

# MALATTIA GRANULOMATOSA CRONICA

## Una diagnosi che può sfuggire

<sup>1</sup>CLAUDIO PIGNATA, <sup>2</sup>LUCIANO BALDUCCI, <sup>3</sup>MARIA BARDARE, <sup>4</sup>DOMENICO DE MATTIA, <sup>5</sup>MAURO GIACCA,

<sup>6</sup>ALESSANDRO VENTURA, per il Gruppo di Studio sulla CGD della Società Italiana di Immunologia Pediatrica

<sup>1</sup>Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II", Napoli; <sup>2</sup>Clinica Pediatrica, Università "La Sapienza", Roma;

<sup>3</sup>Clinica Pediatrica 1<sup>a</sup>, Università di Milano; <sup>4</sup>Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università di Bari;

<sup>5</sup>International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste; <sup>6</sup>Clinica Pediatrica, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

---

**CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE**  
(M&B 3, 155-160, 1998)

**Key words**  
CGD, Molecular genetics

### Summary

*This is a comprehensive review article aimed at providing to paediatricians the basic knowledge on CGD and at improving the quality of care of patients affected by this rare disorder of cellular immune response. Since early diagnosis is very important, signs and symptoms that should lead paediatricians to suspect a CGD are illustrated. A diagnostic approach based on first level screening investigations and second level confirmatory tests is also suggested. The biochemical and molecular features of the disease are analyzed, as they provide the basis for understanding the clinical heterogeneity of the disease, as well as the innovative therapeutic strategies that are being at present evaluated.*

**L**a Malattia Granulomatosa Cronica (CGD) è una rara sindrome da immunodeficienza su base ereditaria, trasmessa con meccanismo recessivo legato al cromosoma X, o con meccanismo autosomico recessivo<sup>1</sup>.

La sua incidenza nella popolazione è di circa 1 nuovo caso ogni 250-500.000 nati<sup>2</sup> e non sembra vi sia alcuna predilezione etnica. Poiché il numero dei casi diagnosticati è inferiore rispetto al numero atteso nella popolazione generale, è probabile che un discreto numero di pazienti non venga diagnosticato. Va sottolineato, peraltro, come il quadro di esordio sia spesso aspecifico e non sia predittivo del grado di gravità della malattia conclamata. Ciò contribuisce, in parte, al ritardo nella diagnosi, che di conseguenza può determinare interventi terapeutici tardivi.

La malattia è caratterizzata dall'incapacità dei fagociti (neutrofilii, eosinofili, monociti e macrofagi) di generare i radicali dell'ossigeno che permettono l'uccisione dei germi che segue la fagocitosi. Il quadro clinico è pertanto caratterizzato dalla presenza di numerose infezioni piogeniche o micotiche e dal caratteristico aspetto granulomatoso delle lesioni infiammatorie nei preparati istologici, che ha dato il nome alla malattia. Tali granulomi sono costituiti da cellule gi-

ganti e macrofagi ripieni di lipidi e, frequentemente, determinano ostruzioni meccaniche del tratto gastrointestinale e urinario. La CGD è un esempio di malattia genetica ad espressione eterogenea, al cui fenotipo clinico sottendono numerosi meccanismi patogenetici, che coinvolgono differenti molecole che partecipano alla produzione dell'anione superossido<sup>3</sup>.

Recentemente, un considerevole ampliamento delle conoscenze sulle basi molecolari della malattia ha permesso di identificare vari geni, le cui alterazioni determinano un quadro clinico di CGD<sup>4,5</sup>. Tali conoscenze hanno permesso di spiegare, almeno in parte, l'eterogeneità genetica della malattia<sup>6,7</sup>. La caratterizzazione molecolare del singolo caso rappresenta, quindi, una necessità clinica, oltre ad avere importanza per le finalità di consulenza genetica e diagnosi prenatale.

Lo scopo di questo articolo è quello di riassumere le principali caratteristiche cliniche della CGD, con particolare riferimento ai sintomi di presentazione della malattia, che in alcuni casi possono essere alquanto aspecifici, e di fornire delle linee guida utili per il riconoscimento precoce di un numero maggiore di casi. Verranno, inoltre, discussi elementi di biochimica cellulare e genetica

molecolare, che possano essere di ausilio per il pediatra nella fase del riconoscimento precoce della malattia e nell'affiancare il Centro specialistico di riferimento per un'appropriata gestione terapeutica.

**QUADRO CLINICO**

I pazienti affetti da CGD manifestano i primi segni generalmente entro i primi 2 anni di vita. Si è, tuttavia, già accennato alla eterogeneità di espressione della malattia. La forma legata al cromosoma X sembra avere un esordio più precoce, mentre le forme autosomiche recessive sembrano avere un esordio più tardivo e, in alcuni casi, si manifestano in giovani adulti. Peraltro, in alcuni casi è stato segnalato che le infezioni possono essere meno frequenti e di lieve entità, e ciò ha fatto sì che la diagnosi venisse posta in età adulta<sup>8</sup>. La sintomatologia è dipendente dalla localizzazione delle infezioni. Tuttavia, alcune manifestazioni morbose ricorrono più frequentemente di altre, e coinvolgono la cute, i linfonodi, i polmoni, gli organi ipocondriaci e il tratto gastrointestinale.

In un recente studio retrospettivo è stata analizzata l'incidenza delle differenti manifestazioni morbose in una casistica di 48 pazienti affetti da CGD<sup>9</sup>. Oltre il 70% dei pazienti aveva presentato infezioni dei polmoni, dei linfonodi o della cute, e una percentuale considerevole della casistica (15-40%) aveva presentato infezioni intestinali, o franchi episodi di peritonite, ascessi epatici o perirettali, osteomieliti, artriti settiche e infezioni delle vie urinarie.

In *Tabella I* sono rappresentate le principali localizzazioni delle infezioni, raggruppate in molto frequenti (> 60% degli episodi infettivi), frequenti (20-60%), e poco frequenti o sporadiche (< 20%). I dati illustrati sono relativi alle manifestazioni cliniche di grandi casistiche<sup>9,16</sup> comparate tra loro<sup>1</sup>. Va segnalato che a fronte dell'aspecificità del quadro clinico, alcune manifestazioni, quali le infezioni da *Aspergillus*, le piodermiti recidivanti, l'ascesso granulomatoso epatico, diagnosi atipiche di tubercolosi e l'osteomielite delle ossa metatarsali resistente al trattamento, indirizzano fortemente il sospetto verso la diagnosi di malattia cronica granulomatosa.

In *Tabella II* sono elencati alcuni "campanelli di allarme" che devono far sospettare una CGD.

Allo scopo di favorire il pediatra nel

riconoscimento precoce di futuri casi, abbiamo ritenuto utile analizzare i sintomi di presentazione della casistica di 31 pazienti seguiti da 9 Centri italiani nell'ambito delle attività del Gruppo di Studio policentrico sulla CGD. La *Tabella III* indica che l'ascesso epatico ha rappresentato il problema clinico più frequente all'esordio della malattia. Segue per frequenza la colite granulomatosa (diagnosi differenziale con il morbo di Crohn!) associata o meno ad ascessi/fistole perianali.

I patogeni più frequentemente in causa sono quei germi che producono catalasi, e che, quindi, sono in grado di degradare la quota di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prodotta dai batteri stessi. Al contrario, nel caso di infezione con germi non produttori di cata-

lasi, tale quota residua di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permette il "suicidio" del germe stesso. I microrganismi più frequentemente in causa sono lo *Staphylococcus aureus*, l'*Aspergillus fumigatus*, la *Candida* e l'*Escherichia coli*. Infezioni possono essere causate anche da *Salmonella*, *Klebsiella*, vari ceppi di *Pseudomonas* e saprofiti, quali *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter*. Va sottolineato che infezioni da *Aspergillus*, *Serratia* o *Candida* devono sempre far porre il sospetto di una CGD.

**CONFERMA DIAGNOSTICA DEL SOSPETTO CLINICO DI CGD**

Si basa sulla dimostrazione del deficit

LOCALIZZAZIONE DEI PROCESSI INFETTIVI NELLA MALATTIA GRANULOMATOSA CRONICA		
Molto frequenti (>60%)	Frequenti (20-60%)	Sporadiche (<20%)
Polmoni	Orecchio medio	Seni paranasali
Linfonodi	Sistema osseo	Apparato urinario
Cute	Regione perirettale	Sistema nervoso centrale e meningi
	Sistemica (setticemia)	Pericardio

(Modificata da Curnutte JT, *Clin Immunol Immunopathol* 67, 3, s2, 1993)

Tabella I

" CAMPANELLI DI ALLARME" CHE DEVONO FAR PENSARE A UNA CGD
Infezione da <i>Aspergillus</i> sp. a qualsiasi età
Infezione da <i>Serratia marcescens</i> a qualsiasi età
Polmonite neonatale (soprattutto da <i>Aspergillus</i> )
Osteomielite metatarsale
Linfadenite da stafilococco nel lattante
Ascesso epatico
Colite granulomatosa (con o senza infezione da patogeno intestinale)
Ostruzione delle vie aeree e/o digestive e/o urinarie da flogosi granulomatosa

Tabella II

MANIFESTAZIONE CLINICA PRINCIPALE DI ESORDIO IN 31 BAMBINI CON CGD SEGUITI IN 9 CENTRI ITALIANI	
Ascesso epatico	9
Colite granulomatosa/ascessi-fistole perianali	8
Ostruzione vie aeree	4
Osteomielite metatarsale da <i>Serratia</i>	2
Linfadenite sottomandibolare da <i>Candida</i> o stafilococco	2
Ascessi cutanei recidivanti multipli	2
Broncopolmonite a lenta risoluzione	2
Broncopolmonite neonatale da <i>Aspergillus</i>	1
Infezione urinaria da stenosi granulomatosa ureterale	1

Tabella III

del burst respiratorio nei granulociti neutrofili, mediante il **Test del nitro blue tetrazolium (NBT)**.

È un esame di screening qualitativo e semiquantitativo. In presenza di superossido l'NBT, giallo e solubile, viene ridotto a formazano, reagente blu scuro e insolubile che precipita nelle cellule. Questo test è in grado di:

1. identificare i soggetti affetti da CGD XL e AR;
2. identificare i portatori di CGD XL, i cui valori saranno compresi fra il 5 e il 90% del normale.

Non consente invece di individuare i portatori delle forme autosomiche recessive. Inoltre alcune forme di CGD, sia XL che AR, possono conservare una parziale attività enzimatica, rendendo meno grave l'espressione clinica della malattia, e quindi più difficile l'identificazione dei soggetti affetti. Questo test, grazie alla facilità e rapidità di esecuzione, rappresenta il più valido strumento per diagnosticare pazienti che presentino sintomi di sospetto.

Nei casi fortemente sospetti, in cui il test del NBT non sia informativo e, in ogni caso, per il completamento dell'iter diagnostico, sono disponibili le seguenti indagini:

□ **Test del citocromo "C"**: consente una misura quantitativa del superossido prodotto dai neutrofili e monociti stimolati con forbolo miristato acetato (PMA). La riduzione del ferricitocromo "C" viene misurata in spettrofotometria a 550 nm.

□ **Misurazione dei prodotti reattivi dell'ossigeno mediante chemiluminescenza o analisi citometrica**. Tale test si basa sulla capacità dei fagociti stimolati di interagire con substrati ossidabili che, tornando allo stato energetico di partenza, emettono luce, misurabile per mezzo di un luminometro, di uno scintillatore beta in fase liquida o di un citometro a flusso. La citometria a flusso rappresenta attualmente la tecnologia di più ampio utilizzo. Questo strumento diagnostico dovrebbe essere disponibile presso ogni Centro di riferimento. Il consumo di  $O_2$  può essere misurato in sospensione di fagociti stimolati usando un elettrodo a ossigeno.

□ Identificazione del difetto della subunità proteica del complesso del citocromo mediante **analisi in Western-Blot** su frazioni di membrana di granulociti impiegando anticorpi specifici per le diverse subunità del citocromo C. Questa tecnica consente, quindi, l'individuazione della proteina che si presume sia alterata, e che pertanto sarà assente o avrà mobilità elettroforetica anomala.

La Figura 1 illustra un diagramma di

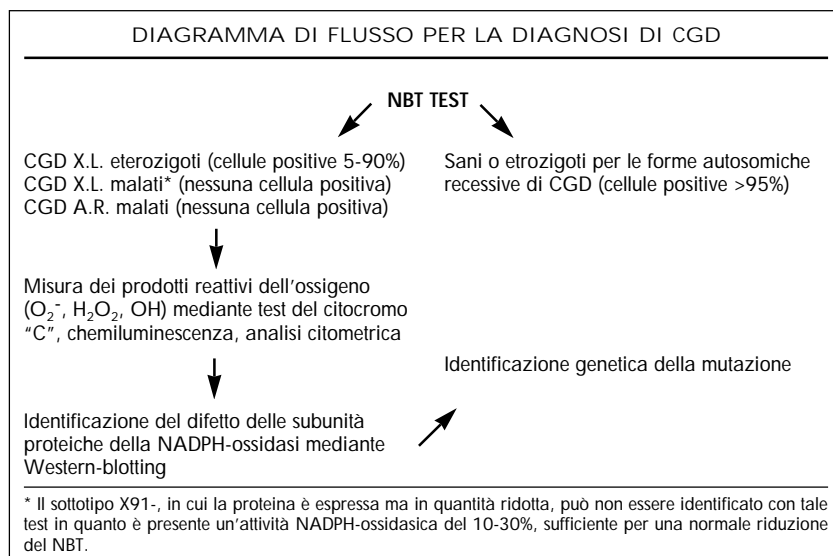


Figura 1. Diagramma di flusso per la diagnosi di CGD.

flusso che consente la diagnosi nella maggior parte delle forme di CGD.

Una possibile proposta diagnostica per livelli, in un contesto di integrazione tra Divisioni pediatriche periferiche e Centri di riferimento, potrebbe prevedere, quale accertamento di primo livello nei casi sospetti, l'esecuzione del test del NBT, qualora tale test sia eseguibile. In caso di positività, o anche in caso di esito negativo in pazienti con storia fortemente suggestiva di CGD, bisognerà prevedere il completamento dell'iter diagnostico presso il Centro regionale di riferimento; in questa seconda fase diagnostica è indicato l'impiego dei test funzionali indicati in precedenza e l'identificazione delle subunità proteiche. A nostro avviso, tenuto conto della possibile correlazione tra genotipo e gravità della forma clinica, è auspicabile che ogni paziente diagnosticato riceva anche la caratterizzazione molecolare.

Tenuto conto dell'esiguità del numero dei pazienti affetti da CGD, riteniamo anche auspicabile che i pazienti affetti da questa patologia siano seguiti da un unico Centro di riferimento regionale, così da garantire il più alto standard assistenziale.

#### DIAGNOSI PRENATALE

In passato la diagnosi prenatale si basava sulla ricerca delle alterazioni biochimiche della malattia nei fagociti ottenuti da sangue di cordone (mediante funicolocentesi), prelevato alla ventesima setti-

mana di gestazione. La clonazione dei geni che codificano per le varie subunità della NADPH-ossidasi permette oggi l'identificazione della mutazione e quindi anche la diagnosi prenatale mediante analisi del DNA dei villi coriali, ottenibile sin dalla 10<sup>a</sup> settimana di gestazione, o amniocentesi, eseguibile alla 15-16<sup>a</sup> settimana di gestazione. La diagnosi prenatale è possibile solo in quei casi in cui sia già stata identificata la mutazione in un altro membro della famiglia affetto dalla malattia. È questo uno dei motivi per cui è opportuno effettuare la caratterizzazione genetica in tutti i casi identificati.

#### BASI BIOCHIMICHE E MOLECOLARI DELLA CGD

L'attività microbica dei fagociti è essenzialmente legata alla capacità della cellula di produrre ione superossido ( $O_2^-$ ) e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), cui segue la formazione di ipoclorito (HOCl) ad opera della mieloperossidasi lisosomiale<sup>1,3,4</sup>. Tali sostanze hanno un'intensa attività battericida e, quindi, permettono la rapida uccisione dei germi, che segue la fagocitosi. Il processo ha inizio con l'attivazione dei fagociti, che si verifica a seguito di varie stimolazioni sia con fattori solubili che corpuscolati. In condizioni di normalità, l'esposizione dei fagociti a germi opsonizzati determina una rapida attivazione metabolica, che si accompagna a un incremento fino a 100 volte del consumo di ossigeno ("respiratory burst").

Un ruolo fondamentale nella produzione di ione superossido è svolto dal sistema della NADPH-ossidasi. Tale enzima è una flavoproteina di membrana che trasferisce elettroni dalla NADPH all'ossigeno molecolare con formazione di ione superossido. Alterazioni del sistema della NADPH-ossidasi causano la CGD. La Figura 2 illustra schematicamente il complesso molecolare della NADPH-ossidasi e le principali reazioni biochimiche che consentono la trasmissione del segnale.

Il complesso molecolare NADPH-ossidasi è costituito da 4 subunità principali. Due molecole, p22 e gp91 *phox*, sono costitutivamente endovate in membrana e costituiscono il complesso denominato citocromo b558. Altri 2 elementi, rispettivamente di 47 e 67 kDa, sono presenti in cellule a riposo esclusivamente nel citoplasma. L'attivazione cellulare induce la traslocazione di questi elementi in membrana, determinando, quindi, il definitivo assemblaggio del complesso in grado di svolgere piena attività ossidativa. L'attivazione di elementi intracellulari mediante processi di fosforilazione sembra avere un ruolo importante nella trasmissione del messaggio e nella fase di traslocazione di elementi intracitoplasmici in membrana per l'assemblaggio del macrocomplesso molecolare<sup>3</sup>. Tali conoscenze di biochimica molecolare hanno fornito un considerevole contributo alla comprensione della malattia, in quanto hanno permesso di discriminare forme fenotipicamente simili ma legate a differenti alterazioni molecolari. È presumibile, inoltre, che in un prossimo futuro le conoscenze sui meccanismi di regolazione mediante fosforilazione del complesso enzimatico si amplieranno ulteriormente e forniranno pertanto un valido presupposto per interventi farmacologici di potenziamento funzionale mirato.

Sulla base dei difetti finora individuati è quindi possibile, almeno in parte, spiegare l'eterogeneità genetica della CGD. La Tabella IV illustra le principali forme molecolari della malattia e le relative caratteristiche.

Nella maggior parte dei casi di CGD, la malattia viene trasmessa come carattere recessivo legato al cromosoma X. Questi casi sono dovuti a mutazione del gene che codifica per la subunità gp91 *phox*. In alcuni casi la quota di proteina è ridotta, ma non assente. Tale forma è generalmente associata a una considerevole quota di attività enzimatica residua ed è, pertanto, possibile incontrare difficoltà diagnostiche.

Le forme autosomiche recessive possono essere legate a mutazioni di ciascuna delle altre 3 subunità. Tra queste, la più frequente sembra essere quella lega-

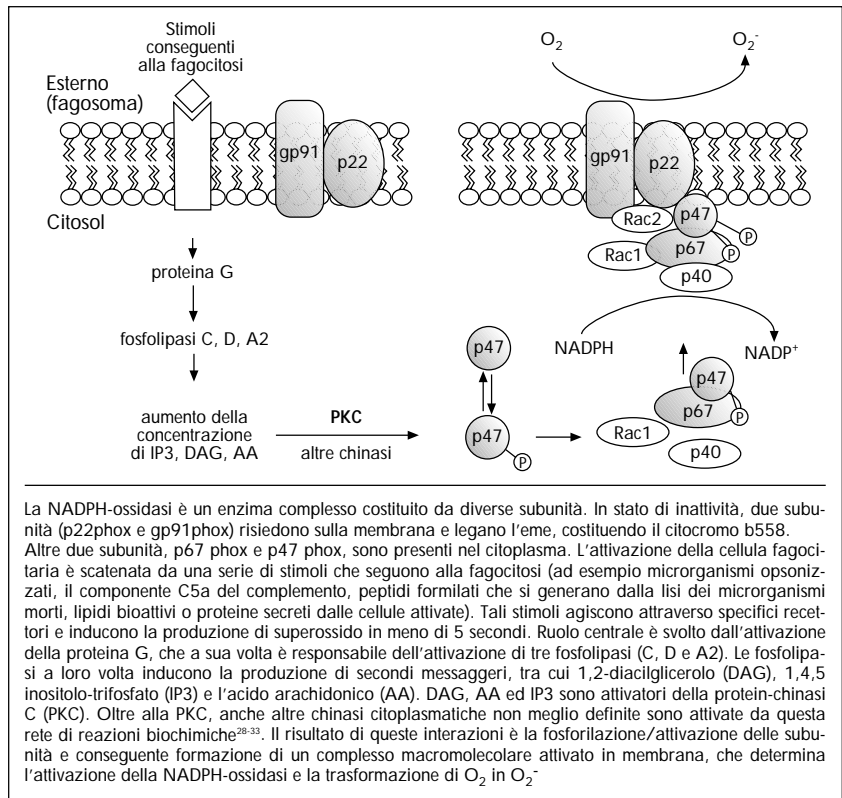


Figura 2. Schema rappresentativo dei meccanismi biochimici che permettono la trasmissione del segnale e l'attivazione della NADPH-ossidasi di membrana dei fagociti.

BASI MOLECOLARI DEL DIFETTO NELLA MALATTIA GRANULOMATOSA CRONICA				
Molecola alterata	Trasmissione e sottotipi	NBT (score)	Frequenza (% di casi)	Citocromo b558
gp91 <i>phox</i>	X91°	0	50	0
	X91-	80-100	3	basso
	X91+	0	3	N
p22 <i>phox</i>	A22°	0	5	0
	A22+	0	1	N
p47 <i>phox</i>	A	0	33	N
p67 <i>phox</i>	A	0	5	N

Tabella IV

ta ad alterazioni della subunità p47 *phox*, responsabile di circa il 30% dei casi.

**STRATEGIE TERAPEUTICHE NELLA CGD**

La prognosi per i pazienti affetti da CGD è notevolmente migliorata dagli anni '50, epoca in cui furono descritti i primi casi, la maggior parte dei quali ra-

ramente superava i sette anni di età. Il miglioramento della prognosi è stato ottenuto grazie ai molteplici approcci terapeutici messi a punto in questi anni, indirizzati a migliorare sia la prognosi "quoad vitam" che quella "quoad valetudinem"<sup>17</sup>. Quale norma generale nell'approccio al paziente con CGD va ricordato che ogni episodio infettivo è potenzialmente pericoloso, per cui è utile fare



ogni sforzo per isolare il microrganismo in causa, ponendo particolare attenzione all'*Aspergillus*.

#### STRATEGIE GENERALI PER LA PREVENZIONE DELLE INFEZIONI

Gli elementi essenziali della terapia attuale sono elencati nei seguenti punti:

□ *Prevenzione delle infezioni* sostenute da particolari tipi di patogeni, basata sull'uso estensivo delle vaccinazioni e sull'igiene sia personale (pulizia accurata del cavo orale e della cute, in particolare se lesa) sia ambientale (evitare ambienti con eccessiva inquinazione quale fumo da tabacco o presenza di piante in decomposizione e, quindi, ricche di *Aspergillus*).

□ *Profilassi con antibiotici* in grado di attraversare la membrana cellulare e fagocitaria e di concentrarsi all'interno delle cellule ove sopravvivono "protetti" i batteri fagocitati.

Solo alcuni antibiotici hanno questa capacità: rifampicina, teicoplanina, azitromicina per i batteri Gram-positivi; ciprofloxacina, fosfomicina, cotrimossazolo per i batteri Gram-negativi<sup>18</sup>; itraconazolo e amfotericina B per i miceti (*Candida*, *Aspergillus* ecc.)<sup>19</sup>. L'associazione tra cotrimossazolo e itraconazolo è generalmente utilizzata per la profilassi a lungo termine delle infezioni.

□ *Profilassi con interferone gamma*. Tale molecola è una citochina in grado di potenziare la produzione di metaboliti tossici dell'ossigeno da parte dei fagociti e di indurre un più efficace killing batterico, micotico e di patogeni protozoari. Il reale meccanismo di azione è tuttora sconosciuto<sup>20</sup>. Alcuni importanti studi multicentrici hanno dimostrato una significativa riduzione della frequenza di infezioni gravi nei soggetti trattati con interferone gamma. Ciò ne giustifica l'uso in profilassi contro le infezioni nei pazienti con CGD, preferibilmente in associazione con la terapia antibiotica e antimicotica<sup>21</sup>.

□ *Drenaggio o resezione* di granulomi resistenti alla terapia medica. Tale intervento è, talvolta, indicato anche a fini diagnostici.

#### ALTRI POSSIBILI INTERVENTI TERAPEUTICI

Di seguito vengono elencati alcuni tentativi terapeutici alternativi, effettuati da vari gruppi di lavoro. Anche se alcuni

risultati sembrano essere incoraggianti, tuttavia la loro efficacia non è tuttora dimostrata.

□ *Trasfusioni di granulociti* da donatori sani previa stimolazione con G-CSF<sup>22</sup>. Tale strategia terapeutica non è esente da rischi e va riservata a situazioni di emergenza.

□ *Trapianto di midollo osseo*. Tale intervento può essere preso in considerazione in alcuni pazienti con forma recessiva legata al cromosoma X, nel caso sia disponibile un donatore correlato HLA-identico<sup>23</sup>. Non vi è, tuttavia, consenso sulle indicazioni a tale tipo di terapia.

#### PROSPETTIVE FUTURE

La CGD presenta diversi requisiti che la candidano alla terapia mediante trasferimento genico della porzione codificante di una copia normale del gene mutato (terapia genica). In particolare, l'osservazione che alcuni individui normali presentano livelli di ossidasi molto ridotti in assenza di infezioni suggerisce che anche una parziale correzione del difetto potrebbe determinare un beneficio terapeutico. Considerata la breve vita delle cellule fagocitarie, la terapia genica della CGD si propone il trasferimento del gene terapeutico nelle cellule ematopoietiche staminali prelevate in vitro, seguito dal trapianto autologo di queste cellule modificate. Analogamente a tutte le altre malattie per cui la terapia genica presuppone il trasferimento di geni in questo tipo cellulare, il successo della terapia genica per la CGD dipenderà dal conseguimento di diversi obiettivi tecnici e concettuali. I principali di questi obiettivi sono:

- la corretta identificazione fenotipica dei precursori staminali ematopoietici;
- la possibilità di coltivarli e di espanderli in vitro senza che si perdano le loro proprietà staminali;
- lo sviluppo di vettori virali per il trasferimento genico ad alta efficienza in queste cellule;
- la possibilità di selezionare le cellule corrette dopo reinfusione nel paziente.

Lo stato attuale della ricerca in questo campo vede impegnati diversi gruppi in Europa e negli Stati Uniti, prevalentemente in fase di sperimentazione pre-clinica<sup>24-27</sup>.

Al momento è puramente ipotetica la possibilità di somministrare fagociti autologhi transfettati con il gene alterato nelle fasi di acuzie della malattia, in quanto l'efficacia di questo intervento

non è stata dimostrata da trial clinici controllati. Questo modello, avendo i fagociti un'emivita breve, rappresenterebbe tuttavia un possibile approccio di terapia genica "a termine".

#### Bibliografia

1. Curnutte JT: Chronic granulomatous disease: The solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* 67, 2, 1993.
2. Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Middleton-Price H: Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 87, 1663, 1996.
3. Orkin SH: Molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Ann Rev Immunol* 7, 277, 1989.
4. Smith RM, Curnutte JT: Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 77, 673, 1991.
5. Roos D: The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev* 138, 121, 1994.
6. Weening RS, Adriaansz LH, Weemaes CMR, Lutter R, Roos D: Clinical differences in chronic granulomatous disease in patients with cytochrome b-negative or cytochrome b-positive neutrophils. *J Pediatr* 107, 102, 1985.
7. Forehand JR, Johnston RBJ: Chronic granulomatous disease: newly defined molecular abnormalities explain disease variability and normal phagocyte physiology. *Current Opinion in Pediatrics* 6, 668, 1994.
8. Liese JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropoulos T, Kloos S, Gahr M, Belohradsky BH: Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet* 347, 220, 1996.
9. Mouy R, Fischer A, Vilmer E, Seger R, Griscelli C: Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. *J Pediatr* 114, 555, 1989.
10. Johnston RBJ, Newman SL: Chronic granulomatous disease. *Pediatr Clin North Am* 24, 365, 1977.
11. Forrest CB, Forehand JR, Axtell RA, Roberts RL, Johnston RBJ: Clinical features and current management of chronic granulomatous disease. In: Curnutte JT, ed. *Hematology Oncology Clinics of North America: Phagocytic Defects II*. Philadelphia PA, WB Saunders Company, 253, 1988.
12. Hitzig WH, Seger RA: Chronic granulomatous disease, a heterogeneous syndrome. *Hum Genet* 64, 207, 1983.
13. Hayakawa H, Kobayashi N, Yata J: Chronic granulomatous disease in Japan: a summary of the clinical features of 84 registered patients. *Acta Paediatr Jpn* 27, 1, 1985.
14. Tauber AI, Borregaard N, Simons E, Wright J: Chronic granulomatous disease: a syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine* 62, 286, 1983.
15. Gallin JI, Buescher ES, Seligmann BE, Nath J, Gaither T, Kazt P: Recent advances in chronic granulomatous disease. *Ann Intern Med* 99, 657, 1983.
16. Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root

- RK, Wilfert CM, Gutman L, Buckley RH: Fungal infection in chronic granulomatous disease. *Am J Med* 71, 59, 1981.
17. Schettini F: La Malattia Granulomatosa Cronica. *Riv Ital Ped* 13, 495, 1987.
18. Jacobs R, Wilson C: Activity of antibiotics in chronic granulomatous disease leukocytes. *Pediatr Res* 17, 916, 1983.
19. Neijens H: Invasive *Aspergillus* infection in chronic granulomatous disease: treatment with itraconazole. *J Pediatr* 115, 1016, 1989.
20. Todd P, Goa K: Interferon  $\gamma$  1-b. A review of its pharmacology and therapeutic potential in chronic granulomatous disease. *Drugs* 43, 111, 1982.
21. The international chronic granulomatous disease cooperative study group: A controlled trial of interferon  $\gamma$  to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 8, 509, 1981.
22. Buescher E: Leukocyte transfusion in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 307, 800, 1982.
23. Di Bartolomeo P, Schettini F, De Mattia D, Manzionna M: Reconstitution of normal neutrophil function in chronic granulomatous disease by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 4, 695, 1989.
24. Thrasher A, Chetty M, Casimir C, Segal AW: Restoration of superoxide generation to a chronic granulomatous disease-derived B-cell line by retrovirus mediated gene transfer. *Blood* 80, 1125, 1992.
25. Li F, Linton GF, Sekhsaria S, Whiting-Theobald N, Katkin JP, Gallin JI, Malech HL: CD34+ peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b558 defective forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 84, 53, 1994.
26. Zentilin L, Tafuro S, Grassi G, Garcia R, Ventura A, Baralle FE, Falaschi A, Giacca M: Functional reconstitution of oxidase activity in X-linked chronic granulomatous disease by retrovirus-mediated gene transfer. *Exp Cell Res* 225, 257, 1996.
27. Ding C, Kume A, Bjorgvinsdottir H, Hawley RG, Pech N, Dinanuer MC: High-level reconstitution of respiratory burst activity in a human X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) cell line and correction of murine X-CGD bone marrow cells by retroviral-mediated gene transfer of human gp91phox. *Blood* 88, 1834, 1996.
28. Okamura N, Curnutte JT, Roberts RL, Babior BM: Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group closely related 48-kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 263, 6777, 1988.
29. Andrews PC, Babior BM: Phosphorylation of cytosolic proteins by resting and activated human neutrophils. *Blood* 64, 883, 1984.
30. Hayakawa T, Suzuiki K, Suzuki S, Andrews PC, Babior BM: A possible role for protein phosphorylation in the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Evidence from studies with cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 261, 9109, 1986.
31. White JR, Huang CK, Hill JMJ: Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate and its analogue 4-alpha-phorbol 12,13-didecanoate on protein phosphorylation and lysosomal enzyme release in rabbit neutrophils. *J Biol Chem* 259, 8605, 1984.
32. Pontremoli S, Melloni E, Salamino F, Sparatore B, Michetti M, Sacco O, Horecker BL: Phosphorylation of proteins in human neutrophils activated with phorbol myristate acetate or with chemotactic factor. *Arch Biochem Biophys* 250, 23, 1986.
33. Segal WW, Heyworth PG, Cockcroft S, Barrowman MM: Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature* 316, 547, 1985.
34. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW: Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353, 668, 1991.
35. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM: Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254, 1512, 1991.