicata dei neonati pretermine. Gaviglio et al. (55) raccomandano un campione dopo le 32 settimane di età gestazionale corretta e un controllo a 37 settimane, e il protocollo ligure ha già una logica sovrapponibile. Servono infine registri e follow-up a lungo termine per valutare gli esiti (38) e, soprattutto, l'inserimento delle SCID nel programma di screening neonatale nazionale.

CONCLUSIONE

Il presente lavoro di tesi descrive i primi cinque anni di attività del programma di screening neonatale per SCID della Regione Liguria, analizzando i suoi risultati.

Il tasso di adesione, 99,8%, e l'assenza di perdite al follow-up nell'intera coorte dei neonati positivi indicano un'implementazione solida e ben accettata dalle famiglie. Le performance del test sono in linea con quelle dei programmi più consolidati: il tasso di invio a valutazione clinica, 0,019%, è il secondo più basso tra gli studi analizzati, vicino a quello californiano (0,017%); mentre il VPP di 21,4%, si colloca all'interno dell'intervallo osservato per le linfopenie T clinicamente significative (14,1%-37,9%), a conferma della validità dell'algoritmo diagnostico adottato dal Centro Screening Gaslini. (38–40,42–47,49)

Nei cinque anni considerati sono stati identificati sei neonati con una patologia target: due casi di ADA-SCID, gli obiettivi primari del programma, oltre a una linfopenia T idiopatica, una sindrome di DiGeorge, una linfopenia B transitoria e un'agammaglobulinemia congenita da deficit di IGLL1, considerati reperti secondari clinicamente significativi. Quest'ultimo dato conferma quanto già osservato in letteratura per programmi di screening con casistica più ampia, ovvero che il test basato sui TREC, grazie alla sua elevata sensibilità, identifica un ventaglio di condizioni più ampio della sola SCID, con ricadute positive anche sulla diagnosi di altre immunodeficienze e sindromi associate a compromissione timica (38,40,42,49). I due soli casi di SCID identificati non consentono stime di incidenza solide e generalizzabili al di fuori del contesto regionale, ma la rapidità del percorso diagnostico-terapeutico, con richiamo clinico ad un'età mediana di quindici giorni e la comunicazione della diagnosi a venti giorni dal richiamo, è risultata sovrapponibile a quella dei programmi internazionali di riferimento. Questo è particolarmente rilevante perché diagnosi e trattamento precoci correlano direttamente con un tasso di sopravvivenza nettamente superiore se confrontato con il tasso di sopravvivenza ottenuto con la diagnosi clinica.

Il programma ligure si aggiunge così all'esperienza toscana (38) nel dimostrare, su base regionale, la fattibilità ed il valore clinico dello screening per le SCID nel contesto italiano. Queste patologie saranno incluse nello Screening Nazionale Esteso previsto dai LEA dal 30 ottobre 2026, come deliberato dal DPCM 7 agosto 2026 e dal decreto del Ministro della Salute 3 agosto 2026, pubblicati in Gazzetta Ufficiale n.227 del 30 settembre 2026. I risultati qui presentati, perciò, offrono un ulteriore elemento a sostegno dell'introduzione di un programma dedicato su base nazionale, in linea con quanto già avvenuto in un numero sempre crescente di Paesi europei ed extraeuropei (18). Resta inoltre auspicabile un progressivo cammino verso l'armonizzazione delle unità di misura, dei cut-off diagnostici e dei criteri di classificazione tra i diversi programmi, in modo da poter costruire nel tempo registri nazionali e internazionali facilmente confrontabili e per ampliare e consolidare, su casistiche più ampie di quella presente in questo studio, le stime sull'incidenza delle patologie trattate e le evidenze dell'efficacia dello screening neonatale per le immunodeficienze severe combinate.

BIBLIOGRAFIA

1. Lougaris V, Pession A, Baronio M, Soresina A, Rondelli R, Gazzurelli L, et al. The Italian Registry for Primary Immunodeficiencies (Italian Primary Immunodeficiency Network; IPINet): Twenty Years of Experience (1999-2019). *J Clin Immunol.* ottobre 2020;40(7):1026–37. doi:10.1007/s10875-020-00844-0 PubMed PMID: 32803625; PubMed Central PMCID: PMC7505879.
2. Bousfiha AA, Jeddane L, Moundir A, Poli MC, Aksentijevich I, Cunningham-Rundles C, et al. The 2024 update of IUIS phenotypic classification of human inborn errors of immunity. *J Hum Immun.* 5 maggio 2025;1(1):e20250002. doi:10.70962/jhi.20250002 PubMed PMID: 41608113; PubMed Central PMCID: PMC12829316.
3. Kobrynski L, Powell RW, Bowen S. Prevalence and morbidity of primary immunodeficiency diseases, United States 2001-2007. *J Clin Immunol.* novembre 2014;34(8):954–61. doi:10.1007/s10875-014-0102-8 PubMed PMID: 25257253; PubMed Central PMCID: PMC4820073.
4. Aranda CS, Guimarães RR, de Gouveia-Pereira Pimentel M. Combined immunodeficiencies. *J Pediatr (Rio J).* 2021;97 Suppl 1(Suppl 1):S39–48. doi:10.1016/j.jped.2020.10.014 PubMed PMID: 33340461; PubMed Central PMCID: PMC9432339.
5. Kwan A, Puck JM. History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Semin Perinatol.* aprile 2015;39(3):194–205. doi:10.1053/j.semperi.2015.03.004 PubMed PMID: 25937517; PubMed Central PMCID: PMC4433840.
6. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, et al. The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* ottobre 2022;42(7):1508–20. doi:10.1007/s10875-022-01352-z PubMed PMID: 36198931.
7. McWilliams LM, Dell Railey M, Buckley RH. Positive Family History, Infection, Low Absolute Lymphocyte Count (ALC), and Absent Thymic Shadow: Diagnostic Clues for All Molecular Forms of Severe Combined Immunodeficiency (SCID). *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;3(4):585–91. doi:10.1016/j.jaip.2015.01.026 PubMed PMID: 25824440; PubMed Central PMCID: PMC4500664.
8. Shearer WT, Dunn E, Notarangelo LD, Dvorak CC, Puck JM, Logan BR, et al. Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium experience. *J Allergy Clin Immunol.* aprile 2014;133(4):1092–8. doi:10.1016/j.jaci.2013.09.044 PubMed PMID: 24290292; PubMed Central PMCID: PMC3972266.

9. Barreiros LA, Sousa JL, Geier C, Leiss-Piller A, Kanegae MPP, França TT, et al. SCID and Other Inborn Errors of Immunity with Low TRECs — the Brazilian Experience. *J Clin Immunol.* 1 agosto 2022;42(6):1171–92. doi:10.1007/s10875-022-01275-9
10. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med.* novembre 2001;79(11):631–40. doi:10.1007/s001090100271 PubMed PMID: 11715066.
11. Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, Déry V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ.* aprile 2008;86(4):317–9. doi:10.2471/BLT.07.050112 PubMed PMID: 18438522; PubMed Central PMCID: PMC2647421.
12. Lindegren ML, Kobrynski L, Rasmussen SA, Moore CA, Grosse SD, Vanderford ML, et al. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep.* 16 gennaio 2004;53(RR-1):1–29. PubMed PMID: 14724556.
13. Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, André-Schmutz I, Basile G de S, de Villartay JP, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev.* febbraio 2005;203:98–109. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00223.x PubMed PMID: 15661024.
14. Atkins AE, Cogley MF, Baker MW. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency: Do Preterm Infants Require Special Consideration? *Int J Neonatal Screen.* 8 luglio 2021;7(3):40. doi:10.3390/ijns7030040 PubMed PMID: 34287233; PubMed Central PMCID: PMC8293075.
15. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 17 dicembre 1998;396(6712):690–5. doi:10.1038/25374 PubMed PMID: 9872319.
16. Puck JM, Gennery AR. Establishing Newborn Screening for SCID in the USA; Experience in California. *Int J Neonatal Screen.* 31 ottobre 2021;7(4):72. doi:10.3390/ijns7040072 PubMed PMID: 34842619; PubMed Central PMCID: PMC8628983.
17. Blom M, Bredius RGM, van der Burg M. Efficient screening strategies for severe combined immunodeficiencies in newborns. *Expert Rev Mol Diagn.* 2023;23(9):815–25. doi:10.1080/14737159.2023.2244879 PubMed PMID: 37599592.

18. Blom M, Soomann M, Soler-Palacín P, Šedivá A, Stray-Pedersen A, Zetterström R, et al. Newborn screening for SCID and severe T lymphocytopenia in Europe. *J Allergy Clin Immunol.* febbraio 2025;155(2):377–86. doi:10.1016/j.jaci.2024.10.018 PubMed PMID: 39510364.
19. Griffith LM, Cowan MJ, Notarangelo LD, Puck JM, Buckley RH, Candotti F, et al. Improving cellular therapy for primary immune deficiency diseases: recognition, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol.* dicembre 2009;124(6):1152-1160.e12. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.022 PubMed PMID: 20004776; PubMed Central PMCID: PMC2831471.
20. Walter JE, Ziegler JB, Ballou M, Cunningham-Rundles C. Advances and Challenges of the Decade: The Ever-Changing Clinical and Genetic Landscape of Immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract.* gennaio 2023;11(1):107–15. doi:10.1016/j.jaip.2022.11.007 PubMed PMID: 36610755.
21. Chan B, Wara D, Bastian J, Hershfield MS, Bohnsack J, Azen CG, et al. Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for adenosine deaminase (ADA)-deficient severe combined immunodeficiency (SCID). *Clin Immunol.* novembre 2005;117(2):133–43. doi:10.1016/j.clim.2005.07.006 PubMed PMID: 16112907.
22. Gans MD, Bernstein L, Shliozberg J, Gavrilova T, Rubinstein A. Outcomes of 3 patients with adenosine deaminase deficiency on long-term enzyme replacement therapy. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol.* maggio 2021;126(5):593–5. doi:10.1016/j.anai.2020.12.008 PubMed PMID: 33359138.
23. Grunebaum E, Reid B, Naqvi A, Hershfield MS, Kim VHD, Muller MP, et al. Morbidity in an adenosine deaminase-deficient patient during 27 years of enzyme replacement therapy. *Clin Immunol.* febbraio 2020;211:108321. doi:10.1016/j.clim.2019.108321 PubMed PMID: 31812707.
24. Tartibi HM, Hershfield MS, Bahna SL. A 24-Year Enzyme Replacement Therapy in an Adenosine-deaminase-Deficient Patient. *Pediatrics.* gennaio 2016;137(1). doi:10.1542/peds.2015-2169 PubMed PMID: 26684479.
25. Scott O, Kim VHD, Reid B, Pham-Huy A, Atkinson AR, Aiuti A, et al. Long-Term Outcome of Adenosine Deaminase-Deficient Patients-a Single-Center Experience. *J Clin Immunol.* agosto 2017;37(6):582–91. doi:10.1007/s10875-017-0421-7 PubMed PMID: 28748310.
26. Kohn DB, Hershfield MS, Puck JM, Aiuti A, Blincoe A, Gaspar HB, et al. Consensus approach for the management of severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* marzo 2019;143(3):852–63. doi:10.1016/j.jaci.2018.08.024 PubMed PMID: 30194989; PubMed Central PMCID: PMC6688493.

27. Cuvelier GDE, Logan BR, Prockop SE, Buckley RH, Kuo CY, Griffith LM, et al. Outcomes following treatment for ADA-deficient severe combined immunodeficiency: a report from the PIDTC. *Blood*. 18 agosto 2022;140(7):685–705. doi:10.1182/blood.2022016196 PubMed PMID: 35671392; PubMed Central PMCID: PMC9389638.
28. Dvorak CC, Hassan A, Slatter MA, Hönig M, Lankester AC, Buckley RH, et al. Comparison of outcomes of hematopoietic stem cell transplantation without chemotherapy conditioning by using matched sibling and unrelated donors for treatment of severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. ottobre 2014;134(4):935-943.e15. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.021 PubMed PMID: 25109802; PubMed Central PMCID: PMC4186906.
29. Heimall J, Logan BR, Cowan MJ, Notarangelo LD, Griffith LM, Puck JM, et al. Immune reconstitution and survival of 100 SCID patients post-hematopoietic cell transplant: a PIDTC natural history study. *Blood*. 21 dicembre 2017;130(25):2718–27. doi:10.1182/blood-2017-05-781849 PubMed PMID: 29021228; PubMed Central PMCID: PMC5746165.
30. Haddad E, Logan BR, Griffith LM, Buckley RH, Parrott RE, Prockop SE, et al. SCID genotype and 6-month posttransplant CD4 count predict survival and immune recovery. *Blood*. 25 ottobre 2018;132(17):1737–49. doi:10.1182/blood-2018-03-840702 PubMed PMID: 30154114; PubMed Central PMCID: PMC6202916.
31. Lankester AC, Neven B, Mahlaoui N, von Asmuth EGJ, Courteille V, Alligon M, et al. Hematopoietic cell transplantation in severe combined immunodeficiency: The SCETIDE 2006-2014 European cohort. *J Allergy Clin Immunol*. maggio 2022;149(5):1744-1754.e8. doi:10.1016/j.jaci.2021.10.017 PubMed PMID: 34718043.
32. Goebel GA, de Assis CS, Cunha LAO, Minafra FG, Pinto JA. Survival After Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Severe Combined Immunodeficiency (SCID): A Worldwide Review of the Prognostic Variables. *Clin Rev Allergy Immunol*. aprile 2024;66(2):192–209. doi:10.1007/s12016-024-08993-5 PubMed PMID: 38689103.
33. Fischer A. Gene therapy for inborn errors of immunity: past, present and future. *Nat Rev Immunol*. giugno 2023;23(6):397–408. doi:10.1038/s41577-022-00800-6 PubMed PMID: 36434109.
34. Tucci F, Scaramuzza S, Aiuti A, Mortellaro A. Update on Clinical Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Inherited Monogenic Diseases. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 3 febbraio 2021;29(2):489–504. doi:10.1016/j.ymthe.2020.11.020 PubMed PMID: 33221437; PubMed Central PMCID: PMC7854296.

35. Mamcarz E, Zhou S, Lockey T, Abdelsamed H, Cross SJ, Kang G, et al. Lentiviral Gene Therapy Combined with Low-Dose Busulfan in Infants with SCID-X1. *N Engl J Med.* 18 aprile 2019;380(16):1525–34. doi:10.1056/NEJMoa1815408 PubMed PMID: 30995372; PubMed Central PMCID: PMC6636624.
36. Kohn DB, Booth C, Shaw KL, Xu-Bayford J, Garabedian E, Trevisan V, et al. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *N Engl J Med.* 27 maggio 2021;384(21):2002–13. doi:10.1056/NEJMoa2027675 PubMed PMID: 33974366; PubMed Central PMCID: PMC8240285.
37. Fischer A, Neven B. Gene therapy for SCID, now up to 3! *J Allergy Clin Immunol.* maggio 2023;151(5):1255–6. doi:10.1016/j.jaci.2023.02.015 PubMed PMID: 36828079.
38. Ricci S, Guarnieri V, Capitanini F, Pelosi C, Astorino V, Boscia S, et al. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Immunity: The Experience of Tuscany. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 1 giugno 2024;12(6):1622-1630.e4. doi:10.1016/j.jaip.2024.04.011 PubMed PMID: 38636590.
39. Rimbert M, Audrain M, Léger A, Miot C, Fantou A, Hémond C, et al. NEOSKID study: Four years of experience in newborn screening for severe combined immunodeficiencies in the Pays de la Loire region of France. *Arch Pédiatrie.* 1 novembre 2025;32(8):570–4. doi:10.1016/j.arcped.2025.07.004
40. Soomann M, Prader S, Sluka S, Boucq C, Schmid JP, Trück J, et al. Five Years of Combined Newborn Screening Quantifying TREC and KREC in Switzerland. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 1 gennaio 2026;14(1):243-252.e2. doi:10.1016/j.jaip.2025.10.031 PubMed PMID: 41177434.
41. Bzdok J, Czibere L, Burggraf S, Landt O, Maier EM, Röschinger W, et al. Quality considerations and major pitfalls for high throughput DNA-based newborn screening for severe combined immunodeficiency and spinal muscular atrophy. *PLOS ONE.* 28 giugno 2024;19(6):e0306329. doi:10.1371/journal.pone.0306329 PubMed PMID: 38941330; PubMed Central PMCID: PMC11213327.
42. Amatuni GS, Currier RJ, Church JA, Bishop T, Grimbacher E, Nguyen AAC, et al. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency and T-cell Lymphopenia in California, 2010–2017. *Pediatrics.* febbraio 2019;143(2):e20182300. doi:10.1542/peds.2018-2300 PubMed PMID: 30683812; PubMed Central PMCID: PMC6361357.
43. Marakhonov A, Mukhina A, Efimova I, Balinova N, Ampleeva M, Bobreshova A, et al. First 2-year experience of nationwide newborn screening for severe forms of T and B cell immunodeficiency: 2.3 million newborns analyzed using TREC and KREC in Russia. *Front Immunol.* 17:1742811.

- doi:10.3389/fimmu.2026.1742811 PubMed PMID: 41727503; PubMed Central PMCID: PMC12920452.
44. Göngrich C, Ekwall O, Sundin M, Brodzski N, Fasth A, Marits P, et al. First Year of TREC-Based National SCID Screening in Sweden. *Int J Neonatal Screen*. 25 agosto 2021;7(3):59. doi:10.3390/ijns7030059 PubMed PMID: 34449549; PubMed Central PMCID: PMC8395826.
 45. Heather N, de Hora M, Brothers S, Grainger P, Knoll D, Webster D. Introducing Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency—The New Zealand Experience. *Int J Neonatal Screen*. 10 maggio 2022;8(2):33. doi:10.3390/ijns8020033 PubMed PMID: 35645287; PubMed Central PMCID: PMC9149990.
 46. Nishinosono T, Muramatsu H, Wakamatsu M, Ishige N, Hanai J, Imaizumi T, et al. Nationwide TREC/KREC-based newborn screening and clinical outcomes in Japan. *J Hum Immun*. 17 agosto 2026;2(5):e20260083. doi:10.70962/jhi.20260083 PubMed PMID: 42662969; PubMed Central PMCID: PMC13521547.
 47. Boyarchuk O, Yarema N, Kravets V, Shulhai O, Shymanska I, Chornomydz I, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency: The results of the first pilot TREC and KREC study in Ukraine with involving of 10,350 neonates. *Front Immunol*. 15 settembre 2022;13:999664. doi:10.3389/fimmu.2022.999664 PubMed PMID: 36189201; PubMed Central PMCID: PMC9521488.
 48. Barreiros LA, Sousa JL, Geier C, Leiss-Piller A, Kanegae MPP, França TT, et al. SCID and Other Inborn Errors of Immunity with Low TRECs — the Brazilian Experience. *J Clin Immunol*. 1 agosto 2022;42(6):1171–92. doi:10.1007/s10875-022-01275-9
 49. Argudo-Ramírez A, Martín-Nalda A, Laguna J, Riviere JG, González de Aledo-Castillo JM, López-Galera RM, et al. SCID newborn screening: seven-year performance and outcomes including T-cell lymphopenia in Catalonia (Spain). *Front Immunol*. 17:1803232. doi:10.3389/fimmu.2026.1803232 PubMed PMID: 42079620; PubMed Central PMCID: PMC13128370.
 50. Lee WI, Fan WL, Lu CH, Chen SH, Kuo ML, Lin SJ, et al. A Novel CD3G Mutation in a Taiwanese Patient With Normal T Regulatory Function Presenting With the CVID Phenotype Free of Autoimmunity—Analysis of all Genotypes and Phenotypes. *Front Immunol*. 19 dicembre 2019;10:2833. doi:10.3389/fimmu.2019.02833 PubMed PMID: 31921117; PubMed Central PMCID: PMC6930882.
 51. Clément MC, Mahlaoui N, Mignot C, Bihan CL, Rabetrano H, Hoang L, et al. Systematic neonatal screening for severe combined immunodeficiency and

- severe T-cell lymphopenia: Analysis of cost-effectiveness based on French real field data. *J Allergy Clin Immunol.* 1 giugno 2015;135(6):1589–93. doi:10.1016/j.jaci.2015.02.004 PubMed PMID: 25840725.
52. Saavedra-Matiz CA, Isabelle JT, Biski CK, Duva SJ, Sweeney ML, Parker AL, et al. Cost-Effective and Scalable DNA Extraction Method from Dried Blood Spots. *Clin Chem.* 1 luglio 2013;59(7):1045–51. doi:10.1373/clinchem.2012.198945
 53. Van der Ploeg CPB, Blom M, Bredius RGM, van der Burg M, Schielen PCJ, Verkerk PH, et al. Cost-effectiveness of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Eur J Pediatr.* 1 maggio 2019;178(5):721–9. doi:10.1007/s00431-019-03346-3
 54. Ding Y, Thompson JD, Kobrynski L, Ojodu J, Zarbalian G, Grosse SD. Cost-Effectiveness/Cost-Benefit Analysis of Newborn Screening for Severe Combined Immune Deficiency in Washington State. *J Pediatr.* 1 maggio 2016;172:127–35. doi:10.1016/j.jpeds.2016.01.029
 55. Gaviglio A, Lasarev M, Sheller R, Singh S, Baker M. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency: Lessons Learned from Screening and Follow-Up of the Preterm Newborn Population. *Int J Neonatal Screen.* 15 dicembre 2023;9(4):68. doi:10.3390/ijns9040068 PubMed PMID: 38132827; PubMed Central PMCID: PMC10744167.

RINGRAZIAMENTI

Un grazie sincero al Prof. Stefano Volpi, il mio relatore, che mi ha dato fiducia affidandomi questo argomento e mi ha seguito con disponibilità e competenza dall'inizio alla fine. Gli sono davvero grato per essermi venuto incontro nonostante i tempi stretti: senza il suo aiuto non sarei riuscito a portare a termine questo lavoro.

Grazie anche alla Dott.ssa Serena Palmeri, la mia correlatrice, che c'è sempre stata, con pazienza e attenzione ai dettagli, e che ha risposto a ogni mio dubbio. La ringrazio in particolare per la disponibilità e per avermi aiutato anche quando il tempo era poco. I suoi suggerimenti hanno reso questa tesi più chiara e completa.

La stesura di questa tesi è solo l'ultimo tassello di un percorso universitario che non sarebbe stato possibile senza l'aiuto e la presenza di molte persone.

Il primo grazie va ai miei genitori: mi avete sostenuto fin da quando ho scelto di iscrivermi a Medicina e avete reso tutto possibile, anche a costo di tanti sacrifici. Grazie anche a tutta la mia famiglia: in questi anni vi siete sempre interessati ai miei studi e non mi avete mai fatto mancare il vostro appoggio.

Un grazie speciale ai miei amici: senza di voi questi anni sarebbero stati molto più complicati e pesanti. Avete alleggerito tante preoccupazioni con serate passate insieme a ridere e scherzare e tante giornate difficili da dimenticare. Vi voglio bene.

Infine, un immenso grazie a Matilde, la mia fidanzata. È difficile esprimere a parole quanto tu sia stata fondamentale per me in questi anni. Spronandomi, supportandomi, consigliandomi, tranquillizzandomi, organizzandomi... grazie. Senza di te il mio percorso sarebbe stato più difficile e sicuramente più lungo.

Un sentito grazie a tutti!

Riccardo Fiumefreddo