

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI

XXXVI Ciclo

(Anni 2020-2024)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

Profilo genetico dei pazienti con Immunodeficienza Comune

Variabile e impatto diagnostico, prognostico e terapeutico

TUTOR/RELATORE

Chiar.mo

Prof. Giuseppe Spadaro

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Spadaro', is written below the name of the tutor.

CANDIDATO/A

Dott.ssa Alessandra Punziano

UNIVERSITY OF NAPLES FEDERICO II



PH.D. PROGRAM IN
CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE
CURRICULUM IN TRANSLATIONAL MEDICAL SCIENCES

XXXVI Cycle
(Years 2020-2024)

Chairman: Prof. Francesco Beguinot

PH.D. THESIS

**Genetic profile of patients with Common Variable
Immunodeficiency and diagnostic, prognostic and
therapeutic impact**

TUTOR

Prof. Giuseppe Spadaro

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Spadaro', with a long horizontal stroke extending to the right.

PH.D. STUDENT

Dr. Alessandra Punziano

INDICE

INTRODUZIONE	3
1. Impatto della genetica in medicina	3
2. Genetica e <i>Inborn Error of Immunity</i> (IEIs)	4
3. <i>Inborn Error of Immunity</i> (IEIs)	5
4. Immunodeficienza Comune Variabile	7
4.1 Eziopatogenesi	8
4.2 Manifestazioni cliniche	10
4.2.1 <i>Manifestazioni infettive</i>	10
4.2.2 <i>Manifestazioni autoimmuni</i>	11
- <i>Citopenie autoimmune</i>	12
- <i>Manifestazioni reumatologiche e dermatologiche</i>	12
4.2.3 <i>Immunodisregolazione</i>	13
- <i>Manifestazioni gastrointestinali</i>	13
- <i>Fegato</i>	14
- <i>Manifestazioni polmonari</i>	15
4.2.4 <i>Linfoproliferazione e neoplasie</i>	16
4.3 Stratificazione dei pazienti con CVID	17
4.3.1 <i>Classificazione Chapel</i>	17
4.3.2 <i>Classificazione EUROclass</i>	18
4.4. Trattamento	20

PROFILO GENETICO DEI PAZIENTI CON IMMUNODEFICIENZA	
COMUNE VARIABILE E IMPATTO DIAGNOSTICO, PROGNOSTICO E	
TERAPEUTICO	23
1. Introduzione allo studio	23
2. Materiali e Metodi	25
<i>2.1 Reclutamento dei soggetti</i>	<i>25</i>
<i>2.2 Sequenziamento genetico e analisi dei dati</i>	<i>26</i>
<i>2.3 Analisi statistiche</i>	<i>27</i>
3. Risultati	27
<i>3.1 Parametri clinico-demografici e laboratoristici della popolazione</i>	<i>27</i>
<i>3.2 Risultati analisi genetica con Next Generation Sequencing (NGS)</i>	<i>28</i>
<i>3.3 Mutazioni genetiche patologiche e fenotipo clinico dei pazienti</i>	<i>28</i>
<i>3.4 Varianti geniche di significato incerto (VUS)</i>	<i>31</i>
4. Discussione	32
<i>4.1 TNFRSF13B (TACI)</i>	<i>33</i>
<i>4.2 CTLA-4</i>	<i>35</i>
<i>4.3 NF-κB1</i>	<i>37</i>
<i>4.4 KMT2D</i>	<i>38</i>
<i>4.5 Varianti di significato incerto (VUS)</i>	<i>39</i>
5. Conclusioni e prospettive future	41
6. Bibliografia	43
7. Figure e tabelle	50

INTRODUZIONE

1. Impatto della genetica in medicina

Per molte patologie la suscettibilità individuale è influenzata da alterazioni genetiche. Di conseguenza, comprendere la correlazione tra mutazioni genetiche e sviluppo delle patologie, rappresenta uno strumento per identificare i meccanismi alla base dell'eziopatogenesi e per evidenziare nuove e più specifiche strategie per la diagnosi, la prevenzione e il trattamento delle stesse [1].

Tra il 1980 e il 1990, gli sforzi per la mappatura del genoma si sono concentrati su malattie rare, monogeniche e sindromiche, e per lo più guidati dall'analisi dei collegamenti all'interno di complessi alberi genealogici. L'individuazione dei segnali genetici è stata poi seguita dal sequenziamento dei geni trovati con metodica Sanger, per identificare gli alleli causativi di malattia all'interno dei loci. Successivamente la patogenicità delle mutazioni geniche (basata sul riscontro di varianti presumibilmente causative di malattia in più famiglie e la concomitante assenza delle stesse negli individui sani) era generalmente confermata da studi funzionali in modelli cellulari e animali. Questo percorso verso l'identificazione dei geni è stato laborioso; tuttavia, nel 2000, erano state caratterizzate circa 1.000 delle 7.000 malattie ereditarie monogeniche [2]. Gradualmente, quindi, si è ridotta l'attenzione sull'analisi degli alberi genealogici a favore di una raccolta dati sui singoli casi affetti, fino all'analisi di grandi coorti di pazienti con caratteristiche fenotipiche differenti, rivelando nuove varianti a trasmissione dominante e associate a diverse presentazioni cliniche [3-4]. Dopo il primo sequenziamento completo del genoma umano nel 2004, la crescente necessità di

analizzare un gran numero di genomi in modo rapido, economico e accurato ha guidato il passaggio dal tradizionale metodo Sanger verso nuove tecnologie ad alto rendimento [5]. Nel 2005, è stata inaugurata la nuova era della tecnologia *Next Generation Sequencing* (NGS), il primo sequenziamento in parallelo del DNA, che ha notevolmente accelerato il ritmo della generazione dati, riducendone, al tempo stesso, i costi [6].

La genetica medica è stata caratterizzata dalla rapida applicazione nella pratica clinica. Ad oggi esistono test genetici mirati congiuntamente a tecniche di sequenziamento del genoma più estese che, quando necessario, consentono l'analisi di un maggior numero di geni rilevanti [7]. La transizione dai test genetici mirati al sequenziamento dell'esoma completo (WES) e dell'intero genoma (WGS) ha consentito la rianalisi e la reinterpretazione di singole sequenze geniche individuando nuove mutazioni alleliche causative di malattia e le loro conseguenze fenotipiche [8].

2. Genetica e *Inborn Error of Immunity* (IEIs)

Più che in altre discipline mediche, le conoscenze nel campo degli *Inborn Error of Immunity* (IEIs) sono in rapida espansione grazie ai recenti progressi nel sequenziamento genico, negli strumenti di editing genetico e all'introduzione di nuovi farmaci biologici e di *small molecules* diretti contro specifici *checkpoints* rilevanti nell'immunità, nell'infiammazione e nel cancro [9].

Con l'utilizzo della tecnologia NGS nello studio del WES e del WGS, è stato possibile individuare un numero sempre maggiore di IEIs definiti, evidenziando l'eterogeneità fenotipica e il pleiotropismo genetico di questi disturbi [10]. È stato inoltre evidenziato

come anche le mutazioni introniche profonde possano causare malattia [11-12]. L'incremento del successo diagnostico delle malattie rare ottenuto utilizzando il WGS rispetto al WES è tra 6-11% e l'uso del sequenziamento dell'RNA supporta il processo diagnostico, aiutando a chiarire la fisiopatologia della malattia [13].

La possibilità di diagnosticare gli IEIs utilizzando la tecnologia NGS porta con sé la necessità di confermare il significato delle nuove mutazioni, classificate come “varianti di significato incerto” (VUS), anche in geni noti correlati alle patologie. I costi economici, unitamente al tempo e alle competenze necessarie per analizzare queste mutazioni e per interpretarne i risultati rappresentano attualmente i principali ostacoli all'utilizzo routinario dell'analisi genetica nella pratica clinica [9].

3. *Inborn Error of Immunity* (IEIs)

Gli *Inborn Error of Immunity* (IEIs) comprendono un vasto gruppo di disordini caratterizzati da deficit a diversi livelli della risposta immunitaria innata e adattativa. I pazienti affetti presentano maggiore suscettibilità a infezioni, manifestazioni autoimmuni, infiammatorie e/o allergiche, linfoproliferazione policlonale e neoplasie. Queste condizioni possono essere causate da mutazioni germinali che provocano perdita di espressione e/o alterata funzione di proteine, recettori e mediatori coinvolti nel processo di maturazione del sistema immunitario [14]. Ciò si traduce in un alterato funzionamento delle cellule del sistema immunitario, durante l'omeostasi e/o in risposta ad agenti esterni e stimoli interni [15]. Nel 2022, la commissione di esperti della

International Union of Immunological Societies (IUIS) ha aggiornato la classificazione degli IEIs, in cui vengono descritte 485 patologie con fenotipi diversi, proponendo una suddivisione in 10 gruppi sulla base della componente immunitaria interessata e dell'eventuale associazione a sindromi specifiche [16]:

- 1) Immunodeficienze combinate B e T cellulari;
- 2) Immunodeficienze combinate con caratteristiche associate o sindromiche;
- 3) Immunodeficienze prevalentemente anticorpali (PAD);
- 4) Malattie da immunodisregolazione;
- 5) Difetti congeniti dei fagociti (numero e/o funzione);
- 6) Difetti dell'immunità innata;
- 7) Disordini autoinfiammatori;
- 8) Difetti del complemento;
- 9) Immunodeficienze associate a insufficienza midollare;
- 10) Fenocopie degli IEIs [17].

Tra queste, le immunodeficienze prevalentemente anticorpali (PAD) sono la conseguenza di difetti nello sviluppo, maturazione e funzione dei linfociti B, che comportano una ridotta e/o alterata produzione anticorpale. Clinicamente sono accomunate da una maggiore predisposizione allo sviluppo di infezioni batteriche ricorrenti e/o severe.

Si riconoscono:

- PAD con linfociti B circolanti assenti, che comprendono l'agammaglobulinemia *X-linked* (XLA) e la forma a trasmissione autosomica recessiva (ARA);
- PAD con conta dei linfociti B circolanti >1% includendo l'immunodeficienza comune variabile (CVID) e forme con deficit genetici noti (CVID-like);

- PAD con ridotti livelli sierici di IgG e IgA, dosaggio IgM normale/elevato e conta dei linfociti B normali, come la sindrome da Iper IgM (HIGM);
- PAD con deficit funzionali, dell'isotipo o nelle catene leggere, con conta totale di linfociti B nella norma, tra cui: deficit selettivo di IgA, ipogammaglobulinemia transitoria dell'infanzia, deficit di IgA e sottoclassi di IgG, deficit isolato delle sottoclassi di IgG, deficit di anticorpi specifici, deficit selettivo di IgM, mutazione e delezione delle catene pesanti Ig, deficit delle catene K;
- PAD con linfocitosi B da attivazione costitutiva di NF- κ B. [17].

4. Immunodeficienza Comune Variabile (CVID)

L'immunodeficienza comune variabile (CVID) è l'immunodeficienza primitiva sintomatica più frequente, con una prevalenza stimata tra 1: 10.000 e 1: 50.000 [18-19]. È caratterizzata da una severa riduzione (>2 DS) dei livelli sierici di almeno due classi di immunoglobuline, IgG e IgA, con o senza riduzione di IgM, linfociti B circolanti normali o lievemente ridotti in numero e scarsa risposta anticorpale alle vaccinazioni [20].

Nella maggior parte dei casi si presenta in maniera sporadica ma, in una percentuale variabile dal 5% al 25%, è caratterizzata da familiarità con forme monogeniche a pattern autosomico dominante o, più raramente, recessivo (2-10% dei casi) [18].

L'espressione massima della malattia si ha tra i 15 e i 35 anni, con forme ad esordio tardivo oltre i 50 anni (CVID "*Adult Onset*"). Il rapporto M:F è circa 1:1, a sottolineare l'assenza di fattori legati al genere nello sviluppo della patologia, tuttavia, l'esordio sembra essere più precoce nei maschi (2:1, nella fascia d'età < 10 anni) [21].

La CVID viene spesso diagnosticata tardivamente a causa della sua clinica eterogenea, con un ritardo diagnostico medio di circa 6-9 anni in Europa. La grande eterogeneità delle manifestazioni cliniche e la scarsa specificità delle stesse rende spesso difficile il corretto inquadramento, con conseguenze anche importanti [22]. Per questo motivo è fondamentale stabilire un iter diagnostico ben delineato, anche attraverso l'esecuzione di test di screening, che consenta una diagnosi non solo precoce, ma anche precisa. Per rispondere a questa esigenza, l'*European Society for Immunodeficiencies* (ESID), ha individuato dei criteri diagnostici, aggiornati nel 2019, che comprendono:

- almeno un elemento tra infezioni ricorrenti, manifestazioni autoimmuni, malattia granulomatosa, linfoproliferazione policlonale inspiegabile, familiarità;
- marcata riduzione dei livelli sierici di IgA e IgG con o senza riduzione di IgM (valori inferiori a due deviazioni standard rispetto ai livelli normali per età), misurate in due occasioni diverse;
- almeno uno tra: ridotta risposta anticorpale ai vaccini e/o isoemoagglutinine assenti, <70% del valore per età dei linfociti B *switched-memory*;
- esclusione di cause secondarie di immunodeficienza;
- età >4 anni;
- esclusione di deficit profondi a carico dei linfociti T [20].

4.1 Eziopatogenesi

L'eziopatogenesi della CVID è ancora poco chiara. Ad oggi sono stati identificati numerosi geni associati alla patologia; essi codificano principalmente per recettori, ligandi e proteine di *signalling* implicati nell'interazione tra linfociti B e T e nei processi

di maturazione e differenziazione dei linfociti B. ICOS è stato il primo gene ad essere associato alla CVID: codifica per un recettore di superficie T-cellulare appartenente alla famiglia CD28/CTLA-4 e implicato nella formazione dei centri germinativi, nella differenziazione finale dei linfociti B e nella modulazione della risposta immunitaria [23]. Nonostante alla scoperta di ICOS abbia fatto seguito l'identificazione di molti altri geni, si stima che solo il 2-10% di questi pazienti sia affetto da una forma monogenica. Nei restanti casi sono comunque chiamati in causa fattori genetici; alcuni studi hanno portato all'individuazione di svariati geni modificatori, altri hanno valutato il possibile ruolo di fattori epigenetici [24].

Nei pazienti affetti da CVID sono state riconosciute ampie disregolazioni immunitarie innate e adattative, soprattutto nei fenotipi complessi [25].

Il deficit immunitario comune a tutti i pazienti con CVID è rappresentato dalla perdita di funzione dei linfociti B, come disturbo intrinseco o secondario ad una insufficiente stimolazione da parte di altre cellule nella produzione anticorpale. Tra le alterazioni citofluorimetriche a carico dei linfociti B è stata rilevata una riduzione delle cellule B *switched memory*, dovuta a un'aberrante selezione e maturazione a livello dei centri germinativi, e un aumento in percentuale dei linfociti B CD21^{low} nel sangue periferico, correlato allo sviluppo di manifestazioni disimmuni (linfoproliferazione e autoimmunità). È stato identificato inoltre un incremento dei linfociti B di transizione associato frequentemente a linfadenopatia. Infine, in casi più rari, è possibile riscontrare una quasi totale assenza di linfociti B [26]. È stata dimostrata una relativa perdita di funzione dei linfociti T, in particolare dei linfociti T CD4 circolanti (CD4 *naïve*, linfociti T antigene-specifiche, Treg) e un'alterata produzione, attivazione e secrezione di alcune citochine antiinfiammatorie (IL-2, IFN- γ e IL-10) a favore di un

aumento delle citochine pro-infiammatorie come IL-6 e IL-12, BAFF, IL-6, TNF- α e IL-4. Più recentemente sono stati dimostrati anche difetti nella maturazione del timo, alterazioni nei monociti/cellule dendritiche e nelle risposte immunitarie innate, inclusa la perdita di funzione delle cellule killer naturali [18].

4.2 Manifestazioni cliniche

Il quadro clinico dei pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile è molto eterogeneo. Può presentarsi con una maggiore suscettibilità a infezioni ricorrenti, manifestazioni infiammatorie e autoimmuni, linfoproliferazione policlonale e tumori maligni. L'estrema variabilità fenotipica della CVID si traduce in un interessamento sistemico tale che, ogni organo e apparato, può essere coinvolto [27] (**Figura 1**).

4.2.1 Manifestazioni infettive

Una storia di infezioni ricorrenti costituisce il quadro clinico tipico dei pazienti con CVID. Le infezioni interessano il tratto respiratorio, gastrointestinale e genito-urinario. I principali patogeni responsabili sono *Haemophilus Influenzae*, *Moraxella Catarrhalis*, *Neisseria Meningitidis*, *Stafilococchi*, *Streptococchi*, *Mycoplasma*, *Herpes Zooster*, *Rinovirus*, mentre infezioni determinate da patogeni opportunisti come *Pneumocystis Jirovecii*, *Candida Albicans*, *Citomegalovirus* sono tendenzialmente associate ad un deficit che coinvolge anche i linfociti T CD4+ [28] [29].

Le manifestazioni più frequenti sono rappresentate da otiti, sinusiti croniche, bronchiti acute e polmoniti ricorrenti, spesso seguite dallo sviluppo di complicanze strutturali,

come danno polmonare cronico, bronchiectasie e GLILD, che favoriscono la cronicizzazione dei processi infiammatori [28].

Le infezioni del tratto gastrointestinale sono rappresentate da diarrea acuta o cronica e malassorbimento con calo ponderale, malessere e astenia. I principali patogeni responsabili del coinvolgimento gastrointestinale sono *Giardia*, *Lamblia*, *Criptosporidium*, *Campylobacter Jejuni* e *Salmonella*, soprattutto nei pazienti in cui coesiste un deficit di IgA, che non trae beneficio dalla terapia sostitutiva con immunoglobuline umane polivalenti [30]. Non risulta una maggiore suscettibilità all'infezione da *Helicobacter Pylori* rispetto alla popolazione sana, sebbene questa, quando presente, sia associata all'insorgenza precoce di lesioni precancerose con progressione rapida a forme maligne come il carcinoma e il linfoma gastrico. [31].

Va infine ribadito il maggior rischio di sviluppo di infezioni delle vie urinarie, cutanee, nonché di sepsi [28].

4.2.2 Manifestazioni autoimmuni

Le manifestazioni autoimmuni si osservano in circa 30% dei pazienti con CVID e rappresentano spesso il primo e unico sintomo di esordio di un IEI [28]. È stato dimostrato che lo sviluppo di autoimmunità in questi pazienti è dato da una minore efficacia dei meccanismi di tolleranza immunologica, associata alla presenza di cloni autoreattivi di B e T, alla riduzione dei linfociti Treg e ad un'alterata secrezione di citochine infiammatorie [32].

Citopenie autoimmuni

Le citopenie autoimmuni, come la trombocitopenia autoimmune (ITP) e l'anemia emolitica autoimmune (AIHA) sono descritte nel 10-18% dei casi, potendo esordire in forma isolata o come sindrome di Evan, seguite da neutropenia autoimmune [33].

I pazienti con citopenie autoimmuni presentano una maggiore predisposizione allo sviluppo di una o più complicanze non infettive, come linfoproliferazione policlonale, granulomi, patologie disimmuni epatiche e polmonari, enteropatia [34]. La diagnosi si basa su reperti laboratoristici persistentemente alterati e confermata, in caso di deficit multilineare, da biopsia midollare che mostra ipercellularità e arresto maturativo tardivo delle cellule ematiche. È stata riscontrata in questi pazienti una riduzione dei linfociti B *switched memory* su sangue periferico e un aumento dei CD21^{low}. La gestione terapeutica di queste manifestazioni non differisce da quella nei soggetti immunocompetenti [35].

Manifestazioni reumatologiche e dermatologiche

L'associazione tra la CVID e le manifestazioni reumatologiche è stata confermata da numerosi studi. Possono includere artrite idiopatica giovanile o dell'adulto, malattie del tessuto connettivo, malattia di Behçet (BD) e sindrome di Raynaud.

In alcune coorti di pazienti è stato evidenziato un livello sierico basale di IgG più alto, familiarità per autoimmunità, coesistenza di manifestazioni autoinfiammatorie e neoplasie [36]. L'iter diagnostico-terapeutico di questi pazienti è sovrapponibile a quello seguito nella popolazione generale; va precisato che nei pazienti con CVID la ricerca di

anticorpi può risultare inconcludente a causa del deficit anticorpale e/o della terapia sostitutiva in corso con immunoglobuline umane polivalenti (IgRT) [35].

Le manifestazioni dermatologiche sono rappresentate principalmente da psoriasi, alopecia, lichen planus e vitiligo. La psoriasi è sicuramente la dermatopatia più frequente (19%), ma la causa non è stata ancora chiarita; la patogenesi della psoriasi sembra essere dovuta ad un'alterata differenziazione intrinseca ai linfociti B o a un'insufficiente *cross-talk* tra linfociti B e T [37]. In più del 90% dei casi la dermatopatia si presenta in forma lieve, probabilmente dovuta all'effetto immunomodulante della IgRT sulla funzione delle cellule dendritiche, dei linfociti Treg, dei linfociti B e delle cellule NK [38].

4.2.3 Immunodisregolazione

Manifestazioni gastrointestinali

La prevalenza dei disturbi gastrointestinali nei pazienti con CVID varia dal 40% al 70%. Tra le manifestazioni più frequenti sono riportate diarrea cronica o intermittente (presente nel 20-60% dei casi), gonfiore e dolore addominale [39].

L'eziologia di tali disturbi è piuttosto varia; escludendo le infezioni, in molti casi la sintomatologia gastrointestinale è secondaria a complicanze non infettive. Il 30-60% dei pazienti affetti da CVID presenta segni e sintomi di enteropatia a carico dell'intestino tenue (prevalentemente il duodeno). La severità del quadro clinico associato è molto variabile: da forme pauci- o asintomatiche a gravi sindromi caratterizzate da diarrea cronica, malassorbimento e calo ponderale. Tra queste la *celiac-like disease* (definita così per le notevoli somiglianze con la malattia celiaca) è la più comune,

caratterizzandosi istologicamente da distorsione e/o atrofia dei villi intestinali e infiltrato linfocitario T-cellulare nella lamina propria della mucosa intestinale. A differenza della malattia celiaca però, non sono presenti plasmacellule nell'infiltrato infiammatorio della lamina propria ed è frequente la presenza di iperplasia follicolare linfoide; non è descritta l'associazione con gli alplotipi DQ2-DQ8 e vi è scarsa o assente risposta alla dieta aglutinata [40].

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (definite *IBD-like disease* per le differenze clinico-istologiche riscontrate) hanno una prevalenza maggiore di quella riportata nella popolazione generale, variando dal 2% al 13% a seconda delle casistiche [41]. Il quadro clinico delle *IBD-like disease* non si discosta troppo dalle forme classiche; tuttavia, le terapie convenzionali risultano poco efficaci nel ridurre sia l'infiammazione che la sintomatologia [42][40].

Fegato

Un coinvolgimento epatico clinicamente evidente è presente nel 10% dei pazienti affetti da CVID. Infezioni, meccanismi autoimmuni e/o autoinfiammatori, linfoproliferazione, granulomi e ostruzione biliare intraepatica sono stati riportati come possibili cause di danno epatico nella CVID. Il coinvolgimento epatico, inoltre, risulta fortemente associato ad enteropatia cronica, suggerendo il ruolo patogenetico dell'asse fegato-intestino [43].

Lo spettro clinico varia dall'aumento isolato degli enzimi epatici a quadri di epatite cronica con iperplasia nodulare rigenerativa (NRH) e ipertensione portale non cirrotica. I pazienti possono essere asintomatici, o presentare nausea, vomito, ittero, prurito,

ascite, edema, epatomegalia, splenomegalia e varici esofagee [44]. La diagnosi si avvale dell'utilizzo degli esami di laboratorio (aumento persistente della fosfatasi alcalina e degli enzimi epatici, con o senza alterazioni della bilirubina), strumentali (per valutare i cambiamenti strutturali del tessuto) e biotici. Il trattamento comprende glucocorticoidi (GC) e farmaci immunomodulanti. Il trapianto epatico viene eseguito in caso di insufficienza epatica, sebbene sia stata riportata una ridotta sopravvivenza nei pazienti sottoposti all'operazione (55% a 3-5 anni) [45].

Manifestazioni polmonari

Fino al 90% dei pazienti affetti può sviluppare complicanze polmonari correlate alle infezioni, a cause immuno-mediate e/o neoplastiche [46]. L'effettiva incidenza non è chiara, ma sembra che queste manifestazioni si associno ad altri disordini disimmuni, quali citopenie autoimmuni, linfadenopatie e splenomegalia. L'esame istologico evidenzia quadri linfoproliferativi benigni, tra cui bronchiolite follicolare, polmonite interstiziale linfocitaria e iperplasia nodulare linfoide [47].

Tra le complicanze polmonari non infettive della CVID, una menzione a parte merita la GLILD (*Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease*), riportata fino al 20% dei casi. È stata definita come una malattia polmonare interstiziale (ILD) clinicamente e radiologicamente definita, associata a infiltrati linfocitari e granulomi nel polmone e per la quale tutte le altre condizioni cliniche siano state valutate ed escluse. La GLILD rappresenta una rilevante causa di danno polmonare a lungo termine e di insufficienza respiratoria, associata a riduzione della sopravvivenza in questi pazienti [48].

I reperti radiologici dimostrano la presenza di noduli polmonari, bronchiectasie e/o opacità a vetro smerigliato, mentre i test di funzionalità polmonare, eseguiti anche mediante la diffusione alveolo-capillare di monossido di carbonio (DLCO) aiutano a quantificare il danno polmonare. La biopsia polmonare resta *il gold standard* per una diagnosi di certezza; i prelievi bioptici vengono studiati per la ricerca di linfociti T CD3+ e linfociti B CD19+/CD20+ nella caratterizzazione dell'infiltrato predominante, per la stadiazione del danno e per l'esclusione di forme di malignità. La GLILD è una patologia ad impegno multisistemico, con possibili manifestazioni extrapolmonari; sono infatti riportati granulomi multipli a carico di linfonodi, milza, fegato e tratto gastrointestinale, associati ad una prognosi peggiore [49].

4.2.4 Linfoproliferazione e neoplasie

L'iperplasia linfonodale cervicale, mediastinica e addominale è riscontrata in circa il 20% dei pazienti con CVID. Le biopsie linfonodali mostrano iperplasia linfoide aspecifica, di tipo reattivo o granulomatoso con assenza di plasmacellule. La splenomegalia è riportata in più del 25% dei pazienti, con genesi multifattoriale. Il reperto istologico mostra lesioni granulomatose, congestione della polpa rossa, iperplasia follicolare e atrofia dei centri germinativi e della polpa bianca. Queste anomalie potrebbero contribuire allo sviluppo di manifestazioni ematologiche, come una piastrinopenia da sequestro [50].

Numerosi studi hanno registrato un aumentato rischio, nella CVID, di sviluppare linfomi a cellule B e adenocarcinoma gastrico, con una prevalenza media rispettivamente del 4-5% e del 2% (valori di gran lunga superiori a quelli riscontrati nella popolazione

generale). I pazienti con linfadenopatia hanno un rischio maggiore di sviluppare neoplasie linfoidi; in più dell'80% dei casi si tratta di linfoma non-Hodgkin (NHL) a cellule B extranodale [51].

I pazienti con CVID rappresentano una popolazione ad alto rischio anche per lo sviluppo di adenocarcinoma gastrico [52]. La maggiore incidenza di questa neoplasia rispetto alla popolazione sana non è del tutto compresa; l'infezione da *Helicobacter Pylori* (HP) è stata largamente riconosciuta come parte del processo di carcinogenesi. Attualmente si ritiene che nei pazienti con gastrite autoimmune (presente nel 10% dei pazienti con CVID) e acloridia, l'infezione da *Helicobacter Pylori* decorra in maniera più aggressiva. Fondamentale l'applicazione di un protocollo di screening ed eradicazione dell'infezione da HP, per garantire una diagnosi e un trattamento precoce delle lesioni precancerose prima di una trasformazione maligna [53].

4.3 Stratificazione dei pazienti con CVID

4.3.1 Classificazione Chapel

La grande eterogeneità dello spettro clinico della CVID ha richiesto una suddivisione dei pazienti in fenotipi clinici distinti, garantendo una maggiore omogeneità delle coorti sia a scopi scientifici che pratici (gestione terapeutica, follow-up, prognosi). L'utilità nella prognosi è stata poi confermata, evidenziando una correlazione significativa tra il fenotipo clinico individuato e la sopravvivenza di questi pazienti.

Inizialmente sono state individuate cinque classi diverse:

- nessuna complicanza associata (descritta come “fenotipo solo infettivo”);

- autoimmunità (comprendente citopenie autoimmuni e autoimmunità organo-specifica);
- enteropatie (escludendo enteropatie infettive, autoimmuni, da intolleranza al glutine);
- linfoproliferazione policlonale (includendo epatomegalia, linfadenopatia non specificata, LIP, granulomi non infettivi);
- tumori linfoidi.

Ulteriori studi multicentrici hanno dimostrato che nella classe “autoimmunità”, solo le citopenie autoimmuni presentavano una ridotta sopravvivenza, comportando l’eliminazione della componente autoimmune “organo-specifica”. Successivamente anche la classe “tumori linfoidi” è stata rimossa per la scarsa prevalenza nei pazienti. La nuova classificazione fenotipica si presentava quindi come segue:

- nessuna complicanza associata (descritta come “fenotipo solo infettivo”);
- citopenie autoimmuni (come trombocitopenia autoimmune, anemia emolitica autoimmune, neutropenia);
- enteropatie (escludendo enteropatie infettive, autoimmuni, da intolleranza al glutine);
- linfoproliferazione policlonale (includendo epatomegalia, linfadenopatia non specificata, LIP, granulomi non infettivi) [54] (**Tabella 1**).

4.3.2 Classificazione EUROclass

L’EUROclass rappresenta un modello di classificazione dei pazienti con CVID basato sull’immunofenotipizzazione dei linfociti B circolanti. Nella maggior parte dei pazienti con CVID, la percentuale dei linfociti circolanti resta ai limiti bassi del range di riferimento. Si riconoscono sei distinte sottopopolazioni di queste cellule e la loro

distribuzione riflette la differenziazione antigene dipendente/antigene indipendente a livello degli organi linfoidi secondari. È possibile distinguere: linfociti B *naive* IgM+IgD+CD27-, linfociti B *marginal zone* IgM+IgD+CD27+, linfociti B *switched memory* IgD-CD27+, linfociti B di transizione CD38^{hi}IgM^{hi}, linfociti B attivati CD21^{low}CD38^{low} e plasmoblasti *class-switched* CD38+++IgM-.

La più comune alterazione è a carico dei linfociti B *switched memory* (smB), il cui valore percentuale correla con i livelli di IgG e IgA sieriche dei pazienti alla diagnosi. I linfociti B *marginal zone* sono quasi sempre alterati nella CVID, ma non sembra esserci correlazione con i livelli di IgM sierici. I linfociti B di transizione risultano più alti, ma non è evidente una correlazione con il numero assoluto dei linfociti B circolanti. È stata evidenziata un'espansione nella popolazione dei linfociti B CD21^{low}, riscontrata anche nei pazienti immunocompetenti con malattie autoimmuni. Infine, i plasmoblasti *class-switched* nel sangue periferico risultano ridotti in molti pazienti con la CVID.

Uno degli obiettivi principali è stato quello di individuare marker specifici riscontrabili in alcuni dei quadri clinici tipici della patologia, come la splenomegalia, la linfadenopatia diffusa, la malattia granulomatosa e l'autoimmunità. In base alla conta percentuale dei linfociti B, l'EUROclass distingue i pazienti in due gruppi, B+ (linfociti B > 1%) e B- (linfociti B ≤ 1%). Per identificare i pazienti con un deficit severo nei linfociti B *switched memory*, i pazienti sono ulteriormente divisi in smB+ (linfociti B sm > 2%) e smB- (linfociti B sm ≤ 2%); nel gruppo smB- è possibile un'ulteriore classificazione in base all'espansione in percentuale dei linfociti B di transizione. Si riconosce un gruppo smB-Tr^{hi} (linfociti B di transizione >9%) e smB-Tr^{norm} (linfociti B di transizione ≤9%). In questi pazienti è stata evidenziata una maggiore incidenza di splenomegalia e granulomi nel gruppo smB-, di linfadenopatia nel sottogruppo smB-

Tr^{hi}. Non vi erano differenze statisticamente significative nei pazienti con citopenie autoimmuni. Infine, è stata posta attenzione sui linfociti B CD21^{low}, suddividendo i pazienti nei gruppi smB⁺ e smB⁻ in smB+21^{lo} e smB-21^{lo} (Linfociti B 21 low $\geq 10\%$) e smB⁺ e smB⁻ in smB+21^{norm} e smB-21^{norm} (Linfociti B 21 low $< 10\%$). È stata dimostrata una maggiore incidenza di splenomegalia e granulomi nei pazienti con aumento dei linfociti B CD21^{low} (sia smB+21^{lo} e smB-21^{lo}), mentre non sono state riportate differenze significative tra i gruppi individuati per le manifestazioni di citopenie autoimmuni e linfadenopatia [55] (**Figura 2**).

4.4 Trattamento

Il trattamento cardine della CVID è rappresentato dalla terapia sostitutiva con immunoglobuline umane polivalenti e aspecifiche (IgRT) che, insieme alla profilassi antibiotica, ha ridotto sensibilmente la frequenza delle manifestazioni infettive e delle ospedalizzazioni correlate. La terapia sostitutiva consiste nell'infusione, per via endovenosa (IV) o sottocutanea (SC), di immunoglobuline umane polivalenti di classe G (IgG) derivate dal plasma di migliaia di donatori sani. Questa modalità di approvvigionamento impone un evidente limite di produzione; è cruciale, dunque, l'appropriatezza diagnostica e una terapia con la più idonea via di somministrazione (IV o SC) [56]. Sebbene sia spesso difficile stabilire la dose di IgRT adeguata ad ogni paziente, la maggior parte delle linee guida raccomanda una dose iniziale di IgG di 400-800 mg/kg/mese, per ottenere un livello di IgG circolanti superiore a 500 mg/dl e bilanciato in sottoclassi. La somministrazione endovenosa (IVIG) presenta diversi vantaggi:

- possibilità di raggiungere elevati livelli di IgG sieriche circolanti in poche ore (*“effetto picco”*) (**Figura 3**);
- lungo intervallo tra le somministrazioni, stabilito in base alla cinetica delle IgG infuse;
- possibilità di infondere grandi volumi di prodotto quando il paziente necessita di una terapia ad alto dosaggio nel trattamento di infezioni severe;
- ridotte o assenti reazioni nel sito di infusione.

La terapia sostitutiva per via sottocutanea (SCIG) è stata ideata per una *self infusion* con un intervallo di somministrazione che può variare da giornaliera fino a 10-15 giorni. Le immunoglobuline vengono assorbite lentamente *dal reservoir* sottocutaneo e immesse nel circolo sanguigno, evitando *l'effetto picco* e mantenendo uno *steady state level* delle IgG sieriche, che rende superflua la valutazione dei livelli pre-infusionali (**Figura 3**).

La SCIG può essere somministrata gradualmente o più velocemente nei siti dove il tessuto adiposo sottocutaneo è meglio rappresentato, utilizzando fino a sei siti di infusione, a seconda del volume da infondere. La somministrazione può durare dai 30 ai 90 minuti in infusione lenta, dai 5 ai 20 minuti in infusione rapida (*push therapy*) ed entrambe le modalità risultano ben tollerate. I vantaggi della SCIG sono:

- mantenimento di uno *steady state level*;
- somministrazione della terapia in ambiente domiciliare, con maggiore flessibilità in termini di tempo e modalità;
- possibilità di infusione nei pazienti con accessi venosi difficili o con scarsa tolleranza alla IVIG;
- riduzione degli eventi avversi sistemici, comparati alla terapia IVIG [57-58-59].

La SCIG “*facilitata*” (fSCIG) è un’infusione praticata previo l’utilizzo della ialuronidasi umana ricombinante che degrada l’acido ialuronico della matrice extracellulare, permettendo al tessuto di accogliere un maggiore volume di prodotto in uno singolo sito di infusione. La ialuronidasi viene degradata dopo qualche ora, con un ritorno della normale istologia tissutale in circa 24-48 ore. Nella fSCIG le immunoglobuline somministrate hanno la stessa biodisponibilità della terapia con IVIG [60] (**Figura 3**).

Gli effetti collaterali della IgRT sono comuni e non tali da superarne i benefici. Reazioni infusionali si verificano in circa il 2-5% dei casi; in oltre il 95% dei casi si tratta di reazioni lievi o moderate (cefalea, febbre, brividi, mialgie, nausea, vomito, ipotensione), gestite tramite l’interruzione dell’infusione e la somministrazione di antinfiammatori non steroidei (FANS) e/o GC. [61].

Lo sviluppo di sempre più avanzati processi di purificazione e stabilizzazione delle immunoglobuline negli emoderivati, hanno reso questa terapia sicura ed efficace, tanto da essere inserita dalla *World Health Organization* (WHO) nella lista dei “*farmaci essenziali*”. Nel 2022, l’Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha approvato un documento per la regolamentazione dell’uso delle immunoglobuline in condizione di carenza (come accaduto durante la pandemia da COVID19), garantendo l’utilizzo prioritario nelle condizioni cliniche per le quali non sono disponibili alternative terapeutiche. Infatti, sebbene per più di 30 anni la terapia con IgG sia stata utilizzata a dosaggio immunomodulante nel trattamento delle malattie autoimmuni e infiammatorie, la prima indicazione resta la terapia sostitutiva nelle immunodeficienze primitive e secondarie, con lo scopo di ridurre sia la frequenza che la severità degli episodi infettivi.

PROFILO GENETICO DEI PAZIENTI CON IMMUNODEFICIENZA COMUNE VARIABILE E IMPATTO DIAGNOSTICO, PROGNOSTICO E TERAPEUTICO.

1. Introduzione allo studio

Nell'ultimo decennio è diventato evidente come molte mutazioni genetiche siano responsabili dello sviluppo di manifestazioni cliniche tipiche della CVID. Ad oggi, una causa genetica è stata identificata in circa il 10% dei pazienti.

Una volta individuata la variante genetica causativa, i pazienti vengono classificati come disordini *CVID-like* e non più come immunodeficienza comune variabile, rappresentando questa una diagnosi “ombrello”.

In uno studio del 2023, Ameratunga et al. classificano le varianti geniche nei pazienti con CVID in quattro categorie:

- Mutazioni genetiche che predispongono e/o accentuano la severità della CVID;
- Mutazioni genetiche causative di disordini *CVID-like*;
- Mutazione genetiche tipicamente associate allo sviluppo di altri IEIs, con manifestazione cliniche che mimano la CVID;
- Mutazioni genetiche nuove, di significato incerto (VUS), non ancora definite come causative e/o associate a IEIs [62].

È ormai noto che la modalità di trasmissione di una determinata mutazione genica influenza sia il tipo che l'intensità delle manifestazioni cliniche associate.

Individui con familiarità per IEIs presentano solitamente mutazioni genetiche con ereditarietà autosomica recessiva ad alta penetranza e tendono a sviluppare sintomi con

esordio precoce e decorso severo. Diversamente, in molti pazienti con mutazione genetica *de novo* si evidenziano varianti a trasmissione autosomica dominante con penetranza ed espressività clinica variabile. Inoltre, alcuni individui portatori di alterazioni genetiche possono restare asintomatici e non presentare mai alcuna complicanza di malattia, altri presentare i sintomi tardivamente, dopo l'esposizione a trigger ambientali e/o infettivi [63-64].

Maggiore attenzione va poi data alla quarta categoria citata, le varianti genetiche di significato incerto (VUS), valutando l'impatto di queste mutazioni sul rischio di sviluppare CVID e disordini CVID-like.

Inoltre, i risultati ottenuti con le recenti tecniche di sequenziamento e analisi genica hanno suggerito la teoria delle varianti poligeniche alla base della patogenesi della CVID. Questi determinanti poligenici, guidati da complesse interazioni gene-gene, penetranza incompleta e mutazioni nelle regioni non codificanti, chiarirebbero il perché la malattia non segua un modello di ereditarietà mendeliana classica [65].

La diagnosi genetica diventa quindi una sfida significativa.

L'obiettivo di questo studio è stato dunque quello di correlare il profilo genetico dei pazienti affetti da CVID con le loro caratteristiche demografiche, cliniche e laboratoristiche, allo scopo di utilizzare le informazioni ottenute per creare dei follow-up diagnostico-terapeutici personalizzati e, quando possibile, utilizzare la genetica come target terapeutico in questi pazienti.

2. Materiali e Metodi

2.1 Reclutamento dei soggetti

Abbiamo reclutato 87 pazienti (39 maschi e 48 femmine) con diagnosi di CVID afferenti presso l'U.O.S.D. di Allergologia e Immunodeficienze, dipartimento di Scienze mediche Traslazionali, dell'Università di Napoli "Federico II". La diagnosi di CVID è stata formulata sulla base dei criteri diagnostici ESID. Tutti i dati clinici ed immunologici rilevanti sono stati raccolti retrospettivamente dalle cartelle cliniche e da altre documentazioni mediche disponibili. Al reclutamento, tutti i pazienti praticavano terapia sostitutiva con immunoglobuline umane polivalenti sottocute o endovena.

Per tutti i pazienti sono stati prelevati campioni ematici per il sequenziamento genetico e i risultati sono stati riportati nei nostri database.

Tutte le procedure dello studio che coinvolgono i soggetti arruolati sono avvenute nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki II. La riservatezza delle procedure di identificazione dei pazienti e quella di tutti i dati registrati sarà mantenuta secondo le linee guida della Good Clinical Practice (GCP), riguardante la protezione della privacy. Tutti i pazienti studiati sono stati anonimizzati utilizzando un codice identificativo unico a 2 cifre (es. 01, 02, 03). Il protocollo di studio è stato disegnato e condotto assicurando l'aderenza ai principi e alle procedure della GCP, in conformità alle leggi italiane. Per tutti i pazienti è stato condotto un colloquio orale, durante il quale sono stati informati sul significato dell'analisi genetica. Un consenso scritto, per l'utilizzo dei dati clinici, è stato infine fornito da tutti i pazienti.

2.2 Sequenziamento genetico e analisi dei dati

Il sequenziamento genetico è stato eseguito dal centro “CEINGE-Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore” tramite tecnologia *targeted-Next Generation Sequencing* (NGS), su un pannello che include 141 geni associati allo sviluppo di disordini del sistema immunitario, quali immunodeficienze combinate (CID), immunodeficienze combinate gravi (SCID) e immunodeficienza comune variabile (CVID) (**Figura 4**). Le librerie genomiche sono state prodotte attraverso protocollo Sure Select Target Enrichment (Agilent Technologies) e successivamente sottoposte a sequenziamento bidirezionale ad alta produttività mediante tecnologia Illumina. L’analisi dei dati è stata condotta utilizzando il software Alissa Interpret v5.2.6 CE IVD software (Agilent Technologies). Il DNA dei soggetti in esame è stato poi amplificato nuovamente nelle regioni geniche laddove si riscontrava una mutazione causativa nota, una variante dal significato clinico incerto ma potenzialmente patogenetica e suggestiva del fenotipo e/o una regione non coperta dal sequenziamento genico ad alta produttività. Le sequenze amplificate sono state sottoposte a sequenziamento automatico bidirezionale con metodo Sanger. Le varianti sono state classificate secondo le linee guida standard dell’American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) e l’interpretazione dei risultati è stata eseguita sulla scorta dei dati clinici dei pazienti.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[illegible]

Bar Index	Relative Length (approximate)
1	100
2	65
3	68
4	95
5	70
6	80
7	75
8	72
9	85
10	100
11	100
12	25
13	100
14	100
15	100
16	100
17	45
18	100
19	75
20	100
21	100
22	100
23	100
24	90

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

The image consists of a single, uniform black rectangle that fills the entire frame. There are no discernible features, text, or patterns other than the solid black color.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



5. Conclusioni e prospettive future

Negli ultimi anni, numerosi passi avanti sono stati fatti nella comprensione dei complessi meccanismi patogenetici alla base della CVID, sfruttando la crescente accessibilità dello studio dello WES e del WGS attraverso la tecnologia dell'NGS. Mutazioni poligeniche e l'esposizione a fattori di rischio ambientali, potrebbero rappresentare i *drivers* nello sviluppo delle diverse manifestazioni cliniche della CVID e dei disordini *CVID-like*.

Nonostante gli sforzi però, nella maggioranza dei pazienti, l'analisi genetica risulta ancora inconcludente. Nel nostro studio, i limiti della metodica sono rappresentati dall'analisi circoscritta delle regioni esoniche e di circa 25 bp a monte e a valle di ogni esone e di ampie regioni al 5' e 3' di ogni gene disponibile nel pannello. Il risultato di tale indagine non esclude la presenza di ulteriori varianti geniche non indagate (mutazioni in geni non presenti nel pannello, in regioni promotrici e introniche profonde), o la presenza di varianti geniche in regioni non sufficientemente coperte e/o di delezioni e mutazioni non puntiformi.

La terapia sostitutiva, associata a farmaci immunomodulanti/immunosoppressori, rappresenta tutt'ora l'approccio terapeutico classico nei pazienti con CVID e disordini *CVID-like*. Tuttavia, il trattamento non è sempre efficace in tutti i pazienti, a causa della grande eterogeneità genetica alla base dei meccanismi eziopatogenetici. L'identificazione delle mutazioni genetiche verosimilmente implicate nella patogenesi

della CVID e dei disordini CVID-like ne permetterebbero l'utilizzo come target terapeutici mirati, con evidenti implicazioni sulla prognosi e sulla qualità della vita di questi pazienti. Tra gli esempi l'utilizzo dell'abatacept e del belatacept nell'aploinsufficienza di CTLA-4 e nel deficit di LRBA, o gli studi condotti sull'inibitore di PI3K δ , il leniolisib.

Molte delle mutazioni trovate sono state classificate come varianti di significato incerto (VUS). È importante la comprensione delle VUS, in particolare:

- il ruolo patogenetico e l'eventuale conseguenza sulla struttura della proteina codificata;
- l'espressività variabile di queste mutazioni a livello fenotipico;
- il possibile effetto sinergico della coesistenza di due o più varianti rare nel determinare la malattia.

Lo studio funzionale rappresenta il passo in più per comprendere il significato delle mutazioni. Gli strumenti di analisi in silico forniscono risultati predittivi, tuttavia, potrebbe essere problematico chiarire l'impatto delle mutazioni in eterozigosi in vivo o ex vivo, se è interessato più di un gene. Sono infine necessari studi estesi sui familiari dei pazienti per la valutazione e la rivalutazione delle varianti rilevate.

La diagnosi genetica nei pazienti con CVID o CVID-like consentirebbe quindi una migliore caratterizzazione del deficit immunitario e delle complicanze associate. Permetterebbe inoltre la personalizzazione dell'iter diagnostico-terapeutico e del follow-up del paziente in base alla prognosi prevista.

6. Bibliografia

1. Claussnitzer M, Cho JH, Collins R, Cox NJ, Dermitzakis ET, Hurles ME et al. A brief history of human disease genetics. *Nature*. 2020 Jan;577(7789):179-189. doi: 10.1038/s41586-019-1879-7.
2. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921. doi: 10.1038/35057062.
3. Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*. 2015 Mar 12;519(7542):223-8. doi: 10.1038/nature14135.
4. Splinter, K., Adams, D. R., Bacino, C. A., Bellen, H. J., Bernstein, J. A., Cheattle-Jarvela, A. M. et al. Effect of genetic diagnosis on patients with previously undiagnosed disease. *New England Journal of Medicine*, (2018) 379(22), 2131-2139. doi: 10.1056/NEJMoa1714458.
5. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45. doi: 10.1038/nature03001.
6. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46. doi: 10.1038/nrg2626.
7. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett*. 2013 Nov 1;340(2):284-95. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.025.
8. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell*. 2019 Mar 21;177(1):32-37. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.040.
9. Bucciol G, Meyts I. Recent advances in primary immunodeficiency: from molecular diagnosis to treatment. *F1000Res*. 2020 Mar 19;9:F1000 Faculty Rev-194. doi: 10.12688/f1000research.21553.1.
10. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2020 Jan;40(1):24-64. doi: 10.1007/s10875-019-00737-x.
11. Meyts I, Bosch B, Bolze A, Boisson B, Itan Y, Belkadi A et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):957-969. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.003.
12. Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet*. 2017 Sep;136(9):1093-1111. doi: 10.1007/s00439-017-1809-4.

13. Frésard L, Smail C, Ferraro NM, Teran NA, Li X, Smith KS et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts. *Nat Med.* 2019 Jun;25(6):911-919. doi: 10.1038/s41591-019-0457-8.
14. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2018 Jan;38(1):96-128. doi: 10.1007/s10875-017-0464-9.
15. Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: Unique insights into immunological redundancy. *Semin Immunol.* 2018 Apr;36:1-12. doi: 10.1016/j.smim.2017.12.008.
16. Tangye, S.G., Al-Herz, W., Bousfiha, A. et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 42, 1473–1507 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01289-3>.
17. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W et al. The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2022 Oct;42(7):1508-1520. doi: 10.1007/s10875-022-01352-z.
18. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT e al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016 Jan-Feb;4(1):38-59. doi: 10.1016/j.jaip.2015.07.025.
19. Tessarin G, Baronio M, Lougaris V. Monogenic forms of common variable immunodeficiency and implications on target therapeutic approaches. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2023 Dec 1;23(6):461-466. doi: 10.1097/ACI.0000000000000947.
20. <https://esid.org/>.
21. Sanchez LA, Maggadottir SM, Pantell MS, Lugar P, Rundles CC, Sullivan KE; USIDNET Consortium. Two Sides of the Same Coin: Pediatric-Onset and Adult-Onset Common Variable Immune Deficiency. *J Clin Immunol.* 2017 Aug;37(6):592-602. doi: 10.1007/s10875-017-0415-5.
22. Graziano V, Pecoraro A, Mormile I, Quaremba G, Genovese A, Spadaro G et al. Delay in diagnosis affects the clinical outcome in a cohort of covid patients with marked reduction of iga serum levels. *Clin Immunol.* 2017 Jul;180:1-4. doi: 10.1016/j.clim.2017.03.011.
23. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* 2003 Mar;4(3):261-8. doi: 10.1038/ni902.
24. Abolhassani H, Hammarström L, Cunningham-Rundles C. Current genetic landscape in common variable immune deficiency. *Blood.* 2020 Feb 27;135(9):656-667. doi: 10.1182/blood.2019000929.

25. Ho HE, Cunningham-Rundles C. Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis. *Front Immunol.* 2020 Feb 7;11:149. doi: 10.3389/fimmu.2020.00149.
26. Friman V, Quinti I, Davydov AN, Shugay M, Farroni C, Engström E et al. Defective peripheral B cell selection in common variable immune deficiency patients with autoimmune manifestations. *Cell Rep.* 2023 May 30;42(5):112446. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112446.
27. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013 Nov-Dec;1(6):545-56; quiz 557. doi: 10.1016/j.jaip.2013.09.015.
28. Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G, Abolhassani H, Olbrich P, Aghamohammadi A. Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2020;30(1):14-34. doi: 10.18176/jiaci.0388.
29. Kainulainen L, Vuorinen T, Rantakokko-Jalava K, Osterback R, Ruuskanen O. Recurrent and persistent respiratory tract viral infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Jul;126(1):120-6. doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.016.
30. Daniels JA, Lederman HM, Maitra A, Montgomery EA. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study and review. *Am J Surg Pathol.* 2007 Dec;31(12):1800-12. doi: 10.1097/PAS.0b013e3180cab60c.
31. Desai IM, van Deuren M, Sprong T, Jansen JB, Namavar F et al. Serum bactericidal activity against *Helicobacter pylori* in patients with hypogammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol.* 2009 Jun;156(3):434-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03909.x.
32. Schmidt RE, Grimbacher B, Witte T. Autoimmunity and primary immunodeficiency: two sides of the same coin? *Nat Rev Rheumatol.* 2017 Dec 19;14(1):7-18. doi: 10.1038/nrrheum.2017.198.
33. Amaya-Urbe L, Rojas M, Azizi G, Anaya JM, Gershwin ME. Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2019 May;99:52-72. doi: 10.1016/j.jaut.2019.01.011.
34. Feuille EJ, Anooshiravani N, Sullivan KE, Fuleihan RL, Cunningham-Rundles C. Autoimmune Cytopenias and Associated Conditions in CVID: a Report From the USIDNET Registry. *J Clin Immunol.* 2018 Jan;38(1):28-34. doi: 10.1007/s10875-017-0456-9.
35. Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019 Nov;123(5):454-460. doi: 10.1016/j.anai.2019.07.014.
36. Gutierrez MJ, Sullivan KE, Fuleihan R; USIDNET Consortium; Bingham CO 3rd. Phenotypic characterization of patients with rheumatologic manifestations of

- common variable immunodeficiency. *Semin Arthritis Rheum*. 2018 Oct;48(2):318-326. doi: 10.1016/j.semarthrit.2018.02.013.
37. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A et al. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. *Clin Exp Immunol*. 2012 Nov;170(2):202-11. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04643.x.
 38. Megna M, Pecoraro A, Balato N, Villani A, Crescenzi L, Balato A, Spadaro G. Psoriasis in a cohort of patients with common variable immunodeficiency. *Br J Dermatol*. 2019 Apr;180(4):935-936. doi: 10.1111/bjd.17408.
 39. Jørgensen SF, Reims HM, Frydenlund D, Holm K, Paulsen V, Michelsen AE et al. A Cross-Sectional Study of the Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Pathology in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *Am J Gastroenterol*. 2016 Oct;111(10):1467-1475. doi: 10.1038/ajg.2016.329.
 40. Pecoraro A, Nappi L, Crescenzi L, D'Armiento FP, Genovese A, Spadaro G. Chronic Diarrhea in Common Variable Immunodeficiency: a Case Series and Review of the Literature. *J Clin Immunol*. 2018 Jan;38(1):67-76. doi: 10.1007/s10875-017-0461-z.
 41. Agarwal S, Mayer L. Diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in patients with primary immunodeficiency. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep;11(9):1050-63. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.024.
 42. Fischer A, Provot J, Jais JP, Alcais A, Mahlaoui N; members of the CEREDIH French PID study group. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Nov;140(5):1388-1393.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.978.
 43. Song J, Lleo A, Yang GX, Zhang W, Bowlus CL, Gershwin ME et al. Common Variable Immunodeficiency and Liver Involvement. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018 Dec;55(3):340-351. doi: 10.1007/s12016-017-8638-z.
 44. Ward C, Lucas M, Piris J, Collier J, Chapel H. Abnormal liver function in common variable immunodeficiency disorders due to nodular regenerative hyperplasia. *Clin Exp Immunol*. 2008 Sep;153(3):331-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03711.x.
 45. Azzu V, Elias JE, Duckworth A, Davies S, Brais R, Kumararatne DS et al. Liver transplantation in adults with liver disease due to common variable immunodeficiency leads to early recurrent disease and poor outcome. *Liver Transpl*. 2018 Feb;24(2):171-181. doi: 10.1002/lt.24979.
 46. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):277-86. doi: 10.1182/blood-2007-11-124545.
 47. Maglione PJ, Overbey JR, Cunningham-Rundles C. Progression of Common Variable Immunodeficiency Interstitial Lung Disease Accompanies Distinct Pulmonary and Laboratory Findings. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015 Nov-Dec;3(6):941-50. doi: 10.1016/j.jaip.2015.07.004.

48. Cinetto F, Scarpa R, Carrabba M, Firinu D, Lougaris V, Buso H et al. Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Multicenter Retrospective Study of Patients From Italian PID Referral Centers. *Front Immunol.* 2021 Mar 10;12:627423. doi: 10.3389/fimmu.2021.627423.
49. Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019 Nov;123(5):454-460. doi: 10.1016/j.anai.2019.07.014.
50. Gompels MM, Hodges E, Lock RJ, Angus B, White H, Larkin A, Chapel HM, Spickett GP, Misbah SA, Smith JL; Associated Study Group. Lymphoproliferative disease in antibody deficiency: a multi-centre study. *Clin Exp Immunol.* 2003 Nov;134(2):314-20. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02253.x.
51. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood.* 2012 Feb 16;119(7):1650-7. doi: 10.1182/blood-2011-09-377945.
52. Pulvirenti F, Pecoraro A, Cinetto F, Milito C, Valente M, Santangeli E et al. Gastric Cancer Is the Leading Cause of Death in Italian Adult Patients With Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol.* 2018 Nov 5;9:2546. doi: 10.3389/fimmu.2018.02546.
53. Milito C, Pulvirenti F, Garzi G, Sculco E, Cinetto F, Firinu D, Lagnese G, Punziano A et al. Decline of gastric cancer mortality in common variable immunodeficiency in the years 2018-2022. *Front Immunol.* 2023 Oct 6;14:1231242. doi: 10.3389/fimmu.2023.1231242.
54. Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E, Gerard L, Oksenhendler E. Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Nov;130(5):1197-1198.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.046.
55. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2008 Jan 1;111(1):77-85. doi: 10.1182/blood-2007-06-091744
56. Ness S. Differentiating characteristics and evaluating intravenous and subcutaneous immunoglobulin. *Am J Manag Care.* 2019 Jun;25(6 Suppl):S98-S104. PMID: 31318515.
57. Sriaroon P, Ballow M. Immunoglobulin Replacement Therapy for Primary Immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015 Nov;35(4):713-30. doi: 10.1016/j.iac.2015.07.006.
58. Shapiro RS. Why I use subcutaneous immunoglobulin (SCIG). *J Clin Immunol.* 2013 Jan;33 Suppl 2:S95-8. doi: 10.1007/s10875-012-9853-2.
59. Berger M, Jolles S, Orange JS, Sleasman JW. Bioavailability of IgG administered by the subcutaneous route. *J Clin Immunol.* 2013 Jul;33(5):984-90. doi: 10.1007/s10875-013-9876-3.

60. Wasserman RL. Overview of recombinant human hyaluronidase-facilitated subcutaneous infusion of IgG in primary immunodeficiencies. *Immunotherapy*. 2014;6(5):553-67. doi: 10.2217/imt.14.34.
61. Bichuetti-Silva DC, Furlan FP, Nobre FA, Pereira CT, Gonçalves TR, Gouveia-Pereira et al. Immediate infusion-related adverse reactions to intravenous immunoglobulin in a prospective cohort of 1765 infusions. *Int Immunopharmacol*. 2014 Dec;23(2):442-6. doi: 10.1016/j.intimp.2014.09.015.
62. Ameratunga R, Edwards ESJ, Lehnert K, Leung E, Woon ST, Lea E et al. The Rapidly Expanding Genetic Spectrum of Common Variable Immunodeficiency-Like Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023 Jun;11(6):1646-1664. doi: 10.1016/j.jaip.2023.01.048.
63. Ameratunga R, Ahn Y, Jordan A, Lehnert K, Brothers S and Woon ST. Keeping it in the family: the case for considering late-onset combined immunodeficiency a subset of common variable immunodeficiency disorders, *Expert Review of Clinical Immunology*. 2018; 14:7, 549-556, DOI: 10.1080/1744666X.2018.1481750
64. Staels F, Collignon T, Betraíns A, Gerbaux M, Willemsen M, Humblet-Baron S et al. Monogenic Adult-Onset Inborn Errors of Immunity. *Front Immunol*. 2021 Nov 17;12:753978. doi: 10.3389/fimmu.2021.753978.
65. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*. 2016 Sep;53(9):575-90. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103690.
66. Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejún MB, Martínez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):468-76. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.029.
67. Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *J Immunol Res*. 2015;2015:247426. doi: 10.1155/2015/247426.
68. Modell V, Quinn J, Orange J, Notarangelo LD, Modell F. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network. *Immunol Res*. 2016 Jun;64(3):736-53. doi: 10.1007/s12026-016-8784-z.
69. Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-Hammarström Q, Jennings S, Lougaris V, et al. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1967-76. doi: 10.1182/blood-2008-02-141937.
70. Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C, Specchia F, Spadaro G, Danieli MG et al. Clinical Associations of Biallelic and Monoallelic TNFRSF13B Variants in Italian Primary

- Antibody Deficiency Syndromes. *J Immunol Res.* 2016;2016:8390356. doi: 10.1155/2016/8390356.
71. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2011 Nov 25;11(12):852-63. doi: 10.1038/nri3108.
 72. Kim GR, Choi JM. Current Understanding of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4) Signaling in T-Cell Biology and Disease Therapy. *Mol Cells.* 2022 Aug 31;45(8):513-521. doi: 10.14348/molcells.2022.2056.
 73. Tessarin G, Baronio M, Lougaris V. Monogenic forms of common variable immunodeficiency and implications on target therapeutic approaches. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2023 Dec 1;23(6):461-466. doi: 10.1097/ACI.0000000000000947.
 74. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med.* 2014 Dec;20(12):1410-1416. doi: 10.1038/nm.3746.
 75. Rojas-Restrepo J, Caballero-Oteyza A, Huebscher K, Haberstroh H, Fliegauf M, Keller B, et al. Establishing the Molecular Diagnoses in a Cohort of 291 Patients With Predominantly Antibody Deficiency by Targeted Next-Generation Sequencing: Experience From a Monocentric Study. *Front Immunol.* 2021 Dec 17;12:786516. doi: 10.3389/fimmu.2021.786516.
 76. Egg D, Rump IC, Mitsuiki N, Rojas-Restrepo J, Maccari ME, Schwab C et al. Therapeutic options for CTLA-4 insufficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Feb;149(2):736-746. doi: 10.1016/j.jaci.2021.04.039.
 77. Fliegauf M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K et al. Haploinsufficiency of the NF- κ B1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* 2015 Sep 3;97(3):389-403. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.07.008.
 78. Ramirez NJ, Posadas-Cantera S, Caballero-Oteyza A, Camacho-Ordonez N, Grimbacher B. There is no gene for CVID - novel monogenetic causes for primary antibody deficiency. *Curr Opin Immunol.* 2021 Oct;72:176-185. doi: 10.1016/j.coi.2021.05.010.
 79. Murakami H, Tsurusaki Y, Enomoto K, Kuroda Y, Yokoi T, Furuya N et al. Update of the genotype and phenotype of KMT2D and KDM6A by genetic screening of 100 patients with clinically suspected Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A.* 2020 Oct;182(10):2333-2344. doi: 10.1002/ajmg.a.61793.
 80. Kermode W, De Santis D, Truong L, Della Mina E, Salman S, Thompson G et al. A Novel Targeted Amplicon Next-Generation Sequencing Gene Panel for the Diagnosis of Common Variable Immunodeficiency Has a High Diagnostic Yield: Results from the Perth CVID Cohort Study. *J Mol Diagn.* 2022 Jun;24(6):586-599. doi: 10.1016/j.jmoldx.2022.02.007.

7. Figure e tabelle

Figura 1. Manifestazioni cliniche nella immunodeficienza comune variabile (CVID) [27].

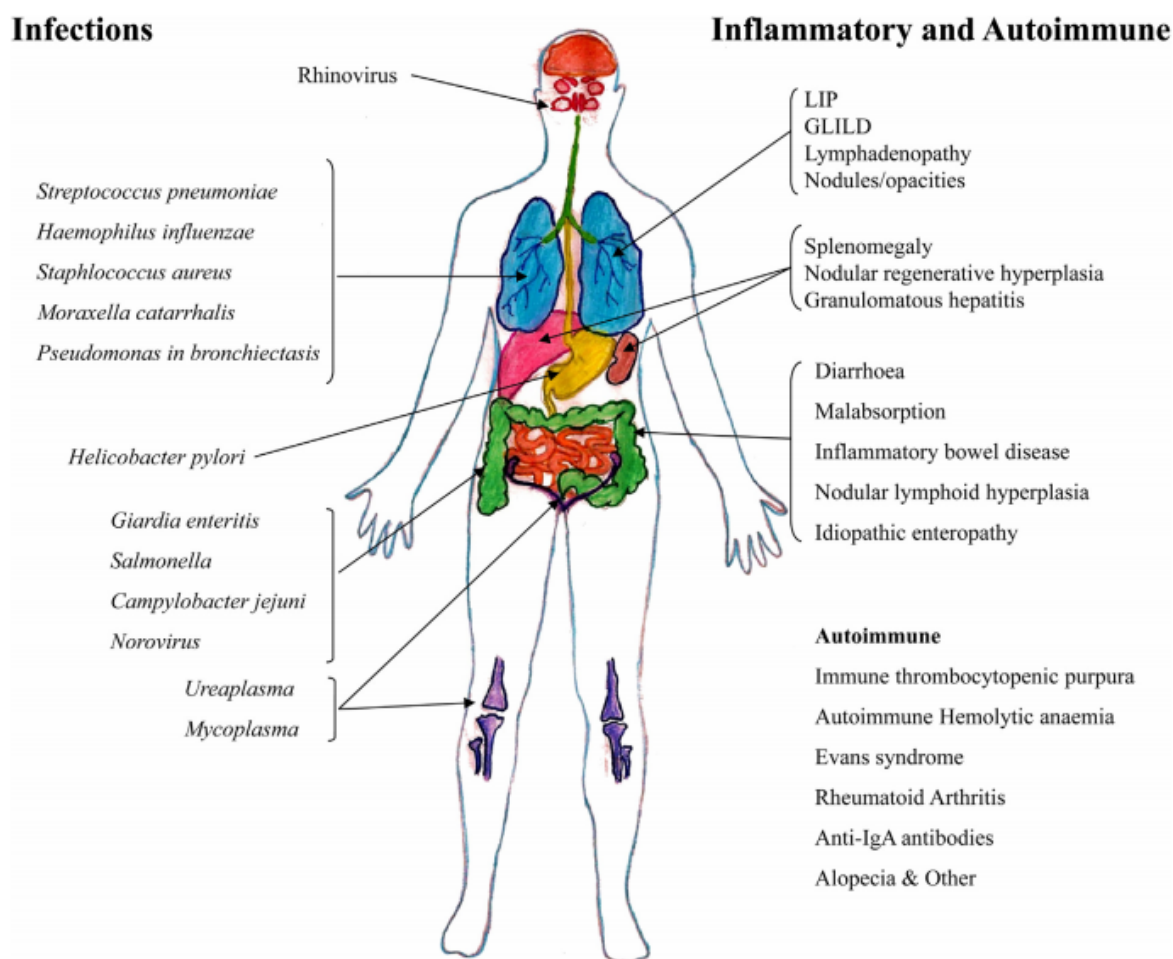


Tabella 1. Aggiornamento delle classi fenotipiche nei pazienti con CVID secondo criteri di Chapel et al. [54].

<i>Criteri originali (Chapel et. al 2008)</i>	<i>Criteri aggiornati (Chapel et al. 2012)</i>
• Autoimmunità (disordini autoimmuni organo-specifici, citopenie).	• Citopenie autoimmuni.
• Enteropatia (escludendo enteropatie infettive, autoimmuni, da intolleranza al glutine).	• Enteropatia (escludendo enteropatie infettive, autoimmuni, da intolleranza al glutine).
• Nessuna complicanza associata (“fenotipo solo infettivo”).	• Nessuna complicanza associata (“fenotipo solo infettivo”).
• Linfoproliferazione policlonale (includendo epatomegalia, linfadenopatia non specificata, LIP, granulomi non infettivi).	• Linfoproliferazione policlonale (includendo epatomegalia, linfadenopatia non specificata, LIP, granulomi non infettivi).
• Tumori maligni.	

Figura 2. Classificazione EUROclass dei pazienti con CVID basato sull'immunofenotipizzazione dei linfociti B circolanti [55].

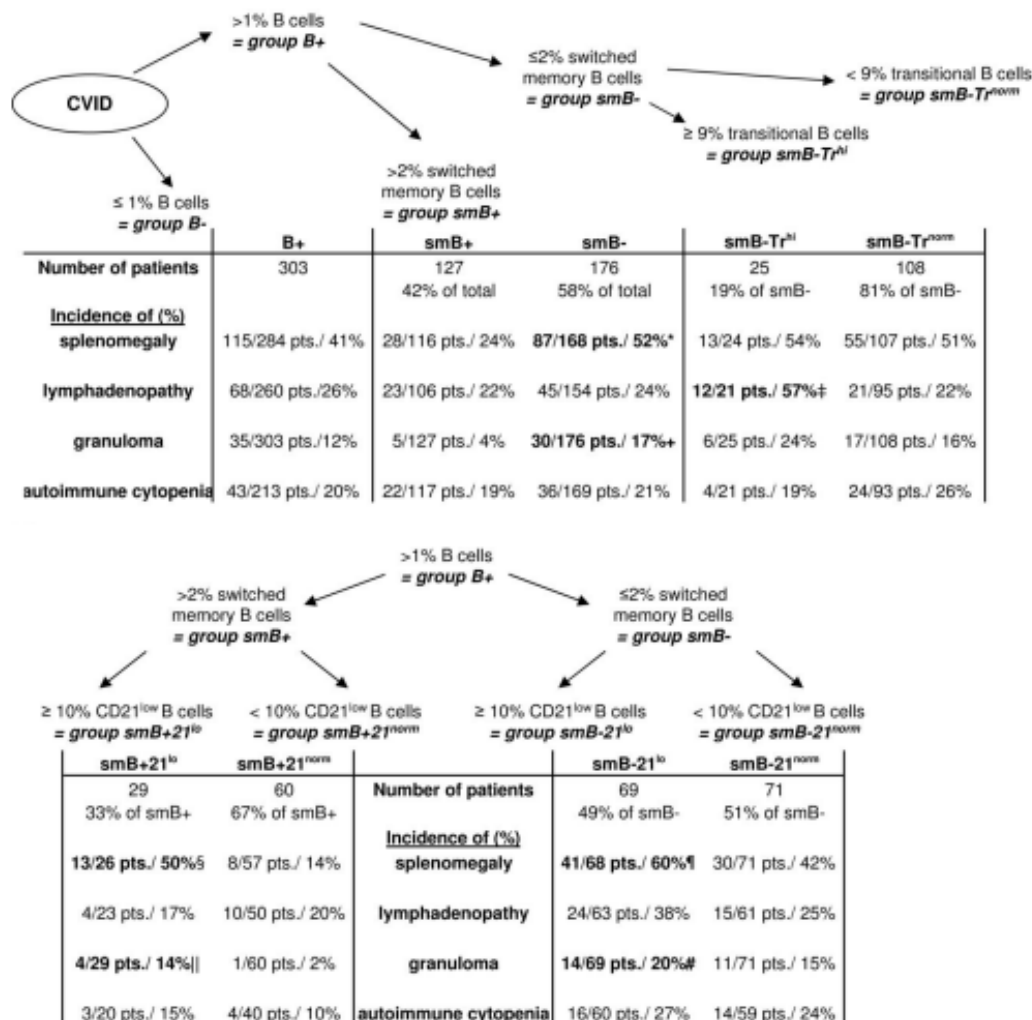


Figura 3. Valutazione della concentrazione sierica di IgG nella IgRT utilizzando diverse tecniche infusionali (IVIG, SCIG e fSCIG).

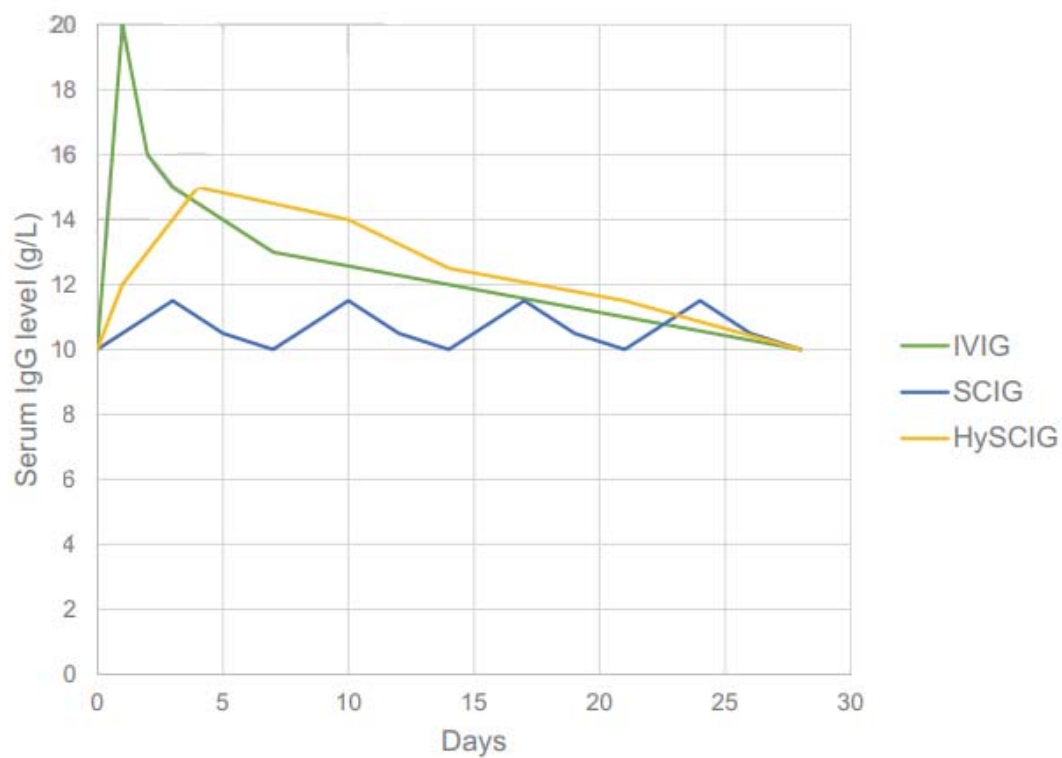


Figura 4. Pannello utilizzato per l'analisi genetica nei pazienti con CVID, comprendente 140 geni associati allo sviluppo di disordini del sistema immunitario, quali immunodeficienze combinate (CID), immunodeficienze combinate gravi (SCID) e immunodeficienza comune variabile (CVID).

ADA	CORO1A	INO80	PMS2	STAT1
AICDA	CR2	IRF2BP2	PNP	STAT5B
AK2	CTLA 4	ITPKB	POLD1	STIM1
ARHGEF1	DCLRE1C	JAK3	POLD2	STX4
ARPC1B	DNMT3B	KDM6A	POLE	TAP1
ATM	DOCK2	KMT2A	POLE2	TAP2
ATP6AP1	DOCK8	KMT2D (MLL2)	PRKDC	TAPBP
B2M	EPG5	LAT	PTEN	TBX1
BCL10	ERCC6L2	LCK	PTPRC	TCF3
BCL11B	EXTL3	LIG1	RAC2	TFRC
BLM (RECQL3)	FAT4	LIG4	RAG1	TNFRSF13B
BLNK	FCHO1	LRBA	RAG2	TNFRSF13C
BTK	FOXN1	MALT2	REL	TNFRSF4
CARD12	GIN51	MAP3K14	RELA	TNFSF12
CCBE1	HELLS	MCM4	RELB	TOP2B
CD19	HOIL1 (RBCK1)	MOGS (GCS1)	RFX5	TRAC
CD247	HCIP1 (RNF31)	MS4A1	RFXANK	TRNT1
CD3D	ICOS	MSH6	RFXAP	TTC37
CD3E	ICOSLG	MSN	RHOH	TTC7A
CD3G	IGHM	MYSM1	RMRP	UNG
CD40 (TNFRSF5)	IGKC	NBS1 (NBN)	RNF168	WAS
CD40LG (TNFSF5)	IGLL1	NFE2L2	RNU4ATAC	WIPF1
CD79A	IKBA (NFKBIA)	NFKB1	SEC61A1	ZAP70
CD79B	IKKB	PIK3R1	SP110	ZBTB24
CD81	IKZF1	NFKB2	SEMA3E	
CD8A	IL21	NHEJ1	SH3KBP1	
CDCA7	IL21R	ORAI1	SKIV2L/TTC37	
CHD7	IL2RG	NSMCE3	SLC39A7	
CIITA	IL7R	PIK3CD GOF	SMARCA11	

Category	Value	Category	Value
Category 1	10	Category 2	10
Category 3	5	Category 4	5
Category 5	3	Category 6	3
Category 7	2	Category 8	8
Category 9	7	Category 10	9
Category 11	8	Category 12	8
Category 13	10	Category 14	10

Category	2019	2020
1. Total	100%	100%
2. Sub-category 1	25%	25%
3. Sub-category 2	15%	15%
4. Sub-category 3	30%	30%
5. Sub-category 4	20%	20%
6. Sub-category 5	10%	10%
7. Sub-category 6	5%	5%
8. Sub-category 7	5%	5%
9. Sub-category 8	5%	5%

Category	Percentage	Category	Percentage
Very good	10%	Very good	10%
Good	15%	Good	15%
Satisfactory	25%	Satisfactory	25%
Unsatisfactory	15%	Unsatisfactory	25%
Very poor	45%	Very poor	25%

Category	Percentage
Very good	10%
Good	15%
Not good	25%
Very bad	50%

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED] [REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]