

Linfoistocitosi emofagocitica: una sfida diagnostica per il pediatra

ELENA SIENI, VALENTINA CETICA, MAURIZIO ARICÒ

Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Firenze

La linfoistocitosi emofagocitica è un disordine assai raro, gravissimo, genetico o acquisito. La comprensione dei meccanismi patogenetici, e anche di quelli che ne consentono la curabilità, è nello stesso tempo sorprendente e "mind opening".

La linfoistocitosi emofagocitica (LE) è una malattia grave con sindrome iperinfiammatoria causata da una risposta immunitaria incontrollata e inefficace. Le sue manifestazioni principali sono: febbre persistente senza causa apparente, epatosplenomegalia, pancitopenia; l'esame morfologico dell'aspirato midollare permette di escludere una leucemia e documentare, nella metà dei casi, immagini di emofagocitosi.

Nell'individuo immunocompetente i meccanismi di citotossicità, mediati principalmente dalle cellule natural killer (NK) e dai linfociti T citotossici (LTC), consentono il riconoscimento e l'eliminazione delle cellule infettate da patogeni intracellulari e delle cellule tumorali, mantenendo l'omeostasi dell'organismo. Le funzioni effettrici delle cellule NK e LTC sono mediate dall'esocitosi di granuli citolitici preformati, contenenti perforina, granzimi e altre serino-proteasi, nella sinapsi immunologica che si forma tra la cellula effettrice e la cellula bersaglio. Prima di rilasciare il loro contenuto nello spazio intercellulare, i granuli citolitici devono "polarizzarsi" all'interno del citoplasma per confluire al sito di contatto, quindi aderire alla membrana plasmatica e fondersi con essa. Una volta rilasciata dalle cellule citotossiche, la proteina perforina si ancora alla cellula bersaglio e polimerizza a formare canali transmembrana che permettono il passaggio dei granzimi e di altre serino-proteasi nel citoplasma della cellula bersaglio; questo ne induce l'apoptosi,

HAEMOPHAGOCYTIC LYMPHOHISTIOCYTOSIS: A DIAGNOSTIC CHALLENGE FOR THE PEDIATRICIAN
(*Medico e Bambino* 2012;31:21-29)

Key words

Haemophagocytic lymphohistiocytosis, Cellular cytotoxicity, Natural killer, Haemophagocytosis

Summary

Haemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a severe hyperinflammatory syndrome caused by uncontrolled but ineffective immune response. Inherited human disorders causing the defect of selected proteins involved in the cellular cytotoxicity machinery are responsible for this disease. Since 2000 some genes, whose mutations cause the disease, have been progressively identified. Occasionally a transient state of functional impairment may result from a contingent situation; these patients without evidence of a genetic defect are defined as affected by "secondary" or "acquired" HLH. The international cooperative effort has allowed to develop, by prospective trials, an effective therapy that today enables most affected children to be cured. A diagnostic strategy based on clinical criteria and functional assays has also been defined, thus providing a strong support to the clinical diagnosis and directing early start of specific therapy. On this basis, genetic diagnosis can now be directed to the gene(s) most likely involved; definitive diagnosis allows to define indication to haematopoietic stem cells transplantation, familial genetic counselling, with prenatal diagnosis. Investigation of these rare genetic cases provided important clues for better understanding some mechanisms of the immune system in humans.

attraverso meccanismi caspasi-dipendenti e indipendenti¹⁴ (Figura 1).

La LE si sviluppa per un difetto di attività citotossica che previene l'efficiente rimozione degli antigeni e la down regulation della risposta immunitaria; come risultato, si ha una persistente attivazione e proliferazione dei LTC e delle cellule NK^{5,7}, con produzione di grandi quantità di citochine, tra cui IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, che portano all'attivazione degli istiociti (macrofagi e cellule dendritiche). Queste cellule a loro volta si dirigono ai siti di attivazione di LTC e cellule NK, causando la formazione di infiltrati tis-

sutali e la secrezione di elevati livelli di citochine infiammatorie, come TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18^{8,9}. L'infiltrazione tissutale e l'ipercitochinemia causate dai linfociti e dagli istiociti attivati sono responsabili delle manifestazioni cliniche della LE, e in particolare del danno tissutale, a carico di fegato e cervello, che può risultare fatale.

Il difetto di attività citotossica può essere il risultato di alterazioni di proteine diverse su base costituzionale. La ricerca in questo campo ha permesso di identificare numerosi difetti genetici che danno origine alla LE. Occasionalmente uno stato transitorio di insuffi-

SINTESI DI ALCUNE CARATTERISTICHE DEI DISORDINI GENETICI ASSOCIATI ALLA LINFOISTIOCITOSI EMOFAGOCITICA

Sottotipo	Classificazione OMIM	Locus genetico	Proteina affetta	Difetto di citotossicità	Screening funzionale	Modello animale	Note
LEF1	603552	9q21.3-22	Non nota	Non noto	Non noto	–	
LEF2	267700	9q21.3-q22	Perforina	Completo	Difetto espressione perforina	Pfn1 -/-	
LEF3	608898	17q25.1	Munc13-4	Completo	Difetto degranulazione	jinx	
LEF4	603552	6q24	Syntaxina 11	Moderato	Difetto degranulazione	–	
LEF5	613101	19p	Munc 18-2	Moderato	Difetto degranulazione	–	Ipogammaglobulinemia disturbi gastrointestinali, manifestazioni emorragiche
Griscelli tipo 2	607624	15q21	RAB27a	Completo	Difetto degranulazione	ashen	Ipipigmentazione
Chédiak-Higashi	214500	1q42.1-q42.2	LYST	Completo	Difetto degranulazione	beige	Ipipigmentazione, granuli giganti
Hermansky-Pudlak tipo 2	608233	5q14.1	Adaptor protein-3 (AP3)	Completo	Difetto degranulazione	pearl	Ipipigmentazione, granuli giganti
XLP 1	308240	Xp25	SH2D1A	Possibile	Difetto espressione SAP	–	
XLP 2	300635	Xp25	XIAP o BIRC4	Assente	Difetto espressione XIAP	–	

Tabella 1

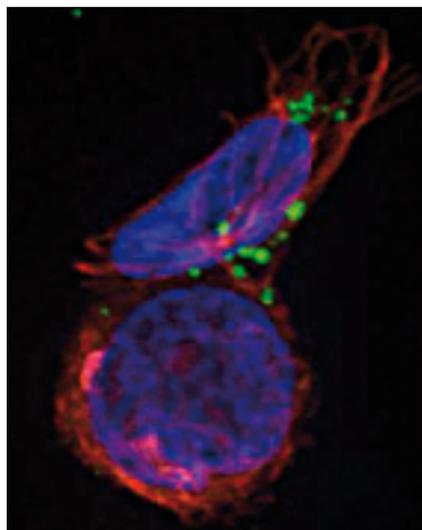


Figura 1. Linfocita NK che riconosce una cellula bersaglio e polarizza il citoscheletro (tubulina, rosso) e i granuli litici (perforina, verde) verso la cellula bersaglio. I nuclei sono colorati in blu con Hoechst.

ienza funzionale può scaturire da una situazione contingente; l'interesse dei ricercatori è focalizzato oggi anche su questi pazienti in cui, apparentemente, non è dimostrabile un difetto costituzionale e per questo definiti come affetti da forme “secondarie” o “acquisite” di LE.

LINFOISTIOCITOSI EMOFAGOCITICA FAMILIARE (LEF)

La prima descrizione della forma familiare della malattia (LEF) risale al 1952 quando Farquhar e Claireaux hanno descritto l'insorgenza, in due fratellini, di una malattia caratterizzata da febbre, citopenia, epatosplenomegalia con esito rapidamente fatale nonostante il trattamento con antibiotici e steroidi¹⁰. Da questa prima descrizione è stata proposta, e poi confermata, per la LEF una modalità di trasmissione ereditaria autosomica recessiva. L'incidenza è stimata intorno a 1:50.000 nati. I sintomi sono di solito presenti nei primi mesi di vita, ma va ricordato che il 20% dei casi viene diagnosticato oltre i 5 anni di età; recentemente sono stati descritti casi di LEF anche in età adulta¹¹⁻¹³.

La LEF è geneticamente eterogenea, cioè può essere causata da mutazioni in diversi geni, tutti coinvolti nell'esocitosi mediata da granuli¹⁴.

A oggi sono stati identificati 5 loci indipendenti implicati nella LEF, e il difetto genetico sottostante è stato descritto per 4 di questi (Tabella 1, Box 1)¹⁵⁻⁴⁵.

IMMUNODEFICIENZE GENETICHE ASSOCIATE ALLA LE

Altre condizioni genetiche con caratteristiche cliniche addizionali e distintive possono causare una sindrome clinica che in larga parte si sovrappone alla LE. Queste sono riassunte nel Box 2⁴⁶⁻⁸⁴.

LINFOISTIOCITOSI EMOFAGOCITICA ACQUISITA O SECONDARIA

I primi casi di LE “acquisita” sono stati descritti nel 1979 in pazienti adulti con un'infezione virale in seguito a terapia immunosoppressiva⁸⁵. Successivamente è divenuto evidente che la LE può comparire come complicanza in pazienti, più frequentemente adulti, con malattie neoplastiche quali linfomi o leucemie⁸⁶. Anche trattamenti immunosoppressivi che seguono un trapianto d'organo o di cellule staminali emopoietiche possono associarsi allo sviluppo di LE.

Oggi è noto che LE possono essere osservate in pazienti precedentemente sani che vadano incontro a un trattamento che li rende immunodepressi acquisiti. Triggers più frequenti pos-

Box 1 - I 5 TIPI DI LINFOISTIOCITOSI FAMILIARE

Linfoistiocitosi emofagocitica familiare di tipo 1 (LEF1)

La mappatura genetica applicata a quattro famiglie consanguinee di origine pakistana ha permesso di identificare una regione di 7.8 cM sul cromosoma 9q21.3-22¹⁵. Purtroppo il difetto genetico alla base di questa forma non è stato ancora identificato.

Linfoistiocitosi emofagocitica familiare di tipo 2 (LEF2)

Il primo gene che è stato riportato come causa di LEF è *PRF1*, che codifica per la proteina perforina¹⁶. Come dimostrato in un modello di topo *knock-out*, l'assenza di perforina determina la perdita della capacità citotossica¹⁷. Nei pazienti con LEF2 le mutazioni di *PRF1* determinano una riduzione, completa o parziale, della sintesi della proteina perforina che induce nell'alterazione del meccanismo di esocitosi mediata da granuli delle cellule NK e T CD8^{4,18}.

Finora sono state identificate più di 70 diverse mutazioni distribuite lungo i due esoni codificanti del gene^{11,16,18-25}; alcune di queste sono associate a specifici gruppi etnici: la mutazione c.1122G>A (p.W374X) è stata trovata con un'alta incidenza nei pazienti turchi²⁶, la c.50delT(L17FsX) è predominante nei pazienti di origine africana (o afro-americana)²⁴ e la c.1090-1091delCT(L364fsX) non è mai stata identificata in pazienti non giapponesi²³. In uno studio internazionale genotipo-fenotipo su 124 pazienti con LEF2 l'età mediana alla diagnosi era di 3 mesi; un esordio più tardivo era associato alla presenza di almeno una mutazione *missense*, che permette una funzione residua della proteina. L'attività NK era assente o ridotta in tutti i pazienti valutabili²⁵. Le mutazioni di *PRF1* sono responsabili del 20-50% delle LEF, in funzione della coorte studiata^{18,22,24}. La nostra osservazione personale in un'ampia popolazione di più di 100 pazienti suggerisce che circa il 40% dei casi totali di LEF rientrano nel sottogruppo LEF2¹⁴ (Aricò M, 2011, dati non pubblicati).

Linfoistiocitosi emofagocitica familiare di tipo 3 (LEF3)

Nel 2003 un terzo locus, 17q25, è stato riportato in associazione con la LEF. Il gene coinvolto, *UNC13D*, codifica per la proteina Munc13-4, che contribuisce al *priming* dei granuli secretori e alla loro fusione con la membrana plasmatica²⁷. Il difetto di Munc13-4 compromette l'entrata delle proteine effettrici, perforina e granzimi, nelle cellule bersaglio, determinando un difetto di citotossicità cellulare e un quadro clinico non distinguibile da quello della LEF2. È stato dimostrato che, se messe in coltura con cellule bersaglio suscettibili, le cellule NK dei pazienti affetti da LEF3 esprimono bassi livelli dell'antigene di superficie CD107a (LAMP-1) in confronto ai controlli sani o ai pazienti con difetto di perforina. Questo tipo di analisi citofluorimetrica è diventato quindi uno strumento rapido e sensibile per l'identificazione dei difetti di Munc13-4, caratterizzati da ridotta o assente degranulazione⁹. Circa il 30-40% dei casi di LEF appartiene a questo sottogruppo^{8,28} (Aricò M, 2011, dati non pubblicati). Sono note più di 50 diverse mutazioni di *UNC13D*^{27,29-32}, distribuite uniformemente lungo il gene; fino al 15% di esse è responsabile di errori di *splicing*³³. Non sono state descritte correlazioni tra gruppi etnici e specifiche mutazioni con l'eccezione della c.1596+1G>C, la più frequente in Giappone³⁴ e la c.754-1G>C, responsabile della maggior parte delle LEF3 in Corea³⁵. Nella più ampia coorte di pazienti con LEF3 riportata fino ad oggi, l'età mediana all'esordio era di 4 mesi, con un ampio range fino a 18 anni. Come nella LEF2, i pazienti con almeno una mutazione *missense* avevano un'età di esordio dei sintomi più tardiva. L'età alla diagnosi era significativamente più alta nei pazienti con LEF3 rispetto ai pazienti con LEF2 quando erano considerate solo le mutazioni distruttive. Lo stesso studio dimostra attività citotossica ridotta o assente in 44 dei 45 pazienti analizzati (98%)³².

Linfoistiocitosi emofagocitica familiare di tipo 4 (LEF4)

Sintaxina 11 (STX11) è un membro della famiglia di proteine coinvolte nella regolazione del trasporto intracellulare, definite *N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein*, che si trovano sulla membrana delle cellule bersaglio (t-SNARE)³⁶. L'interazione di queste proteine con specifiche proteine SNARE vescicolari (v-SNARE) è coinvolta nel processo di ancoraggio (*docking*) e di fusione delle vescicole con la membrana plasmatica³⁷. A oggi è stato riportato un numero molto limitato di pazienti in cui la LEF è dovuta a mutazioni di STX11; benché la quasi totalità di essi provenga da famiglie di origine Curda^{31,36-39}, casi rarissimi rendono necessario esplorare anche questo gene in pazienti di origine caucasica o ispanica⁴⁰. La recente analisi di 15 pazienti affetti da LEF4 provenienti da un consorzio internazionale suggerisce un'età all'esordio più elevata (mediana 12,2 mesi) ma con un quadro clinico non distinguibile da quello degli altri sottotipi di LEF (Sieni E, Aricò M, 2011, dati non pubblicati).

Linfoistiocitosi emofagocitica familiare di tipo 5 (LEF5)

Di recente è stato descritto un nuovo gene LEF-correlato, *STXBP2*, che codifica per la proteina Munc18-2, coinvolta nella regolazione del trasporto delle vescicole alla membrana plasmatica, in interazione con STX11; mutazioni di *STXBP2* nei pazienti con LEF5 causano la perdita di questa interazione a cui consegue una ridotta stabilità di entrambe le proteine^{41,42}. A oggi sono state descritte 24 diverse mutazioni, in prevalenza di tipo *missense*^{28,41,43}, senza correlazione con specifici gruppi etnici. Apparentemente solo una minoranza di pazienti con LEF, dal 6% al 14%^{28,42,43}, appartiene al sottogruppo LEF5. Sebbene quindi le informazioni su questi pazienti siano limitate, sulla base di dati recenti su una coorte di 34 pazienti provenienti da tre centri di riferimento europei, l'età mediana all'esordio è di 6 mesi e il fenotipo sembra non distinguibile da altri sottogruppi⁴³⁻⁴⁵. Tuttavia va segnalato che alcuni pazienti possono avere una presentazione atipica con disturbi gastrointestinali, ipogammaglobulinemia e manifestazioni emorragiche⁴⁴ (Sieni E, Aricò M, 2011, dati non pubblicati). Nei pazienti con LEF5 l'espressione di CD107a è deficitaria così come l'attività NK e T citotossica. Quindi sembra che Munc18-2 abbia un ruolo essenziale negli ultimi step della via secretoria per il rilascio dei granuli citotossici attraverso il legame con STX11 (Figura 2).

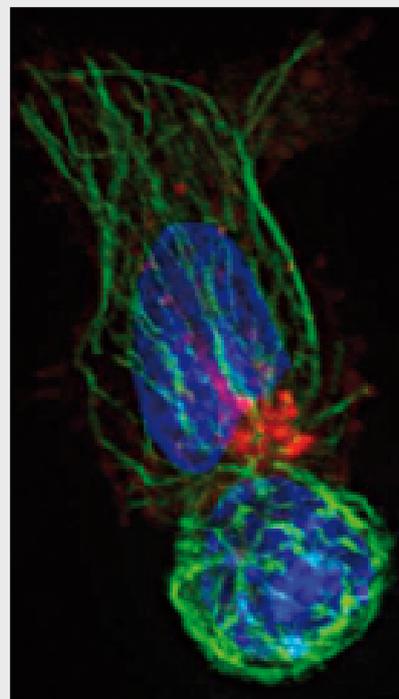


Figura 2. Linfocita T citotossico con difetto di *Munc18-2*; microtubuli (verde) e granuli di perforina (rosso) sono polarizzati verso la cellula bersaglio. I nuclei sono colorati in blu con Hoechst.

Box 2 - LE IMMUNODEFICIENZE GENETICHE ASSOCIATE ALLA LINFOISTIOCITOSI EMOFAGOCITICA

Sindrome di Chédiak-Higashi (SCH)

Menzionata per la prima volta da Béguez César⁴⁶, Chédiak e Higashi ne hanno descritto le caratteristiche cliniche peculiari^{47,48}. SCH è una malattia rara, autosomica recessiva, caratterizzata da albinismo oculocutaneo di grado variabile, diatesi emorragica di modesta entità, infezioni batteriche ricorrenti e disfunzione neurologica progressiva; questi pazienti possono avere un decorso complicato da episodi tipo LE^{49,50}. La malattia è causata da mutazioni del gene *LYST* (*lysosomal trafficking regulator*); l'omonima proteina è coinvolta nel traffico intercellulare e sembra avere un ruolo nel dirigere le proteine lisosomiali verso la forma matura degli endosomi^{51,52} o nel regolare il processo di fusione o scissione dei lisosomi⁵³. Le mutazioni che causano una perdita di funzione di *LYST*, nei pazienti con SCH e nel modello animale murino *beige*, determinano l'incremento delle dimensioni dei lisosomi e degli organelli a essi correlati, tra cui melanosomi, corpi densi piastrinici e granuli citolitici⁵⁴; per questo la presenza di corpi inclusi giganti in cellule ematopoietiche e melanociti è diventata il segno distintivo della malattia⁵⁰. In particolare, nelle cellule NK e LTC i granuli citotossici giganti polarizzano alla sinapsi immunologica, ma la loro secrezione è ostacolata portando dunque a un difetto di attività citotossica⁵⁵; la formazione anomala del melanosoma è responsabile del difetto di pigmentazione⁵⁶. Sono stati descritti vari fenotipi clinici correlati a diversi genotipi. Le mutazioni *nonsense* o *frameshift*, che portano all'assenza completa di proteina o a una sua variante tronca, sono associate con la forma severa, a esordio precoce della malattia che si osserva in oltre i due terzi dei pazienti ed è caratterizzata da infezioni fatali e dallo sviluppo di LE nella cosiddetta "fase accelerata". Invece le mutazioni *missense* sono associate alla SCH più mite, a esordio tardivo, con disfunzione neurologica lentamente progressiva e infezioni ma senza una vera LE⁵⁷.

Sindrome di Hermansky-Pudlak di tipo 2 (SHP-2)

La sindrome di Hermansky-Pudlak (SHP)⁵⁸ definisce un gruppo di almeno otto disordini genetici caratterizzati da albinismo oculocutaneo parziale e manifestazioni emorragiche⁵⁹, suscettibilità alle infezioni a causa di neutropenia congenita e ridotta attività citotossica⁶⁰. È causata da mutazioni del gene che codifica per la subunità β -3A del complesso *adaptor protein-3* (AP3)⁶¹, che causano ostacolo al trasporto delle proteine lisosomiali in alcuni tipi cellulari inclusi melanosomi, piastrine, cellule NK e LTC. L'alterato trasporto della tirosinasi, il substrato per la sintesi della melanina nei melanosomi, è responsabile dell'ipopigmentazione, mentre l'anomala direzionalità dell'elastasi neutrofila contribuisce alla neutropenia⁶². Il difetto di attività citotossica è attribuito alla presenza di granuli citotossici aumentati di volume incapaci di muoversi lungo i microtubuli e quindi di polarizzare alla sinapsi immunologica⁶⁰. Sebbene tutti i pazienti con SHP-2 a oggi analizzati abbiano un difetto di attività citotossica, finora è stato riportato un solo caso di LE⁶³, diversamente da quanto accade in tutti gli altri disordini genetici associati a difetto di citotossicità (Tabella 1). Rimane dunque da determinare se il difetto di attività citotossica nei pazienti con SHP-2 predisponga o meno allo sviluppo di LE.

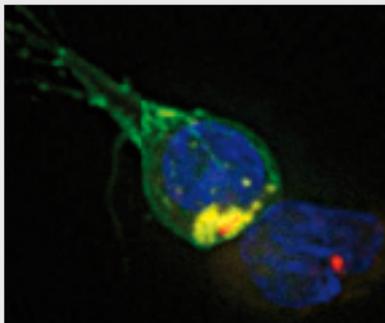


Figura 3. Linfocita T citotossico CD8+ (verde), con difetto di Rab27a, che riconosce ma non uccide una cellula bersaglio con granuli colorati con LAMP1 (giallo). I centrosomi e i nuclei di entrambe le cellule sono colorati con tubulina (rosso) e Hoechst (blu).

Sindrome di Griscelli di tipo 2 (SG-2)

La SG-2 è una rara malattia autosomica recessiva, la cui caratteristica clinica distintiva è la colorazione grigio-argentea dei capelli che può tuttavia essere anche estremamente sfuggente^{64,65}. La mancanza dei corpi inclusi giganti e la presenza del tipico pattern microscopico di distribuzione irregolare dei granuli giganti pigmentati la distingue dalla SCH⁴⁹. È causata da mutazioni di *RAB27a*⁶⁶ descritte oggi in più di 100 pazienti; l'omonima proteina, una GTP-asi, interagisce con Munc13-4 nella funzione delle cellule NK e LTC; il suo difetto causa incapacità dei granuli citotossici ad ancorarsi alla membrana plasmatica (Figura 3), mentre l'ipopigmentazione è da attribuire al difettoso rilascio dei melanosomi dai dendriti melanocitici^{59,67}.

Sindrome linfoproliferativa X-linked di tipo 1 (XLP-1, malattia di Duncan)

La XLP è un'immunodeficienza primitiva, legata al cromosoma X, caratterizzata da una severa disregolazione immunitaria scatenata, nel 90% dei casi, da infezioni da Epstein-Barr virus (EBV)^{68,70}. È dovuta a mutazioni di *SH2D1A*, che codifica per la *signaling lymphocyte activation molecule* (SLAM)-associated protein (SAP)^{71,72}, proteina importante nello sviluppo, nella differenziazione e nelle funzioni effettrici delle cellule T, NK, NKT e probabilmente B. SAP è una proteina adattatrice che si lega al dominio intracellulare di vari membri della famiglia SLAM, espressi da numerose cellule del sistema immunitario, promuovendo la loro attivazione e/o differenziazione. In caso di difetto di SAP, la famiglia di recettori SLAM modifica la sua funzione e media segnali inibitori che sopprimono le funzioni delle cellule del sistema immunitario. Il comportamento paradossale del recettore 2B4 può quindi essere usato per la diagnosi di XLP³. I pazienti con XLP-1 presentano difetti di funzione o di sviluppo di varie cellule del sistema immunitario (linfociti T, NKT, NK e B)^{4,75}, che rendono conto delle manifestazioni cliniche della malattia. I fenotipi più caratteristici sono rappresentati da: mononucleosi infettiva fulminante o LE associata a EBV (58% dei pazienti), ipogammaglobulinemia (30%), disordini linfoproliferativi incluso il linfoma maligno (20-30%) e altre manifestazioni meno comuni (anemia aplastica, vasculite, gastrite cronica)^{76,77}. Pertanto i pazienti maschi con un quadro clinico di LEF devono essere indagati per una possibile XLP⁸.

ti di funzione o di sviluppo di varie cellule del sistema immunitario (linfociti T, NKT, NK e B)^{4,75}, che rendono conto delle manifestazioni cliniche della malattia. I fenotipi più caratteristici sono rappresentati da: mononucleosi infettiva fulminante o LE associata a EBV (58% dei pazienti), ipogammaglobulinemia (30%), disordini linfoproliferativi incluso il linfoma maligno (20-30%) e altre manifestazioni meno comuni (anemia aplastica, vasculite, gastrite cronica)^{76,77}. Pertanto i pazienti maschi con un quadro clinico di LEF devono essere indagati per una possibile XLP⁸.

Sindrome linfoproliferativa X-linked di tipo 2 (XLP-2)

Recentemente è stato identificato un sottogruppo di pazienti con un fenotipo simile a XLP dovuto a mutazioni in *BIRC4*, il gene che codifica per la proteina XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*)⁷⁹, potente proteina anti-apoptotica che lega specifiche caspasi inibendole. La maggior parte delle mutazioni di *BIRC4* porta all'assenza di espressione della proteina^{79,80}. Come questo porti al fenotipo della sindrome XLP rimane da spiegare. La funzione e il numero delle cellule NK e NKT sono normali nel topo⁸¹ e nell'uomo con mutazioni in *BIRC4*^{79,80}. La manifestazione clinica principale della XLP-2 è la LE (spesso associata a EBV); sono stati riportati anche casi di disammaglobulinemia, sebbene meno frequenti che in XLP-1, mentre a oggi non è stato descritto nessun caso di linfoma^{80,82}. Nonostante XLP-1 e XLP-2 abbiano in comune il locus genetico di origine e la suscettibilità a sviluppare LE, le due malattie presentano specificità cliniche e funzionali^{80,83}. Rimane dunque da chiarire se SAP e XIAP siano parte di una comune via di segnale, anche se un'interazione diretta tra queste due proteine sembra improbabile⁸⁴. Il numero limitato di pazienti con XLP-2 a oggi descritti non permette una maggiore chiarificazione del fenotipo e delle caratteristiche di questo sottogruppo di pazienti.

Box 3 - LA SINDROME DA ATTIVAZIONE MACROFAGICA

La **sindrome da attivazione macrofagica** (MAS) può essere osservata in bambini e adulti con malattie autoimmunitarie, tra cui principalmente la forma sistemica dell'artrite idiopatica giovanile (AIG-s) ma anche il lupus eritematoso sistemico (LES) o la malattia di Kawasaki. Per la diagnosi di MAS sono state sviluppate linee guida che suggeriscono, come caratteri distintivi della MAS di grado severo: piastrinopenia, iperferritinemia, evidenza di emofagocitosi al midollo osseo, ipertransaminasemia, neutropenia, febbre continua persistente $\geq 38^\circ\text{C}$, riduzione della velocità di eritrosedimentazione, rapida caduta dei valori di fibrinogeno e ipertrigliceridemia^{89,90}. L'incidenza della MAS nei pazienti con AIG-s è stimata intorno al 7%, con una mortalità del 10-20%, comparabile a quella precoce dei pazienti con LE. Il trattamento con ciclosporina A rappresenta l'attuale standard per la MAS, ma alcuni pazienti possono necessitare di un trattamento più aggressivo che si sovrappone a quello della LE. Ciò è in linea con la constatazione che, sebbene la maggior parte dei pazienti con MAS non presentino un difetto profondo di attività citotossica, una ridotta espressione di perforina o SAP e la presenza di mutazioni eterozigotiche nei geni correlati alla LEF possono lanciare un ponte tra le forme genetiche di LE e i meccanismi patogenetici della MAS^{91,93}.

sono essere virus comuni, ma occasionalmente anche batteri, protozoi e funghi^{87,88}. I virus erpetici, e in particolare Epstein-Barr virus (EBV) e citomegalovirus (CMV), rappresentano i più frequenti agenti infettivi associati allo sviluppo di LE. Le forme associate a EBV, nella maggior parte dei casi, si presentano con un quadro simile a quello di una mononucleosi atipica e prolungata ma, seppur raramente, possono avere decorso aggressivo e rapidamente fatale equiparabile a quello delle forme genetiche.

Raramente la LE può complicare il decorso di errori congeniti del metabolismo come l'intolleranza alle proteine con lisinuria mediante un meccanismo patogenetico ancora non chiaro. Un quadro clinico simile alla LE, noto come sindrome da attivazione macrofagica (MAS), può essere osservato in bambini e adulti con malattie autoimmunitarie, tra cui principalmente la forma sistemica dell'artrite idiopatica giovanile (AIG-s) ma anche il lupus eritematoso sistemico (LES) o la malattia di Kawasaki (Box 3)^{89,93}.

MANIFESTAZIONI CLINICHE E DI LABORATORIO

La LE è una malattia grave ma insidiosa per il pediatra perché il quadro clinico non è specifico. Il sospetto iniziale di LE deve essere suscitato dall'identificazione di una sindrome che comprende sintomi e segni clinici e al-

terazioni di laboratorio. Le manifestazioni più comuni della LE sono: febbre prolungata e inspiegata, con negatività delle emocolture e resistenza agli antibiotici, epatosplenomegalia e citopenia^{12,94}. Segni meno comuni della malattia sono linfadenopatia, ittero, rash, edema. Fino al 30% dei pazienti presenta alla diagnosi disturbi neurologici, tra cui irritabilità, ipertono, paralisi dei nervi cranici, convulsioni e alterazioni dello stato di coscienza. L'esame del liquor evidenzia in oltre la metà dei pazienti pleiocitosi, proteinorachia o entrambe^{12,95}. Lo studio TC o RM mostra alterazioni, tra cui diffuse anomalie di intensità di segnale nella sostanza bianca nelle immagini T2-pesate, atrofia, lesioni focali iperintense, mielinizzazione ritardata o calcificazione parenchimale⁹⁶⁻⁹⁸.

Il laboratorio rivela diverse anomalie: i valori di piastrine e di emoglobina sono solitamente ridotti; il fibrinogeno, il cui aumento è un marcatore classico dell'infiammazione, è invece ridotto; i trigliceridi, ma non il colesterolo, sono aumentati; i valori di ferritina sono molto spesso alti o molto alti. L'aspirato midollare, che si impone nel sospetto di una leucemia, non mostra blasti e in circa la metà dei casi può presentare, talora solo a un esame accurato ed esperto, fenomeni di emofagocitosi. Va ricordato che in alcuni casi la malattia può avere un esordio meno tipico, ad esempio con un quadro prevalentemente neurologico, o con una insufficienza epatica acuta o

fulminante^{12,45,99}. La maggior parte delle manifestazioni cliniche e di laboratorio sono spiegate dalla sottostante ipercitochinemia e dall'infiltrazione d'organo. La febbre è indotta da IL-1 e IL-6, la pancitopenia da elevati livelli di IFN- γ e TNF- α e dall'emofagocitosi; l'ipertrigliceridemia è la conseguenza dell'inibizione della lipoprotein-lipasi da parte di TNF- α ; la ferritina è secreta dai macrofagi attivati insieme a elevati livelli di attivatore del plasminogeno responsabili dell'iperfibrinolisi.

STRATEGIA DIAGNOSTICA

Per venire incontro alle difficoltà dei clinici nel 1994 la *Histiocyte Society* ha definito dei criteri diagnostici, poi revisionati nel 2004 (*Tabella II*)⁴⁵. Tuttavia la diagnosi di LE può essere ancora difficile. Infatti i criteri diagnostici possono non essere presenti all'esordio della malattia e svilupparsi più tardi durante il decorso clinico oppure possono essere soddisfatti solo parzialmente. Con l'accumularsi dei casi, grazie al lavoro cooperativo, si cerca oggi di semplificare i criteri diagnostici¹⁰⁰. Allo scopo di contribuire a questo dibattito, il nostro gruppo ha osservato che la combinazione di febbre, splenomegalia e piastrinopenia rappresenta il quadro clinico iniziale per sospettare la LE; quando associate a evidenza di iperferritinemia, queste caratteristiche possono essere considerate uno strumento molto sensibile per indirizzare la diagnosi già nelle prime ore dall'ammissione anche in centri non specializzati³².

Differenziare le forme genetiche di LE da quelle acquisite è di fondamentale importanza per le implicazioni prognostiche e terapeutiche che ne derivano, ma non è sempre facile. Anche se l'esordio è molto precoce nella maggior parte dei casi genetici, circa il 20% di essi sviluppa la malattia oltre i 2 anni di età¹², e casi a esordio più tardivo, fino al giovane adulto, sono segnalati sempre più frequentemente^{11,13,101}. Alcune informazioni cliniche e anamnestiche possono essere di aiuto nella diagnosi differenziale.

CRITERI DIAGNOSTICI PER LA LINFOISTIOCITOSI EMOFAGOCITICA

La diagnosi di LE può essere stabilita se i punti 1 o 2 sono soddisfatti:

1. Diagnosi molecolare consistente con LE
2. Criteri clinici e di laboratorio (5/8 criteri sottostanti):
 - Febbre
 - Splenomegalia
 - Citopenia (che riguarda ≥ 2 delle 3 linee nel sangue periferico):
 - Emoglobina < 9 g/dl (in lattanti < 4 settimane: Hb < 10 g/dl)
 - Piastrine $< 100 \times 10^9/l$
 - Neutrofili $< 1,0 \times 10^9/l$
 - Ipertrigliceridemia e/o Ipoalbuminemia:
 - Trigliceridi ≥ 265 mg/dl
 - Fibrinogeno ≤ 150 mg/dl
 - Emofagocitosi nel midollo osseo o milza o linfonodi
 - Attività NK ridotta o assente
 - Ferritina ≥ 500 μ g/l
 - CD25 (recettore IL-2) solubile ≥ 2400 U/ml

Nota. Elementi di supporto alla diagnosi sono: sintomi cerebrali con moderata pleiocitosi e/o iperproteinorachia, transaminasi e bilirubina elevate, incremento di LDH.

Tabella II

L'evidenza di consanguineità documentata o probabile, sebbene riportata in non più del 25% dei casi, può essere informativa. Ancora più rilevante è la storia di un fratello/sorella morto precocemente per cause non precisate ma riconducibili a infezione, meningite, sepsi, linfoma. La costellazione di segni e sintomi non è specifica e lo stesso vale per le anomalie biochimiche, nessuna delle quali è di per sé specifica. Ovviamente, laddove presente, un'alterazione del colore dei capelli o degli occhi indirizza fortemente la diagnosi. Un'accurata valutazione clinica e specifici esami di laboratorio dovrebbero essere effettuati per escludere le principali cause secondarie di LE. In particolare, la leucemia acuta è rapidamente esclusa dall'esecuzione, nelle prime ore dal ricovero, di un aspirato midollare. Sfortunatamente l'identificazione di patogeni comuni, specialmente virus, non aiuta nel distinguere le forme primitive da quelle secondarie, dato che gli stessi agenti noti come causa di LE acquisita possono anche scatenare la prima presentazione delle forme genetiche. Diverso è il caso della leishmaniosi viscerale che si può manifestare in modo molto simile alla LEF e la cui identificazione è spesso condizionata dall'eventuale endemia, e quindi dalla frequenza di osservazio-

ni e dalla consuetudine del pediatra a questa diagnosi. Infatti, in aree non endemiche, può facilmente sfuggire nella diagnosi differenziale, e questo fa comprendere perché casi sporadici di leishmaniosi viscerale siano stati trattati come LEF con conseguenze importanti¹⁰². È quindi raccomandato che lo studio diagnostico di una sospetta LE comprenda sempre anche un accurato esame morfologico del midollo osseo, per la ricerca diretta del parassita, ma anche la ricerca di anticorpi specifici oltre al genoma mediante PCR. Va precisato che il trattamento specifico per l'agente infettivo identificato può essere utile ma non sufficiente a controllare l'iperinfiammazione con la possibile eccezione della LE indotta dalla *Leishmania* che, nella maggior parte dei pazienti, può essere trattata efficacemente con il solo antiparassitario (gluconato di antimonio o, più recentemente, amfotericina B liposomiale).

Di fronte a un bambino o a un giovane adulto con il sospetto clinico di LE il medico dovrebbe richiedere uno screening funzionale presso un laboratorio di riferimento¹⁰³. Il difetto persistente di attività citotossica NK/LTC è molto indicativo per una LEF^{5-7,9}. Tuttavia questo test è complesso e rimane confinato a pochissimi laboratori di riferimento. Per facilitare

il percorso di diagnosi, quindi, sono stati sviluppati metodi di screening tali da confermare il sospetto clinico e indirizzare l'analisi di mutazioni¹⁰³⁻¹⁰⁵. Lo studio in citofluorimetria dei linfociti del sangue periferico per valutare la capacità di esprimere perforina permette di identificare i pazienti con LEF²¹. Basandosi sull'assunzione che l'attivazione della catena citotossica porta all'espressione del marcatore di superficie CD107a, abbiamo successivamente dimostrato che l'espressione di CD107a sulla membrana delle cellule citotossiche rappresenta uno strumento rapido per l'identificazione dei pazienti con una forma di LEF causata da un difetto di degranolazione, tra cui LEF3, LEF4, LEF5^{9,37,42}, e XLP¹⁰⁶.

Nei rimanenti pazienti con un fondato sospetto di LE genetica, nei quali lo screening citofluorimetrico non dimostra un difetto, diventa davvero indispensabile l'analisi dell'attività citotossica. L'evidenza di un difetto confermato e quindi persistente sosterrà fortemente la diagnosi di LE su base genetica, eventualmente di un sottotipo diverso o ancora non identificato.

L'analisi di mutazioni rimane il *gold standard* per la diagnosi delle forme genetiche di LE ed è obbligatoria per l'identificazione di un marker familiare. Secondo le conoscenze attuali un difetto genetico può essere assegnato a circa l'80% dei casi familiari, supportando l'indicazione al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE), permettendo la selezione di donatori familiari, il *counselling* e la diagnosi prenatale. La riattivazione della malattia in pazienti con ridotta attività NK/LTC e difetto genetico non assegnato, ma anche in un piccolo numero di famiglie con normale attività NK/LCT, suggerisce che ci siano almeno altri due geni correlati alla LEF ancora da identificare. A questo proposito l'applicazione degli attuali test funzionali può permettere di selezionare pazienti da sottoporre a studi addizionali come la microscopia confocale e l'espressione di proteina al fine di identificare i nuovi difetti e anche di aumentare le conoscenze del meccanismo della citotossicità nell'uomo.

MESSAGGI CHIAVE

- La linfoistiocitosi emofagocitica (LE) è una sindrome iper-infiammatoria causata da una risposta immunitaria incontrollata e inefficace, secondaria a infezione (EBV, CMV, e/o altri).
- Il meccanismo di fondo della sindrome consiste in un difetto dei linfociti T citotossici e dei Natural killer di riconoscere ed eliminare le cellule infettate da patogeni intracellulari.
- La forma familiare della malattia (LEF) è geneticamente eterogenea, determinata da geni diversi, tutti coinvolti nella esocitosi mediata da granuli. La terapia comprende inevitabilmente il trapianto.
- Quadri simili (sindrome da attivazione macrofagica, MAS) si possono osservare in malattie autoimmuni, spontaneamente o a seguito di trattamenti citoriduttivi o immunosoppressivi.
- La terapia (LEF a parte) si basa su protocolli antinfiammatori (classicamente, una combinazione di desametasone, etoposide e ciclosporina).
- Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è l'unica terapia risolutiva nei casi con difetto genetico.

TRATTAMENTO

La LE è una malattia aggressiva, che in passato si è dimostrata rapidamente fatale nella maggior parte dei pazienti con difetto genetico se non trattati appropriatamente^{12,94}. Pertanto, è necessario che in tutti i casi in cui il sospetto appaia fondato la terapia sia iniziata prontamente. Lo scopo immediato della terapia è quello di sopprimere lo stato iperinfiammatorio ed eliminare le cellule presentanti l'antigene, infettate dai patogeni; questo permetterà di rimuovere lo stimolo all'attivazione continua ma inefficace delle cellule citotossiche. Sulla base dell'ampio studio cooperativo HLH-94 condotto dalla *Histiocyte Society*, la combinazione di desametasone, etoposide e ciclosporina è definita come standard per la cura della LE⁹⁹. Con questa strategia la maggior parte dei pazienti ottiene un controllo della malattia entro 4-8 settimane.

Per coloro nei quali è stato documentato un difetto genetico il TCSE costituisce l'unico approccio terapeutico potenzialmente curativo¹⁰⁷. In assenza di un donatore familiare compatibile (documentatamente esente dalla malattia) si utilizzerà un donatore alternativo, sia esso adulto volontario non familiare selezionato attraverso le banche, ovvero una unità di sangue cordone¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Se è vero che un paziente con LEF deve essere avviato tempestivamente al trapianto, è altrettanto vero che l'indicazione deve essere attentamente valutata e confermata. Per evitare trapianti non necessari l'attuale strategia terapeutica suggerisce, per i pazienti con normale funzione allo screening o anche normale attività citotossica, di sospendere il trattamento dopo la remissione clinica che si ottiene di solito con le prime 8 settimane di terapia combinata. In caso di riattivazione di malattia, indice che il paziente è incapace di mantenere una condizione libera da malattia in assenza di terapia, il trapianto sarà preso in considerazione anche in assenza di un difetto genetico identificato. Sono allo studio programmi cooperativi di terapia che introducono l'uso di siero anti-linfocitario (*anti-thymocyte globuline, ATG*)¹¹¹. Dati derivanti dal modello animale¹⁷ suggeriscono che il blocco dell'attività dell'IFN- γ possa indurre il controllo della malattia senza citoriduzione, con possibili future implicazioni terapeutiche.

Indirizzo per corrispondenza:

Maurizio Aricò
e-mail: m.arico@meyer.it

Bibliografia

1. Jenkins MR, Griffiths GM. The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Curr Opin Immunol* 2010;22:308-13.
2. Trambas CM, Griffiths GM. Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* 2003;4:399-403.
3. de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol* 2010;10:568-79.
4. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin mediated target-cell death and im-

5. mune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:940-52.
5. Perez N, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Fischer A, Griscelli C. Impaired natural killer activity in lymphohistiocytosis syndrome. *J Pediatr* 1984;104:569-73.
6. Aricò M, Nespoli L, Maccario R, et al. Natural cytotoxicity impairment in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Arch Dis Child* 1988;63:292-6.
7. Schneider EM, Lorenz I, Müller-Rosenberger M, Steinbach G, Kron M, Janka-Schaub GE. Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytotoxicity but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis. *Blood* 2002;100:2891-8.
8. Ishii E, Ohga S, Imashuku S, et al. Review of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in children with focus on Japanese experiences. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53:209-23.
9. Marcenaro S, Gallo F, Martini S, et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood* 2006;108:2316-23.
10. Farquhar JW, Claireaux AE. Familial haemophagocytic reticulosis. *Arch Dis Child* 1952;27:519-25.
11. Clementi R, Emmi L, Maccario R, et al. Adult onset and atypical presentation of hemophagocytic lymphohistiocytosis in siblings carrying PRF1 mutations. *Blood* 2002;100:2266-7.
12. Aricò M, Janka G, Fischer A, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Leukemia* 1996;10:197-203.
13. Allen M, De Fusco C, Legrand F, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: how late can the onset be? *Haematologica* 2001;86:499-503.
14. Cetica V, Pende D, Griffiths GM, Aricò M. Molecular basis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica* 2010;95:538-41.
15. Ohadi M, Lalloz MR, Sham P, et al. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* 1999;64:165-71.
16. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999;286:1957-9.
17. Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, Marrack P. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 2004;104:735-43.
18. Clementi R, zur Stadt U, Savoldi G, et al. Six novel mutations in the PRF1 gene in children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 2001;38:643-6.
19. Göransdotter Ericson K, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S, et al. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet* 2001;68:590-7.
20. Feldmann J, Le Deist F, Ouachée-Charadin M, et al. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2002;117:965-72.

21. Kogawa K, Lee SM, Villanueva J, Marmer D, Sumegi J, Filipovich AH. Perforin expression in cytotoxic lymphocytes. *Blood* 2002;99:61-6.
22. Suga N, Takada H, Nomura A, et al. Perforin defects of primary haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Br J Haematol* 2002;116:346-9.
23. Ueda I, Morimoto A, Inaba T, et al. Characteristic perforin gene mutations of haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Br J Haematol* 2003;121:503-10.
24. Molleran Lee S, Villanueva J, Sumegi J, et al. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 2004;41:137-44.
25. Trizzino A, zur Stadt U, Ueda I, et al. Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis due to perforin mutations. *J Med Genet* 2008;45:15-21.
26. zur Stadt U, Kabisch H, Janka G, Schneider EM. Rapid LightCycler assay for identification of the perforin codon 374 Trp → stop mutation in patients and families with hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). *Med Pediatr Oncol* 2003;41:26-9.
27. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 2003;115:461-73.
28. Nagai K, Yamamoto K, Fujiwara H, et al. Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One* 2010;5:e14173.
29. Rudd E, Bryceson YT, Zheng C, et al. Spectrum and clinical presentations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 2008;45:134-41.
30. Santoro A, Cannella S, Bossi G, et al. Novel Munc13-4 mutations in children and young adult patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 2006;43: 953-60.
31. Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, et al. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat* 2006;27:62-8.
32. Sieni E, Cetica V, Santoro A, et al. Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. *J Med Genet* 2011;48:343-52.
33. Santoro A, Cannella S, Trizzino A, et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defect in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. *Haematologica* 2008;93:1086-90.
34. Ueda I, Ishii E, Morimoto A, Ohga S, Sako M, Imashuku S. Correlation between phenotypic heterogeneity and gene mutational characteristics in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL). *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:482-8.
35. Yoon HS, Kim HJ, Yoo KH, et al. UNC13D is the predominant causative gene with recurrent splicing mutations in Korean patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica* 2010;95:622-6.
36. zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type 4 to chromosome 6q24 and identification of mutation in syntaxin 11. *Hum Mol Genet* 2005;14:827-34.
37. Bryceson YT, Rudd E, Zheng C, et al. Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients. *Blood* 2007;110:1906-15.
38. Rudd E, Göransdotter Ericson K, Zheng C, et al. Spectrum and clinical implications of syntaxin 11 gene mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: association with disease-free remissions and haematopoietic malignancies. *J Med Genet* 2006;43:e14.
39. Yamamoto K, Ishii E, Horiuchi H, et al. Mutations of syntaxin 11 and SNAP23 genes as causes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis were not found in Japanese people. *J Hum Genet* 2005;50:600-3.
40. Marsh RA, Satake N, Biroshchak J, et al. STX11 mutations and clinical phenotypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in North America. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:134-40.
41. zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am J Hum Genet* 2009;85:482-92.
42. Côte M, Ménager MM, Burgess A, et al. Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *J Clin Invest* 2009;119:3765-73.
43. Cetica V, Santoro A, Gilmour KC, et al. STXBP2 mutations in children with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 5. *J Med Genet* 2010;47:595-600.
44. Meeths M, Entesarian M, Al-Herz W, et al. Spectrum of clinical presentations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 patients with mutations in STXBP2. *Blood* 2010;116:2635-43.
45. Henter JI, Horne A, Aricò M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:124-31.
46. Béguez-César A. Neutropenia crónica maligna familiar con granulaciones atípicas de los leucocitos. *Bol Soc Cubana Pediatr* 1943;15:900-22.
47. Chédiak MM. New leukocyte anomaly of constitutional and familial character. *Rev Hematol* 1952;7:362-7.
48. Higashi O. Congenital gigantism of peroxidase granules; the first case ever reported of qualitative abnormality of peroxidase. *Tohoku J Exp Med* 1954;59:315-32.
49. Griscelli C, Durandy A, Guy-Grand D, Dauguillard F, Herzog C, Prunieras M. A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am J Med* 1978;65:691-702.
50. Introne W, Boissy RE, Gahl WA. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chédiak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metab* 1999;68:283-303.
51. Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chédiak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996;382:262-5.
52. Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chédiak-Higashi syndrome. *Nature Genet* 1996;14:307-11.
53. Kwong J, Roundabush FL, Hutton Moore P, et al. Hrs interacts with SNAP-25 and regulates Ca²⁺-dependent exocytosis. *J Cell Sci* 2000;113:2273-84.
54. Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, Gunay-Aygun M, Gahl WA. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008;9:359-86.
55. Bossi G, Griffiths GM. CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol* 2005;17:87-94.
56. Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM. Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chédiak-Higashi syndrome patients. *Traffic* 2000;1:435-44.
57. Karim MA, Suzuki K, Fukai K, et al. Apparent genotype-phenotype correlation in childhood, adolescence, and adult Chédiak-Higashi syndrome. *Am J Med Genet* 2002;108:16-22.
58. Hermansky F, Pudlak P. Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood* 1959;14:162-9.
59. Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science* 2004;305:55-9.
60. Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, et al. Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol* 2003;4:1111-20.
61. Dell'Angelica EC, Ohno H, Ooi CE, Rabinovich E, Roche KW, Bonifacino JS. AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J* 1997;16:917-28.
62. Massullo P, Druhan LJ, Bunnell BA, et al. Aberrant subcellular targeting of the G185R neutrophil elastase mutant associated with severe congenital neutropenia induces premature apoptosis of differentiating promyelocytes. *Blood* 2005;105:3397-404.
63. Enders A, Zieger B, Schwarz K, et al. Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II. *Blood* 2006;108:81-7.
64. Klein C, Philippe N, Le Deist F, et al. Partial albinism with immunodeficiency (Griscelli syndrome). *J Pediatr* 1994;125:886-95.
65. Meeths M, Bryceson YT, Rudd E, et al. Clinical presentation of Griscelli syndrome type 2 and spectrum of RAB27A mutations. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:563-72.
66. Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, et al. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 2000;25:173-6.
67. Ménasché G, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G. Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol Rev* 2005;203:165-79.
68. Purtilo DT, Cassel CK, Yang JP, Harper R. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1975;1:935-40.
69. Sumegi J, Huang D, Lanyi A, et al. Correlation of mutations of the SH2D1A gene and Epstein-Barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 2000;96:3118-25.
70. Gilmour KC, Cranston T, Jones A, et al. Diagnosis of X-linked lymphoproliferative disease by analysis of SLAM-associated protein expression. *Eur J Immunol* 2000;30:1691-7.
71. Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, et al. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 1998;20:129-35.

72. Sayos J, Wu C, Morra M, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998;395:462-9.
73. Parolini S, Bottino C, Falco M, et al. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus infected cells. *J Exp Med* 2000;192:337-46.
74. Dong Z, Veillette A. How do SAP family deficiencies compromise immunity? *Trends Immunol* 2010;31:295-302.
75. Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM Family Receptors and SAP Adaptors in Immunity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:665-705.
76. Kanegane H, Ito Y, Ohshima K, et al. X-linked lymphoproliferative syndrome presenting with systemic lymphocytic vasculitis. *Am J Hematol* 2005;78:130-3.
77. Booth C, Gilmour KC, Veys P, et al. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood* 2011;117:53-62.
78. Aricò M, Danesino C, Pende D, Moretta L. Pathogenesis of haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2001;114:761-9.
79. Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006;444:110-4.
80. Marsh RA, Madden L, Kitchen BJ, et al. XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 2010;116:1079-82.
81. Rumble JM, Oetjen KA, Stein PL, Schwartzberg PL, Moore BB, Duckett CS. Phenotypic differences between mice deficient in XIAP and SAP, two factors targeted in X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP). *Cell Immunol* 2009;259:82-9.
82. Sumegi J, Barnes MG, Nestheide SV, et al. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from children with active hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2011;117:e151-60.
83. Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, et al. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* 2011;117:1522-9.
84. Filipovich AH, Zhang K, Snow AL, Marsh RA. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood* 2010;116:3398-408.
85. Risdall RJ, McKenna RW, Nesbit ME, et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer* 1979;44:993-1002.
86. Jaffe ES, Costa J, Fauci AS, Cossman J, Tsokos M. Malignant lymphoma and erythrophagocytosis simulating malignant histiocytosis. *Am J Med* 1983;75:741-9.
87. Janka G, Imashuku S, Elinder G, Schneider M, Henter JL. Infection- and malignancy-associated hemophagocytic syndromes. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998;12:435-44.
88. Roupheal NG, Talati NJ, Vaughan C, Cunningham K, Moreira R, Gould C. Infections associated with haemophagocytic syndrome. *Lancet Infect Dis* 2007;7:814-22.
89. Davi S, Consolaro A, Guseinova D, et al. An international consensus survey of diagnostic criteria for macrophage activation syndrome in systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:764-8.
90. Ravelli A, Magni-Manzoni S, Pistorio A, et al. Preliminary diagnostic guidelines for macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr* 2005;146:598-604.
91. Hazen MM, Woodward AL, Hofmann I, et al. Mutations of the hemophagocytic lymphohistiocytosis-associated gene UNC13D in a patient with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;50:567-70.
92. Villanueva J, Lee S, Giannini EH, et al. Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R30-7.
93. Grom AA, Villanueva J, Lee S, Goldmuntz EA, Passo MH, Filipovich A. Natural killer cell dysfunction in patients with systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *J Pediatr* 2003;142:292-6.
94. Janka GE. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Pediatr* 1983;140:221-30.
95. Horne A, Trottestam H, Aricò M, et al. Frequency and spectrum of central nervous system involvement in 193 children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2008;140:327-35.
96. Haddad E, Sulis ML, Jabado N, Blanche S, Fischer A, Tardieu M. Frequency and severity of central nervous system lesions in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1997;89:794-800.
97. Goo HW, Weon YC. A spectrum of neuro-radiological findings in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Radiol* 2007;37:1110-7.
98. Decaminada N, Cappellini M, Mortilla M, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical and neuroradiological findings and review of the literature. *Childs Nerv Syst* 2010;26:121-7.
99. Henter JL, Samuelsson-Horne A, Aricò M, et al. Histiocyte Society. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100:2367-73.
100. Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:127-31.
101. Nagafuji K, Nonami A, Kumano T, et al. Perforin gene mutations in adult-onset hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica* 2007;92:978-81.
102. Gagnaire MH, Galambrun C, Stéphan JL. Hemophagocytic syndrome: A misleading complication of visceral leishmaniasis in children: a series of 12 cases. *Pediatrics* 2000;106:E58.
103. Aricò M, Allen M, Brusa S, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: proposal of a diagnostic algorithm based on perforin expression. *Br J Haematol* 2002;119:180-8.
104. Johnson TS, Villanueva J, Filipovich AH, Marsh RA, Bleesing JJ. Contemporary diagnostic methods for hemophagocytic lymphohistiocytosis disorders. *J Immunol Methods* 2011;364:1-13.
105. Wheeler RD, Cale CM, Cetica V, Aricò M, Gilmour KC. A novel assay for investigation of suspected familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2010;150:727-30.
106. Marsh RA, Bleesing JJ, Filipovich AH. Using flow cytometry to screen patients for X-linked lymphoproliferative disease due to SAP deficiency and XIAP deficiency. *J Immunol Methods* 2010;362:1-9.
107. Fischer A, Cerf-Bensussan N, Blanche S, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for erythrophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr* 1986;108:267-70.
108. Ouachée-Chardin M, Elie C, de Saint Basile G, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis: a single-center report of 48 patients. *Pediatrics* 2006;117:e743-50.
109. Marsh RA, Vaughn G, Kim MO, et al. Reduced-intensity conditioning significantly improves survival of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2010;116:5824-31.
110. Cesaro S, Gazzola MV, Marson P, et al. Successful engraftment and stable full donor chimerism after myeloablation with thiopeta, fludarabine, and melphalan and CD34-selected peripheral allogeneic stem cell transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol* 2003;72:143-6.
111. Mahlaoui N, Ouachée-Chardin M, de Saint Basile G, et al. Immunotherapy of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with antithymocyte globulins: a single-center retrospective report of 38 patients. *Pediatrics* 2007;120:e622-8.

