



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
MEDICINA E CHIRURGIA**

Tesi di Laurea
Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia,
Genetica e Scienze Materno-Infantili

**Neutropenie di lunga durata e ad insorgenza tardiva:
inquadramento diagnostico, meccanismi fisiopatologici
e gestione clinica**

Relatore
Professor Mohamad Maghnie

Candidato
Stefano Nicoletta

Correlatrice
Dott.ssa Francesca Fioredda

Anno accademico 2023-2024

Sommario

INTRODUZIONE.....	4
1. I NEUTROFILI	4
1.1. VALORI DI RIFERIMENTO DEI NEUTROFILI	4
2. LE NEUTROPENIE	5
2.1. LE NEUTROPENIE CRONICHE	6
2.1.1. LE NEUTROPENIE CONGENITE	7
2.1.2. LE NEUTROPENIE ACQUISITE.....	10
3. LE NEUTROPENIE IMMUNOMEDIATE	12
3.1. ANTICORPI ANTI-NEUTROFILO.....	12
3.2. METODI DI IDENTIFICAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-HNA	13
3.3. LA NEUTROPENIA ALLOIMMUNE.....	15
3.4. LA NEUTROPENIA AUTOIMMUNE PRIMARIA	16
3.5. LA NEUTROPENIA AUTOIMMUNE SECONDARIA.....	17
4. LE NEUTROPENIE NON IMMUNOMEDIATE	20
4.1. LA NEUTROPENIA IDIOPATICA DELL'INFANZIA	20
4.2. LA NEUTROPENIA IDIOPATICA CRONICA DELL'ADULTO.....	22
5. LA NEUTROPENIA AD ESORDIO TARDIVO E DI LUNGA DURATA	25
SCOPO DELLO STUDIO.....	29
PAZIENTI E METODI.....	30
1. CRITERI DI INCLUSIONE E DEFINIZIONI	30
2. RACCOLTA DEI DATI	31
2.1. NEXT-GENERATION SEQUENCING/WHOLE EXOME SEQUENCING (WES).....	33
2.2. IMMUNOFENOTIPO.....	33
2.3. ANALISI STATISTICA.....	35
2.4. MACHINE LEARNING	35
RISULTATI.....	37
1. CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE	37
2. PARAMETRI EMATOLOGICI	38
3. DATI CLINICI	40
3.1. PATTERN INFETTIVO	40

3.2. SEGNI E SINTOMI DI AUTOIMMUNITÀ.....	41
3.3. QUADRO IMMUNOLOGICO.....	43
3.3.1. IMMUNOGLOBULINE	43
3.3.2. SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE.....	43
3.4. ANALISI GENETICA	46
3.4.1. <i>WHOLE EXOME SEQUENCING</i>	49
<u>DISCUSSIONE.....</u>	52
<u>CONCLUSIONI.....</u>	58
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	60

INTRODUZIONE

1. I neutrofili

I granulociti, effettori primari della difesa innata, si sviluppano nel midollo osseo da cellule staminali ematopoietiche multipotenti e rivestono un ruolo cruciale nella risposta infiammatoria, sia in presenza di agenti patogeni microbici che in processi autoimmuni.¹ Questi leucociti specializzati si distinguono in tre sottotipi distinti: neutrofili, eosinofili e basofili. Attraverso un processo graduale di differenziazione ciascuno di questi tre tipi di cellule acquisisce caratteristiche e funzioni specifiche, divergendo verso il proprio stadio finale di maturazione.²⁻⁴

I neutrofili hanno un ruolo cruciale nella difesa dell'organismo attraverso diverse funzioni come la chemiotassi, la fagocitosi, il rilascio dei granuli citoplasmatici e la formazione dei *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs). Le disfunzioni della chemiotassi e della fagocitosi o il mancato rilascio di granuli possono causare una maggiore suscettibilità alle infezioni, mentre un'eccessiva attivazione dei neutrofili può contribuire allo sviluppo di malattie autoimmuni e infiammazioni croniche.⁵

1.1. Valori di riferimento dei neutrofili

Il numero assoluto di neutrofili (NA) è pari alla quota percentuale calcolata sul totale dei leucociti.⁶ In un individuo adulto sano caucasico il valore normale di NA è superiore a $1.5/1.8 \times 10^9$ cellule/L, in accordo alle due più comuni fonti internazionali.^{7,8}

Oltre alla variabilità interindividuale, il NA di neutrofili è influenzato anche dall'etnia.⁵ Di fatto i valori di leucociti e neutrofili delle popolazioni di origine africana, e non solo, sono minori rispetto a quelli delle popolazioni caucasiche, con valori compresi tra 0.4×10^9 cellule/L e 0.8×10^9 cellule/L.^{9,10} Nonostante questa grande variabilità di valori tra le diverse popolazioni, non è stata riscontrata una correlazione significativa tra valori di neutrofili più bassi e maggior tasso di infezioni.¹¹

Il limite soglia per definire la neutropenia è di 1.0×10^9 cellule/L nei neonati entro il primo anno di vita e di 1.5×10^9 cellule/L nei bambini oltre l'anno di età. Nei neonati pretermine (nati tra la ventottesima e la trentaseiesima settimana di gestazione) e durante la prima settimana di vita la soglia di normalità è pari a 2.5×10^9 cellule/L. Negli *early preterm* (nati prima della ventottesima settimana di gestazione) si parla di neutropenia quando i valori scendono al di sotto di 1.0×10^9 cellule/L.¹⁰

2. Le neutropenie

La neutropenia è una condizione patologica caratterizzata da una conta dei neutrofilii nel sangue inferiore alla soglia minima specifica per età ed etnia.

Come precedentemente riportato, alcune etnie, come quella africana, presentano fisiologicamente una conta di neutrofilii inferiore rispetto alle popolazioni caucasiche; questo fenomeno è noto come *DARC/ACKR1 associated neutropenia*, per sottolineare l'associazione a un particolare polimorfismo del recettore delle chemochine DARC/ACKR1. Infatti, una variante del gene di tale recettore è strettamente legata a un minor numero di neutrofilii negli individui di origine africana.¹²

Studi sulla distribuzione geografica delle varianti del polimorfismo Duffy hanno evidenziato la sua importanza nella patogenesi di diverse malattie infettive, in particolare nell'infezione da *Plasmodium Vivax*. In Africa centrale l'antigene Duffy è stato soggetto a selezione positiva, poiché il parassita *Plasmodium Vivax* utilizza questo antigene per entrare nei globuli rossi. La mancanza dell'antigene Duffy, indicata come fenotipo Duffy-null Fy(a-b-), ha garantito nel corso dell'evoluzione una protezione dall'infezione e un vantaggio evolutivo.¹³

L'assenza dell'antigene Duffy, identificata come fenotipo Fy(a-b-), è stata associata alla neutropenia. Diversi studi hanno evidenziato che gli individui con fenotipo Duffy-null Fy(a-b-) presentano una NA inferiore rispetto a quelli con fenotipo Duffy-positivo^{14,15}, sebbene il meccanismo molecolare non sia ancora completamente compreso; è possibile che la mutazione del gene DARC causi un'alterazione nelle chemochine, portando a una redistribuzione dei neutrofilii nel midollo osseo.¹⁶

Pertanto, la *DARC/ACKR1 associated neutropenia* ha una distribuzione geografica specifica, prevalente tra gli individui di origine africana e alcuni gruppi etnici del Medio Oriente.^{17,18} Oltre alle popolazioni africane, anche altri gruppi presentano valori di leucociti e neutrofilii inferiori alla media caucasica. Tra questi troviamo soggetti ebrei yemeniti e Falasha, Indo-occidentali, Giordani arabi e Beduini neri.^{9,19}

2.1. Classificazione delle neutropenie

La neutropenia può essere classificata in base a diversi criteri. Dopo il primo anno di vita, nell'ambito della popolazione caucasica, è possibile suddividere la neutropenia in tre diverse categorie, determinate in base al NA:

1. *Neutropenia lieve*, se i neutrofili circolanti sono compresi tra 1.0 e 1.5×10^9 cellule/L;
2. *Neutropenia moderata*, se i neutrofili circolanti sono compresi tra 0.5 e 1.0×10^9 cellule/L;
3. *Neutropenia grave*, se i neutrofili circolanti sono inferiori a 0.5×10^9 cellule/L.

Valori di NA inferiori a 0.2×10^9 cellule/L sono correlati a un elevato rischio di infezioni gravi; in questo caso si parla di *agranulocitosi*.

In base alla durata temporale, la neutropenia può essere classificata in forma acuta e forma cronica: la neutropenia acuta è caratterizzata da una conta dei neutrofili inferiore alla norma per meno di 3 mesi, mentre la neutropenia cronica persiste per più di 3 mesi.²⁰

La *neutropenia acuta* è spesso causata da reazioni avverse ai farmaci o da malattie infettive acute, che possono ridurre il numero di neutrofili circolanti nel sangue e nel midollo osseo.²¹ Questo fenomeno, pur essendo comune, talvolta sfugge alla rilevazione durante le fasi acute o di convalescenza delle infezioni virali. In ogni caso, spesso, le forme acute post-infettive sono transitorie.²²

La *neutropenia cronica* è, di norma, persistente; il paziente è a rischio elevato di sviluppare infezioni batteriche invasive, come infezioni cutanee, polmoniti e setticemie. È interessante notare che tali siti di infezione non presentano pus, poiché questo liquido è principalmente costituito da leucociti neutrofili in via di decomposizione, notoriamente bassi o assenti nei pazienti con neutropenia.²³

2.1. Le neutropenie croniche

In linea con la più recente classificazione internazionale²⁴, le neutropenie croniche vengono suddivise in *congenite* e *acquisite*. Recentemente è stata introdotta una nuova categoria, nota come *Likely Acquired*, che comprende forme pediatriche di lunga durata o ad insorgenza tardiva e le forme idiopatiche degli adulti.

2.1.1. Le neutropenie congenite

Le neutropenie congenite rappresentano un ampio insieme di disturbi che si caratterizzano per un'anomala produzione, differenziazione e sopravvivenza dei neutrofili nel midollo osseo e sono dovute ad una variante genetica che ne determina il mancato sviluppo. Tipica, in questi casi, è l'insorgenza precoce della neutropenia e l'elevata suscettibilità alle infezioni.^{25,26}

La neutropenia congenita può essere ulteriormente suddivisa in neutropenia isolata o associata a manifestazioni extra-ematologiche.²⁴

Le forme congenite isolate mostrano diversi pattern di ereditarietà: si riconoscono forme autosomiche recessive, autosomiche dominanti, X-linked, mutazioni de novo o forme correlate a malattie mitocondriali. Le due forme più frequenti di neutropenia ereditaria sono la neutropenia congenita grave e la neutropenia ciclica, entrambe causate da alterazioni del gene ELANE.²⁷

La *neutropenia congenita grave* è considerata il paradigma della neutropenia congenita.²⁵ Originariamente veniva identificata come Sindrome di Kostmann ma, più recentemente, la scoperta del gene causativo HAX-1 ha permesso di distinguere le due patologie.^{28,29} Nel suo lavoro originale^{30,31} Kostmann descrisse un tratto autosomico recessivo caratterizzato da una grave neutropenia e da un blocco nella maturazione delle cellule nel midollo osseo a cui, inizialmente, diede il nome di "reticolocitosi ereditaria", che poi perfezionò in "agranulocitosi infantile ereditaria".³² La prognosi della sindrome descritta da Kostmann era pessima ma, con l'avvento dell'uso di antibiotici e di G-CSF, è migliorata notevolmente.²³

La *neutropenia ciclica*, nota anche come ematopoiesi ciclica, è una condizione genetica ereditaria che si manifesta con oscillazioni regolari della conta dei neutrofili nel sangue periferico. Queste oscillazioni avvengono con una frequenza di circa ventuno giorni, con un nadir (ovvero il punto più basso) vicino allo zero ed un picco vicino alla norma. Durante il periodo di nadir neutropenico, che ha una durata di circa tre o quattro giorni, possono verificarsi infezioni gravi tra cui stomatiti aftose, parodontiti e, occasionalmente, sepsi.³³

È cruciale evidenziare l'esistenza di varie forme aggiuntive di neutropenia cronica, che possono essere correlate a sindromi extra-ematologiche, a sindromi da

immunodeficienza, a disturbi metabolici o a deficit midollari. Tali forme sono state sintetizzate nella Tabella 1.

Tabella 1: Classificazione delle Neutropenie Congenite. Tratto da Fioredda et al (2023).

	Gene coinvolto	Modalità di trasmissione	Caratteristiche principali
Associate a manifestazioni extra-ematologiche			
Sindrome di Barth	TAZ	X-linked	Nessun arresto di maturazione, cardiomiopatia ipertrofica e sindrome miopatica
Charcot-Marie-Tooth	DNM2	AD	Debolezza e atrofia muscolare degli arti distali secondaria a neuropatia periferica
Sindrome di Cohen	VPS13B	AR	Assenza di arresto maturativo, ritardo psicomotorio, microcefalia, facies caratteristica, ipotonia, lassità articolare, distrofia retino-coroidale e miopia
Mutazione G6PC3	G6PC3	AR	Iperelasticità cutanea e reticolo venoso superficiale prominente, cardiopatie congenite, aritmie, criptorchidismo e pancreatite esocrina
Mutazione GF11	GF11	AD	Eventuale arresto della maturazione, linfopenia, aumento del numero di cellule mieloidi periferiche, anomalie anatomiche dell'orecchio interno
Deficit HYOU1	HYOU1	AR	Ipglicemia e complicanze infiammatorie
Mutazione JAGN1	JAGN1	AR	Eventuale arresto della maturazione, anomalie ossee e dentali, disfunzione esocrina pancreatica
Malattia di Kostmann	HAX1	AR	Arresto maturativo, ritardo mentale, convulsioni e suscettibilità a sindrome mielodisplastica/leucemia acuta mieloide
Mutazione di P14/LAMTOR2	LAMTOR2	AR	Neutropenia cronica, ipogammaglobulinemia, assenza di arresto maturativo, albinismo oculocutaneo
Sindrome di Pearson	Mitocondriale Delezione DNA	Mitocondriale	Anemia sideroblastica refrattaria, vacuolizzazione dei precursori midollari e disfunzione
Displasia immuno-ossea di Schimke	SMARCAL1	AR	Displasia spondilo-epifisaria, immunodeficienza T e glomerulonefrite
Mutazione SEC61A1	SEC61A1	AD	Arresto della maturazione e nefrite tubulointerstiziale
Mutazione SMARCD2	SMARCD2	AR	Sindrome displastica, deficit dei granuli specifici dei neutrofili, diarrea cronica, anomalie ossee
Deficit granuli specifici dei neutrofili	CEBPE	AR	Neutrofili a nuclei bilobati
Mutazione TCIRG1	TCIRG1	AD	Eventuale arresto della maturazione, angiomatosi cutanea
Mutazione VPS45	VPS45	AR	Iperplasia mieloide, mielofibrosi, nefromegalia, ritardo mentale ed epilessia
Sindrome di Wolcott-Rallison	EIF2AK	AR	Arresto di maturazione, diabete neonatale insulino-dipendente, displasia epifisaria, ritardo nella crescita, disfunzione epatica e renale, ritardo nello sviluppo e deficit del pancreas esocrino
Associata a immunodeficienza o immunodisregolazione			
Deficit di Adenosina deaminasi di tipo 2	ADA2	AR	Immunodeficienza combinata grave, vasculite, malattia cerebrovascolare, <i>pure-red cell</i> aplasia
Sindrome linfoproliferativa autoimmune	FAS, FASLG, CASP10	AD	Linfoproliferazione e citopenie autoimmuni
Sindrome da Iper IgM di tipo I	CD40L	X-linked	Infezioni gravi, malattie autoimmuni e predisposizione tumorale
Sindrome di Chédiak-Higashi	LYST	AR	Albinismo oculocutaneo, presenza di corpi inclusi perossidasi negativi nei precursori midollari
Sindrome CLPB	CLPB	AR	Cataratta e coinvolgimento neurologico
Linfoistiocitosi emofagocitica familiare	PRF1, deficit di Perforina (FHL2), UNC13D	AR	Febbre, epatosplenomegalia e citopenie
Sindrome GATA2	GATA2	AD	Monocitopenia, sordità e infezioni da HPV
Sindrome di Griscelli di tipo II	RAB27A	AR	Ipomelanosi e compromissione neurologica

Sindrome di Hermansky-Pudlak di tipo II	AP3B1	AR	Albinismo
Disgenesia reticolare	AK2	AR	Immunodeficienza combinata grave e sordità neurosensoriale
Mutazione STK4	STK4	AR	Neutropenia intermittente, monocitopenia, linfocitopenia T e B, difetto atriale e infezioni da HPV.
Sindrome di WHIM	CXCR4	AD	Assenza di arresto maturativo, mielocatessi, linfopenia, cardiopatie congenite (Tetralogia di Fallot)
Sindrome di Wiskott-Aldrich	WAS	X-linked	Eczema, trombocitopenia, infezioni gravi e diarrea sanguinolenta
CVID	TNFSRF13, BAFRR, CTL4, LRBA, PI3K	AD, AR	Infezioni recidivanti, ipogammaglobulinemia e citopenie autoimmuni, inclusa neutropenia
Associate a disordini metabolici o deficit nutrizionali			
Malattia di Gaucher di tipo I	GBA	AR	Epatosplenomegalia, trombocitopenia e lesioni osteolitiche
Deficit di glicogeno sintetasi di tipo Ib	SLC37A4/G6PT1	AR	Epatomegalia, IBD e ipoglicemia da digiuno
Acidemia isovalerica	IVD	AR	Chetoacidosi neonatale, ritardo di crescita, letargia, rifiuto di alimentazione
Acidemia metilmalonica	MMUT	AR	Letargia, deficit di crescita, vomito incoercibile, ipotonia, epatomegalia e ritardo di crescita
Acidemia propionica	PCCB, PCCA	AR	Letargia, cardiomiopatia, difficoltà nell'alimentazione ed encefalopatia acuta
Deficit di transcobalamina II	TCN2	AR	Ritardo di crescita, diarrea, vomito, letargia e ulcerazione mucosa
Associate a deficit midollari			
Anemia di Franconi	Geni implicati nella riparazione del DNA e nella stabilità genomica	AR, X-linked	Malformazioni congenite e predisposizione tumorale
Sindrome atassia e pancitopenia	SAMD9/SAMD9L	AD	Insufficienza surrenale, malformazioni congenite, atassia cerebellare, gravi infezioni
Mutazione SRP54	SRP54	AD	Arresto maturativo, grave ritardo del neurosviluppo e disfunzione esocrina pancreatica
Disordini telomerici	DKC1 hTR, TERT, TINF2, DKC1 ACD, PARN TERT, NHP2, NOP10 WRAP53, NOLA3, TCB1, RTEL1, CTC1	X-linked AD AR	Fibrosi epatica, fibrosi idiopatica polmonare e predisposizione tumorale
Sintesi del snRNA U6	USB1 (Sindrome di Clericuzio, poichiloderma ereditaria)	AR	Retinopatia, ritardo di crescita, dismorfismi faciali e poichiloderma
Ribosomopatie			
Anemia di Diamond-Blackfan	RPS7, RPS10, RPS15, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS27a, RPS28, RPS29, RPL9, RPL11, C RPL15, RPL18, RPL26, RPL27, RPL31, RPL35a GATA1 EPO	AD X-Linked AR	Ipoplasia eritroide, malformazioni congenite, ritardo di crescita, osteosarcoma, leucemia acuta mieloide Anemia ad insorgenza precoce, trombocitopenia e ipoplasia eritroide midollare
	TSR2, HEATR3	X-linked, AR	Ipoplasia eritroide, dismorfismi faciali, bassa statura e disabilità intellettiva
Ipoplasia Trico-Cartilaginea	RMRP	AR	Nanismo e altre anomalie scheletriche, condrodiplosia metafisaria, lassità legamentosa, deficit immunitario, calvizie
Sindrome di Shwachman-Diamond	SBDS, ELF1, DNAJC21	AR	Neutropenia lieve, disgranulopoiesi, lieve dismegalariopoiesi, diseritropoiesi, deficit pancreatico esocrino, displasia metafisaria, ritardo cognitivo, cardiomiopatia, anomalie a capelli, pelle e denti

2.1.2. Le neutropenie acquisite

Le neutropenie acquisite costituiscono un'entità clinica eterogenea, derivante da una pluralità di fattori eziologici.³⁴

Tra le forme primarie si distinguono le neutropenie immunomediate e quelle non immunomediate.³⁵

Le *neutropenie immunomediate*, o neutropenie autoimmuni (NAI), sono caratterizzate da una riduzione della NA nel sangue, concomitante alla presenza di anticorpi anti-neutrofilo nel siero del paziente. Le manifestazioni cliniche della NAI possono variare notevolmente da forme asintomatiche a forme gravi, seppur in quota minoritaria.³⁶ Le *neutropenie non immunomediate* sono contraddistinte da una riduzione della NA in assenza di anticorpi specifici.²⁴

Le forme acquisite secondarie includono numerose manifestazioni: neutropenie secondarie a infezioni, farmaci o a deficit nutrizionali.⁶

La classificazione delle neutropenie acquisite è riassunta in tabella 2.

Tabella 2: Classificazione delle neutropenie acquisite. Tratto da Fioredda et al (2023).

Neutropenie primarie		
<i>La neutropenia rappresenta il tratto predominante nel quadro clinico; spesso è isolata</i>		
Anticorpo mediata	Autoimmune primaria	
	Alloimmune primaria	
Non anticorpo mediata	Neutropenia idiopatica dell'infanzia	
	Neutropenia idiopatica cronica nell'adulto	
Neutropenie secondarie		
<i>La neutropenia è associata o causata da altre condizioni patologiche</i>		
Splenomegalia	Splenomegalia congestizia, infiltrativa, fagocitica e reattiva	
Infezioni	Virali	HIV, HCV, HBV, CMV, EBV, Influenza, Parvovirus B19, Morbillo, Sars-Cov-2
	Batteriche	Salmonella, Brucella, Rickettsia, Mycobacterium, H. Pylori
	Parassitarie	Plasmodium spp, Leishmaniosi viscerale
	Fungine	Istoplasmosi
Malattie autoimmuni	Organo specifiche	Patologie tiroidee, malattie infiammatorie intestinali e cirrosi biliare primaria
	Sistemiche	Lupus eritematoso sistemico, sindrome di Felty, sindrome di Sjögren
Carenze nutrizionali	Vitamina B12, acido folico, ferro, rame e deficit calorico	
Disturbi immunoregolatori	Immunodeficienza comune variabile, sindrome linfoproliferativa autoimmune (ALPS), malattie ALPS-simili, linfoistiocitosi emofagocitica e sindrome da attivazione macrofagica	

Patologie ematologiche	Primarie	Anemia aplastica
	Clonali	Leucemie mieloidi e linfoidi, inclusa la leucemia linfocitica granulata
Farmaci	Chemioterapici	
	Non chemioterapici	Analgesici e FANS, antibiotici, diuretici, antiretrovirali, antitiroidei, clozapina, deferiprone, fenotiazine, anticorpi monoclonali e terapie biologiche

Likely Acquired

Nei bambini/adolescenti, quando la neutropenia si manifesta o persiste oltre i 5 anni di età in presenza o in assenza di anticorpi specifici contro i neutrofili, la definizione di neutropenia a insorgenza tardiva e di lunga durata può essere appropriata. Articoli recenti hanno identificato questa neutropenia atipica come un epifenomeno di disregolazione immunitaria con caratteristiche biochimiche/immunologiche tipiche e la presenza di varianti nei geni che regolano l'immunità.

3. Le neutropenie immunomediate

Nel processo diagnostico di NAI la positività agli anticorpi anti-neutrofilo (o anti-granulocita) è un requisito essenziale per definirne la diagnosi: i diversi tipi di neutropenia autoimmune sono caratterizzati dalla presenza di anticorpi diretti contro gli antigeni di superficie dei neutrofili.

Gli anticorpi anti-neutrofilo interferiscono con la maturazione e la funzione dei neutrofili.³⁷

Si distinguono tre forme di neutropenia immunomediata: la neutropenia alloimmune, la neutropenia autoimmune primaria e la neutropenia autoimmune secondaria.³⁸

3.1. Anticorpi anti-neutrofilo

Già agli inizi del XX secolo si osservò che i sieri di alcuni pazienti inducevano l'agglutinazione dei leucociti di altri individui.³⁹

Studi successivi hanno dimostrato che l'infusione di anticorpi anti-granulociti di coniglio in cavie sane causava neutropenia, dovuta alla fagocitosi dei granulociti opsonizzati da parte dei macrofagi splenici e midollari.^{40,41} Tuttavia la prima descrizione formale dell'antigene granulocita-specifico risale al 1960, ad opera di Lalezari et al⁴². Questo antigene fu descritto nel contesto della neutropenia neonatale alloimmune.⁴³ L'analisi in vitro ha permesso di chiarire i meccanismi fisiopatologici alla base dell'eliminazione dei neutrofili in questa condizione. Gli anticorpi anti-neutrofilo inducono l'agglutinazione dei neutrofili mediata dal complemento e la loro fagocitosi. Nei pazienti con NAI, la fagocitosi splenica è il principale meccanismo di rimozione dei neutrofili opsonizzati dalla circolazione⁴⁴, sebbene altri siti fagocitari possano essere coinvolti. Studi con radiomarcatura con Indio (¹¹¹In) hanno dimostrato l'eliminazione dei neutrofili da parte di numerosi tessuti contenenti cellule fagocitarie.⁴⁵ Inoltre gli anticorpi anti-granulocita possono influenzare la mielopoiesi nel midollo osseo, contribuendo alla neutropenia.⁴⁶

Gli anticorpi anti-neutrofilo, prevalentemente di classe IgG, si legano ad antigeni specifici espressi sulla superficie dei neutrofili.³⁹ Gli antigeni sono designati dalla sigla HNA, acronimo di *Human Neutrophil Alloantigens*, per evidenziare la loro presenza sui neutrofili. La glicoproteina è indicata da un numero; per esempio, il recettore FcγIIIb

(FcγRIIIb) è noto come HNA-1. I vari polimorfismi della stessa glicoproteina sono identificati alfabeticamente, seguendo l'ordine cronologico di scoperta (HNA-1a, HNA-1b, eccetera).⁴³

Sono state descritte cinque classi di HNA (tabella 3), espressi con frequenza variabile nelle diverse popolazioni.^{47,48} Nella maggior parte dei pazienti affetti da neutropenia immunomediata gli anticorpi appartengono alla classe 1 e sono diretti contro antigeni localizzati sul recettore FcγRIIB.

Tabella 3: Principali antigeni dei neutrofili umani (HNA) - Tratto da Farruggia P et al (2016).

Glicoproteina	Antigene
FcRIIIb (CD16b)	HNA-1a
	HNA-1b
	HNA-1c
	HNA-1d
Gp 58-64 (CD177)	HNA-2a
Choline transporter-like protein 2	HNA-3a
	HNA-3b
CD11b	HNA-4
	HNA-4
CD11a	HNA-5
	HNA-5bw

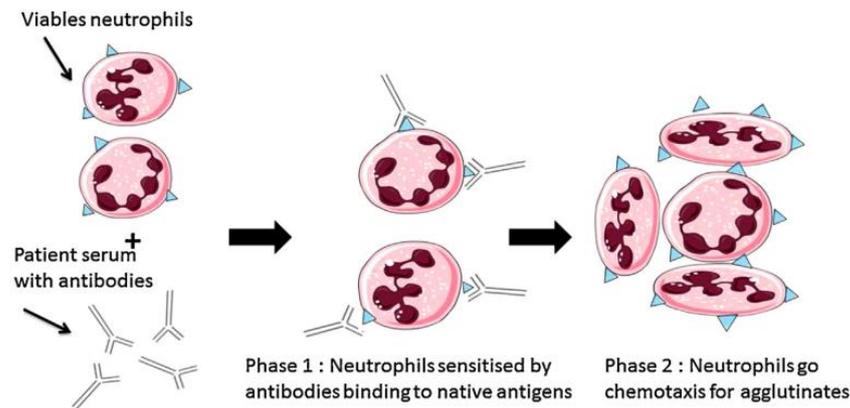
3.2. Metodi di identificazione degli anticorpi anti-HNA

L'identificazione degli anticorpi anti-HNA riveste un ruolo cruciale nella diagnostica dell'AIN⁴⁹; tuttavia tale determinazione presenta notevoli difficoltà, ostacolando la diagnosi precisa e la gestione efficace della malattia.⁵⁰

Attualmente i test di riferimento per la ricerca degli anticorpi anti-HNA includono il test diretto di agglutinazione sui granulociti (*Granulocyte Agglutination Test* o GAT) e il test indiretto di immunofluorescenza (*Granulocyte Immunofluorescence Test* o GIFT). Il GAT, utilizzato per rilevare gli anticorpi anti-HNA, tende a generare molti falsi positivi^{51,52}; il test GIFT, impiegato per identificare gli anticorpi specifici per i granulociti nel siero del paziente presenta, invece, un'alta incidenza di falsi negativi.⁵⁰

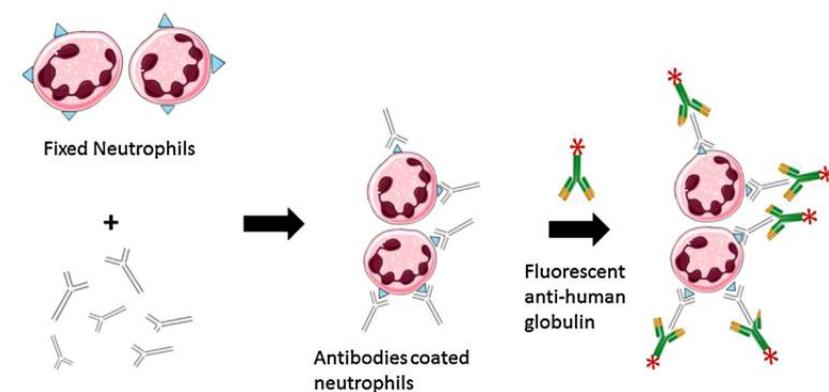
Durante il *test diretto* (figura 1), o *GAT*, il processo di agglutinazione è un processo attivo indotto dagli anticorpi IgG che si sviluppa in due fasi: inizialmente gli anticorpi anti-HNA, presenti nel siero del paziente, si legano agli antigeni presenti sui neutrofili; successivamente i neutrofili sensibilizzati sono soggetti a chemiotassi e, legandosi ad altri neutrofili, formano aggregati microscopici.⁵³

Figura 1: Test diretto (GAT) per la ricerca di anticorpi anti-HNA. Tratto da Moignet A et al. La Presse Médicale (2014)



Durante il *test indiretto* (figura 2), o *GIFT*, i neutrofili, prelevati da donatori, sono incubati con il siero del paziente per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono marcati con frammenti di IgG coniugati a molecole fluorescenti; il legame degli anticorpi viene valutato utilizzando la tecnica della citometria a flusso.⁵⁴

Figura 2: Test indiretto (GIFT) per la ricerca di anticorpi anti-HNA. Tratto da Moignet A et al. La Presse Médicale (2014).



È stato dimostrato che la combinazione dei due test, diretto ed indiretto, costituisce il metodo più efficace per individuare gli anticorpi granulocitari⁵⁵. Questa combinazione sinergica offre una maggiore sensibilità e specificità nella diagnosi.^{43,56}

Un'altra valida alternativa è il test MAIGA (*Monoclonal Antibody Immobilisation of Granulocyte Antigens*)⁵⁷, una tecnica che consente di stabilire contemporaneamente la specificità degli anticorpi verso una gamma di antigeni.⁵⁸ A differenza di GIFT e GAT, che impiegano i neutrofili per identificare gli anticorpi, il test MAIGA individua esclusivamente gli anticorpi che si legano a specifiche glicoproteine della membrana dei granulociti, fornendo risultati più precisi.⁴³ Tuttavia quest'ultimo è un test tecnicamente complesso che richiede molto tempo, poiché necessita di un gran numero di neutrofili da esaminare. I neutrofili, inoltre, sono difficili da manipolare *in vitro*, dato che sono cellule relativamente fragili e hanno una sopravvivenza mediana *in vivo* di circa sette ore.⁵³

3.3. La neutropenia alloimmune

Le prime segnalazioni di casi sospetti di agranulocitosi immunomediata tra fratelli furono riportate negli anni '50^{57,59}, ma fu solo nel 1960 che Lalezari et al evidenziarono per la prima volta la presenza di anticorpi materni responsabili di grave neutropenia, denominando tale condizione "neutropenia neonatale isoimmune", oggi nota come Neutropenia Alloimmune Neonatale (*Neonatal Alloimmune Neutropenia*, NAIN).⁴²

La NAIN rappresenta una condizione di rara incidenza, ma con potenziali conseguenze gravi per lo sviluppo fetale e del neonato. Il processo eziopatogenico alla base è rappresentato dalla sensibilizzazione materna agli antigeni paterni presenti sulle cellule dei neutrofili fetali. Gli anticorpi anti-HNA vengono trasportati attraverso la placenta legandosi ai neutrofili fetali. Questo legame ha conseguenze significative sulla granulocitopoiesi e sulla salute del neonato⁶⁰, compromettendo la capacità del suo sistema immunitario di difendersi dalle infezioni batteriche.⁶¹

Secondo diversi studi la maggior parte dei casi di NAIN è attribuibile ad alloanticorpi materni diretti contro l'HNA-1, ovvero l'antigene neutrofilo più immunogenico.^{62,63} La presenza di tali anticorpi può portare a una grave neutropenia, con potenziali esiti avversi quali polmonite, meningite, infezioni cutanee, sepsi e, nei casi più gravi, il decesso.^{60,64} Dal punto di vista terapeutico il trattamento antibiotico risulta essere spesso sufficiente; quello con G-CSF è altamente efficace nell'aumentare il numero di neutrofili entro pochi giorni e può essere preso in considerazione soprattutto per i neonati colpiti da infezioni gravi.^{61,65,66}

3.4. La neutropenia autoimmune primaria

La neutropenia autoimmune primaria (*Primary AutoImmune Neutropenia*, pNAI) è un raro disordine della prima infanzia, con incidenza di 1/100000. Di solito è diagnosticata durante i primi mesi di vita (5-15 mesi).⁴⁶

Nonostante l'alta prevalenza di neutropenia al momento della diagnosi ($0.5-1.0 \times 10^9$ cellule/L), il decorso clinico è generalmente non complicato. Di norma il midollo osseo è in grado di produrre un adeguato numero di neutrofili in risposta all'infezione, il che potrebbe spiegare l'incidenza piuttosto bassa (12-20%) di infezioni gravi nei neonati con pNAI.^{6,67,68}

Infatti la gravità della neutropenia, che si traduce clinicamente nel tasso di infezioni, dipende dalla capacità del midollo osseo di veicolare i neutrofili ai tessuti piuttosto che dai livelli di NA in quanto tali.^{69,70}

La produzione di anticorpi anti-HNA è un elemento fondamentale nella patogenesi della pNAI. Gli anticorpi anti-HNA sono principalmente diretti contro HNA-1 e HNA-4.⁷¹ L'origine e la patogenesi di questi autoanticorpi rimangono incerte. Tuttavia è possibile che siano associati ad una serie di meccanismi, tra cui il mimetismo molecolare di alcuni antigeni microbici, le alterazioni di antigeni endogeni in seguito all'esposizione a farmaci, l'espressione aumentata o aberrante di antigeni HLA o la perdita dell'attività soppressiva nei confronti dei linfociti autoreattivi.⁷²

L'analisi dell'aspirato midollare rivela una funzione cellulare staminale normale e un'elevata frequenza di progenitori differenziati. Tale aspetto è evidenziato da un significativo aumento delle proporzioni di cellule CD34+ nella citofluorimetria e da un incremento del numero di unità formanti colonie granulocitiche-macrofagiche (CFU-GM) nelle cellule mononucleate del midollo osseo. In aggiunta, nei pazienti affetti da pNAI, la funzione stromale del midollo osseo risulta normale, in quanto è in grado di supportare l'emopoiesi fisiologica. Pertanto i pazienti con pNAI grave e resistente possono essere considerati candidati idonei per il trapianto di cellule staminali autologhe dopo adeguata immunosoppressione.⁷³

Negli ultimi anni diversi studi^{54,68,71,74-78} hanno descritto coorti di pazienti affetti da neutropenia autoimmune, con risultati complessivamente sovrapponibili (riassunti in tabella 4).

Tabella 4: Caratteristiche di diverse coorti di pazienti affetti da pNAI.

	N° pz	Età diagnosi	% Femmine	Inf. Gravi	Risoluzione	Durata NP (mesi)
Lalezari 1986	121	8 (3-30)	60%	--	95%	20
Bux 1998	240	8 (5-15)	54%	12%	80%	7-24
Bruin 1999	21	--	--	No	86%	30 (16-52)
Chung 2004	24	9	50%	10%	55% a 3 aa	28.6
Wang 2009	55	9,8	45%	No	100% (di 24 pz)	12.7 (13-44)
Sella 2010	72	10 (0-42)	37%	15%	100 % (di 53 pz)	4.4 (0.5-30)
Audrain 2011	116	16 (3-59)	48%	--	--	--
Farruggia 2015	157	8 (0-54)	36%	9.6 %	90% a 5 aa	15.6

In sintesi la maggior parte dei pazienti affetti da pNAI presenta una giovane età di esordio (7-8 mesi) e una risoluzione della condizione entro i 36 mesi dalla diagnosi. Il fenotipo clinico è generalmente lieve, con una bassa incidenza di infezioni gravi (circa 10-15%).

3.5. La neutropenia autoimmune secondaria

Le neutropenie autoimmuni secondarie (sNAI) sono associate ad altre patologie concomitanti. La condizione di neutropenia si manifesta in una coorte di pazienti affetti da malattie autoimmuni, condizioni ematologiche, tumori solidi o sindromi da deficit immunitari. Queste complicanze risultano più frequenti in età adulta.⁷⁹

Le tre principali malattie autoimmuni associate alle sNAI sono, in ordine decrescente di frequenza: Sindrome di Felty (*Felty Syndrome*, FS), Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e Sindrome di Sjögren (*Sjögren Syndrome*, SS).³⁹

La FS è stata storicamente descritta come l'associazione tra artrite reumatoide, neutropenia e splenomegalia e si verifica in meno dell'1% dei pazienti con artrite reumatoide.⁸⁰ La neutropenia è spesso inferiore a 1.0×10^9 cellule/L e aumenta il rischio di infezioni cutanee e del tratto respiratorio.⁸¹ Diversi fattori, tra cui farmaci, meccanismi autoimmuni e infezioni virali coesistenti, possono contribuire alla neutropenia nei pazienti affetti da artrite reumatoide.⁸²

Nel LES la neutropenia è rara (solo il 5% dei pazienti presenta neutropenia moderata o grave). In questi pazienti il tasso di apoptosi dei neutrofili è correlato all'attività della

malattia: l'apoptosi determina l'esposizione di antigeni di membrana e la sintesi di autoanticorpi.⁸³

La SS è una malattia autoimmune che colpisce le ghiandole esocrine. In questi pazienti l'incidenza della neutropenia risultata essere del 12%, di cui il 2% in forma grave. Il quadro clinico è dominato da xerofthalmia e xerostomia causati dall'infiltrazione di cellule CD4+ nelle ghiandole esocrine, in particolare quelle salivari e lacrimali.⁸⁴ Nei pazienti affetti da neutropenia non sono state riscontrate differenze cliniche significative. Tuttavia alcuni marker immunologici hanno evidenziato variazioni: i pazienti con neutropenia presentano più frequentemente elevati livelli di anticorpi anti-Ro/SSA (68% rispetto al 22%, $p < 0.001$) e fattore reumatoide (68% rispetto al 32%, $p < 0.001$).³⁹

Le sNAI presentano caratteristiche differenti rispetto alle pNAI. In primo luogo, nelle sNAI gli anticorpi anti-HNA sono, di norma, solo una delle principali cause di neutropenia, che può essere determinata anche da sequestro periferico, mielosoppressione o apoptosi. Inoltre, nella maggior parte dei casi di sNAI, il bersaglio degli autoanticorpi rimane ignoto e alla neutropenia può essere associata trombocitopenia e/o anemia emolitica.^{72,79}

La neutropenia autoimmune secondaria in età pediatrica è una condizione che presenta una documentazione limitata. Tuttavia, uno studio condotto in Italia ha analizzato una piccola casistica proveniente dal Registro Italiano delle Neutropenie. In questo studio sono stati confrontati 26 pazienti affetti da sNAI con una coorte di 263 pazienti affetti da pNAI.⁸⁵

Le differenze significative tra la neutropenia primitiva e quella secondaria sono state riassunte in tabella.

Tabella 5: Confronto tra una coorte di pNAI e di sNAI. Tratto da Farruggia et al (2017).

	pNAI (263)	sNAI (26)	p
Sesso (F%)	41%	61%	0.049
Età all'esordio (mediana)	0.77	10.07	< 0.01
Età alla diagnosi (anni, mediana)	1.09	10.98	< 0.01
G-CSF	6.9%	23.1%	< 0.01
Infezioni gravi	11.8%	40.0%	< 0.01
Risoluzione spontanea	74.9%	7.7%	< 0.01
Età alla risoluzione (mediana)	2.14	14.11	< 0.01
Leucociti (mediana) all'esordio	$5.93 \times 10^9 /L$	$2.48 \times 10^9 /L$	< 0.01

Linfociti (mediana) all'esordio	4.36 x 10 ⁹ /L	1.58 x 10 ⁹ /L	< 0.01
Monociti (mediana) all'esordio	0.62 x 10 ⁹ /L	0.34 x 10 ⁹ /L	< 0.01
NA (mediana) all'esordio	0.45 x 10 ⁹ /L	0.63 x 10 ⁹ /L	0.035

L'età mediana all'esordio della neutropenia è di 0.77 anni per la pNAI e di 10.07 anni per la sNAI. Tra i pazienti con pNAI è stata riscontrata una quota maggiore di ex-prematuri. Si tratta di un dato interessante: suggerisce un possibile legame tra la pNAI e la presenza di un sistema *T-suppressor* immaturo; la neutropenia è una condizione molto comune nei neonati prematuri e contribuisce al rischio di sepsi ed enterocolite necrotizzante.⁸⁶

Il valore medio di NA all'esordio è inferiore nella pNAI (0.45 x 10⁹/L rispetto a 0.63 x 10⁹/L nella sNAI). D'altra parte nella sNAI si osserva linfopenia, assente nella pNAI (1.58 linfociti x 10⁹/L nella sNAI rispetto a 4.36 x 10⁹/L nella pNAI). Altre differenze includono una maggior frequenza di infezioni gravi e leucopenia nella sNAI, mentre nella pNAI si riscontra monocitosi.

La sNAI può essere associata a diverse condizioni, tra cui sindrome di Evans, tiroidite autoimmune, celiachia, deficit di GH, diabete, epatite ed encefalite autoimmune.⁵⁰ Nel 42.3% dei pazienti sNAI i sintomi di autoimmunità sono comparsi contemporaneamente alla neutropenia, nel 30.7% l'hanno preceduta e nel 26.9% l'hanno seguita.⁸⁵

Rispetto alla pNAI, la sNAI tende a risolversi solo in una minoranza dei casi (7.7% dei pazienti). Questa caratteristica qualifica la neutropenia secondaria come una patologia con maggiore tendenza alla cronicizzazione. Nella popolazione adulta la neutropenia autoimmune secondaria è più frequente di quella primitiva e può essere associata a infezioni, somministrazione di farmaci, immunodeficienza, neoplasie, trapianto di staminali emopoietiche e altre patologie autoimmuni.⁸⁵

La neutropenia secondaria in età pediatrica condivide alcune caratteristiche con la neutropenia autoimmune dell'adulto, come la prevalenza del sesso femminile, la bassa frequenza di risoluzione spontanea, la presenza di leucopenia e monocitosi all'esordio e la necessità di terapia con G-CSF. In conclusione, i dati suggeriscono che la neutropenia autoimmune dell'adulto (primaria o secondaria) e la neutropenia pediatrica secondaria possano essere interpretate come diverse manifestazioni, più o meno precoci, di un'unica entità patologica.⁸⁷

4. Le neutropenie non immunomediate

Le neutropenie non immunomediate, o non anticorpo mediate, costituiscono un insieme di neutropenie caratterizzate da una diminuzione dei neutrofilo nel sangue periferico e non associate a titolo anticorpale positivo.⁸⁸

Tra queste la Neutropenia Idiopatica (NI) rappresenta la manifestazione più rilevante.²⁰

La NI è una condizione caratterizzata da neutropenia cronica, titolo anticorpale anti-HNA persistentemente negativo e assenza di cause secondarie. La diagnosi di NI è fondamentalmente una diagnosi di esclusione, stabilita solo dopo aver escluso altre possibili cause di neutropenia.⁸⁹

La patogenesi della NI rimane ancora oggetto di studio. Le attuali ipotesi suggeriscono un'eziologia multifattoriale, che coinvolge principalmente una marcata marginalizzazione dei neutrofilo e un'aumentata eliminazione dei neutrofilo a livello periferico.⁹⁰

All'interno dell'ampio spettro della NI, è possibile distinguere due entità cliniche distinte: la neutropenia idiopatica dell'infanzia e la neutropenia idiopatica cronica dell'adulto (*Chronic Idiopathic Neutropenia, CIN*).

La forma infantile presenta una clinica simile alla pNAI, rendendo complicata una accurata diagnosi di esclusione, mentre la CIN si manifesta in età adulta ed è spesso associata a citopenie multiple.⁹¹

4.1. La neutropenia idiopatica dell'infanzia

Come precedentemente anticipato, esiste una certa sovrapposizione clinica tra i pazienti con diagnosi di NI e pNAI. Tale sovrapposizione deriva sia dalla difficoltà intrinseca nell'identificare con precisione gli anticorpi anti-HNA e sia dalla difficoltà nell'interpretazione clinica della positività al test per la ricerca di tali anticorpi.⁵⁸

Pertanto, in presenza di un primo test negativo ma con persistente sospetto clinico di pNAI, è raccomandata la ripetizione del test fino a quattro o più volte. Se tutti i test indiretti rimangono negativi e il quadro clinico è compatibile con pNAI, i pazienti vengono definiti affetti da NI.⁹²

Occorre specificare che la diagnosi di neutropenia idiopatica dell'infanzia è una diagnosi di esclusione che deve essere periodicamente rivalutata nei soggetti in età pediatrica:

nuovi elementi, acquisiti nel corso del follow up, possono caratterizzare meglio il profilo di questa condizione, consentendo spesso una riclassificazione.⁹³

La più ampia casistica di NI è stata descritta in uno studio italiano pubblicato nel 2019.⁹² Lo studio ha riportato le caratteristiche cliniche e il decorso di 85 bambini affetti da NI, arruolati nel Registro Italiano delle Neutropenie. I dati sono stati confrontati con una coorte di soggetti affetti da pNAI. Questa analisi ha permesso di delineare un quadro più completo della NI, fornendo informazioni preziose per la diagnosi differenziale e per la gestione clinica di questa rara condizione; i dati sono riassunti in tabella 6.

Tabella 6: Confronto tra una coorte di NI e una di pNAI. Tratto da Farruggia et al (2019).

	pNAI (336)	NI (85)	p
Sesso (M%)	56.8%	50.6%	0.29
Età all'esordio (anni, mediana)	0.8	1.2	< 0.001
Età alla diagnosi (anni, mediana)	1.1	2.0	< 0.001
NA (mediana) all'esordio	0.45 x 10 ⁹ /L	0.38 x 10 ⁹ /L	0.47
Neutropenia grave	55.2%	60.0%	0.28
Neutropenia moderata	37.6%	29.4%	0.28
Neutropenia lieve	7.2%	10.6%	0.28
Conta leucocitaria (mediana) all'esordio	6.1 x 10 ⁹ /L	5.7 x 10 ⁹ /L	0.60
Leucopenia all'esordio	35.9%	42.4%	0.27
Conta monocitaria (mediana) all'esordio	0.62 x 10 ⁹ /L	0.61 x 10 ⁹ /L	0.87
Monocitosi all'esordio	20.0%	29.3%	0.08
Conta linfocitaria (mediana) all'esordio	4.5	4.3	0.16
Trombocitosi all'esordio	11.1%	20%	0.06
Aumento delle IgG all'esordio	6.6%	5.9%	0.83
Deficit isolato di IgA	3.1%	3.0%	0.97
Test di Coombs diretto positivo	4.4%	3.1%	0.74
Esecuzione aspirato midollare	31.6%	49.4%	0.003
Infezioni gravi	11.9%	11.8%	0.97
Trattamento con G-CSF	7.5%	2.8%	0.29

L'analisi ha evidenziato una notevole somiglianza tra i pazienti con NI e pNAI per quanto riguarda la presentazione clinica, il tipo e il numero delle infezioni, i fattori prognostici, il tempo e le modalità di risoluzione della neutropenia.

Peraltro sono state identificate differenze in due parametri chiave, l'età di esordio e l'età alla diagnosi. La pNAI tende a manifestarsi in età più precoce rispetto alla NI, con un'età media di esordio rispettivamente di 0.8 anni e 1.2 anni ($p < 0.001$). Analogamente l'età media alla diagnosi di pNAI è risultata inferiore rispetto a quella della NI, con valori rispettivamente di 1.1 e 2 anni ($p < 0.001$).

Lo studio non ha rilevato alcuna differenza significativa in altri aspetti clinici, tra cui valori di leucociti e linfociti, leucopenia per età, NA, severità della neutropenia, monocitosi, sottopopolazioni linfocitarie, presenza di piastrinosi, incidenza di infezioni gravi, ipergammaglobulinemia o positività del test di Coombs diretto. Tali risultati suggeriscono che NI e pNAI possano rappresentare due varianti dello stesso spettro clinico, con differenze minime nella presentazione all'esordio e nel momento della diagnosi.

L'analisi del follow-up a cinque anni non ha evidenziato differenze significative nella tendenza alla risoluzione spontanea della neutropenia tra NI e pNAI. I tassi di risoluzione spontanea erano simili nei due gruppi, con l'87.12% dei pazienti con pNAI e l'81.28% dei pazienti con NI che hanno ottenuto la risoluzione della neutropenia dopo 5 anni. La minore età alla diagnosi e l'assenza di leucopenia e monocitosi all'esordio correlano a una risoluzione spontanea più precoce, sia nei pazienti con NI che in quelli con pNAI.⁹⁴

Alla luce delle evidenti somiglianze cliniche e prognostiche osservate tra i pazienti con NI e pNAI, gli autori dello studio concludono, in accordo con precedenti dati di letteratura^{71,77,92,95}, che la maggior parte dei casi di NI dell'infanzia possa in realtà rappresentare una forma di neutropenia immunomediata. Questa ipotesi è ulteriormente supportata dalla difficoltà di identificare gli anticorpi anti-HNA in pazienti con NI, dovuta alla limitata sensibilità delle tecniche diagnostiche attualmente disponibili.⁵⁰⁻⁵²

4.2. La neutropenia idiopatica cronica dell'adulto

La neutropenia idiopatica cronica nell'adulto (*Chronic Idiopathic Neutropenia*, CIN) è una forma di neutropenia cronica che non risulta essere mediata da anticorpi. Si manifesta negli adulti con un fenotipo generalmente lieve. Lo studio di tale patologia ha permesso di rivelare alcune peculiarità immunologiche.⁹⁶

La diagnosi di CIN rappresenta un processo complesso. Al fine di facilitare e standardizzare la procedura diagnostica, sono stati definiti criteri specifici che aiutano i

clinici a distinguere la CIN da altre condizioni con presentazione clinica simile. Innanzitutto una NA inferiore a 1.8×10^9 cellule/L nei caucasici (o 1.5×10^9 cellule/L nei soggetti di etnia africana), persistente per più di 3 mesi, è condizione necessaria per la diagnosi di NI. È fondamentale dimostrare l'assenza di malattie sottostanti attraverso esami clinici, sierologici ed ecografici negativi; il paziente non deve aver subito esposizione a radiazioni, sostanze chimiche o farmaci che possono causare neutropenia. Un cariotipo del midollo osseo normale è necessario per escludere anomalie cromosomiche. Infine è richiesta la negatività ripetuta ai test per gli anticorpi anti-HNA sierici, utilizzando sia il test GAT che il test GIFT.⁹⁷

La CIN è più frequente nella popolazione femminile, con un rapporto femmine/maschi di 6:1.⁶⁹ Diversi studi suggeriscono che la CIN potrebbe derivare da meccanismi di autoimmunità e disfunzioni delle cellule T.⁸⁹

Dall'analisi di popolazioni di pazienti affetti da CIN sono emersi dati che mostrano un quadro infiammatorio cronico, caratterizzato da elevati livelli di citochine pro-infiammatorie (IL 6, interferone γ e TGF β 1) e mediatori pro-apoptotici (TNF- α e IL-1 β) nel midollo.⁹⁸ L'alterazione del microambiente midollare favorisce l'apoptosi dei progenitori mieloidi, alimentando la neutropenia.⁹⁹

Un'analisi delle cellule T in questi pazienti ha evidenziato una riduzione delle cellule T naive e un aumento delle cellule CD8⁺ attivate, che potrebbero avere un'azione mielosoppressiva, contribuendo alla neutropenia. Bassi livelli di IL-7, una citochina importante per la maturazione e la sopravvivenza dei linfociti T, potrebbero ulteriormente spiegare queste alterazioni.¹⁰⁰

Nei pazienti affetti da CIN è stata osservata una riduzione significativa della concentrazione di monociti totali rispetto ai soggetti sani. Questa deplezione monocitaria è stata associata ad una concomitante diminuzione delle unità formanti colonie granulomonocitarie (GM-CFU) nel midollo osseo. Infine è stata rilevata una correlazione inversa tra il NA e la conta monocitaria nei pazienti con CIN. Queste evidenze suggeriscono un possibile meccanismo compensatorio in atto: la proliferazione monocitaria a livello midollare aumenterebbe in risposta alla neutropenia, tentando di colmare il deficit di neutrofili.⁹⁹

Un recente studio retrospettivo ha rilevato un significativo *overlap* diagnostico tra i pazienti con CIN e leucemia linfocitica granulosa a grandi cellule T (*T-Large Granular*

lymphocytic Leukemia, T-LGL): il 21% dei pazienti con CIN presentava caratteristiche cliniche e di laboratorio compatibili con la T-LGL, sebbene non soddisfacessero i criteri diagnostici formali. Inoltre nel 50% di questi pazienti non era presente la mutazione STAT3 tipica della T-LGL, suggerendo una forma di T-LGL meno polarizzata. L'assenza di anomalie del midollo osseo, riscontrata nelle biopsie del 53% dei pazienti, avvalorava ulteriormente l'ipotesi di una variante atipica di T-LGL.¹⁰¹

Dunque è ragionevole pensare che la CIN non sia, a tutti gli effetti, idiopatica, bensì a genesi autoimmune, o comunque immunomediata.

5. La neutropenia ad esordio tardivo e di lunga durata

Nella pratica clinica quotidiana non sono infrequenti casi di neutropenia autoimmune che sfuggono alle classiche categorizzazioni, non rientrando pienamente nei criteri diagnostici della pNAI o della sNAI.

Tali forme atipiche di neutropenia autoimmune presentano caratteristiche peculiari che le distinguono dai quadri clinici più comuni: non esordiscono nella prima infanzia o non vanno incontro a risoluzione spontanea.

Questi pazienti rappresentano una sfida diagnostica, poiché possono essere sottovalutati o erroneamente classificati come pNAI, ricevendo così un trattamento ed un follow-up inadeguato.

Partendo da questa osservazione, uno studio pubblicato nel 2020 ha, per la prima volta, identificato due nuovi sottotipi di neutropenia autoimmune: la neutropenia autoimmune ad esordio tardivo (LO-Np) e la neutropenia autoimmune di lunga durata (LL-Np). Lo studio ha analizzato un campione di 214 inclusi nel Registro italiano delle Neutropenie.¹⁰²

I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in base ai criteri definiti in precedenza: il gruppo pNAI comprendeva 135 pazienti (63%), mentre i gruppi LO-Np e LL-Np comprendevano rispettivamente 31 pazienti (15%) e 48 pazienti (22%). La coorte con diagnosi atipica era formata da 79 pazienti ed è stata confrontata con 135 pazienti con diagnosi di pNAI conclamata. Lo scopo dello studio era valutare se questi pazienti presentavano differenze immunoematologiche e cliniche rispetto alla pNAI classica.

I principali risultati di questo studio sono illustrati in tabella 7.

Tabella 7: Confronto tra pNAI, Late Onset Neutropenia (LO) e Long Lasting Neutropenia (LL). Tratto da Fioredda et al (2020).

	pNAI (135 pz)	LO-Np (31 pz)	LL-Np (31 pz)	p
Sesso (F)	41 (30%)	16 (52%)	25 (52%)	0.001
Età diagnosi [anni] (Mediana IQR)	0.6 (0.3-1.3)	11.5(7.6-14.6)	1.18 (0.6-2.2)	<0.001
Durata neutropenia [anni] (mediana (IQR)	1.03 (0.54-1.7)	2.1 (1.4-4.4)	4.5 (3.5-7.09)	<0.001
Risoluzione	135 (100%)	4 (13%)	28 (58%)	<0.001
NA all'esordio, mediana (IQR), x10 ⁹ /L	0.430 (0.23-0.716)	0.649 (0.43-0.97)	0.552 (0.35-0.79)	<0.001
Leucociti all'esordio, mediana (IQR), x10 ⁹ /L	6.125 (5.01-7.92)	3.18 (2.67-3.71)	5.03 (3.44-6.90)	<0.001
Linfociti all'esordio, mediana (IQR), x10 ⁹ /L	4.74 (3.50-5.88)	1.68 (1.24-1.90)	2.37(1.92-3.40)	<0.001
Monocitosi all'esordio	15/120 (12.5 %)	5/26 (19%)	10/38 (26%)	ns
Riduzione CD3	7/72 (10%)	2/24 (8%)	11/39 (28%)	0.02

Riduzione CD4	8/72 (11%)	4/25 (16%)	11/38 (29%)	0.06
Riduzione CD8	11/71 (15%)	4/25 (16%)	7/40 (17,5%)	ns
Riduzione CD19	6/64 (9%)	12/25 (48%)	13/37 (35%)	<0.001
Riduzione NK	10/62 (16%)	9/23 (39%)	10/34 (29%)	0.06
Deplezione di Ig	7/113 (6%)	4/26 (15%)	3/44 (7%)	ns
Episodi infettivi	65/130 (50%)	14/29 (48%)	18/47 (38%)	0.4
Infezioni gravi	16/65 (25%)	3/14 (21%)	3/18 (17%)	0.2
Terapia con G-CSF	7/135 (5%)	3/21 (14%)	7/42 (17%)	0.04
Malattie autoimmuni/ marker di autoimmunità	2/135 (1%)	16/29 (55%)	8/48 (17%)	<0.001

Come si evince dai dati sopra riportati, la pNAI esordisce nella prima infanzia, generalmente prima dei tre anni di età, e presenta un quadro clinico lieve o moderato. Si tratta, infatti, di una condizione autolimitante che si risolve spontaneamente nel tempo, con un tasso di remissione del 90% a 24-36 mesi.^{68,78,103}

Diversamente, i pazienti con LO-Np presentano un'età di esordio superiore ai 3 anni, mentre i pazienti con LL-Np esordiscono più precocemente, e comunque entro i 3 anni di vita, ma la patologia non si risolve entro 36 mesi.

Il confronto tra i tre gruppi mostra che, oltre alla differenza dell'età di insorgenza e alla durata della neutropenia, sono presenti differenze significative nella maggior parte delle variabili analizzate.

I pazienti con LO-Np e LL-Np presentano un valore mediano di NA significativamente più elevato rispetto ai pazienti con pNAI ($p < 0.001$); la neutropenia grave è più frequente nei pazienti con pNAI (58%) rispetto a quelli con LL-Np (37%) e LO-Np (32%) ($p < 0.001$).

La leucopenia è più comune nei pazienti con LO-Np (73%) rispetto a quelli con LL-Np (26%) e pNAI (11%) ($p < 0.001$), come visualizzato in figura 3.

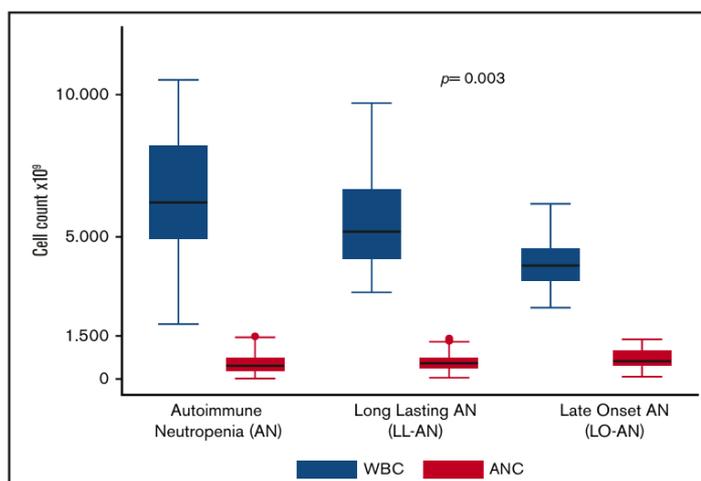


Figura 3: Conta assoluta di globuli bianchi e neutrofili: differenze tra AN, LL-Np e LO-Np. Tratto da Fioredda et al (2020).

L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie rivela una deplezione significativa dei linfociti CD19+ nei pazienti con LO-Np (48%) e LL-Np (35%), assente nei pazienti con pNAI ($p < 0.001$). Una deplezione simile si osserva per le cellule Natural Killer (NK) nei pazienti con LO-Np e LL-Np, mentre non vi è differenza significativa tra i gruppi per quanto riguarda la frequenza di infezioni gravi o ricorrenti o per il tipo di infezioni.

I pazienti con LO-Np presentano un tasso di risoluzione spontanea significativamente inferiore rispetto ai pazienti con LL-Np (58%) e pNAI (100%). Inoltre la conta totale dei globuli bianchi e dei linfociti è minore nel gruppo LO-Np.

Al contrario la differenza nel tasso di risoluzione spontanea tra pNAI e LL-Np è meno marcata (rispettivamente 100% e 58%). Questa osservazione avvalorata l'ipotesi, già sostenuta in studi precedenti⁸⁵, che almeno una parte dei pazienti con LL-Np possa presentare una risoluzione spontanea tardiva, qualificando la loro condizione come vera pNAI.

Un altro dato interessante emerso dallo studio è l'aumento del tasso di autoimmunità nei pazienti con LO-Np durante il decorso della malattia, con un tempo mediano di insorgenza di 42 mesi dalla diagnosi di neutropenia. Questo dato suggerisce una componente autoimmune più marcata nella LO-Np rispetto alla LL-Np. L'ipotesi che la neutropenia nella LO-Np rappresenti un fenomeno prodromico di una malattia da immunodeficienza/disregolazione, piuttosto che un evento isolato, è supportata da questa osservazione e da studi precedenti.^{72,85}

L'analisi di un pannello di 162 geni mediante Next Generation Sequencing (NGS) in un piccolo sottogruppo di pazienti con LO-Np e LL-Np ha rivelato varianti a carico dei geni TAC1, TNF2 e LRBA in 3/10 pazienti con LO-Np e 1/5 pazienti con LL-Np. Questi geni sono noti per essere associati a immunodeficienze monogeniche e telomeropatie, condizioni che possono influenzare il sistema immunitario.¹⁰⁴⁻¹⁰⁹

La presenza di tali varianti genetiche suggerisce che sia la LO-Np che la LL-Np possano avere una base patogenetica più complessa rispetto alla neutropenia autoimmune idiopatica (pNAI). Invece di rappresentare un evento isolato, queste due forme potrebbero essere un epifenomeno che anticipa lo sviluppo di una disregolazione immunitaria più ampia, un processo simile a quanto osservato in altre patologie autoimmuni.

Uno studio recente¹¹⁰ ha ampliato la conoscenza delle neutropenie atipiche, proponendo un'analisi sia con le forme con titolo anti-HNA positivo (LO/LL autoimmuni) che in

assenza di essi (LL/LO idiopatiche). Tale analisi è stata svolta utilizzando la statistica tradizionale e il Machine Learning.

Lo studio ha coinvolto 63 pazienti (di cui 31 femmine, pari al 49.2%). Tra questi, 32 pazienti (pari al 50.8%) soddisfacevano i criteri per LO/LL autoimmuni, mentre 25 pazienti (pari al 39.7%) soddisfacevano i criteri per LO/LL idiopatiche.

Lo scopo dello studio era valutare se queste due forme potessero essere considerate un'unica entità clinica e quale grado di immuno-disregolazione esprimessero, in termini di alterazione delle sottopopolazioni linfocitarie sostenuta da possibili varianti genetiche di IEI (*Inborn Error of Immunity*).

L'analisi ha evidenziato che, da un punto di vista clinico, ematologico, immunologico e genetico, le due forme LO/LL, sia idiopatiche che autoimmuni, appaiono come gruppi relativamente omogenei. Questa conclusione è stata avvalorata da un approccio statistico e da tecniche di Machine Learning, che hanno dimostrato un elevato grado di sovrapposizione tra i due gruppi.

Tale entità clinica si caratterizza per una neutropenia moderata, un basso rischio di infezioni e un fenotipo delle cellule T e B simile a quello di altri disordini autoimmuni. Si osserva una predisposizione allo sviluppo di fenomeni autoimmuni nel corso della malattia. In una quota minoritaria di pazienti è stata identificata una variante patogenetica o probabilmente patogenetica associata ai disturbi immuno-regolatori primari (PIRD).

In sintesi l'indagine sostiene la tesi che le LO/LL autoimmuni e idiopatiche possano essere considerate come una singola entità clinica, caratterizzata da una neutropenia autoimmune clinicamente moderata, con un potenziale rischio di progressione verso disturbi di immuno-deregolazione.

Questa entità clinica si sovrappone, clinicamente, alle neutropenie classificate come "Likely Acquired" dalle linee guida internazionali.²⁴

In conclusione, sia nelle neutropenie "Likely Acquired" che nelle LO/LL autoimmuni e idiopatiche, la neutropenia appare come un semplice epifenomeno di processi immunodisregolatori più complessi. Questi processi sono sostenuti, almeno parzialmente, da geni responsabili di IEI o PIRD.

SCOPO DELLO STUDIO

Le neutropenie croniche pediatriche rappresentano un quadro clinico eterogeneo, caratterizzato da una persistente riduzione del numero di neutrofili circolanti. Le due categorie principali sono le neutropenie autoimmuni primarie (pNAI) e le neutropenie idiopatiche (NI), entrambe caratterizzate da un esordio nella prima infanzia e da un basso tasso di infezioni gravi.

Tuttavia, all'interno di questo spettro nosologico, si distinguono le neutropenie "atipiche", che si discostano dalle pNAI e NI classiche per la loro persistenza oltre il tipico periodo di risoluzione o per un esordio tardivo (tarda infanzia/adolescenza). Queste forme presentano caratteristiche peculiari che le rendono difficilmente inquadrabili nelle categorie pNAI o NI.

Un precedente studio di Fioredda et al ¹⁰² ha approfondito le caratteristiche delle neutropenie atipiche, suddividendole ulteriormente in neutropenia autoimmune ad insorgenza tardiva e di lunga durata (LO/LL NAI) e neutropenia idiopatica ad insorgenza tardiva e di lunga durata (LO/LL NI). Lo studio ha evidenziato una sostanziale omogeneità clinica, ematologica, immunologica e genetica tra i due gruppi.

Tuttavia la letteratura scientifica attuale presenta una carenza di dati relativi a pazienti con neutropenia LL o LO.

La presente tesi si propone di ampliare il numero di pazienti analizzati, al fine di fornire ulteriori informazioni sulle caratteristiche cliniche, ematologiche, immunologiche e genetiche di queste forme atipiche di neutropenia, contribuendo ad una migliore comprensione della loro patogenesi e a un ottimale approccio diagnostico e terapeutico.

PAZIENTI E METODI

1. Criteri di inclusione e definizioni

I pazienti inclusi in questo studio sono stati selezionati dallo Studio Retrospectivo Prospettico Italiano delle Neutropenie Croniche, con sede presso l'Unità Operativa Complessa di Ematologia dell'Istituto Giannina Gaslini sito in Genova. Lo studio raccoglie dati su tutti i pazienti affetti da neutropenia cronica, definita come un valore di NA inferiore a 1.5×10^9 cellule/L in almeno tre determinazioni e di durata superiore a 3 mesi. Per ciascun paziente vengono raccolti dati clinici e genetici, previa acquisizione del consenso informato da parte del paziente o del tutore legale.

Per l'analisi di cui si tratta sono stati considerati eleggibili i pazienti registrati entro il 31 dicembre 2023 e appartenenti alle seguenti categorie:

- Neutropenia cronica a esordio precoce (*Long Lasting Neutropenia*): pazienti con neutropenia esordita prima dei 3 anni di età e persistente per almeno 3 anni;
- Neutropenia cronica a esordio tardivo (*Late Onset Neutropenia*): pazienti con neutropenia esordita dopo i 3 anni di età e di durata superiore a 12 mesi.

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti che presentavano almeno una delle seguenti caratteristiche:

- Citopenia concomitante all'esordio
- Patologia autoimmune o immunodeficienza all'esordio
- Neoplasia concomitante
- Storia di trapianto di midollo osseo
- Neutropenia iatrogena
- DARC/ACKR1 *associated neutropenia*

La diagnosi di neutropenia autoimmune è stata confermata dalla positività del test indiretto per la ricerca di anticorpi anti-neutrofilo (I-GIFT).

Per la diagnosi di neutropenia idiopatica erano necessarie almeno tre determinazioni di anticorpi anti-HNA con esito negativo. I pazienti con esito negativo in meno di tre determinazioni sono stati comunque inclusi nello studio, ma non sono stati considerati nel confronto diretto tra neutropenia idiopatica e autoimmune.

2. Raccolta dei dati

I dati dei pazienti sono stati ottenuti dallo Studio Retrospettivo Prospettico Italiano delle Neutropenie Croniche, previa firma del consenso da parte dei pazienti o dei loro tutori legali.

I dati raccolti per ciascun paziente includono:

- Dati anagrafici e anamnesi familiare, raccolti per indagare la presenza di patologie ematologiche o malattie autoimmuni tra i familiari del paziente;
- Anamnesi infettivologica dettagliata, registrazione del numero, tipo e gravità delle infezioni (ad esempio: afte, gengiviti, periodontiti, infezioni cutanee, ascessi, sinusiti, faringiti, bronchiti, otiti, polmoniti, batteriemie, ascessi epatici, infezioni delle vie urinarie);
- Valutazione clinica, rilevamento di eventuali stimmate cliniche (dismorfismi facciali, cardiopatie, malformazioni, epatomegalia, anomalie cutanee, anomalie scheletriche, sintomi neurologici, anomalie immunologiche) e segni di attivazione immunitaria (linfoadenomegalia, splenomegalia);
- Analisi delle cellule ematopoietiche circolanti, eseguita tramite emocromocitometria e formula leucocitaria all'esordio della patologia e durante il follow-up. Sono stati considerati i valori iniziali, quelli dell'ultimo follow-up e i valori mediani, escludendo gli emocromi effettuati durante episodi infettivi;
- Dosaggio degli anticorpi anti-HNA, effettuata tramite GIFT indiretto con lettura in citofluorimetria;
- Dosaggio immunoglobuline e sottoclassi delle immunoglobuline G (IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4);
- Ricerca dei markers e pattern di autoimmunità, sia alla diagnosi che nel corso del follow-up. I marker ricercati sono ANA, ENA, anticorpi anti-cardiolipina, anti-fosfolipidi, anti-ds-DNA, RA-test, p-NAA, c-NAA, anti-transglutaminasi, anti-endomisio, test di Coombs diretto e indiretto;
- Dati circa l'eventuale trattamento con fattore di crescita dei neutrofili (*Granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) o altre terapie;
- Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie, condotta tramite citometria a flusso. Tale analisi comprende un'analisi estensiva della filiera maturativa delle cellule B. Per determinare eventuali riduzioni o aumenti nei valori delle specifiche sottoclassi di linfociti, sono stati utilizzati valori di riferimento per età in termini

di valori assoluti (cellule/mmc) per le principali classi di linfociti (linfociti T, T helper, T citotossici, B, NK).^{111,112} Per la filiera maturativa B e le sottoclassi minori di linfociti T sono stati considerati i valori percentuali^{113,114},

- Analisi genetica effettuata tramite NGS condotta su un pannello di più di 160 geni associati a neutropenia, insufficienza midollare o immunodeficienza. Le varianti identificate sono state poi confermate tramite la tecnica di Sanger PCR. La patogenicità di queste varianti è stata valutata secondo i criteri dell'*American College of Medical Genetics and Genomics (ACGM)*¹¹⁵ in varianti patogene (P), probabilmente patogene (*Likely Pathogenic, LP*), varianti di significato indeterminato (*Variants of Uncertain Significance, VUS*), probabilmente benigne (*Likely Benign, LB*) e benigne (P).

I geni facenti parte del pannello utilizzato sono: AIRE, CARD11, CASP10, CASP8, CD19, CD20, CD40, CD40L, CD70, CTLA4, CTPS1, DCLRE1C, FADD, FAS, CECR1/ADA2, FASL, FOXP3, GATA2, GBA, GORASP1, IKZF1, IL10, IL10RA, IL10RB, IL2RA, ITK, KRAS, LRBA, NCKAP1L/ HEM1, NEMO, NFKB1, NRAS, PIK3CB, PIK3CD, PIK3R1, PRKCD, RAG1, RAG2, RASGRP1, SOCS1, STAT1, STAT3, STAT5B, MPL, TLR8, TNFRSF13B, TNFRSF13C, MAGT1, ACD/TPP1, CTC1, DKC1, MYSM1, NAF1, NHP2, NOP10, PARN, POT1, RPL11, RPL15, RPL26, RPL27, RPL35A, RPL5, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPS27, RPS28, RPS29, RPS7, RTEL1, STN1, TERC, TERT, TINF2, TSR2, WRAP53/TCAB1, RPS14, ERCC6L2, SRP72, TP53, C16orf57/USB1, DNAJC21, EFL1, SBDS, SRP54, ATM, BLM/RECQL3, LIG4, NBN, NHEJ1, AP3B1, BLOC1S6, CD27, LYST, PRF1, SH2D1A, SLC7A7, STX11, STXBP2, UNC13-D, XIAP/BIRC4, ANKRD26, ASXL1, ATG2B, CD79B, DDX3X, DDX41, EOMES, ERAP1, GATA3, GSKIP, IL13, MKL1, MYD88, PVT1, RBBP6, REL, TCF3, ETV6, ACKR1/DARC, AK2, AK3, CLPB, CSF3R, CXCR2, CXCR4, DNMT2, EIF2, ELA2, G6PC3, GFI1, HAX1, JAGN1, LAMTOR2, RAC2, RMRP, SEC61A1, SLC37A4, SMARCAL1, SMARCD2, STK4, TAZ, TCIRG1, TCN2, VPS13B, VPS45, WAS, WIPF1, RAB27A, GATA1, ADAR1, CBL, CEBPA, MECOM, NPM1, RUNX1, SAMD9, SAMD9L.

Per un'ulteriore analisi delle varianti VUS è stato utilizzato il database *Franklin (Genoox)*¹¹⁶. Tale database impiega un motore di interpretazione avanzato basato sull'intelligenza artificiale per automatizzare un flusso di lavoro dai dati di

sequenziamento grezzi (FASTQ/VCF) a una lista ristretta di varianti candidate, che viene successivamente utilizzata per la preparazione di un referto clinico finale.¹¹⁷ Grazie all'utilizzo del database *Franklin*, è stato possibile classificare le VUS in tre categorie distinte: *cold-VUS* (cVUS), VUS e *hot-VUS* (hVUS).

È stata condotta un'analisi descrittiva completa dei dati raccolti per la coorte in studio. Le variabili qualitative sono state illustrate mediante frequenze assolute e percentuali, mentre le variabili quantitative sono state descritte utilizzando la mediana accompagnata dall'intervallo interquartile (IQR).

2.1. Next-generation sequencing/Whole exome Sequencing (WES)

L'analisi molecolare è stata condotta utilizzando il sequenziamento NGS mediante *Thermo Fisher Target Enrichment System*.

È stata eseguita l'analisi di 162 geni in 70 pazienti. Questi geni sono coinvolti in disordini ematologici, immunodeficienze, disregolazione immunitaria, disordini infiammatori e sindromi da insufficienza midollare. Le varianti sono state confermate mediante sequenziamento Sanger.

Nei soggetti risultati negativi all'analisi del pannello di 160 geni precedentemente menzionato, è stato avviato lo studio tramite *Whole Exome Sequencing* (WES).

La tecnica descritta è capace di identificare il DNA codificante, che comprende la sequenza di circa 20000 geni che codificano per le proteine. Questa porzione del DNA, pur rappresentando solo l'1-2% dell'intero genoma umano, si stima contenga oltre l'85% delle mutazioni responsabili delle malattie ereditarie. Sebbene questa metodologia sia estremamente efficace, essa genera una quantità considerevole di dati, la cui corretta interpretazione è essenziale per la ricerca genetica e l'applicazione clinica.

2.2. Immunofenotipo

È stata effettuata una valutazione citofluorimetrica utilizzando un pannello di immunocolorazione con otto colorazioni e la procedura di lisi e lavaggio. Tutti gli strumenti e i reagenti sono stati forniti da Becton Dickinson (BD), NJ, USA.

La procedura prevede l'incubazione di 100 µL di sangue periferico intero, trattato con anticoagulante EDTA, con anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi, per 20 minuti a 4°C. Successivamente è stata indotta lisi tramite incubazione per 10 minuti a

temperatura ambiente con soluzione lisante FACS. I campioni sono stati acquisiti con un citometro a flusso FACS Lyric, dotato di tre laser: blu (488-nm), rosso (633-nm) e viola (405-nm), e analizzati con il software FACS Suite™. Per l'immunocolorazione di superficie sono stati utilizzati anticorpi monoclonali RUO specifici per i marker CD3, CD4, CD8, CD16-56, CD19, CD20, CD27, TCRab, TCRgd, HLA-DR, CD25, CD45, CD45RO, CD45RA, CD45B220, CD10, CD38, CD21, IgM e IgD. I fluorocromi impiegati sono stati APC, APC-H7, FITC, PE, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, V450 e V500, miscelati diversamente nei pannelli di anticorpi.

Sono state utilizzate varie combinazioni di anticorpi per rilevare i diversi pattern di espressione antigenica.

All'interno dei linfociti T e B sono state analizzate le seguenti subpopolazioni: T Naïve (CD3CD45RA+), T Memory (CD3+CD45RO+), Cellule T helper/suppressor naïve memory (CD3+CD4+/CD8+ CD45RA+CD27+), Cellule T helper/suppressor memory centrali (CD3+CD4+/CD8+ CD45RA-CD27), Cellule T helper/suppressor effettrici (CD3+CD4+/CD8+ CD45RA-CD27-), TEMRA (CD3+CD4+/CD8+ CD45RA+CD27), Cellule T helper/suppressor terminalmente differenziate (CD3+CD4+/CD8+ CD45RA+CD27-), T Regolatori (CD3+CD4+CD25br+CD45RA-), B Naïve (CD19+CD27-CD10+CD38+IgD+), B Memory pre-switched (CD19+CD27+IgM+IgD), B Memory switched (CD19+CD27+IgM-IgD-), B IgD memory (CD19+CD27+IgD+IgM-), B Transitional (CD19+IgM++CD38++), B Double negative, totale (CD19+CD27-IgD-), B CD21low (CD19+CD21lowCD38low), e B Double negative 2 (CD19+CD21lowCD27-IgD-).

I valori delle sottopopolazioni linfocitarie sono stati confrontati con i range di riferimento per età (sia per numeri assoluti che per percentuali). I criteri di etnia, numerosità del campione, ampi range di età (dai bambini ai giovani adulti) e disponibilità di valori assoluti/percentuali hanno guidato la scelta delle fonti di riferimento dalla letteratura.^{114,118-120}

I livelli di immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) sono stati analizzati utilizzando il metodo turbidimetrico e confrontati con i valori normali specifici per etnia ed età. Sono stati considerati anormali i valori che si discostavano di oltre due deviazioni standard dalla mediana di riferimento.

2.3. Analisi statistica

Per le neutropenie LO/LL NAI e le neutropenie LO/LL NI, sono state calcolate le frequenze assolute e percentuali per i dati qualitativi, mentre per i dati quantitativi, a causa della loro distribuzione non gaussiana, sono stati riportati i valori mediani e gli IQR.

Successivamente, è stata condotta un'analisi bivariata per confrontare i gruppi di pazienti con neutropenia LL/LO NAI e neutropenia LL/LO NI. Inoltre sono state esaminate separatamente le coorti LL e LO in relazione alle variabili di interesse

L'associazione tra le variabili qualitative è stata valutata utilizzando il test chi quadrato di Pearson. Nei casi in cui le frequenze attese erano inferiori a 5, è stato utilizzato il test esatto di Fisher. Per le variabili quantitative, invece, è stato impiegato il test non parametrico di Mann-Whitney.

Al fine di valutare eventuali differenze significative tra l'esordio e l'ultima visita nella distribuzione delle variabili quantitative di interesse, è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati. Le distribuzioni delle variabili quantitative sono state rappresentate graficamente mediante il diagramma degli estremi e dei quartili (*boxplot*).

Infine è stato utilizzato il metodo di Kaplan-Meier per stimare il rischio cumulativo di sviluppare sintomi clinici o autoimmuni dall'esordio all'ultima visita. Il rischio cumulativo è stato riportato in percentuale con relativo intervallo di confidenza al 95%. Tutti i test effettuati sono stati a due code e un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software Stata (*StataCorp. Stata Statistical Software, Release 16.1, College Station, TX, Stata Corporatio, 2019*).

2.4. Machine Learning

Poiché il dataset comprende sia caratteristiche numeriche che categoriali, è stata impiegata l'analisi fattoriale su dati misti al fine di ridurre la dimensionalità dei dati stessi. Il numero di caratteristiche da estrarre è stato scelto in modo da spiegare almeno l'80% della varianza del dataset. Per mitigare l'impatto dei valori mancanti, che potrebbero compromettere l'affidabilità dell'analisi, sono state escluse le caratteristiche con una

percentuale di valori mancanti superiore al 20%. I valori mancanti rimanenti sono stati imputati utilizzando la mediana per le caratteristiche numeriche e la moda per quelle categoriali. Per garantire che ogni caratteristica numerica avesse lo stesso peso, esse sono state scalate su un intervallo da 0 a 1.

Il numero ottimale di cluster è stato stimato utilizzando l'indice di silhouette. È stata successivamente eseguita un'analisi di clustering non supervisionata mediante il metodo k-means, al fine di raggruppare i pazienti con valori di caratteristiche simili. I fattori sono stati trasformati nello spazio delle distanze dei cluster e visualizzati come dim1 e dim2 in grafici a dispersione per una rappresentazione grafica.

Le procedure di pre-processamento dei dati e di apprendimento non supervisionato sono state implementate in Python© utilizzando il pacchetto scikit-learn. L'importanza dell'associazione tra i cluster e il tipo di neutropenia è stata valutata mediante il test esatto di Fisher, considerando statisticamente significative le associazioni con un valore $p < 0,05$.

RISULTATI

1. Caratteristiche della popolazione

Nel periodo compreso tra il 1° gennaio 2005 e il 31 dicembre 2023 sono stati arruolati complessivamente 84 pazienti. La distribuzione tra i sessi è risultata omogenea: il campione comprende 46 pazienti di sesso femminile, corrispondenti al 55% del totale, e 38 pazienti di sesso maschile, pari al restante 45%. Degli 84 pazienti, 36 (pari al 43%) sono stati diagnosticati con LL/LO NAI per la presenza di titolo anticorpale anti-HNA positivo, mentre 38 pazienti (pari al 45%) sono stati classificati come affetti da LL/LO NI, per la quale è stata necessaria la negatività degli anticorpi anti-HNA in almeno tre diverse determinazioni. Per 10 pazienti (pari al 12%), la diagnosi è ancora in corso di definizione a causa di un numero insufficiente di test negativi.

La maggioranza dei pazienti con neutropenia ha presentato la forma a insorgenza tardiva (Late Onset, LO), rappresentando il 71% della coorte (60 pazienti su 84), mentre il 24% (29 pazienti su 84) ha manifestato una forma a lunga durata (Long Lasting, LL).

L'età mediana al momento dell'esordio è stata di 11 anni (IQR 2.3-15.6 anni), mentre il follow-up mediano è stato di 4,6 anni (IQR 2.7-7.9 anni). Le caratteristiche generali della coorte sono riassunte in tabella 8.

Tabella 8: Caratteristiche della coorte.

	Totale (n=84 pazienti)
Sesso F, n (%)	46 (55%)
Neutropenia LL/LO Autoimmune (NAI), n (%)	36 (43%)
Neutropenia LL/LO Idiopatica (NI), n (%)	38 (45%)
Late Onset, n (%)	60 (71%)
Long Lasting, n (%)	24 (29%)
Età mediana di insorgenza, anni, (IQR)	11 (2.3-15.6)
Durata mediana del follow up, anni, (IQR)	4.6 (2.7-7.9)
G-CSF, n (%)	12 (14%)

2. Parametri ematologici

Il valore mediano dei leucociti totali è risultato inferiore alla norma già al primo riscontro di neutropenia e è rimasto stabilmente al di sotto dei valori soglia per l'età durante il follow-up. In particolare, all'esordio risulta essere pari a 3.3×10^9 cellule/L, mentre all'ultimo follow-up è risultato pari a 3.2×10^9 cellule/L ($p=0.056$). Tale riduzione risulta essere più marcata nei soggetti affetti da neutropenia LO rispetto ai pazienti affetti da neutropenia LL ($p=0.047$).

È rilevante notare che, durante il periodo di osservazione, il valore dei neutrofilo ha manifestato un incremento: all'esordio, il valore mediano era di 0.8×10^9 cellule/L, mentre all'ultimo controllo è aumentato a 1.0×10^9 cellule/L ($p<0.001$).

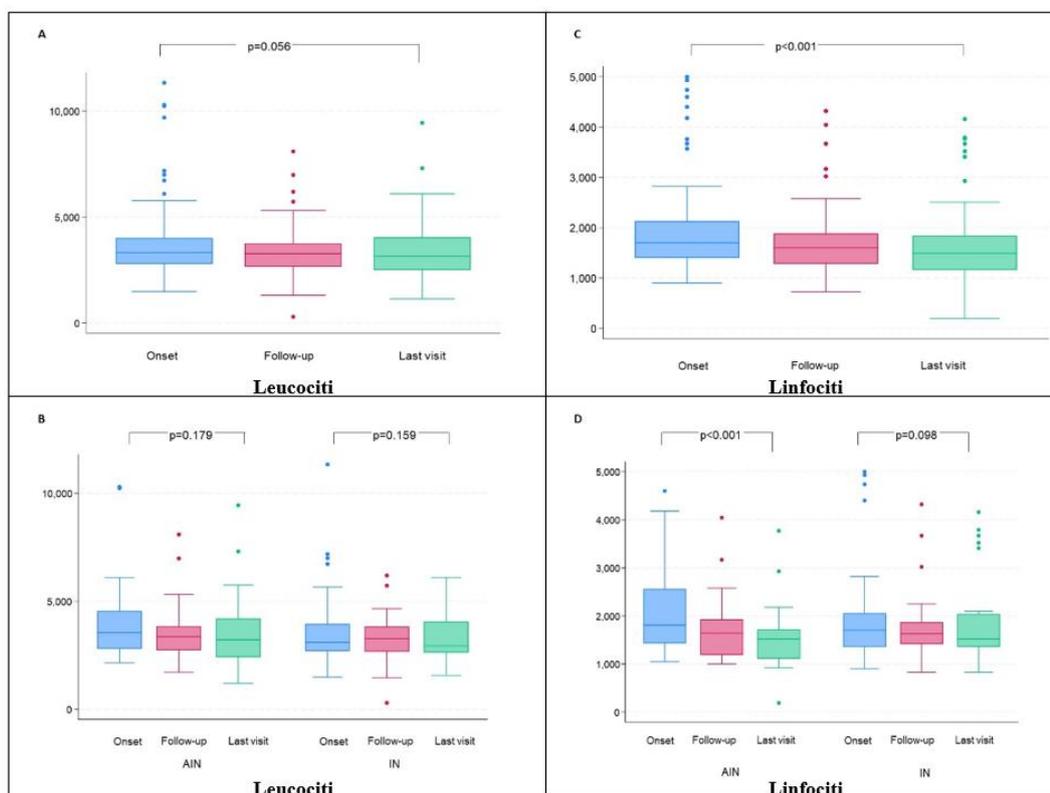
Al contrario, si osserva una diminuzione progressiva del numero assoluto dei linfociti. All'esordio, il valore mediano era di 1.7×10^9 cellule/L, mentre all'ultima visita è sceso a 1.5×10^9 cellule/L ($p<0.001$). I dati sono riportati in tabella 9.

Tabella 9: Variazione dei parametri ematologici nel corso del follow up (tra l'esordio e l'ultimo controllo).

	Onset	Follow up	Ultima Visita	P-value¹
Leucociti $\times 10^9/L$ (mediana, IQR)	3.3 (2.8-4.0)	3.3 (2.7-3.8)	3.2 (2.5-4.1)	0.056
Neutrofilo $\times 10^9/L$ (mediana, IQR)	0.8 (0.4-1.1)	0.9 (0.5-1.3)	1.0 (0.5-1.5)	<0.001
Linfociti $\times 10^9/L$ (mediana, IQR)	1.7 (1.4-2.4)	1.6 (1.3-1.9)	1.5 (1.1-1.8)	<0.001

¹ Per confrontare i parametri all'esordio e all'ultima visita è stato utilizzato il test non parametrico dei ranghi con segno di Wilcoxon.

Figura 4: Variazioni nel tempo della distribuzione della conta dei globuli bianchi e dei linfociti nell'intera coorte e per sottogruppi (LL/LO NAI e LL/LO NI).



Come già notato in tabella 9, l'andamento della conta dei globuli bianchi nella popolazione complessiva mostra una tendenza alla riduzione (Fig. 4A) ($p=0.056$); tale tendenza è osservabile anche nelle forme LL/LO NAI e LL/LO NI (Fig. 4B) (rispettivamente $p=0.179$ $p=0.159$). Tuttavia, in nessuno dei casi, la riduzione ha raggiunto una significatività statistica.

Al contrario, la conta dei linfociti assoluti mostra una diminuzione progressiva nella popolazione generale risultando statisticamente significativa ($p<0.001$) (Fig.4C). Tale tendenza si mantiene significativa anche nel gruppo con neutropenia LL/LO NAI ($p < 0.001$), mentre nel gruppo con neutropenia LL/LO NI, la riduzione dei linfociti non raggiunge la significatività statistica ($p = 0.098$) (Fig. 4D).

È stato osservato che, nei pazienti con neutropenia ad esordio tardivo, la mediana della conta linfocitaria è risultata inferiore rispetto a quanto riscontrato nei pazienti con neutropenia a lunga durata. In particolare nei soggetti con neutropenia LO la conta linfocitaria mediana è pari a 1.45×10^9 cellule/L (IQR $1.12-1.72 \times 10^9$ cellule/L), mentre nei soggetti con neutropenia LL il valore mediano è di 1.79×10^9 cellule/L (IQR $1.12-1.83 \times 10^9$ cellule/L). Tuttavia, questa differenza non ha raggiunto significatività statistica ($p=ns$).

3. Dati clinici

3.1. Pattern infettivo

Durante il follow-up il 69% dei pazienti (54 su 78) ha presentato almeno un episodio infettivo.

Le tipologie di infezioni più frequenti sono state:

- *Infezioni delle vie aeree superiori*, riscontrate nel 56% dei pazienti che hanno avuto almeno un episodio infettivo;
- *Infezioni del cavo orale* (stomatiti aftose, gengiviti, periodontiti), riscontrate nel 48% dei pazienti;
- *Infezioni cutanee*, osservate nel 22% dei pazienti;
- *Otiti*, presenti nel 14% dei pazienti;
- *Polmoniti*, riscontrate nel 17% dei pazienti;
- *Infezioni delle vie urinarie* (IVU), verificatesi nel 11% dei pazienti.

Tra i pazienti che hanno sviluppato almeno un'infezione durante il follow-up (69%), è stata osservata una quota di recidiva pari al 68%. L'infezione recidivante è definita come il verificarsi di più di un episodio di infezione nello stesso paziente.

Le infezioni recidivanti più frequenti sono risultate quelle del cavo orale (73%), seguite dalle infezioni cutanee (58%) e dalle otiti (50%).

È importante sottolineare che il 35% dei pazienti ha presentato almeno un episodio di ipertermia febbrile di origine sconosciuta (*Fever of Unknown Origin, FUO*); tra questi, il 63% ne ha manifestato più di uno.

I dati sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 10: Frequenza e natura delle infezioni nella coorte.

Tipologia di infezione	Pazienti con infezione, n (%)	Pazienti con recidiva, n (%)	LL/LO AIN Pazienti con infezione	LL/LO IN Pazienti con infezione	P-value ¹
Almeno un'infezione, n (%)	54/78 (69.2)	37/54 (68.5)	27/36 (75)	22/34 (64.7)	0.348
Infezione delle vie aeree superiori	30 (55.6)	18/30 (60)	18 (50)	11 (32.3)	0.134
Infezioni del cavo orale	26 (48.1)	19/26 (73)	11 (30.6)	14 (41.2)	0.354
Febbre di origine sconosciuta (Fever of Unknown Origin, FUO)	19 (35.2)	12/19 (63)	12 (33.3)	5 (14.7)	0.069

Infezioni cutanee	12 (22.2)	7/12 (58)	9 (25)	3 (8.8)	0.073
Otiti	14 (25.9)	7/14 (50)	9 (25)	5 (14.7)	0.282
Polmoniti	9 (16.7)	2/9	5 (13.9)	4 (11.8)	0.791
Infezioni delle vie urinarie (IVU)	6 (11.1)	1/6	3 (8.3)	3 (8.8)	0.942
Batteriemia	3 (5.6)	0/3	2 (5.6)	0	0.493
Ascesso epatico, infezioni profonde	1	0/1	1 (2.8)	0	1.000

In un'analisi complessiva sei pazienti hanno manifestato un episodio di infezione grave durante il follow-up. Facendo riferimento al campione di 54 pazienti che ha riportato almeno un episodio infettivo, l'11% ha sviluppato un'infezione grave durante il follow-up comprendente sepsi, meningite, infezioni opportunistiche e polmoniti ricorrenti.

Riguardo alla frequenza generale degli eventi infettivi, non sono state identificate differenze significative tra il gruppo delle neutropenie autoimmuni e di quelle idiopatiche, né tra le neutropenie a lunga durata (LL) e quelle ad esordio tardivo (LO). Nello specifico, tra i vari tipi di infezioni, non è stata riscontrata una differenza significativa nella prevalenza di infezioni del cavo orale tra pazienti con neutropenia autoimmune e idiopatica. Per quanto riguarda le infezioni gravi, non è stata osservata una maggiore incidenza nei soggetti affetti da Np LO rispetto a quelli con Np LL ($p=ns$).

La terapia con G-CSF è stata somministrata al 14% dei pazienti (12 su 84). In tutti i casi il fattore di crescita è stato utilizzato "on-demand" durante episodi infettivi e non in maniera continuativa.

L'analisi statistica non ha evidenziato alcuna correlazione significativa tra l'utilizzo di G-CSF e il tipo di neutropenia (autoimmune vs infettiva; lieve vs grave).

3.2. Segni e sintomi di autoimmunità

Nel corso del follow-up sono stati rilevati segni e/o sintomi di autoimmunità, tra i quali i più frequenti sono stati tiroidite, celiachia, sindrome linfoproliferativa autoimmune (*Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome, ALPS*), positività anticorpi anti-nucleo (ANA), positività anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA), artrite, dolore osseo e astenia cronica.

L'incidenza cumulativa di queste manifestazioni autoimmuni è risultata del 23% (CI 14-37%) a 6 anni dall'esordio della neutropenia e del 55% (CI 32-80%) a 20 anni, con una tendenza di progressione presente anche negli anni successivi.

Figura 5: Rischio cumulativo di sviluppare segni o sintomi di autoimmunità dall'esordio all'ultimo follow up nell'intera coorte

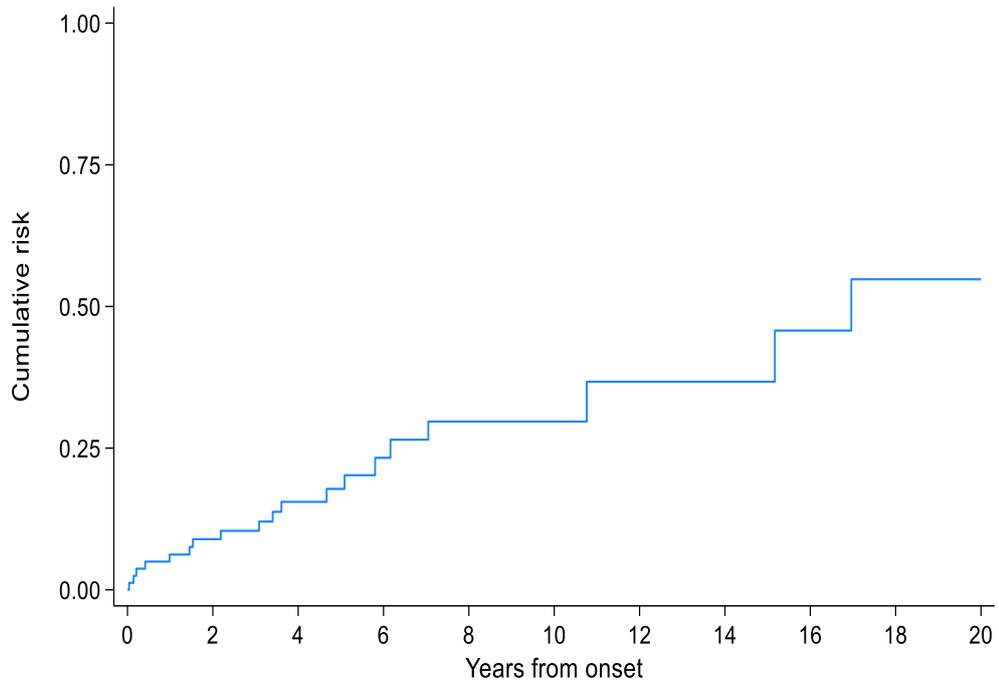
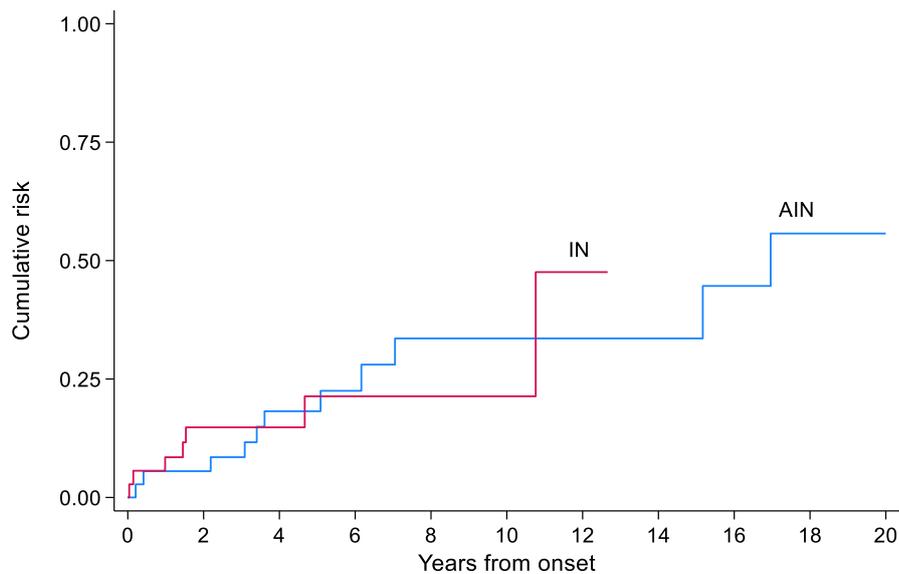


Figura 6: Rischio cumulativo di sviluppare segni o sintomi di autoimmunità dall'esordio all'ultimo follow up per la sottopopolazione LL/LO IN (rosso) e LL/LO NAI (blu)



Nei pazienti affetti da neutropenia LL/LO NAI si è osservata una maggiore prevalenza di segni e sintomi di autoimmunità rispetto a quanto osservato nei

pazienti con neutropenia LL/LO NI; tuttavia tale differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=ns$). Analogamente, i pazienti con neutropenia LO mostrano una tendenza più elevata a sviluppare fenomeni autoimmuni rispetto ai pazienti con neutropenia LL (35% contro 17%), sebbene tale differenza non raggiunga la significatività statistica ($p=ns$).

3.3. Quadro immunologico

I valori delle sottopopolazioni linfocitarie, del dosaggio delle immunoglobuline e delle loro sottoclassi (IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) sono stati analizzati su un campione significativo della coorte oggetto di studio. Questa analisi ha permesso di ottenere una visione dettagliata del profilo immunitario dei soggetti coinvolti.

3.3.1. Immunoglobuline

Nella maggior parte dei pazienti i livelli di IgG, IgM e IgA rientrano nei limiti normali per età (rispettivamente nel 91%, 88% e 89% dei casi). Tuttavia, in un'esigua quota di pazienti (8.3%), il valore di IgM è risultato superiore alla norma.

I dati sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 11: Frequenza assoluta e relativa dei valori di immunoglobuline G, M e A nella coorte.

	Valori ridotti ($< -2 \sigma$)	Valore nella norma	Valori aumentati ($>2 \sigma$)
IgG	4 (4.8%)	77 (91.7%)	3 (3.6%)
IgM	3 (3.6%)	74 (88.1%)	7 (8.3%)
IgA	8 (9.5%)	75 (89.3%)	1 (1.2%)

3.3.2. Sottopopolazioni linfocitarie

Come illustrato in tabella 12 la valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie ha evidenziato alcune anomalie.

Nella popolazione di 84 pazienti, si è riscontrato che in 30 casi (pari al 36% del totale) il numero di linfociti B (CD19+) era inferiore ai valori di riferimento. Analogamente, in 32 pazienti (27% del campione) i livelli di linfociti T citotossici (CD8+) risultavano ridotti rispetto alla norma. Inoltre, è stato osservato che in 26

pazienti (31%) i valori delle cellule Natural Killer (NK) erano inferiori ai parametri normali.

Nel contesto dello studio delle sottopopolazioni T, i linfociti T regolatori (CD3CD4CD25brCD45RA-) erano inferiori ai valori di riferimento in una quota rilevante di pazienti (56/77;72%).

Le popolazioni di linfociti T attivati, che corrispondono ai linfociti T γ/δ e ai linfociti T HLA-DR+, sono risultate aumentate nella maggior parte dei pazienti, rispettivamente in 51/81 (63%) e in 35/81 soggetti (43%).

Per quanto riguarda il profilo di maturazione delle cellule T, è stata osservata una prevalenza significativa di cellule TH effettori (CD4+CD45RA-CD27-) e di cellule TH Central Memory (CD4+CD45RA-CD27+), riscontrate rispettivamente in 25 su 48 soggetti (52%) e in 20 su 48 soggetti (42%). Questa prevalenza è stata rilevata a discapito delle cellule TH Naïve (CD4+CD45RA+CD27+), che risultavano diminuite in 20 dei 48 soggetti esaminati (pari al 42%).

Risultati simili sono stati ottenuti per i linfociti TS Effettori (CD8+CD45RA-CD27) e per i linfociti TS Central Memory (CD8+CD45RA-CD27+), che sono stati riscontrati in livelli elevati rispettivamente in 34 su 48 soggetti (27%) e in 25 su 48 soggetti (52%). I linfociti TS Naïve (CD8+CD45RA+CD27) sono risultati ridotti in 23 dei 48 pazienti (48%).

Le cellule B della memoria sono risultate al di sotto del limite di normalità nel 44% dei pazienti esaminati (34 su 78).

Tabella 12: Sottopopolazioni linfocitarie nell'intera coorte

	Valori ridotti (<-2 SD) n (%)	Valore nella norma n (%)	Valori aumentati (>2 SD) n (%)
Sottopopolazioni principali			
Linfociti T (CD3+)	21 (25%)	62 (74%)	1 (1%)
Linfociti T Helper (CD3+CD4+)	18 (21%)	65 (77%)	1 (1%)
Linfociti T Citotossici (CD3+CD8+)	27 (32%)	56 (67%)	1 (1%)
Linfociti B (CD19+)	30 (36%)	51 (61%)	3 (4%)
Natural Killer (NK) (CD3-CD56+CD16+)	26 (31%)	57 (68%)	1 (1%)

Profilo di maturazione T			
Linfociti T Regolatori (CD3+CD4+CD25br+CD45RA-)	56 (72%)	16 (20%)	6 (7%)
Linfociti T Gamma-Delta (CD3+ TCR $\gamma\delta$ +	7 (9%)	21 (26%)	51 (63%)
Linfociti T Attivati (CD3+ HLA DR+)	19 (23%)	26 (32%)	35 (43%)
Linfociti TH Naïve (CD4+CD45RA+CD27+)	20 (42%)	27 (56%)	1 (2%)
Linfociti TH Central Memory (CD4+CD45RA-CD27+)	1 (2%)	27 (56%)	20 (42%)
Linfociti TH Effettori (CD4+CD45RA-CD27-)	1 (2%)	22 (46%)	25 (52%)
Linfociti TH TEMRA (CD4+CD45RA+CD27-)	9 (19%)	37 (77%)	2 (4%)
Linfociti TS Naïve (CD8+CD45RA+CD27+)	23 (48%)	25 (52%)	0 (0%)
Linfociti TC Central Memory (CD8+CD45RA-CD27+)	0 (0%)	23 (48%)	25 (52%)
Linfociti TS Effettori (CD8+CD45RA-CD27-)	1 (2%)	34 (71%)	13 (27%)
Linfociti TS TEMRA (CD8+CD45RA+CD27-)	2 (4%)	39 (81%)	7 (15%)
Profilo di maturazione B			
Linfociti B memoria (CD19+ CD27+)	34 (44%)	44 (56%)	0 (0%)
Linfociti B Transitional (CD27- CD10++ CD38++) ²	14 (25%)	29 (52%)	13 (23%)
Linfociti B Naïve (CD27- CD10+CD38+- IgD+) ²	19 (34%)	20 (36%)	17 (30%)
Linfociti B Naïve Attivati ² (CD27-CD10+CD38+-IgD+CD21low)	0(0%)	44 (79%)	12 (21%)
Linfociti B Marginal zone (CD27+ IgD+ IgM+) ²	19 (34%)	22 (39%)	15 (27%)
Linfociti B CD21 low CD18 low ²	0 (0%)	42 (75%)	14 (25%)
Linfociti B Switched memory (CD27+ IgD- IgM-) ²	29 (52%)	17 (30%)	10 (18%)
Linfociti B Pre-Switched Memory (CD27+ IgD- IgM+) ²	0 (0%)	42 (75%)	14 (25%)
Linfociti B IgD Memoria (CD27+ IgD+ IgM-) ²	0 (0%)	51 (91%)	5 (9%)
Linfociti B Doppi Negativi (CD27- IgD-) ²	0 (0%)	25 (45%)	31 (55%)
Linfociti B Doppi Negativi 2 ² (CD27- IgD- CD21 low)	0 (0%)	44 (79%)	12 (21%)
Linfociti B Plasmablasti ² (CD27+ CD38+)	19 (34%)	27 (48%)	10 (18%)

È stata condotta un'analisi del profilo di maturazione dei linfociti B su un campione di 56 pazienti, rappresentando il 67% della popolazione totale studiata. Tale analisi ha rivelato una riduzione significativa delle cellule B Switched Memory in 29 dei

² L'analisi del profilo di maturazione B è stato eseguito in 56 pazienti su 84.

56 soggetti (52%). Inoltre, si è osservato un incremento dei linfociti B doppi negativi oltre i limiti di normalità in 31 pazienti su 56 (55%).

Non sono state identificate differenze significative nel confronto tra sottopopolazioni linfocitarie tra neutropenia LL/LO NAI ed LL/LO NI .

Al contrario, valori inferiori alla norma di linfociti B sono stati osservati con maggiore frequenza nella neutropenia LL, rispetto alla neutropenia con LO. In particolare, i linfociti B (CD19+) risultavano ridotti nel 56% dei casi di neutropenia LL, rispetto al 28% dei casi di neutropenia LO, con una significatività statistica ($p=0.017$). Analogamente, è stata rilevata una riduzione più marcata delle cellule B Switched Memory (CD27+IgD-IgM-) nei pazienti con neutropenia LL (62%) rispetto a quelli con neutropenia LO (35%); tale riduzione ha raggiunto la significatività statistica ($p=0.033$).

3.4. Analisi genetica

L'analisi genetica mediante il pannello NGS a 160 geni è stata eseguita su 68 dei 84 pazienti, pari all'81% del campione totale. Tra i pazienti sottoposti a questo esame, 40 (59%) hanno mostrato risultati negativi o erano portatori di varianti classificate come benigne (B) o probabilmente benigne (Likely Benign, LB) secondo i principali database genetici.

Nei rimanenti 28 pazienti (per un totale di 29 varianti), che rappresentano il 41% del gruppo analizzato, sono state identificate varianti di significato incerto (*Variants of Uncertain Significance*, VUS), varianti patogeniche (P) e varianti probabilmente patogeniche (*Likely Pathogenic*, LP). In particolare, sono state riscontrate 9 varianti patogeniche: 7 varianti sono state rilevate nel gene TNFRSF13B (pari al 78% delle varianti patogeniche), una variante è stata identificata nel gene CARD11 (11%) e un paziente ha mostrato una delezione del gene FAS ligando, rappresentando l'11% delle mutazioni patogeniche identificate.

Per quanto riguarda le VUS identificate in 19 pazienti (28%) sono state identificate due mutazioni nel gene CARD11 e una variante del gene AIRE, classificate come *hot-VUS*. Queste mutazioni, sebbene non possiedano un significato patogenico certo, potrebbero avere comunque un certo ruolo nella patogenesi della neutropenia. Inoltre sono state rilevate undici varianti classificate come *cold-VUS*, il cui ruolo quindi è, verosimilmente, trascurabile. Tali varianti riguardano i seguenti geni:

CASP10, TINF2, DNM2, DDX41, LYST, RTEL1, RUNX1, SAMD9L, TSR2 e
PIK3CD.

I dati sono riassunti in tabella 13.

Tabella 13: Caratteristiche genetiche, cliniche ed immunologiche nei pazienti portatori di varianti P/LP o hVUS.

Pz	Gene	Variante	Ereditarietà	Tipo di neutropenia		Clinica		Frequenza allelica	VarSome ¹²¹
				AIN/IN	LO/LL	Segni clinici	Autoimmunità		
1	TNFRSF13B	p.(Ala181Glu)	AD/AR	AIN	LO	Malattia celiaca, infezioni ricorrenti	Si	0.54	LP
2	TNFRSF13B	p.(Leu69Thrfs*12)	AD/AR	IN	LL	Infezione delle alte vie respiratorie	No	0.040	LP
3	TNFRSF13B	p.(Ile87Asn)	AD/AR	IN	LO	Febbre ricorrente	No	0.046	P
4	TNFRSF13B	p.Cys193Ter	AD/AR	AIN	LO	Asma allergico	No	0.0056	P
5	CARD11	p.(Met1Ile)	AD/AR	AIN	LL	Infezione delle alte vie respiratorie	No	ND	P
6	FASL	Del ex 1→4	AD	AIN	LO	ALPS	Si	ND	P
7	TNFRSF13B	p.(Trp40Arg)	AD/AR	IN	LL	ALPS, aftosi ricorrente	No	0.0044	P
8	TNFRSF13B	P.(Cys104Arg)	AD/AR	IN	LO	Artralgie	No	0.034	P
9	TNFRSF13B	p.(Ser144)	AD/AR	IN	LO	FUO	No	ND	P
10	AIRE	c.132+12_1400+195del	AD/AR	IN	LO	Tiroidite	Si	ND	hVUS
11	CARD11	p.(Tyr393_Ser394delinsPheLeu)	AD/AR	IN	LL	Tonsillite	No	ND	hVUS
12	CARD11	p.(Ser439Phe)	AD/AR	IN	LO	HSV	No	0.0028	hVUS

Non sono state osservate differenze significative nella frequenza delle varianti genetiche tra le categorie di neutropenia NAI e NI, né tra le categorie LO e LL.

È stata esaminata la correlazione tra caratteristiche immunologiche e cliniche in soggetti portatori di varianti VUS o LP/P e in soggetti negativi per tali varianti. Non sono emerse differenze rilevanti tra i due gruppi.

Tuttavia, i soggetti portatori di varianti degne di significato presentano un'età di esordio inferiore (mediana di 9 anni, IQR 2.5-13.5 anni) rispetto ai soggetti privi di mutazioni (mediana di 11 anni, IQR 2-16 anni) ($p=0.0175$). Questa relazione è ulteriormente validata mediante l'analisi dei pazienti suddivisi per fasce di età al momento dell'ultimo follow-up. I pazienti sono stati classificati in cinque gruppi di età:

- 0-4 anni;
- 5-9 anni;
- 10-14 anni;
- 15-19 anni;
- Maggiore di 20 anni.

Si osserva che il rischio relativo di identificare una mutazione genetica significativa è dell'11% nel gruppo 0-4 anni e diminuisce progressivamente fino al 5% nel gruppo oltre i 20 anni.

Non è stata rilevata alcuna relazione significativa tra le varianti genetiche di rilievo (VUS, LP e P) e i differenti parametri immunologici. Al contrario, si è evidenziato un aumento significativo dei linfociti B doppi negativi (DN), un importante marker ematologico di autoimmunità, nei pazienti senza mutazioni germinali significative (33% contro 0%) ($p=0.006$).

3.4.1. *Whole Exome Sequencing*

Sono disponibili alcuni dati dell'analisi dell'intero esoma (*Whole Exome Sequencing*, WES) effettuato in un ristretto gruppo di pazienti ($n=9$) che non avevano evidenziato varianti significative mediante l'analisi NGS. Tra i nove

pazienti sottoposti a WES, otto (89%) presentavano un titolo anticorpale contro il neutrofilo positivo, mentre uno (11%) aveva un titolo anticorpale negativo.

L'analisi WES ha mostrato la presenza di due varianti in due pazienti. In particolare, è stata identificata la presenza di una mutazione in eterozigosi del gene BRCA1 (*p.Asp1739Gly*) ereditata dal padre ed una variante *hot*-VUS in eterozigosi del gene RELA2 (*p.s536del*).

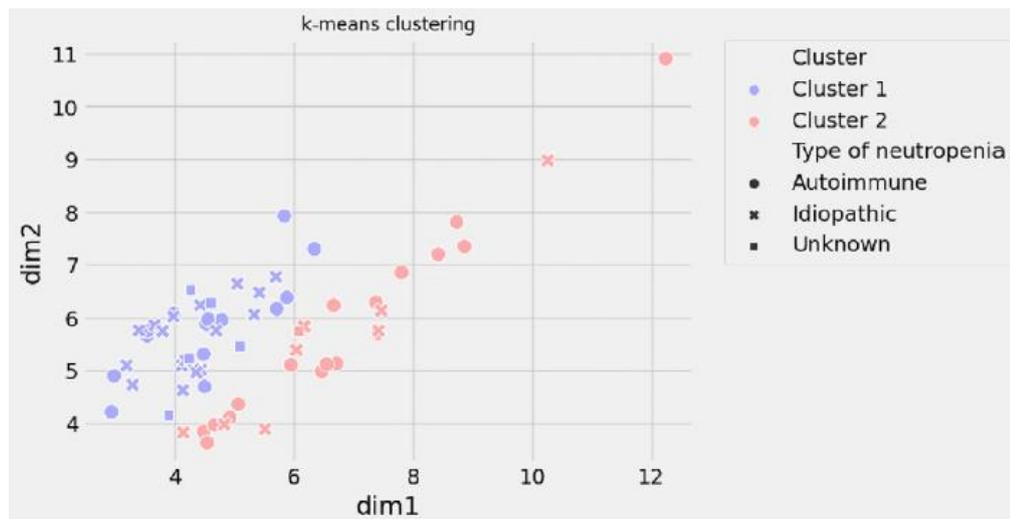
3.5. Machine Learning

Per individuare potenziali modelli nei dati che potrebbero essere stati trascurati da analisi statistiche tradizionali, sono state applicate tecniche di apprendimento automatico non supervisionato all'intero set di dati. Poiché la presenza di valori mancanti può compromettere l'affidabilità delle analisi, è stata valutata la quantità di valori mancanti per ciascuna caratteristica dei pazienti e dei dati di laboratorio. Ventisei delle 58 caratteristiche avevano circa il 4,8% di valori mancanti. Per mitigare l'impatto di questi valori sull'analisi, sono state escluse 17 caratteristiche con più del 20% di dati mancanti, mentre le altre sono state imputate seguendo la metodologia descritta nella sezione "Pazienti e Metodi".

Per ridurre la dimensionalità dei dati, sono stati estratti 17 fattori che spiegavano complessivamente oltre l'80% della varianza totale. Questo *dataset* trasformato è stato poi utilizzato per eseguire un'analisi di clustering k-means non supervisionata. Per determinare il numero ottimale di cluster è stata impiegata l'analisi della silhouette, che ha prodotto un punteggio di silhouette di 0,12, indicante una separazione limitata tra i cluster.

Il numero di cluster corrispondente al punteggio di silhouette più elevato è stato scelto come numero ottimale. L'analisi k-means ha portato all'identificazione di due gruppi, rispettivamente composti da 37 e 26 pazienti. I risultati sono riportati in figura 7.

Figura 7: I cluster sono rappresentati in blu (cluster 1) e rosso (cluster 2). Le neutropenie autoimmuni sono indicate con cerchi, mentre le neutropenie idiopatiche sono indicate con croci.



Non è stata identificata alcuna associazione statisticamente significativa tra i cluster identificati e il tipo di neutropenia (LO/LL NAI e NI) mediante il test esatto di Fisher ($p > 0,05$). Questo risultato indica che l'approccio di apprendimento automatico non ha trovato prove sufficienti per affermare un'associazione tra i cluster e i tipi di neutropenia, confermando così un elevato grado di sovrapposizione tra le categorie LO/LL NAI e NI.

DISCUSSIONE

Questo studio esamina un'ampia coorte di pazienti affetti da neutropenia non remittente che non rientra nelle due forme classiche di neutropenia: neutropenia autoimmune e neutropenia idiopatica primitiva dell'infanzia.

Nella letteratura recente queste forme sono denominate neutropenie Late Onset (LO) e Long Lasting (LL). Con queste espressioni si descrivono neutropenie ad esordio precoce (entro i tre anni) senza remissione o ad esordio tardivo (dopo i tre anni), anch'esse senza remissione apparente, e sembrano costituire una categoria distinta.

Nella popolazione studiata, la caratteristica ematologica più rilevante alla diagnosi è la presenza di una neutropenia di grado lieve o moderato.

La leucopenia, associata alla neutropenia, è stata riscontrata nel 74% della popolazione studiata e mostra una tendenza al peggioramento durante il follow-up, come illustrato nella Figura 4. Inoltre, i livelli di linfociti tendono a diminuire nel tempo, con una riduzione più pronunciata nelle forme caratterizzate dalla presenza di anticorpi (LL/LO NAI) rispetto a quelle senza anticorpi (LL/LO NI) ($p=0,001$).

Alla presentazione iniziale, la neutropenia è per lo più di tipo moderato, con valori di NA tra 0.5 e 1.0×10^9 cellule/L e non si associa a una frequenza elevata di infezioni gravi. La percentuale di pazienti con infezioni gravi è dell'11%, simile a quanto riportato in studi precedenti su popolazioni affette da neutropenia autoimmune primitiva e idiopatica dell'infanzia.^{78,92}

Le infezioni più comuni sono quelle delle vie respiratorie superiori (56%), seguite da infezioni del cavo orale (48%), da condizioni febbrile di origine sconosciuta (35%), otiti (26%) e infezioni cutanee (22%). Le infezioni del cavo orale presentano il più alto tasso di ricorrenza (73%), seguite dalla febbre di origine sconosciuta (63%). Non sono state osservate infezioni opportunistiche. In generale, le manifestazioni infettive sono per lo più paucisintomatiche o assenti; il 26% dei pazienti non ha presentato infezioni durante il follow-up e il 60% ha riportato infezioni non gravi. Considerando il fenotipo lieve della neutropenia, è probabile che questa condizione rimanga asintomatica per un periodo prolungato e che si manifesta solitamente nella tarda adolescenza o in età adulta.

Spesso viene scoperta casualmente in età avanzata, tale modalità di rilevazione giustifica la definizione di "insorgenza tardiva".

I sintomi autoimmuni sono assenti all'esordio della neutropenia, ma diventano manifesti durante il follow-up in una percentuale significativa di soggetti. L'incidenza cumulativa dei sintomi autoimmuni è del 23% dopo 6 anni di follow-up e del 55% a 20 anni. Non si osservano differenze significative nell'incidenza dei fenomeni autoimmuni tra le categorie di pazienti con e senza titolo anticorpale positivo, né tra quelli con neutropenia ad insorgenza tardiva e di lunga durata.

L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie ha rivelato un pattern caratteristico in una parte dei pazienti, già parzialmente identificato in un precedente studio del nostro gruppo su pazienti con neutropenia autoimmune "atipica".¹⁰²

Nella presente coorte, si osserva una riduzione rispetto ai range di riferimento dei linfociti B (CD19+) e NK (CD3- CD16+ CD56+), rispettivamente nel 36% e 31% dei casi. Per quanto riguarda il profilo di maturazione delle cellule B, analizzato nel 67% dei pazienti, si osserva una riduzione dei linfociti B memoria (CD19+ CD27+) e Switched Memory (CD27+ IgD- IgM-) rispettivamente nel 44% e 52% dei casi. In aggiunta si osserva un aumento dei linfociti B doppi negativi (CD27- IgD-) nel 55% della popolazione studiata.

Le sottoclassi di linfociti T mostrano, in una quota rilevante di pazienti, un aumento dei linfociti T gamma-delta (CD3+ TCR $\gamma\delta$ +) e dei linfociti T attivati (HLA-DR+), rispettivamente nel 63% e 43% dei casi. Si osserva anche una riduzione dei linfociti T regolatori (CD3+CD4+CD25^{br}CD45RA+) nel 72% dei casi. Si osserva inoltre un aumento delle cellule T naive effettrici e memoria sia CD4+ che CD8+ a scapito delle cellule naive.

Un pattern immunologico simile, combinato T/B, è stato descritto anche in pazienti affetti da alcune patologie autoimmuni, come la sindrome di Sjögren¹²², l'artrite reumatoide^{123,124} e il lupus eritematoso sistemico (LES)¹²⁵. Le caratteristiche comuni a queste malattie autoimmuni, riscontrate anche nella nostra coorte, includono una riduzione dei linfociti B memoria (CD19+ CD27+) e un aumento dei linfociti B doppi negativi (CD27- IgD-). Nei pazienti con sindrome di Sjögren, in special modo, si osserva un pattern di attivazione con un aumento dei linfociti HLA-DR+ e dei linfociti T gamma-delta, e una riduzione dei linfociti T regolatori¹²⁶,

analogamente a quanto rilevato nella maggior parte della nostra popolazione. Allo stesso modo anche la riduzione dei linfociti B Switched Memory (CD19+ CD27+ IgD-), dei linfociti T CD4+ e CD8+ Naïve e dei linfociti T regolatori ricalca il modello sopracitato anche in una corte di pazienti con citopenia autoimmune.¹²⁷

Nel confronto tra forme autoimmuni ed idiopatiche nell'ambito dell'immunologia non si sono rilevate sostanziali differenze. Se l'analisi di confronto viene effettuata tra le forme LO ed LL, indipendentemente dalla presenza o assenza di anticorpi, è possibile rilevare che le forme a lunga persistenza (LO) presentano più frequentemente un livello di linfociti B (CD19+) e linfociti B Memory inferiore alla norma. Tale riscontro può essere correlato all'età, dal momento che i pazienti LL possiedono un sistema immunitario più immaturo. Inoltre nel gruppo LL è stata osservata una frequenza maggiore di varianti patogeniche, come discusso nel successivo paragrafo.

Sia il fenotipo clinico che quello immunologico sembrano indicare la presenza di meccanismi caratteristici dell'immunodisregolazione. Con il fine di identificare tali processi è stata avviata un'analisi genetica utilizzando un pannello NGS comprensivo di 160 geni associati all'immunodisregolazione e all'insufficienza midollare.

I risultati hanno rivelato che nel 13% dei casi erano presenti malattie congenite dell'immunità. Tali condizioni sono identificate come immunodisregolazioni primarie (*Primary Immunodeficiency-Related Diseases*, PIRD) e si manifestavano prevalentemente come immunodeficienza comune variabile (*Common Variable Immunodeficiency*, CVID).

Tra le mutazioni patogeniche, quelle che coinvolgono il gene TNFRSF13 sono risultate essere le più comuni, riscontrate in 7/9 (78%) pazienti. In questo contesto, la neutropenia è attribuibile alla ridotta tolleranza centrale delle cellule B, che porta a un mancato riconoscimento degli antigeni self. La citopenia si manifesta inizialmente come neutropenia isolata e può evolvere, anche dopo molti anni, in una citopenia multilineare refrattaria, come documentato in letteratura.¹²⁸ Tale condizione evidenzia come le varianti del gene TNFRSF13 possano essere responsabili del progressivo esaurimento della riserva cellulare delle B, che può richiedere anche decenni per rendersi manifesta.

Nel paziente N5 è stata individuata una seconda variante patogenica di tipo *loss of function* (LOF) del gene CARD11 (*p.Met11le*). Tale mutazione compromette l'espressione di una proteina essenziale per la segnalazione della via NF-κB. La ridotta espressione di questa proteina altera il meccanismo immunitario di controllo del self determinando autoimmunità¹²⁹, di cui, nel caso specifico del paziente N5, la neutropenia autoimmune ne è segno tangibile.

Nel paziente N6 è stata individuata un'ampia delezione del gene FAS (Del 1-4). Questa mutazione altera la funzionalità della via FAS/FASL, fondamentale per la regolazione dell'apoptosi. Tale disfunzione è alla base della sindrome autoimmune linfoproliferativa (*Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*, ALPS)¹³⁰. La sindrome ALPS è caratterizzata da un fenotipo clinico tipico, nella quale la citopenia autoimmune e, in particolare, la neutropenia, emerge come epifenomeno della malattia. Secondo la più recente classificazione del NIH (*National Institutes of Health*), la neutropenia associata è classificata come criterio diagnostico secondario.¹³¹

In una porzione rilevante del campione, pari al 20%, sono presenti varianti di significato incerto, per le quali attualmente non si può escludere un possibile ruolo nella genesi della neutropenia.

Tra queste, tre mutazioni sono state classificate come *hot-VUS* a causa del loro elevato potenziale causativo.¹¹⁶

Due mutazioni riguardano il gene CARD11 (pazienti N11 e N12) come indicato in Tabella 10). Entrambe le mutazioni sono presenti in una zona del gene che è definita "*hotspot*", essenziale per il corretto funzionamento del gene; mutazioni in questa regione hanno un'elevata probabilità di determinare una perdita di funzione.¹²⁹ Il quadro immunologico dei due pazienti è molto simile a quello del paziente N5, caratterizzato da un deficit di linfociti T regolatori e di B memoria. Questi due elementi fanno ipotizzare che vi sia un importante ruolo patogenico delle mutazioni VUS nei soggetti portatori.

Nel paziente N10 è stata identificata una mutazione sul gene AIRE. Le mutazioni in questo gene compromettono la selezione timica determinano, quindi, la produzione di linfociti T autoreattivi. Tale condizione prende il nome di

Poliendocrinopatia Autoimmune di tipo 1 o sindrome APECED (*Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy*).¹³²

La sindrome APECED presenta un quadro clinico sistemico, caratterizzato da candidiasi mucocutanea cronica, espressione dell'immunodeficienza acquisita, e da anomalie endocrine quali l'ipoparatiroidismo e l'insufficienza surrenalica, dovute all'infiltrazione di linfociti T autoreattivi nei tessuti endocrini.¹³³ Tuttavia, è importante sottolineare che il paziente in esame presenta un quadro clinico non completamente sovrapponibile a quello tipico della APECED. Per tale ragione, l'interpretazione della patogenicità di tale mutazione deve essere assunta con cautela e necessita di ulteriori approfondimenti diagnostici. Altre indagini, come analisi funzionali della proteina AIRE o studi di sequenziamento del genoma completo, potranno contribuire a definire il ruolo patogenetico della mutazione identificata.

Una parte significativa del campione in esame presenta varianti a significato incerto (*Variants of Uncertain Significance, VUS*) che attualmente non sembrano essere responsabili del quadro clinico osservato. È essenziale sottolineare che la riclassificazione delle VUS in termini di significato patogenetico è un evento frequente: con il progredire delle tecnologie e l'aggiornamento dei database genetici, alcune VUS potrebbero acquisire un valore patogenetico, mentre altre potrebbero essere rivalutate come non patogenetiche. Pertanto, l'interpretazione della patogenicità delle VUS identificate in questo studio deve essere considerata con cautela e necessita di un follow-up continuo.

In questo studio, i dati WES sono stati ottenuti per 9 pazienti. Tale analisi ha evidenziato la presenza di due varianti significative in due geni chiave: *RELA2* e *BRCA1*.

È interessante notare che la variante *hot-VUS* in *RELA2* sia stata identificata in una paziente con afte ricorrenti, coerentemente con il ruolo causale di questo gene nell'afte ricorrente di tipo 3. La presenza della stessa variante nella madre asintomatica della paziente suggerisce una penetranza incompleta della mutazione o una trasmissione non esattamente intesa nel senso mendeliano del termine.

La mutazione in *BRCA1* è stata identificata in eterozigosi. Tale riscontro è particolarmente rilevante nel contesto clinico studiato, considerata la storia

familiare del paziente caratterizzata da una forte incidenza di neoplasie gravi e precoci nel ramo paterno. Le varianti in eterozigosi di BRCA1 sono notoriamente associate a un rischio aumentato di sviluppare tumori al seno, alle ovaie e ad altri organi.¹³⁴

L'identificazione di varianti genetiche associate all'immunodisregolazione è risultata più frequente nei soggetti di giovane età, con un rischio relativo (RR) dell'11% fino ai 4 anni, rispetto agli adulti, che mostrano un RR del 5% oltre i 20 anni. Tuttavia, tale differenza non ha evidenziato una significatività statistica tra le forme con e senza presenza di anticorpi, né tra quelle con insorgenza precoce e tardiva.

CONCLUSIONI

In sintesi i risultati di questo studio evidenziano un fenotipo di neutropenia caratterizzato da una gravità lieve e una bassa incidenza di infezioni severe, ma con una marcata propensione allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni nel corso del follow-up. L'immunodisregolazione associata a questo fenotipo può rimanere asintomatica per decenni, spesso sfuggendo all'osservazione clinica, ma tende a manifestarsi durante la tarda adolescenza o l'età adulta.¹³⁵

La leuco-neutropenia e la linfocitopenia progressiva possono costituire indicatori precoci della neutropenia LO/LL, in parallelo al riconoscimento di un pattern immunologico specifico. L'identificazione tempestiva del fenotipo è cruciale per indirizzare gli approfondimenti genetici necessari e per stabilire un monitoraggio accurato non solo delle citopenie, ma anche degli aspetti correlati all'immunodisregolazione. Questo include, ad esempio, il controllo longitudinale dei livelli delle immunoglobuline e la sorveglianza delle manifestazioni autoimmuni.

Il rilevamento degli anticorpi anti-neutrofilo, tradizionalmente utilizzato per discernere le neutropenie autoimmuni e idiopatiche, sta perdendo rilevanza, poiché queste due forme appaiono sostanzialmente simili in molti aspetti considerati. Ciò è dimostrato non solo dall'analisi statistica tradizionale, ma anche dall'applicazione della Machine Learning.

Sebbene queste forme di neutropenie “atipiche” siano state inizialmente considerate acquisite, meritano la dizione di “verosimilmente congenite” per la possibile associazione a geni di PIRD (Primary Immune Regulatory Disorders, PIRD), seppur rilevati in una quota minima del campione.

L'uso di metodi più sensibili, l'ampliamento del campione oltre che la revisione sistematica delle varianti di significato incerto, potrebbero aumentare l'accuratezza diagnostica.

Inoltre, in alcuni soggetti sono state descritte mutazioni non presenti nei genitori, suggerendo che il classico modello di trasmissione mendeliana potrebbe non spiegare tutte le varianti osservate.

In una prospettiva interpretativa più moderna, è possibile che i disordini in esame non si presentino come classiche malattie monogeniche. Piuttosto, il fenotipo di questi disturbi potrebbe essere influenzato da varianti genetiche multiple (caratteristiche delle malattie poligeniche) o da fattori ambientali.¹³⁶

BIBLIOGRAFIA

1. Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S. & Simon, H.-U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* **34**, 398–409 (2013).
2. Lawrence, S. M., Corriden, R. & Nizet, V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **82**, (2018).
3. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M. & Scapini, P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends in Immunology* vol. 40 565–583
4. Radtke, D. & Voehringer, D. Granulocyte development, tissue recruitment, and function during allergic inflammation. *Eur J Immunol* **53**, (2023).
5. Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. *Cellular And Molecular Immunology*. (2021).
6. Schwartzberg, L. S. *Neutropenia: Etiology and Pathogenesis. Clinical Cornerstone • NEUTROPENIA= OVERVIEW AND CURRENT THERAPIES •* vol. 8 (2006).
7. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0. Preprint at (2017).
8. Khoury, J. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* **36**, 1703–1719 (2022).
9. Hsieh, M. M., Everhart, J. E., Byrd-Holt, D. D., Tisdale, J. F. & Rodgers, G. P. Prevalence of Neutropenia in the U.S. Population: Age, Sex, Smoking Status, and Ethnic Differences. *Ann Intern Med* **146**, 486 (2007).
10. Schmutz, N., Henry, E., Jopling, J. & Christensen, R. D. Expected ranges for blood neutrophil concentrations of neonates: the Manroe and Mouzinho charts revisited. *Journal of Perinatology* **28**, 275–281 (2008).
11. Reed, W. W. & Diehl, L. F. Leukopenia, Neutropenia, and Reduced Hemoglobin Levels in Healthy American Blacks. *Arch Intern Med* **151**, 501–505 (1991).
12. Reich, D. *et al.* Reduced Neutrophil Count in People of African Descent Is Due To a Regulatory Variant in the Duffy Antigen Receptor for Chemokines Gene. *PLoS Genet* **5**, e1000360 (2009).
13. Demogines, A., Truong, K. A. & Sawyer, S. L. Species-Specific Features of DARC, the Primate Receptor for Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi. *Mol Biol Evol* **29**, 445–449 (2012).
14. Bagheri, M. *et al.* White blood cell ranges and frequency of neutropenia by Duffy genotype status. *Blood Adv* **7**, 406–409 (2023).
15. Tournamille, C., Colin, Y., Cartron, J. P. & Le Van Kim, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* **10**, 224–228 (1995).

16. Lim, E. M., Cembrowski, G., Cembrowski, M. & Clarke, E. G. Race-specific WBC and neutrophil count reference intervals. *Int J Lab Hematol* **32**, 590–597 (2010).
17. Chang, E. Y., Tormey, C. A., Siddon, A. J., Rahmani, M. & Wong, E. Y. Duffy Antigen Phenotyping Is a Useful and Clinically Available Test for Benign Ethnic Neutropenia. *Blood* **132**, 2546–2546 (2018).
18. Howes, R. E. *et al.* The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun* **2**, 266 (2011).
19. Fraquelli, M. *et al.* Correlation between ‘ACKR1/DARC null’ polymorphism and benign neutropenia in Yemenite Jews. *British Journal of Haematology* vol. 170 890–892.
20. Dale, D. C. & Welte, K. Cyclic and Chronic Neutropenia. in *Hematopoietic Growth Factors in Oncology* (eds. Lyman, G. H. & Dale, D. C.) 97–108 (Springer US, Boston, MA, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-7073-2_6.
21. Bonnin, A. *et al.* Diagnostic workup in front of an adult neutropenia. *Ann Biol Clin (Paris)* **76**, 651–658 (2018).
22. Newburger, P. E. *Autoimmune and Other Acquired Neutropenias This Educational Review Addresses the Diagnostic Evaluation of Patients for Autoimmune and Other Forms Of.*
23. Klein, C. *Children with Rare Diseases of Neutrophil Granulocytes: From Therapeutic Orphans to Pioneers of Individualized Medicine.*
24. Fioredda, F. *et al.* The European Guidelines on Diagnosis and Management of Neutropenia in Adults and Children: A Consensus Between the European Hematology Association and the EuNet-INNOCHRON COST Action. *Hemasphere* **7**, e872 (2023).
25. Donadieu, J., Fenneteau, O., Beaupain, B., Mahlaoui, N. & Chantelot, C. B. *Congenital Neutropenia: Diagnosis, Molecular Bases and Patient Management.*
26. Skokowa, J., Dale, D. C., Touw, I. P., Zeidler, C. & Welte, K. Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Primers* **3**, (2017).
27. Dobrewa, W., Bielska, M., Bąbol-Pokora, K., Janczar, S. & Młynarski, W. Congenital neutropenia: From lab bench to clinic bedside and back. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **793**, 108476 (2024).
28. Roques, G. *et al.* Neurological findings and genetic alterations in patients with Kostmann syndrome and *HAX1* mutations. *Pediatr Blood Cancer* **61**, 1041–1048 (2014).
29. Klein, C. *et al.* *HAX1* deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* **39**, 86–92 (2007).
30. Kostmann, R. Infantile Genetic Agranulocytosis (Agranulocytosis infantilis hereditaria) A New Recessive Lethal Disease in Man. *Acta Paediatr* **45**, 309–310 (1956).

31. Kostmann, R. Hereditär reticulos-en ny systemsjukdom. *Svenska Läkartidningen* **47**, 2861–2868 (1950).
32. Stenhammar, L., Strömberg, L. & Ljunggren, C. G. Kostmann's disease or severe hereditary neutropenia—the man behind the syndrome. *Ann Hematol* **99**, 2339–2341 (2020).
33. Berliner, N., Horwitz, M. & Loughran, T. P. *Congenital and Acquired Neutropenia I. CONGENITAL AND CYCLIC NEUTROPENIA. Hematology*
34. A, B. L., S, G. M., J, B. G. & P, S. T. Autoimmune Neutropenia. *New England Journal of Medicine* **293**, 748–753 (1975).
35. Dale, D. C. & Bolyard, A. A. An update on the diagnosis and treatment of chronic idiopathic neutropenia. *Curr Opin Hematol* **24**, 46–53 (2017).
36. Palmblad, J. E. W. & von dem Borne, A. E. G. Kr. Idiopathic, immune, infectious, and idiosyncratic neutropenias. *Semin Hematol* **39**, 113–120 (2002).
37. Ishimoto, Y. *et al.* Production of recombinant humanized monoclonal anti-human neutrophil antigen (HNA) antibodies with potential applicability as standard antibodies. *Transfusion (Paris)* **63**, 2282–2288 (2023).
38. Fioredda, F., Dufour, C., Höglund, P., Papadaki, H. A. & Palmblad, J. Autoimmune Neutropenias: Update on Clinical and Biological Features in Children and Adults. *Hemasphere* **7**, e814 (2023).
39. Autrel-Moignet, A. & Lamy, T. Autoimmune neutropenia. *Presse Medicale* vol. 43.
40. Lawrence, J. S., Craddock, C. G. & Campbell, T. N. Antineutrophilic serum, its use in studies of white blood cell dynamics. *J Lab Clin Med* **69**, 88–101 (1967).
41. Simpson, D. M. & Ross, R. *Effects of Heterologous Antineutrophil Serum in Guinea Pigs Hematologic and Ultrastructural Observations.* (1971).
42. LALEZARI, P., NUSSBAUM, M., GELMAN, S. & SPAET, T. H. Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood* **15**, 236–243 (1960).
43. Bux, J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang* **94**, 277–285 (2008).
44. Akhtari, M., Curtis, B. & Waller, E. K. Autoimmune neutropenia in adults. *Autoimmunity Reviews* vol. 9 62–66.
45. Lalezari, P. Chapter 48 - Autoimmune Neutropenia. in *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)* (eds. Rose, N. R. & Mackay, I. R.) 677–683 (Academic Press, Boston, 2014).
46. Capsoni, F., Sarzi-Puttini, P. & Zanella, A. Primary and secondary autoimmune neutropenia. *Arthritis Res Ther* **7**, 208 (2005).
47. Porretti, L. *et al.* Implementation and outcomes of a transfusion-related acute lung injury surveillance programme and study of HLA/HNA alloimmunisation in blood donors. *Blood Transfusion* **10**, 351–359 (2012).

48. Hessner, M. J., Curtis, B. R., Endean, D. J. & Aster, R. H. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion (Paris)* **36**, 895–899 (1996).
49. Berliner, N., Horwitz, M. & Loughran Jr., T. P. Congenital and Acquired Neutropenia. *Hematology* **2004**, 63–79 (2004).
50. Farruggia, P. Immune neutropenias of infancy and childhood. *World Journal of Pediatrics* **12**, 142–148 (2016).
51. Badolato, R., Fontana, S., Notarangelo, L. D. & Savoldi, G. Congenital neutropenia: advances in diagnosis and treatment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **4**, 513–521 (2004).
52. Verheugt, F. W. A., von dem Borne, A. E. G. Kr., van Noord-Bokhorst, J. C. & Engelfriet, C. P. Autoimmune Granulocytopenia: the Detection of Granulocyte Autoantibodies with the Immunofluorescence Test. *Br J Haematol* **39**, 339–350 (1978).
53. Fung, Y. L. Transfusion-related acute lung injury investigation insights. *ISBT Sci Ser* **6**, 206–211 (2011).
54. Bruin, M. C. A. *et al.* Neutrophil Antibody Specificity in Different Types of Childhood Autoimmune Neutropenia. *Blood* **94**, 1797–1802 (1999).
55. Fioredda, F., Dufour, C., Höglund, P., Papadaki, H. A. & Palmblad, J. Autoimmune Neutropenias: Update on Clinical and Biological Features in Children and Adults. *HemaSphere* vol. 7
56. Bux, J. & Chapman, J. Report on the second international granulocyte serology workshop. *Transfusion (Paris)* **37**, 977–983 (1997).
57. Simtong, P. *et al.* Improvement of monoclonal antibody-immobilized granulocyte antigen assay for the detection of anti-HNA-1 alloantibodies. *Transfusion (Paris)* **58**, 200–207 (2018).
58. Farruggia, P. & Dufour, C. Diagnosis and management of primary autoimmune neutropenia in children: insights for clinicians. *Ther Adv Hematol* **6**, 15–24 (2015).
59. Lehndorff, H. Transitorische Granulocytopenie beim Neugborenen. *Acta Paediatrica* (1951).
60. Arneth, B. Neonatal immune incompatibilities between newborn and mother. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9
61. Porcelijn, L. & de Haas, M. Neonatal Alloimmune Neutropenia. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **45**, 311–316 (2018).
62. Browne, T., Dearman, R. J. & Poles, A. Human neutrophil antigens: Nature, clinical significance and detection. *Int J Immunogenet* **48**, 145–156 (2021).
63. van den Tooren-de Groot, R. *et al.* Management and outcome of 35 cases with foetal/neonatal alloimmune neutropenia. *Acta Paediatr* **103**, (2014).
64. Van Den Tooren-de Groot, R. *et al.* Management and outcome of 35 cases with foetal/neonatal alloimmune neutropenia. *Acta Paediatr* **103**, e467–e474 (2014).

65. Kocherlakota, P. & Gamma, E. F. La. Human granulocyte colony-stimulating factor may improve outcome attributable to neonatal sepsis complicated by neutropenia. *Pediatrics* **100**, e6–e6 (1997).
66. Dale, D. C. How I manage children with neutropenia. *Br J Haematol* **178**, 351–363 (2017).
67. Fioredda, F. *et al.* Infectious complications in children with severe congenital, autoimmune or idiopathic neutropenia: a retrospective study from the Italian Neutropenia Registry. *Pediatr Infect Dis J* **32**, 410–412 (2013).
68. Bux, J., Behrens, G., Jaeger, G. & Welte, K. *Diagnosis and Clinical Course of Autoimmune Neutropenia in Infancy: Analysis of 240 Cases.*
69. Papadaki, H. A. & Pontikoglou, C. Pathophysiologic mechanisms, clinical features and treatment of idiopathic neutropenia. *Expert review of hematology* vol. 1 217–229
70. Dale, D. C. & Liles, C. How many neutrophils are enough? *The Lancet* **351**, 1752–1753 (1998).
71. Audrain, M. *et al.* Autoimmune neutropenia in children: Analysis of 116 cases. *Pediatr Allergy Immunol* **22**, 494–496 (2011).
72. Capsoni, F., Sarzi-Puttini, P. & Zanella, A. Primary and secondary autoimmune neutropenia. *Arthritis Res Ther* **7**, 208–214 (2005).
73. Papadaki, H. A., Gibson, F. M., Rizzo, S., Gordon-Smith, E. C. & Marsh, J. C. W. *Assessment of Bone Marrow Stem Cell Reserve and Function and Stromal Cell Function in Patients with Autoimmune Cytopenias.*
74. Lalezari, P., Khorshidi, M. & Petrosova, M. Autoimmune neutropenia of infancy. *J Pediatr* **109**, 764–769 (1986).
75. Chung, B. *et al.* Chronic benign neutropenia among Chinese children. *Hong Kong Medical Journal* **4**, 231–236 (2004).
76. Lin, M. *et al.* Primary autoimmune neutropenia in children in Taiwan. *Transfusion (Paris)* **49**, 1003–1006 (2009).
77. Sella, R., Flomenblit, L., Goldstein, I. & Kaplinsky, C. Detection of Anti-Neutrophil Antibodies in Autoimmune Neutropenia of Infancy: A Multicenter Study. *Isr Med Assoc J* **12**, 91–96 (2010).
78. Farruggia, P. *et al.* Autoimmune neutropenia of infancy: Data from the Italian neutropenia registry. *Am J Hematol* **90**, (2015).
79. Fioredda, F. *et al.* Secondary Autoimmune Neutropenia: Data from the Italian Neutropenia Registry. *Blood* **134**, 3585–3585 (2019).
80. Balint, G. Felty's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **18**, 631–645 (2004).
81. Sibley, J. T., Haga, M., Visram, D. A. & Mitchell, D. M. The clinical course of Felty's syndrome compared to matched controls. *J Rheumatol* **18**, 1163–1167 (1991).

82. Fragoulis, G. E. *et al.* Neutropaenia in early rheumatoid arthritis: Frequency, predicting factors, natural history and outcome. *RMD Open* **4**, (2018).
83. Rauova, L. *et al.* Induction of Biologically Active Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies by Immunization with Human Apoptotic Polymorphonuclear Leukocytes. *Clinical Immunology* **103**, 69–78 (2002).
84. Brito-Zerón, P. *et al.* Prevalence and Clinical Relevance of Autoimmune Neutropenia in Patients with Primary Sjögren’s Syndrome. *Semin Arthritis Rheum* **38**, 389–395 (2009).
85. Farruggia, P. *et al.* Autoimmune neutropenia of childhood secondary to other autoimmune disorders: Data from the Italian neutropenia registry. *American Journal of Hematology* vol. 92 E546–E549
86. Dale, D. C. How I manage children with neutropenia. *Br J Haematol* **178**, 351–363 (2017).
87. Farruggia, P. *et al.* Autoimmune neutropenia of childhood secondary to other autoimmune disorders: Data from the Italian neutropenia registry. *Am J Hematol* **92**, (2017).
88. Fattizzo, B. *et al.* Chronic Idiopathic Neutropenia In Adults: Clinical Features In a 4-Year Prospective Study. *Blood* **122**, 1026–1026 (2013).
89. Dale, D. C. & Bolyard, A. A. An update on the diagnosis and treatment of chronic idiopathic neutropenia. *Current Opinion in Hematology* vol. 24 46–53.
90. Berliner, N., Horwitz, M. & Loughran, T. P. Congenital and Acquired Neutropenia. *Hematology* **2004**, 63–79 (2004).
91. Dinauer, M. C. *Chronic Granulomatous Disease and Other Disorders of Phagocyte Function. Hematology.*
92. Farruggia, P. *et al.* Idiopathic neutropenia of infancy: Data from the Italian Neutropenia Registry. *Am J Hematol* **94**, 216–222 (2019).
93. Fioredda, F. *et al.* Congenital and acquired neutropenia consensus guidelines on diagnosis from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *Pediatr Blood Cancer* **57**, 10–17 (2011).
94. Farruggia, P. *et al.* Idiopathic neutropenia of infancy: Data from the Italian Neutropenia Registry. *Am J Hematol* **94**, 216–222 (2019).
95. Boxer, L. & Dale, D. C. Neutropenia: causes and consequences. in *Seminars in hematology* vol. 39 75–81 (Elsevier, 2002).
96. Palmblad, J. & Papadaki, H. A. Chronic idiopathic neutropenias and severe congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol* **15**, 8–14 (2008).
97. Papadaki, H. A., Palmblad, J. & Eliopoulos, G. D. Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview. *Eur J Haematol* **67**, 35–44 (2001).

98. Koumaki, V. *et al.* Pro-inflammatory bone marrow milieu in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with impaired local production of interleukin-10. *Br J Haematol* **135**, 570–573 (2006).
99. Papadaki, H. A., Giouremou, K. & Eliopoulos, G. D. Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased production of TGF- β ₁ by bone marrow stromal cells. *Eur J Haematol* **63**, 154–162 (1999).
100. Gemetzi, C. *et al.* Lymphopenia in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with decreased number of T-lymphocytes containing T-cell receptor excision circles. *Eur J Haematol* **88**, 210–223 (2012).
101. Ogbue, O. D. *et al.* New approaches to idiopathic neutropenia in the era of clonal hematopoiesis. *Exp Hematol Oncol* **12**, 42 (2023).
102. Fioredda, F. *et al.* Late-onset and long-lasting autoimmune neutropenia: An analysis from the Italian Neutropenia Registry. *Blood Adv* **4**, 5644–5649 (2020).
103. Bruin, M. C. A. *et al.* Neutrophil Antibody Specificity in Different Types of Childhood Autoimmune Neutropenia. *Blood* **94**, 1797–1802 (1999).
104. Walne, A. J., Vulliamy, T., Beswick, R., Kirwan, M. & Dokal, I. TINF2 mutations result in very short telomeres: Analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood* **112**, 3594–3600 (2008).
105. Gámez-Díaz, L. *et al.* The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, 223–230 (2016).
106. Zhang, L. *et al.* Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: Clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**, 1178–1185 (2007).
107. Garcia-Carmona, Y., Fribourg, M., Sowa, A., Cerutti, A. & Cunningham-Rundles, C. TACI and endogenous APRIL in B cell maturation. *Clinical Immunology* **253**, 109689 (2023).
108. Salzer, U. & Grimbacher, B. TACI deficiency — a complex system out of balance. *Curr Opin Immunol* **71**, 81–88 (2021).
109. Salzer, U. *et al.* Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* **37**, 820–828 (2005).
110. Fioredda, F. *et al.* Late-onset and long-lasting neutropenias in the young: A new entity anticipating immune-dysregulation disorders. *Am J Hematol* **99**, 534–542 (2024).
111. Shearer, W. T. *et al.* Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **112**, 973–980 (2003).

112. Bisset, L. R., Lung, T. L., Kaelin, M., Ludwig, E. & Dubs, R. W. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* **72**, 203–212 (2004).
113. Orkin, S. H. *et al. Hematology and Oncology of Infancy and Childhood*. (Philadelphia, 2014).
114. Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G. & Girschick, H. J. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* **162**, 271–279 (2010).
115. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* **17**, 405–424 (2015).
116. Genoox. Franklin. <https://franklin.genoox.com> (2021).
117. Rodrigues, E. da S. *et al.* Variant-level matching for diagnosis and discovery: Challenges and opportunities. *Hum Mutat* (2022) doi:10.1002/humu.24359.
118. Bisset, L. R., Lung, T. L., Kaelin, M., Ludwig, E. & Dubs, R. W. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* **72**, 203–212 (2004).
119. Shearer, W. T. *et al.* Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **112**, 973–980 (2003).
120. van Gent, R. *et al.* Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol* **133**, 95–107 (2009).
121. Kopanos, C. *et al.* VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* **35**, 1978–1980 (2019).
122. Simon, Q. *et al.* In-depth characterization of CD24 high CD38 high transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, 1577-1584.e10 (2016).
123. Chalan, P., Bijzet, J., Kroesen, B.-J., Boots, A. M. H. & Brouwer, E. Altered Natural Killer Cell Subsets in Seropositive Arthralgia and Early Rheumatoid Arthritis Are Associated with Autoantibody Status. *J Rheumatol* **43**, 1008–1016 (2016).
124. Kawashiri, S. *et al.* CD4+CD25highCD127low/- Treg Cell Frequency from Peripheral Blood Correlates with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* **38**, 2517–2521 (2011).
125. Wei, C. *et al.* A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* **178**, 6624–6633 (2007).
126. Mingueneau, M. *et al.* Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, 1809-1821.e12 (2016).

127. Schiavo, E. *et al.* Autoimmune Cytopenias and Dysregulated Immunophenotype Act as Warning Signs of Inborn Errors of Immunity: Results From a Prospective Study. *Front Immunol* **12**, (2022).
128. Bergman, P. *et al.* Mutation in the TACI gene and autoimmune neutropenia: A case report. *Am J Hematol* **97**, (2022).
129. Dorjbal, B. *et al.* Hypomorphic caspase activation and recruitment domain 11 (CARD11) mutations associated with diverse immunologic phenotypes with or without atopic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, 1482–1495 (2019).
130. Consonni, F., Gambineri, E. & Favre, C. ALPS, FAS, and beyond: from inborn errors of immunity to acquired immunodeficiencies. *Ann Hematol* **101**, 469–484 (2022).
131. Oliveira, J. B. *et al.* Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* **116**, e35–e40 (2010).
132. Oikonomou, V., Break, T. J., Gaffen, S. L., Moutsopoulos, N. M. & Lionakis, M. S. Infections in the monogenic autoimmune syndrome APECED. *Curr Opin Immunol* **72**, 286–297 (2021).
133. Ferre, E. M. N. *et al.* Redefined clinical features and diagnostic criteria in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *JCI Insight* **1**, (2016).
134. Rebbeck, T. R. *et al.* Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **313**, 1347–1361 (2015).
135. Walter, J. E., Farmer, J. R., Foldvari, Z., Torgerson, T. R. & Cooper, M. A. Mechanism-Based Strategies for the Management of Autoimmunity and Immune Dysregulation in Primary Immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol Pract* **4**, 1089–1100 (2016).
136. Yao, Q., Gorevic, P., Shen, B. & Gibson, G. Genetically transitional disease: a new concept in genomic medicine. *Trends in Genetics* **39**, 98–108 (2023).