



Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica



Prospettive diagnostiche e terapeutiche nelle immunodeficienze

Francesco Liotta

XXIX Congresso Sezione S.I.A.I.C. Toscana

VIII Congresso Sezione S.I.A.I.C. Toscana, Emilia Romagna e San Marino

I Congresso Sezione S.I.A.I.C. Umbria e Marche

Novotel - Firenze, 12-13 aprile 2013

GRUPPO DI LAVORO PER LO STUDIO DELLE IMMUNODEFICIENZE

Il gruppo di studio per le ID è stato fondato nell'estate 2012 con una duplice missione: 1. diagnostica; 2. terapeutica:

1. Integrare i tests immunologici attualmente disponibili con nuovi studi funzionali a carico dei linfociti T ed NK
2. Mettere a punto le tecniche di laboratorio necessarie per il trattamento di gravi infezioni sistemiche mediante terapia adottiva con linfociti T specifici per antigeni di agenti patogeni

Il gruppo di studio è costituito da:

Annunziato Francesco, Biagiotti Roberta, Bianchi Leila, Canessa Clementina, Cosmi Lorenzo, Liotta Francesco, Lippi Francesca, Matucci Andrea, Troilo Arianna, Vultaggio Alessandra

DESCRIZIONE GENERALE DELL'ATTIVITA' DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Per il raggiungimento dell'obiettivo 1, il gruppo di lavoro ha avviato una proficua collaborazione con la SOD di Terapie Rigenerative (Dir. Prof. Francesco Annunziato), grazie alla quale è stata realizzata una nuova attività diagnostica presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi a partire da Novembre 2012.

Il campo di intervento verte sullo studio fenotipico e funzionale dei linfociti T (sia CD4+ che CD8+) e dei linfociti NK di sangue periferico o di altro fluido biologico.

Tale studio è complementare al tradizionale profilo linfocitario e permette di cogliere in modo più fine e più sensibile uno stato di immunosoppressione o al contrario di attivazione e di risposta a patogeni.

PANNELLI ATTUALMENTE DISPONIBILI PER LO STUDIO LINFOCITARIO FUNZIONALE

- **Produzione di citochine dopo stimolo policlonale**
- **Produzione di citochine dopo stimolo antigenico (ESAT-6)**
- **Espressione di CD154 (CD40-L) dopo stimolo policlonale**
- **Linfociti T regolatori**
- **Perforina e Granzima A**
- **Studio ipereosinofilie**

DSCRIZIONE DEI PANNELLI PER LO STUDIO FUNZIONALE LINFOCITARIO ATTUALMENTE DISPONIBILI

Produzione di citochine dopo stimolo policlonale

(Indicazione: approfondimento in pazienti con clinica suggestiva di immunodeficienza primitiva o secondaria)

Valuta la frequenza di linfociti T CD4+ e CD8+ in grado di produrre IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-2, IL-17 e la frequenza di linfociti NK in grado di produrre IFN- γ e TNF- α dopo stimolazione policlonale.

Produzione di citochine dopo stimolo antigenico (ESAT-6)

(Indicazione: sospetto di infezione tubercolare)

Valuta la frequenza di linfociti T CD4+ specifici per l'antigene ESAT-6 del micobatterio della tubercolosi e la tipologia di citochine da essi prodotte.

Espressione di CD154 (CD40-L) dopo stimolo policlonale

(Indicazione: approfondimento nell'ipogammaglobulinemia comune variabile e nella sindrome da iper-IgM)

Valuta la frequenza di linfociti T CD4+ che, dopo attivazione policlonale, esprimono sulla membrana cellulare la molecola di costimolo CD154 essenziale per indurre l'attivazione cellulare nei linfociti B

DSCRIZIONE DEI PANNELLI PER LO STUDIO FUNZIONALE LINFOCITARIO ATTUALMENTE DISPONIBILI

Linfociti T regolatori

(Indicazione: sospetta IPEX - Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked -)

Valutazione della frequenza dei linfociti T regolatori nativi

Perforina e Granzima A

(Indicazione: sospetta emolinfocitosi familiare, suscettibilità ad infezioni virali ricorrenti. In associazione allo studio delle citochine dopo stimolo policlonale può dare indicazione sulla presenza di infezioni virali sistemiche in atto o recenti)

Valutazione del potenziale citotossico basato sull'espressione di Perforina e Granzima A a livello dei linfociti T CD4+, CD8+ e dei linfociti NK

Studio ipereosinofilie

(Indicazione: sospetta ipereosinofilia linfoide)

Valuta la presenza e la frequenza di linfociti T patologici in circolo, con immunofenotipo CD4+CD3-CD2+CD5+CRTH2+ e la produzione di citochine, dopo stimolo policlonale, di tipo Th2: IL-4, IL-5, IL-13



1: Infezione polmonare da CMV in paziente sottoposta a trattamento con CKF per vasculite ad interessamento renale e polmonare.

(linfociti T CD8DR+ 3%,
linfociti T CD4DR+ 1.1%)

Id.:7000071606 Sig.ra

Provenienza: TERAPIA INTENSIVA DI EMERGENZA

Data Nascita: Età: ! Anni Sesso

Routine

Richiesta n. 70452863 del 08/02/2013 Ore: 07:00

| Esame | Metodica | Risultato | U.M. | Valori Riferimento | Materiale |
|--|----------|---|------|--------------------|-----------|
| <i>Citochine a stimolo policlonale</i> | | | | | |
| Linfociti CD3+CD8+ | | 36.9 | % | 23.00 - 49.00 | |
| Linfociti CD3+CD8- | | 45.8 | % | 42.00 - 69.00 | |
| Linfociti CD3+CD8+IFN-gamma+ | | 88.3 | % | 20.50 - 74.00 | |
| Linfociti CD3+CD8-IFN-gamma+ | | 18.5 | % | 9.60 - 44.80 | |
| Linfociti CD3+CD8+IL-17A+ | | 0.6 | % | 0.10 - 4.70 | |
| Linfociti CD3+CD8-IL-17A+ | | 1.5 | % | 0.20 - 6.70 | |
| Linfociti CD3+CD8+IL-4+ | | 2.4 | % | 0.20 - 7.10 | |
| Linfociti CD3+CD8-IL-4+ | | 2.6 | % | 1.00 - 7.90 | |
| Linfociti CD3+CD8+TNF-alpha+ | | 45.1 | % | 11.40 - 61.00 | |
| Linfociti CD3+CD8-TNF-alpha+ | | 36 | % | 9.20 - 50.00 | |
| Linfociti CD3-CD56+IFN-gamma+ | | 61.9 | % | 50.00 - 96.70 | |
| Linfociti CD3+CD8-IL-2+ | | 54.5 | % | 19.60 - 68.00 | |
| Linfociti CD3+CD8+IL-2+ | | 29.3 | % | 14.50 - 86.00 | |
| Conclusioni | | Aumentato della frequenza di linfociti T CD8+ produttori IFN-gamma. Quadro compatibile con infezione virale in corso o recente | | | |
| <i>Perforina e granzimaA</i> | | | | | |
| Linfociti CD3+CD4+perforina+ | | 15.8 | % | 0.30 - 40.30 | |
| Linfociti CD3+CD8+perforina+ | | 86.6 | % | 12.00 - 63.60 | |
| Linfociti CD3-CD16+perforina+ | | 93.7 | % | 72.00 - 96.00 | |
| Linfociti CD3+CD4+GranzimaA+ | | 16.1 | % | 4.30 - 40.00 | |
| Linfociti CD3+CD8+GranzimaA+ | | 88.2 | % | 29.40 - 80.50 | |
| Linfociti CD3-CD16+GranzimaA+ | | 91.2 | % | 73.00 - 97.00 | |
| Conclusioni | | Incremento della frequenza di linfociti T CD8+ con fenotipo citotossico (esprimenti granzima perforina) | | | |



2: paziente affetto da sepsi. In fase di immunodepressione (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome -CARS-).

Id.:6038604 Sig.

Provenienza: TERAPIA INTENSIVA DI EMERGENZA

Data Nascita:

Sesso

Routine

Richiesta n. 70484356 del 04/03/2013 Ore: 08:00

| Esame | Metodica | Risultato | U.M. | Valori Riferimento | Materiale |
|--|----------|-----------|------|--------------------|-----------|
| <i>Citochine a stimolo policlonale</i> | | | | | |
| Linfociti CD3+CD8+ | | 34.3 | % | 23.00 - 49.00 | |
| Linfociti CD3+CD8 | | 42.8 | % | 42.00 - 69.00 | |
| Linfociti CD3+CD8+IFN-gamma+ | | 18.5 < | % | 20.50 - 74.00 | |
| Linfociti CD3+CD8-IFN-gamma+ | | 10.9 | % | 9.60 - 44.80 | |
| Linfociti CD3+CD8+IL-17A+ | | 0.1 | % | 0.10 - 4.70 | |
| Linfociti CD3+CD8-IL-17A+ | | 0.5 | % | 0.20 - 6.70 | |
| Linfociti CD3+CD8+IL-4+ | | 0.5 | % | 0.20 - 7.10 | |
| Linfociti CD3+CD8-IL-4+ | | 1 | % | 1.00 - 7.90 | |
| Linfociti CD3+CD8+TNF-alpha+ | | 5.2 < | % | 11.40 - 61.00 | |
| Linfociti CD3+CD8-TNF-alpha+ | | 7.2 < | % | 9.20 - 50.00 | |
| Linfociti CD3-CD56+IFN-gamma+ | | 32.5 < | % | 50.00 - 96.70 | |
| Linfociti CD3+CD8-IL-2+ | | 51.6 | % | 19.60 - 68.00 | |
| Linfociti CD3+CD8+IL-2+ | | 21.6 | % | 14.50 - 86.00 | |
| Conclusioni | | | | | |
| Riduzione della frequenza di linfociti T CD8+ e dei linfociti NK produttori IFN-gamma, riduzione della frequenza di linfociti T CD4+ e T CD8+ produttori TNF-alfa | | | | | |

| | | | | | |
|---|--|--------|---|---------------|--|
| <i>Perforina e granzimaA</i> | | | | | |
| Linfociti CD3+CD4+perforina+ | | 5.2 | % | 0.30 - 40.30 | |
| Linfociti CD3+CD8+perforina+ | | 30.9 | % | 12.00 - 63.60 | |
| Linfociti CD3-CD16+perforina+ | | 96.1 > | % | 72.00 - 96.00 | |
| Linfociti CD3+CD4+GranzimaA+ | | 4.1 < | % | 4.30 - 40.00 | |
| Linfociti CD3+CD8+GranzimaA+ | | 26.9 < | % | 29.40 - 80.50 | |
| Linfociti CD3-CD16+GranzimaA+ | | 95 | % | 73.00 - 97.00 | |
| Conclusioni | | | | | |
| Lieve riduzione dell'espressione di granzima nei linfociti T | | | | | |

OBIETTIVI FUTURI

- 1. INTRODUZIONE DI NUOVI PANNELLI DIAGNOSTICI**
- 2. ISOLAMENTO CON METODICA CLINICAL GRADE DI LINFOCITI T SPECIFICI PER ANTIGENI DI PATOGENI**

1. INTRODUZIONE DI NUOVI PANNELLI DIAGNOSTICI

Attualmente è disponibile il test di stimolazione antigenica con ESAT-6 per la diagnosi di memoria immunologica verso il micobatterio della tubercolosi.

L'obiettivo è di aggiungere entro la fine del 2013 ulteriori pannelli per la diagnosi di infezione da CMV, EBV e Adenovirus, che costituiscono i principali agenti responsabili di infezioni o riattivazioni infettive in varie categorie di soggetti immunodepressi, particolarmente nel post-trapianto di midollo osseo o di organo solido.

2. ISOLAMENTO CON METODICA CLINICAL GRADE DI LINFOCITI T SPECIFICI PER ANTIGENI DI AGENTI PATOGENI

Le nuove frontiere terapeutiche per il trattamento di gravi infezioni virali, batteriche o fungine, in pazienti immunocompromessi (particolarmente pazienti con trapianto di midollo osseo o di organo) prevedono l'isolamento ed il reinocolo di linfociti T specifici per antigeni di patogeni.

A tale riguardo, il 15 febbraio u.s., in collaborazione con la SOD di Terapie Rigenerative è stato organizzato un workshop dal titolo **“The new era of vaccination: antigen-specific adoptive T cell therapy”**, a cui hanno partecipato oratori di rilievo internazionale e direttamente coinvolti in studi clinici basati su questo tipo di intervento terapeutico.

Entro giugno 2014 il gruppo di lavoro, in collaborazione con la SOD di Terapie Rigenerative, ha come obiettivo quello di realizzare, l'isolamento in vitro di linfociti T CD4+ e CD8+ specifici per antigeni di CMV (p65) con protocollo GMP. Tale isolamento si basa sulla tecnica di “cattura della citochina prodotta” dopo stimolo antigenico su sangue intero.