

# I difetti primitivi dei fagociti: dal sospetto diagnostico alla terapia

a cura della Commissione di Immunologia della SIAIP

Fabio Cardinale <sup>1</sup> (coordinatore)

Baldassarre Martire <sup>2</sup>, Carlo Capristo <sup>3</sup>, Fabio Cardinale <sup>4</sup>,  
Michele Fiore <sup>5</sup>, Silvana Martino <sup>6</sup>, Viviana Moschese <sup>7</sup>,  
Annarosa Soresina <sup>8</sup>



Parole chiave: fagociti, neutropenia, meccanismi antimicrobici

## Abstract

Il panorama dei difetti congeniti dell'immunità innata e in particolare dei fagociti, si è arricchito negli ultimi anni di nuove importanti conoscenze sotto il profilo della fisiopatologia e della caratterizzazione molecolare di tali malattie. Questi progressi hanno anche portato alla identificazione di difetti fagocitari caratterizzati da una suscettibilità selettiva verso infezioni sostenute da un gruppo limitato di patogeni o da un solo agente infettivo. D'altro canto la creazione di registri nazionali di malattia, come quello delle Neutropenie e della Malattia Granulomatosa Cronica, hanno consentito di comprendere meglio la storia naturale di queste immunodeficienze e di prospettare nuove e più accurate metodologie di approccio diagnostico e terapeutico. Scopo di questo lavoro è di illustrare tali novità e di fornire alcune indicazioni per il sospetto diagnostico e la gestione integrata di questi bambini tra centro specialistico e pediatria di famiglia.

## Introduzione

I fagociti (granulociti neutrofili, monociti e macrofagi) costituiscono la prima linea di difesa contro le infezioni batteriche e fungine, esplicando funzioni diverse, ordinatamente concatenate e perfettamente integrate con quelle del sistema linfocitario, e rappresentano per questo le cellule che meglio esprimono

la complessità delle interazioni tra immunità innata e adattativa. Difetti numerici di queste linee cellulari o delle loro funzioni biologiche si traducono clinicamente in un'aumentata suscettibilità alle infezioni con spiccata tendenza alla cronicizzazione e che spesso si rivelano scarsamente sensibili alla antibiotico-terapia. Le infezioni si localizzano a livello di cute, mu-

<sup>1</sup> **MANCA QUESTO RIFERIMENTO**; <sup>2</sup> Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Policlinico-Giovanni XXIII", Bari; <sup>3</sup> Dipartimento di Pediatria, Seconda Università di Napoli; <sup>4</sup> Struttura Complessa di Medicina e Pneumo-Allergoimmunologia Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Policlinico-Giovanni XXIII", Bari; <sup>5</sup> Pediatra di Libera Scelta, Consigliere Nazionale FIMP, Genova; <sup>6</sup> Ospedale Regina Margherita, Università di Torino; <sup>7</sup> Policlinico Tor Vergata, Università "Tor Vergata", Roma; <sup>8</sup> Clinica Pediatrica, Università di Brescia. Con la collaborazione di Teresa Perillo, U.O. di Pediatria "Federico Vecchio", Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università di Bari

baldo.martire@bioetaev.uniba.it

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse rispetto agli argomenti trattati nell'articolo.

cose e linfonodi, che costituiscono le prime barriere anatomiche all'invasione microbica: da qui possono poi diffondersi a tutti gli altri organi. I difetti a carico delle cellule fagocitarie possono essere di tipo quantitativo o funzionale, riguardare cioè la capacità di raggiungere il focolaio d'infezione (*chemiotassi*), di fagocitare il microorganismo (*fagocitosi*) o di eliminarlo attraverso il proprio corredo enzimatico (*killing batterico*). Attualmente sono noti 29 difetti congeniti diversi della funzione e del numero dei fagociti<sup>1</sup>. In questo gruppo di patologie sono compresi: 1) difetti del numero dei granulociti neutrofili; 2) difetti dei meccanismi antimicrobici non ossidativi come il deficit dei granuli specifici; 3) i difetti dell'attività antimicrobica di tipo ossidativo tra cui le varie forme di malattia granulomatosa cronica, il deficit di mieloperossidasi e la micobatteriosi atipica familiare e 4) i difetti della chemiotassi, che includono i deficit di adesione leucocitaria (LAD I, LAD II e LAD III) e la immunodeficienza con lper Ig-E.

### Principali difetti del numero dei granulociti neutrofili

Si definisce neutropenia una conta granulocitaria nel sangue periferico inferiore a  $1500/\text{mm}^3$ , per pazienti di età superiore a 1 anno, inferiore a  $1000/\text{mm}^3$  al di sotto del primo anno di vita. Questa condizione può derivare da una ridotta produzione di granulociti a livello midollare, da un difetto della mobilitazione dei neutrofili dal midollo osseo verso il sangue periferico o da una esagerata apoptosi.

#### Neutropenia Congenita Severa

La Neutropenia Congenita Severa è una immunodeficienza geneticamente eterogenea con una incidenza attualmente stimata intorno a 1:200.000, caratterizzata da un basso valore dei PMN (inferiore a  $500/\text{mm}^3$ , spesso a  $200/\text{mm}^3$ ), esordio sintomatologico precoce con infezione ombelicale, ulcere orali, infezioni polmonari, perineali o perirettali e presentazione isolata o sindromica. Numerosi sono i geni implicati<sup>2</sup>: può essere ereditata come condizione autosomica recessiva (malattia di Kostmann) associata a mutazioni del gene *HAX1*, implicato nella down regolazione del meccanismo intrinseco mitocondriale dell'apoptosi, o come condizione autosomica dominante con mutazioni del gene *ELA2* che codifica per l'elastasi granulocitaria, proteina componente dei granuli primari. Sono state descritte

mutazioni del gene *GF11* nel dominio zinc finger, che hanno come bersaglio *ELA2* e del recettore per il G-CSF (*CSF3R gene*). È stata recentemente identificata una nuova forma sindromica di neutropenia congenita associata a malformazioni cardiache e urogenitali, legata a mutazione del gene *G6PC3* che codifica per la subunità catalitica 3 della glucosio-6-fosfatasi. Mutazioni del gene *WASP* (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) infine, sono state identificate in maschi con *Neutropenia Congenita Severa isolata* a trasmissione X-recessiva. È ancora in gran parte sconosciuto il meccanismo responsabile della neutropenia; è stato suggerito che queste mutazioni geniche comportino l'attivazione intramidollare di meccanismi pro-apoptotici dei precursori mieloidi. L'esame del midollo rivela un arresto maturativo allo stadio promielocitico mentre l'esame dello striscio periferico mostra l'assenza parziale o completa di mielociti, metamielociti, forme a banda o neutrofili maturi, talvolta con associate monocitosi ed eosinofilia. Alcune forme di neutropenia congenita grave, in particolare quella causata da mutazione del *G-CSFR* presentano un rischio elevato di evoluzione verso sindrome mielo-displastica o leucemia mieloide. Il trattamento si basa sulla somministrazione di G-CSF che attiva la maturazione dei granulociti forzando il blocco maturativo tra lo stadio promielocitico e quello metamielocitico, ed esercita anche una azione antiapoptotica<sup>3</sup>. Laddove vi sia disponibilità di un donatore compatibile, va preso in considerazione il trapianto di midollo osseo.

**La Neutropenia Congenita Severa è una immunodeficienza geneticamente eterogenea caratterizzata da un basso valore dei PMN, esordio sintomatologico precoce con infezione ombelicale, ulcere orali, infezioni polmonari, perineali o perirettali e presentazione isolata o sindromica**

### Neutropenia ciclica

Come la Neutropenia Congenita Severa, è causata da mutazioni sporadiche o ad ereditarietà autosomica dominante del gene *ELA2*, ma localizzate in posizioni diverse<sup>4</sup>. La neutropenia ciclica è caratterizzata da oscillazioni periodiche della conta dei neutrofili con intervalli di circa 21 giorni (il range può variare dalle 2 alle 6 settimane), nei quali la neutropenia dura in media 3-6 giorni potendo raggiungere un nadir < 200/mm<sup>3</sup>. In alcuni casi può associarsi una oscillazione dei reticolociti e della conta piastrinica o monocitosi con eosinofilia. Di solito, durante il nadir si osservano febbre, gengivostomatite, faringite e infezioni cutanee. Infezioni più gravi includono polmonite, enterocolite necrotizzante con peritonite e sepsi da *Escherichia coli* o *Clostridium perfringens*. Quando il paziente giunge all'attenzione del medico, tuttavia, la conta dei neutrofili può già essere in fase di recupero, pertanto, porre la diagnosi di neutropenia ciclica può richiedere 2-3 conte ematiche a settimana per 6 settimane, intese a osservare la periodicità del ciclo e a distinguerle dalle altre febbri periodiche senza neutropenia. Il reperto midollare durante la fase neutropenica evidenzia una ipoplasia cellulare e un arresto maturativo allo stadio del mielocita; la ciclicità dell'attività midollare è osservabile anche nella serie eritroide. Inoltre, non sembra esservi un aumentato rischio di mielodisplasia o di leucemia mieloide acuta. Per la prevenzione delle infezioni al nadir del ciclo è stato raccomandato l'impiego profilattico di G-CSF.

### Difetti dei meccanismi antimicrobici di tipo non ossidativo

#### Deficit dei granuli secondari

Il deficit dei granuli specifici dei PMN è una rara malattia genetica causata da mutazioni del gene CAAT/enhancer binding protein  $\epsilon$  (C/EBP $\epsilon$ ) che codifica per un fattore di trascrizione mieloide-specifico<sup>5</sup>. I granuli specifici compaiono, durante la differenziazione dei precursori neutrofili, più tardivamente rispetto ai granuli azzurofilo o primari, allo stadio cioè di promielocita /mielocita e contengono principalmente lattoferrina e altri enzimi lisosomiali. La loro comparsa richiede una precisa coordinazione ed attivazione sequenziale di numerosi geni che codificano per fattori di trascrizione fra i quali GATA-1,

GATA-2, PU.1, c-myb, e vari membri della famiglia C/EBP. Le mutazioni del gene C/EBP $\epsilon$ , che è stato mappato sul cromosoma 3q21-q23, sono trasmesse quasi sempre come carattere autosomico recessivo e determinano un blocco maturativo dei granulociti allo stadio di mielociti con conseguente assenza dei granuli specifici, facilmente evidenziabile negli strisci di sangue periferico o in immunofluorescenza con anticorpi anti-lattoferrina. L'abnorme maturazione dei PMN è dimostrata anche dalla presenza di nuclei bilobati e di diverse altre anomalie delle proteine contenute nei granuli, quali la riduzione della lattoferrina, delle defensine, della transcobalmina I, delle gelatinasi e delle collagenasi anche a carico degli eosinofili e delle piastrine. La diminuzione del rilascio delle proteine contenute nei granuli piastrinici è probabilmente il motivo della diatesi emorragica osservata in alcuni pazienti. In vitro si evidenziano anche anomalie funzionali quali riduzione della chemiotassi, della fagocitosi e del killing intracellulare batterico. In conseguenza del difetto, i pazienti presentano un'aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche soprattutto da *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

### Principali difetti dei meccanismi antimicrobici di tipo ossidativo

L'esposizione dei fagociti a germi opsonizzati determina una rapida attivazione metabolica, soprattutto dello shunt degli esoso-monofosfati che si accompagna ad un incremento del consumo di ossigeno e di glucosio. Un ruolo fondamentale nel "burst respiratorio" è svolto dal sistema della nicotinamide-adenina-dinucleotide-fosfato ossidasi. Questo enzima è una flavoproteina di membrana che trasferisce elettroni dalla NADPH all'ossigeno molecolare (O<sub>2</sub>) con formazione di ione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), che all'interno del fagosoma si trasforma poi in acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ipoclorito (HOCl) ad opera rispettivamente della superossido dismutasi e della mieloperossidasi lisosomiale. Il killing dei microrganismi fagocitati è legato alla produzione di questi prodotti reattivi dell'ossigeno che danneggiano la membrana batterica provocandone la morte. Un difetto in una qualsiasi delle componenti dell'ossidasi, come pure difetti associati alla generazione del cofattore NADPH come nei casi di grave deficit di G6PD o di glutatione sintetasi, possono causare un difetto dell'attività microbica ossigeno-dipendente.

### Malattia Granulomatosa Cronica

Rappresenta il prototipo dei difetti funzionali dei neutrofili e può essere causata dal difetto di ciascuna delle quattro subunità proteiche formanti la NADPH-ossidasi, che può essere assente, ridotta o funzionalmente difettiva e ciò spiega l'eterogeneità genotipica della malattia. Il complesso molecolare NADPH ossidasi è costituito da 4 subunità: due molecole, *p22phox* (subunità  $\alpha$ ) e *gp91phox* (subunità  $\beta$ ), che formano il complesso denominato citocromo *b558*, costitutivamente indovato sulla membrana cellulare e su quella di specifici granuli e vescicole secretorie del granulocita neutrofilo: questo complesso contiene due gruppi eme e due gruppi FAD necessari per il trasporto degli elettroni dall'NADPH citoplasmatico all'O<sub>2</sub> contenuto nel fagosoma. Altre due proteine, rispettivamente di 47 e 67 kDa, sono presenti esclusivamente nel citoplasma; una terza proteina, p40 phox presente nel citosol è coinvolta nella stabilizzazione del complesso p47/p67phox nei fagociti a riposo. In seguito all'attivazione cellulare, che può essere indotta da una serie di stimoli (microorganismi o peptidi batterici opsonizzati, frazione C5a del complemento, ecc.) le vescicole secretorie si fondono con la membrana plasmatica del fagocita e ciò determina il passaggio del citocromo *b558* sulla membrana cellulare del fagocita. Nello stesso tempo anche le proteine citosoliche p47 e p67 phox, dopo essere state fosforilate, traslocano sulla membrana plasmatica, dove interagiscono con il complesso *b558* determinando così il definitivo assemblaggio del complesso enzimatico NADPH in grado di svolgere la piena attività ossidasica.

Nel processo di traslocazione sono coinvolte altre proteine di basso peso molecolare "GTP-binding proteins" appartenenti alla famiglia *rac*: in particolare *rac1*, che si lega al complesso delle proteine citosoliche p47, p67 e p40 phox. Un'altra proteina di basso peso molecolare *rap1A* localizzata in associazione al citocromo *b558* sulla membrana dei granuli e delle vescicole secretorie, è coinvolta nella regolazione dell'attività ossidasica<sup>6</sup>.

Nel 70% circa dei casi la CGD è causata da una mutazione del gene che codifica per la subunità gp91 phox, localizzato sul braccio corto del cromosoma X (Xp21.1). Le varianti autosomiche recessive sono invece causate da mutazioni del gene per la subunità p22 phox che mappa sul braccio lungo del cromosoma 16 (16q24), circa il 5% dei casi, oppure dei geni per p47 phox o p67 phox che mappano rispettivamente sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q11.23)

e sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q25) e che rappresentano rispettivamente il 20% e il 5% circa di tutti i casi di CGD<sup>7</sup>. Di recente è stata identificata la prima mutazione a carico di NCF4, gene che codifica per la subunità proteica p40phox<sup>8</sup>.

La malattia esordisce in genere molto precocemente: l'età media all'esordio dei sintomi è di 1 anno. La forma X recessiva ha generalmente un esordio più precoce di quella autosomica recessiva che in alcuni casi può manifestarsi anche in età adulta<sup>9</sup>. Tutti gli organi possono essere interessati; tuttavia le infezioni più frequenti interessano i polmoni, i linfonodi e la cute.

Caratteristiche peculiari dell'infezione sono l'elevata frequenza, il tipo di agente eziologico e l'evoluzione granulomatosa delle lesioni infiammatorie. Questi granulomi, costituiti da cellule giganti e macrofagi infarciti di lipidi, provocano distruzione dei parenchimi e determinano frequentemente stenosi del tratto gastrointestinale o urinario, tali da richiedere correzione chirurgica.

La diffusione dell'infezione è facilitata dal fatto che i leucociti, che hanno fagocitato ma non ucciso i microorganismi nella sede dell'infezione primitiva, possono di fatto trasportarla a distanza interessando rene, muscoli, pericardio, SNC ed altri organi.

Va segnalato che, a fronte della aspecificità del quadro clinico, alcune manifestazioni, quali le infezioni da Aspergillo, le piodermiti recidivanti, l'ascenso granulomatoso epatico e l'osteomielite, indirizzano fortemente il sospetto verso la diagnosi di malattia granulomatosa cronica. I patogeni più frequentemente in causa sono germi catalasi positivi, in grado di

**La malattia granulomatosa cronica esordisce in genere molto precocemente.**

**Caratteristiche peculiari dell'infezione sono l'elevata frequenza, il tipo di agente eziologico e l'evoluzione granulomatosa delle lesioni infiammatorie.**

degradare la quota di  $H_2O_2$  da essi stessi prodotta: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, vari ceppi di *Pseudomonas*, saprofiti quali *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter*, *Burkholderia Cepacia*, e funghi, soprattutto *Aspergillus spp.* e *Candida spp.* La diagnosi della malattia granulomatosa cronica si basa sullo studio in citofluorimetria con DHR123 del burst respiratorio granulocitario, valutando la generazione di superossido e dei metaboliti intermedi dell'ossigeno.

### **Deficit di mieloperossidasi (MPO)**

Costituisce il più frequente difetto funzionale dei granulociti con una incidenza che varia da 1:2000 a 1:4000 rispettivamente per il deficit parziale e totale<sup>10</sup>. La malattia si trasmette con modalità autosomica recessiva, ma mutazioni nel gene codificante per MPO che mappa sul braccio lungo del cromosoma 17 sono state identificate solo in un modesto numero di soggetti affetti, suggerendo che altri loci genici possano determinare indirettamente un deficit di MPO. Il suo riscontro è per lo più occasionale ed è legato all'analisi di espressione dell'enzima che viene effettuata da molte macchine conta-globuli per l'esecuzione automatica dell'esame emocromocitometrico. La mieloperossidasi viene espressa dai granulociti in una fase precoce di maturazione da mieloblasto a promielocita e contribuisce insieme ad altre proteine ad attività antimicrobica come lisozima e defensine, a costituire i granuli primari dei granulociti. L'attività antimicrobica dell'enzima dipende dalla capacità di sintetizzare acido ipoclorico a partire dal perossido d'idrogeno generato dai granulociti attivati per effetto della NADPH ossidasi. Questa condizione risulta essere quasi sempre asintomatica o si manifesta come aumentata suscettibilità a infezioni cutanee da candida. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di una residua attività enzimatica specie nei granulociti eosinofili o ad un più efficiente burst respiratorio granulocitario reso possibile dall'assenza di HOCl che normalmente inattiva le ossidasi cellulari. Deficit acquisiti di MPO possono realizzarsi in corso di leucemia mieloide, linfoma di Hodgkin, sideropenia e diabete mellito.

### **Micobatteriosi atipica familiare**

Le cellule della linea monocitaria giocano un ruolo fondamentale nella difesa contro le infezioni da patogeni intracellulari. Dopo l'ingresso di questi patogeni nell'organismo segue la loro captazione e fagocitosi da parte dei monociti e delle cellule dendritiche che

così attivate sono in grado di produrre IL-12. Questa interagendo con il suo recettore espresso sulle cellule T e NK, innesca una serie di eventi biochimici che portano alla trascrizione dei geni inducibili dall'IL12, in particolare IFN- $\gamma$ . La risposta ad interferon-gamma è mediata da un recettore, costituito da due subunità (IFN- $\gamma$ R1 ed R2) che costituiscono un eterodimero; a seguito del legame della citochina con il recettore si ha attivazione delle chinasi Jak-1 e Jak-2, associate al complesso recettoriale; queste, a loro volta fosforilano le proteine di trasduzione di segnale STAT-1. Dopo la dimerizzazione STAT-1 migra nel nucleo e attiva una cascata di eventi di trascrizione nucleare e attivazione cellulare che si traducono nell'espressione di enzimi come la sintetasi dell'ossido nitrico inducibile (NOS<sub>2</sub>) e quindi la sintesi di ossido nitrico, i cui metaboliti sono estremamente tossici per i patogeni intracellulari. L'importanza della IL-12 e del IFN- $\gamma$  nella difesa contro microorganismi intracellulari, è testimoniata dalla descrizione di pazienti con infezioni gravi e disseminate da questi patogeni, in particolare micobatteri e salmonelle, che presentano mutazioni in quattro geni diversi che codificano per queste due citochine o per i loro recettori<sup>11</sup>. Queste mutazioni definiscono una condizione nota come *micobatteriosi atipica familiare* che comprende un gruppo di malattie a trasmissione autosomica recessiva. Le mutazioni note riguardano il gene IFNGR1 o IFNGR2 codificanti rispettivamente per la subunità 1 e 2 del recettore del IFN- $\gamma$  e possono impedire la sintesi della proteina o causare la produzione di una proteina disfunzionale. Nelle forme clinicamente severe la diagnosi si basa sull'analisi citofluorimetrica di espressione delle catene del recettore per interferon-gamma o su test funzionali; per la diagnosi genetica definitiva occorre l'analisi di sequenza dei due geni. La malattia si manifesta con infezioni sostenute da micobatteri non tubercolari o dopo vaccinazione antitubercolare con bacillo di Calmette-Guerin (BCG); questi patogeni che generalmente causano infezioni limitate ai linfonodi o alla cute, nei pazienti affetti da micobatteriosi atipica familiare sono invece causa di infezioni disseminate, con epatosplenomegalia ed osteomieliti ad esito frequentemente fatale. Quadri clinici simili ma a prognosi più benigna sono stati osservati in pazienti con difetti a carico di geni che codificano per la subunità p40 della IL-12, per la catena  $\beta$ 1 del suo recettore e di STAT-1<sup>12</sup>. La precisa caratterizzazione del difetto genetico influenza notevolmente la prognosi e modifica l'approccio terapeutico. Infatti nei pazienti con forme cliniche severe,

sostenute da mutazioni dei geni codificanti per il recettore per interferon-gamma, il trattamento di scelta è il trapianto di midollo osseo. Nelle forme in cui siano coinvolti i geni che codificano per IL-12 o per il suo recettore, è opportuno invece ricorrere alla somministrazione di interferon-gamma, in quanto la risposta alla citochina è completamente conservata.

## Principali difetti funzionali (chemiotassi)

*Difetti delle proteine di adesione*<sup>13</sup>. Configurano il prototipo dei difetti correlati alle funzioni di membrana dei monociti-macrofagi: i granulociti, funzionalmente competenti ed in numero normale, non sono in grado di raggiungere i siti d'infezione e si formano tipicamente ascessi cutanei "freddi", necrotizzanti e senza formazione di pus, con estese perdite di sostanza e rischio incombente di sepsi. I germi più frequentemente in causa sono Stafilococchi e *Pseudomonas*. La malattia, nella forma ad espressività completa, è rapidamente fatale, se non s'interviene con misure di profilassi antimicrobica e antifungina.

*Deficit di adesione leucocitaria (LAD)* è una rara immunodeficienza primitiva a trasmissione autosomica recessiva; di questa malattia sono note tre forme, distinguibili sia geneticamente che clinicamente. *Il LAD di tipo I* è dovuto a difetti di espressione e/o funzione di CD18, la subunità comune alle  $\beta 2$ -integrine espressa esclusivamente dai leucociti. Affinché CD18 possa essere trasportato sulla membrana deve associarsi ad una delle tre subunità alfa delle integrine a costituire un eterodimero. Il complesso CD11a/CD18 ( $\alpha 1/\beta 2$ ), noto come LFA-1, partecipa al processo di adesione stabile dei leucociti all'endotelio legando ICAM-1, molecola di superficie espressa sulle cellule endoteliali; attraverso questo processo, i leucociti possono iniziare il processo di extravasazione e migrazione verso il sito infiammatorio. Inoltre CD18 si associa a CD11b a formare Mac-1, capace di legare fibronectina e il frammento C3b inattivato del complemento, contribuendo così ai processi di adesione e fagocitosi. La funzione del terzo complesso costituito da CD11c e CD18, non è ancora del tutto chiarita. Questa stretta associazione tra CD18 e le tre subunità \_ comporta che i pazienti con LAD-1 presentino mancata espressione sulla membrana delle cellule leucocitarie di tutte e tre le subunità  $\alpha$  oltre che della subunità  $\beta 2$ . Il deficit di questa molecola codificata

dal gene ITG82(21q22.3) determina un difetto presoché generalizzato nell'adesione leucocitaria e nella migrazione di queste cellule nei siti di infiammazione. Il LAD-1 nella sua forma classica si manifesta entro i primi mesi di vita con ritardata caduta del cordone ombelicale ed infezioni cutanee caratterizzate dalla scarsa formazione di pus e frequente esito in cicatrici. È sempre riscontrabile marcata leucocitosi (con conta leucocitaria anche superiore a 50000/mm<sup>3</sup>), che contrasta con la guarigione lenta delle ferite e la scarsa formazione di pus; in età giovanile è frequente il riscontro di una severa paradontopatia.

La *LAD-II* (disordine congenito di glicosilazione) è una rara malattia a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da leucocitosi e periodontite ma non si osserva ritardo nella caduta del cordone ombelicale e la suscettibilità alle infezioni è meno marcata che nel LAD-I. Inoltre i soggetti affetti presentano ritardo mentale e ritardo di crescita oltre che fenotipo gruppo-ematico Bombay. Alla base della malattia vi è un difetto della sintesi di glicoproteine contenenti il monosaccaride fucosio. Tra queste, il Sialil Lewis-X (CD15s) è espresso sui leucociti e funziona da ligando per le selectine espresse sull'endotelio (L-selectina, P-selectina, E-selectina). Il deficit di CD15s sulla membrana dei leucociti affetti da LAD-II determina un difetto nella fase di interazione debole (rolling) tra leucociti ed endotelio che è mediata dalle selectine. La base genetica del LAD-II è stata identificata in un difetto a carico della proteina trasportatrice il GDP-fucosio nel complesso del Golgi (FUCT1). Per il trattamento del LAD-II è stata proposta la somministrazione di fucosio efficace nel migliorare il grado di glicosilazione delle proteine.

La diagnosi differenziale fra LAD-I e LAD-II si basa sull'analisi citofluorimetrica dell'espressione di CD18 e su test di adesione granulocitaria a cellule endoteliali attivate. I granulociti di pazienti con LAD-I non esprimono o esprimono bassi livelli di CD18 sulla superficie cellulare e aderiscono male alle cellule endoteliali. I granulociti dei pazienti con LAD-II esprimono normalmente CD18, ma mostrano un'anomala adesione a cellule endoteliali attivate da IL-1. Anticorpi diretti contro la sialil-Lewis X possono essere usati in citofluorimetria per la quantificazione della proteina. Una nuova variante autosomica recessiva del difetto di adesione leucocitaria è stata recentemente identificata: *LAD-III*. Le alterazioni funzionali e il quadro clinico sono simili alla LAD-I, con associata una particolare tendenza emorragica legata a un difetto di aggregazione piastrinica. Il difetto genetico interessa

una proteina Rap-1 coinvolta nella attivazione delle  $\beta$  integrine dei neutrofili ma anche dei linfociti T e delle piastrine e codificata dal gene *KINDLIN3*.

### **Immunodeficienza con Iper-IgE (HIES)**

Sotto il profilo nosologico questa malattia è stata di recente inserita nell'ambito dei difetti primitivi dei fagociti<sup>1</sup>, anche se la sua patogenesi come vedremo è eterogenea e investe numerosi aspetti della funzione linfocitaria. Il difetto molecolare riguarda il "pathway" biochimico JAKs-STATs costituito da numerose molecole proteiche coinvolte nella trasmissione del segnale dalla membrana cellulare al nucleo e quindi nel controllo di molte importanti funzioni cellulari.

Si conoscono attualmente 2 varianti genetiche: in entrambe le forme sono costanti IgE sieriche elevatissime, eosinofilia, dermatite, ed infezioni ricorrenti (soprattutto di cute e polmoni); per la diagnosi è sempre indispensabile lo score clinico di Grimbacher<sup>14</sup>.

### **HIES Autosomica Dominante da mutazione di STAT3<sup>15</sup>**

STAT3 rappresenta una molecola chiave nella trasmissione e trascrizione del segnale da parte di moltissime citochine e fattori di crescita ed ha la capacità di attivare differenti set di geni in molteplici tipi cellulari. Mutazioni in eterozigosi di STAT3 sono presenti in circa il 75% dei pazienti con AD-HIES. Tutte le manifestazioni tipiche della "Sindrome di Giobbe" sono presenti in questa forma:

*Dermatite*, compare in genere nei primi due mesi di vita: è una dermatite cronica papulo-pustolosa e pruriginosa legata alla colonizzazione della cute da parte degli *Stafilococchi aureus* e *coagulasi-negativi* con formazione di noduli cutanei-sottocutanei scarsamente dolenti e tendenti alla colliquazione: "ascessi freddi", oggi meno frequenti grazie alla profilassi antisettica e antibiotica.

*IgE sieriche elevate*: > 2.000 UI/ml dopo i 5 anni di vita, spesso con picchi molto più alti. In età adulta il livello tende a scendere entro i limiti della norma. Le IgE sono policlonali e rivolte con titoli altissimi sia contro antigeni di *S. aureus* e *Candida* sia contro i più svariati antigeni e allergeni. Nonostante i livelli straordinari di IgE e l'intensa positività del prick test verso molti antigeni, c'è una paradossale assenza di manifestazioni cliniche di ipersensibilità di tipo "reaginic" (anafilassi, orticaria, angioedema, asma allergico). Questo paradosso è tipico della AD-HIES con

mutazione di Stat3 ma non delle AD-HIES variants.

*Gravi infezioni ricorrenti*: soprattutto a carico di cute e polmoni e causate principalmente da miceti, stafilococchi e altri batteri extracellulari piogeni. Caratteristica della forma di HIES da deficit di STAT3 è una abnorme modalità di riparazione del processo di flogosi del tessuto polmonare ("lung aberrant healing") con formazione di bronchiectasie e soprattutto di pneumatoceci che a loro volta predispongono a sovrainfezioni da batteri gram-negativi.

*Manifestazioni extra-immunologiche*: ritenzione dei denti decidui, alterazioni scheletriche, osteopenia e fragilità ossea, iperlassità ligamentosa.

### **HIES Autosomica Recessiva (AR-HIES)**

È una forma molto rara e grave, caratterizzata da sopravvivenza molto ridotta e precoce mortalità. Sono assenti le manifestazioni extra-immunologiche e a tendenza alla formazione di pneumatoceci, tratto quest'ultimo che consente di differenziare fenotipicamente questa forma dalla HIES STAT3 mutata. Si caratterizza invece per una particolare suscettibilità alle infezioni virali, a patologie autoimmuni e alle manifestazioni vasculo-emorragiche a livello del sistema nervoso centrale.

La maggior parte delle HIES autosomico recessive sono causate da mutazioni di *DOCK8* gene localizzato sul cromosoma 9p che codifica per una proteina (dedicator della citochinesi 8) implicata nella regolazione del citoscheletro dell'actina, come recentemente dimostrato da uno studio multicentrico internazionale<sup>16</sup>. Il fenotipo clinico di questi pazienti è caratterizzato da infezioni polmonari e virali severe, in particolare da herpes virus e da mollusco contagioso, eczema atopico, oltre che eosinofilia e IperIgE.

In un unico paziente giapponese è stata identificata una mutazione in omozigosi del gene *tyk2* codificante per la tirosin-kinasi 2<sup>17</sup>.

### **Patogenesi delle alterazioni immunologiche delle HIES<sup>18</sup>**

- 1) I meccanismi che determinano livelli altissimi di IgE sieriche in tutte le forme di HIES sono ancora in gran parte sconosciuti; l'ipotesi principale resta quella di una produzione di citochine con effetto soppressivo sulla produzione di IgE, in particolare l'IFN- $\gamma$ , prodotto da T linfociti e cellule NK sotto lo stimolo di IL-21, citochina a sua volta Th-17 e STAT3-dipendente.
- 2) Sotto stimolo antigenico (batteri Gram+, Gram- e miceti) i linfociti Th-17 inducono la produzione di

molecole ad attività chemiotattica verso neutrofili e macrofagi e l'attivazione della ossido-nitrico sintetasi (NOS), enzima provvisto di importante azione anti-stafilococcica. Questo meccanismo sottenderebbe al ben noto deficit di chemiotassi " della Sindrome di Giobbe, con gli "ascessi freddi" e la torpidità delle lesioni polmonari croniche e alla suscettibilità alle infezioni da stafilococchi.

- 3) DOCK 8 appartiene ad una famiglia di proteine espresse in vari organi (placenta, polmone, rene e pancreas) che regolano la migrazione, l'adesione e la crescita cellulare. Il deficit di DOCK8 è responsabile della alterazione delle funzioni effettrici delle cellule T e della differenziazione dei linfociti Th17.
- 4) Il deficit di TYK2 comporta nei T-linfociti e macrofagi un grave difetto di risposta a molte citochine: le mutazioni in omozigosi di TYK2 determinano un'alterazione della trasmissione del *pathway* dell'IL-23, che predispone alle infezioni da batteri extracellulari, dell'IFN- $\gamma$  che giustifica la suscettibilità alle infezioni da virus, e dell'IL-12 che spiega le infezioni da germi intracellulari (micobatteri). L'alterazione della trasmissione del segnale dell'IL-6 e attraverso IL22 con conseguente ridotta produzione di  $\beta$ -defensina, spiega l'assenza dei tipici segni della infiammazione acuta.

### Difetti della fagocitosi

I difetti della fagocitosi sono di solito secondari a infezioni, farmaci, alcool e malattie sistemiche. I difetti primitivi sono rari, frequentemente riconducibili al difetto di opsonizzazione secondario a ipogammaglobulinemia o al deficit congenito di frazioni del complemento. Il deficit primitivo della  $\beta$  *actina*, malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante estremamente rara, comporta un difetto di polimerizzazione di questa proteina e della organizzazione del citoscheletro cellulare con conseguente alterazione della motilità e della fagocitosi<sup>19</sup>. Si associa a bassa statura e ritardo mentale.

### Diagnosi differenziale dei difetti dei fagociti

Al sospetto di deficit a carico dei fagociti si perviene di fronte a soggetti con infezioni precoci e spesso gravi, di origine batterica e fungina, che tendono

all'ascessualizzazione o alla disseminazione sistemica; molti difetti fagocitari possono tuttavia presentare una grande variabilità clinica. (Fig. 1) L'anamnesi infettivologica deve fornire importanti suggestioni riguardanti il numero, il tipo, la sede delle infezioni e la risposta alla terapia antiinfettiva. La conoscenza dei patogeni causa di infezione poi, consente da sola di orientare in maniera corretta l'iter diagnostico verso specifici difetti dei fagociti (Tab. I) L'esame clinico può differenziare caratteristiche diagnostiche come il parziale albinismo oculocutaneo nella *sindrome di Chediak-Higashi*, la facies tipica della sindrome da iper IgE o la bassa statura e le alterazioni scheletriche di alcune forme di neutropenia sindromica come la *Shwachman-Diamond*. Le valutazioni di laboratorio devono procedere secondo un insieme di test mirati diretti verso specifiche malattie, sulla base delle caratteristiche cliniche del caso e sulla prevalenza di ciascun difetto. L'emocromo sarà immediatamente di ausilio, rivelando una neutropenia o una neutrofilia; tanto la CGD quanto soprattutto il LAD decorrono con neutrofilia (Fig. 2). La presenza di granuli giganti nel citoplasma consente di sospettare la sindrome di Chediak-Higashi mentre l'assenza di granuli dovrà suggerire il difetto primitivo dei granuli specifici. La persistenza della neutropenia una volta superato l'episodio infettivo acuto richiede che venga esplorata la possibilità di una forma cronica severa, possibilmente congenita. Occorre tuttavia ricordare che la neutropenia acquisita (anticorpo-mediata, farmaco-indotta o post-infettiva) è di gran lunga più comune delle forme congenite, e richiede solo il monitoraggio dell'emocromo fino alla risoluzione. Il recidivare delle infezioni

**Tab. I.** Microrganismi associati a specifici difetti fagocitari.

Microrganismi	Disordini specifici
Aspergillus	CGD
Micobatterio atipico	Micobatteriosi atipica
Bacillo Calmette-Guerin (BCG) – disseminato	CGD, micobatteriosi atipica
Burkholderia cepacia	CGD
Candida – invasiva	CGD
Candida – muco cutanea	Sindrome da iper IgE, Deficit MPO
Serratia marcescens	CGD
Staphylococcus aureus	CGD, Neutropenia, IperIgE
Batteri catalasi positivi	CGD



Nell'anamnesi infettivologica, la conoscenza dei patogeni causa di infezione consente da sola di orientare in maniera corretta l'iter diagnostico verso specifici difetti dei fagociti.

La diagnosi di LAD di tipo 1 si basa su dati clinici suggestivi e sul riscontro di leucocitosi neutrofila marcata; la conferma è data dalla dimostrazione in citofluorimetria dell'assenza della glicoproteina CD18. Nel più raro LAD tipo 2, la mancata espressione di sialil-Lewis X (CD15) sulla superficie dei neutrofili e il riscontro del fenotipo Bombay all'analisi del gruppo eritrocitario confermerà la diagnosi.

Pazienti con eczema intrattabile associato ad accessi freddi ricorrenti devono essere indagati per confermare una sindrome da iper-IgE. In questo caso saranno dimostrabili, elevati livelli di IgE totali e specifiche verso *S. Aureus* e *Candida*, deficit di sottoclassi IgG e vari difetti dell'attività T linfocitaria, in particolare dei Th17.

Di scarsa utilità pratica risultano lo studio della fagocitosi e della chemiotassi in quanto si tratta di test poco specifici, difficilmente standardizzabili e spesso di difficile interpretazione.

Per molte delle patologie descritte è possibile eseguire l'analisi di mutazione, cioè la ricerca del difetto genico della malattia, che rappresenta il gold standard della diagnosi e che consente anche di eseguire una diagnosi prenatale.

Per molte delle patologie summenzionate è oggi possibile eseguire l'analisi di mutazione cioè la ricerca del difetto genico della malattia, che rappresenta il gold standard della diagnosi e che consente anche di eseguire una diagnosi prenatale.

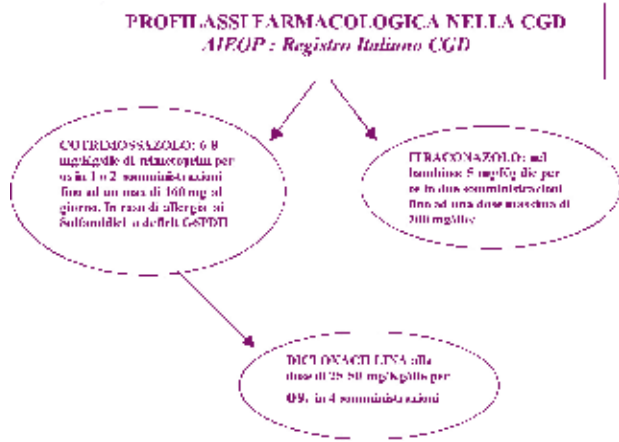
Tutti i test discussi sopra sono incentrati su singoli disturbi, generalmente causati da una o più mutazioni genetiche trasmesse tramite ereditarietà mendeliana classica. È probabile tuttavia che future valutazioni dei difetti dell'immunità innata coinvolgano analisi simultanee di molti singoli polimorfismi di nucleotidi (SNPs), sia all'interno che all'esterno di regioni codificanti del genoma umano. Diversi specifici SNPs sono già stati associati a suscettibilità alle infezioni meno severe, ma probabilmente più comune dei difetti riconosciuti dei fagociti.

### Elementi di terapia

Il trattamento dei pazienti con difetto dei fagociti richiede alcune misure di carattere generale ed altre più specifiche diverse secondo il tipo di patologia. In ogni caso l'obiettivo fondamentale è quello di prevenire gli episodi infettivi mediante l'adozione di misure d'igiene e norme comportamentali scrupolose (Tab. III). Una rigorosa e continuativa profilassi antimicrobica e anti-fungina, deve essere osservata dai pazienti con CGD (Fig. 4), LAD, Iper-IgE (Tab. IV) e con granulocitopenia severa congenita. In quest'ultimo caso è indicata la terapia con il G-

**Tab. III.** Norme igieniche-comportamentali per i pazienti con difetti primitivi dei fagociti.

- Curare l'igiene personale e in particolare quella del cavo orale: lavare i denti due volte al giorno con perossido di idrogeno e pasta dentifricia al bicarbonato, usare collutorio per ridurre la possibilità di gengiviti.
- Lavare profondamente ogni taglio o abrasione con acqua e sapone, proseguire con un antisettico ed infine risciacquare con perossido di idrogeno.
- Assumere antibiotici prima e dopo qualsiasi trattamento ortodontico.
- Prevenzione della stipsi.
- Profilassi vaccinale tranne BCG.
- È possibile frequentare la scuola, evitando tuttavia il contatto con bambini palesemente ammalati.
- Non utilizzare campi da gioco con truciol di legno ma con superficie liscia o ghiaia.
- Evitare di avere fiori freschi e piante in casa, la muffa spesso cresce nel terreno.
- Informare immediatamente il proprio medico in ogni caso di febbre.



**Fig. 4.** inserire didascalia

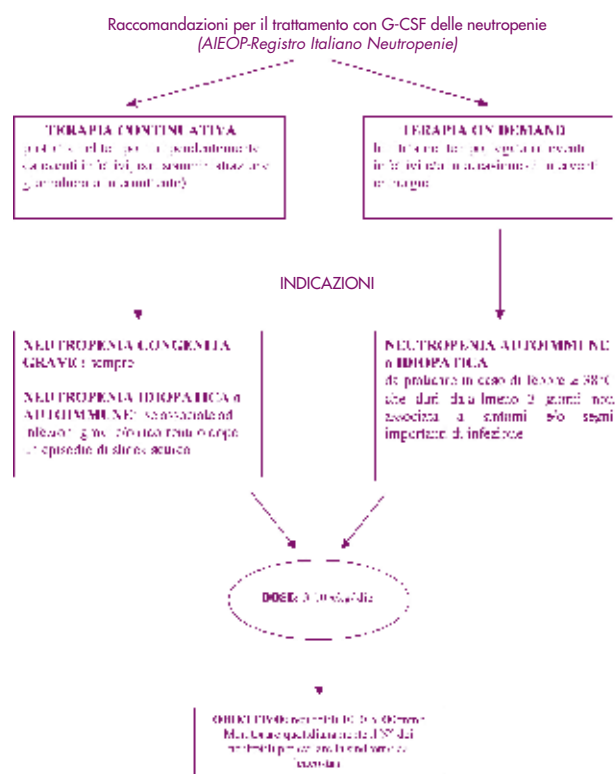
**Tab. IV.** Profilassi antimicrobica nelle HIES.

Modalità	Indicazioni	Farmaci
Profilassi	Dermatite	Bagni quotidiani o a giorni alterni in soluzione di Ipcloclorito di Sodio 0.07%, nuoto in piscine clorate
Profilassi	Infezioni batteriche	Amoxicillina-Ac. Clavulanico 50 mg/kg/die
Profilassi	Infezioni Fungine	Itraconazolo sciroppo 5 mg/kg/die

CSF che induce la proliferazione e la differenziazione dei progenitori mieloidi in granulociti neutrofili maturi consentendo di ridurre la frequenza e la gravità degli episodi infettivi (Fig. 5). Nella maggior parte dei difetti primitivi dei fagociti non è compromessa la risposta anticorpale agli antigeni vaccinali e quindi questi, con l'eccezione del BCG (Bacillo di Calmette Guerin) per i pazienti affetti da Malattia Granulomatosa Cronica e Micobatteriosi atipica familiare, possono essere somministrati in conformità con l'abituale protocollo vaccinale.

**Criteri generali per il trattamento degli episodi infettivi**

Ogni episodio infettivo deve essere considerato come potenzialmente pericoloso; è quindi corretto adottare misure d'intervento tempestive e aggressive, che vanno comunque associate a una valutazione approfondita delle condizioni cliniche del soggetto. È necessario fare ogni sforzo per isolare il microorganismo



**Figura 5.** Raccomandazioni per il trattamento con G-CSF delle neutropenie

in causa, con particolare attenzione all'Aspergillo, mediante indagini sierologiche, colturali e bioptiche. Una notazione che va tenuta nella massima considerazione per una pianificazione razionale dell'antibioticoterapia in caso di Malattia Granulomatosa Cronica, riguarda l'utilizzo di farmaci attivi su patogeni intracellulari e quindi in grado di attraversare la membrana cellulare del fagocita e di concentrarsi all'interno delle cellule. Solo alcuni antibiotici hanno questa capacità, quali rifampicina, teicoplanina, azitromicina, linezolid per i batteri Gram+; ciprofloxacina, fosfomicina, cotrimossazolo per i batteri Gram-. La terapia deve essere proseguita a lungo anche in presenza di un significativo miglioramento degli indici di flogosi e delle condizioni cliniche del paziente, con l'intento di eradicare definitivamente l'infezione.

**Terapia empirica del paziente con neutropenia febbrile**

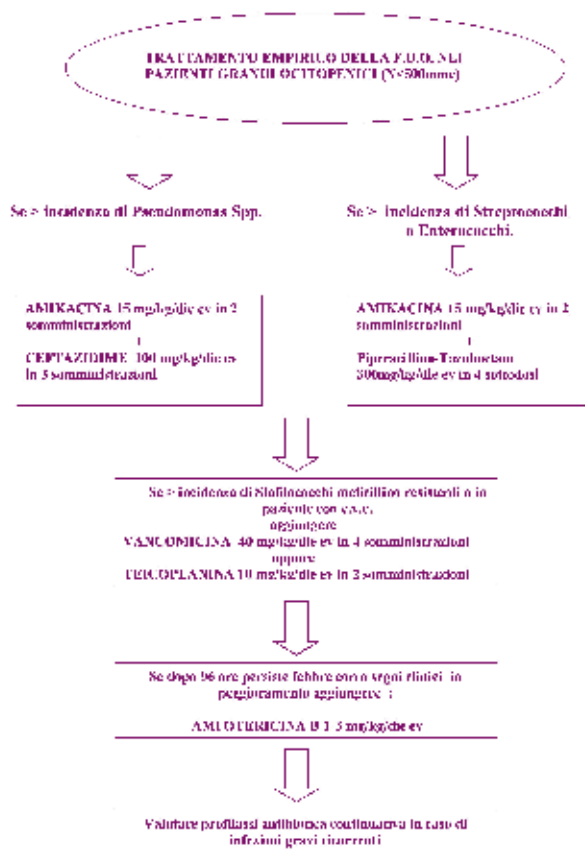
Le linee guida AIEOP per la terapia empirica del paziente con neutropenia febbrile<sup>20</sup> prevedono

l'associazione di almeno due antibiotici attivi su Gram+ e Gram-. La scelta dello schema di terapia empirica iniziale dovrebbe essere basata su dati epidemiologici locali riguardanti il tipo di patogeno più frequentemente isolato. Sulla scorta di questi dati e a parità di efficacia clinica, deve essere privilegiata l'opzione terapeutica di minor tossicità e minor costo.

I protocolli di terapia antibiotica empirica usati più comunemente sono (Fig. 6):

**Associazione ceftazidime+amikacina.** Questa associazione rimane probabilmente ancora quella da preferire in centri con elevata incidenza di infezioni da *Pseudomonas spp.*

**Associazione piperacillina-tazobactam+amikacina.** L'utilizzo di questa associazione può essere consigliato invece in centri con frequenti infezioni da streptococchi o enterococchi.



**Fig. 6.** Linee guida AIEOP per la terapia empirica del paziente con neutropenia febbrile.

### Uso dei glicopeptidi

Parecchi studi in pazienti pediatrici ed adulti hanno dimostrato che l'aggiunta routinaria di un antibiotico glicopeptidico (vancomicina o teicoplanina) al protocollo di terapia antibiotica empirica non è indicata, se non in centri con elevata incidenza di infezioni da stafilococchi meticillino-resistenti ed in situazioni cliniche di alta probabilità di infezione da Gram-positivi: è questo il caso del paziente portatore di catetere venoso centrale a permanenza.

### Modifiche della terapia iniziale

Le indicazioni alla modifica della terapia antibiotica empirica nel paziente non responsivo alle terapie di prima scelta sono poco chiare ed i comportamenti non sono unanimi.

Qualunque modifica della terapia antibiotica dovrebbe basarsi su obiettivi segni di peggioramento clinico o suggestivi di una eziologia non coperta dagli antibiotici somministrati (cellulite perianale, tiplite, ecc.), e non sulla semplice persistenza di febbre, specie se di entità moderata ( $37-38,5^{\circ}C$ ). In ogni caso modifiche della terapia empirica iniziale non dovrebbero essere effettuate prima di almeno 4 giorni di trattamento a meno che i dati microbiologici non lo giustifichino. In mancanza di segni e sintomi clinici specifici e di indicazioni microbiologiche, la sola modifica empirica di terapia antibiotica accettata da tutti i maggiori esperti consiste nell'aggiunta di un farmaco antifungino.

### Aggiunta di antifungini

Sulla base di studi clinici (peraltro eseguiti su casistiche assai limitate) è divenuta pratica corrente, in pazienti persistentemente febbrili ( $> 38^{\circ}C$ ) e neutropenici ( $< 500 PMN/mm^3$ ) privi di documentazione di infezione, il somministrare empiricamente un farmaco antifungino dopo un periodo variabile di terapia antibatterica di solito 4-5 giorni). Il farmaco generalmente impiegato è l'amfotericina B ma la durata della terapia rimane imprecisata.

### Durata del trattamento

Comunemente, la durata della terapia antibiotica nel paziente neutropenico affetto da un'infezione documentata non dovrebbe essere inferiore ai 10-14 giorni. Per i pazienti con febbre di origine sconosciuta le opzioni sono meno chiare. In questo caso è preferibile proseguire la terapia per 4 giorni dopo lo sfebbramento, con un minimo di 7 giorni di trattamento totale.

**Tab. V.** Raccomandazioni AIEOP-IPINET per il trapianto di cellule staminali emopoietiche nella malattia granulomatosa cronica.

Il trapianto da donatore HLA identico familiare o non correlato è efficace nella cura della CGD e rappresenta una valida alternativa al trattamento convenzionale.

Le probabilità di successo sono maggiori se il trapianto è effettuato prima dell'adolescenza e comunque prima che si instaurino danni d'organo permanenti (< rischio GVHD).

Anche i pazienti con infezione attiva o complicanze infiammatorie croniche sono eleggibili al trapianto, sia pure con un maggior rischio di complicazioni infettive e di GVHD.

**Tab. VI.** Indicazioni al trapianto di cellule staminali emopoietiche nelle neutropenie congenite gravi (AIEOP-Registro Italiano Neutropenie)

1. mancata risposta al trattamento con G-CSF
2. necessità di dosi elevate di G-CSF (> 20  $\gamma$ /Kg/die)
3. mutazione isolata del recettore del G-CSF
4. displasia morfologica e anomalie citogenetiche

### Prospettive di cura definitiva

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche da donatore HLA-identico rappresenta ad oggi l'unica possibilità di cura definitiva per alcune di queste malattie, come la CGD (Tab. V) e la Neutropenia congenita grave (Tab. VI)<sup>21-22</sup>. La terapia genica, cioè la possibilità già adottata per altre immunodeficienze primitive, di curare la malattia attraverso la somministrazione di cellule staminali autologhe contenenti una copia sana del gene alterato, rappresenta sul piano teorico una strategia terapeutica promettente in particolare per la

**Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche da donatore HLA-identico rappresenta ad oggi l'unica possibilità di cura definitiva per alcune di queste malattie, come la CGD e la Neutropenia congenita grave.**

CGD, essendo in questo caso implicati geni che codificano per proteine metaboliche non coinvolte nei processi di proliferazione cellulare. La sicurezza di questo approccio tuttavia, è stata di recente messa in discussione in seguito all'insorgenza di proliferazione leucemica in 5 pazienti affetti da X SCID<sup>23</sup> e di mielo-displasia in 2 pazienti con CGD<sup>23</sup>. Tale procedura ad oggi deve pertanto essere considerata ancora oggetto di studi sperimentali.

### Bibliografia

- 1 International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies - Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, et al. *Primary immunodeficiencies: 2009 update*. J Allergy Clin Immunol 2009;124:1161-78.
- 2 Schäffer AA, Klein C. *Genetic heterogeneity in severe congenital neutropenia: how many aberrant pathways can kill a neutrophil?* Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7:481-94.
- 3 Ward AC, Dale DC. *Genetic and molecular diagnosis of severe congenital neutropenia*. Curr Opin Hematol 2009;16:9-13.
- 4 Horwitz MS, Duan Z, Korkmaz B, et al. *Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia*. Blood 2007;109:1817-24.
- 5 Halene S, Gaines P, Sun H, et al. *C/EBPepsilon directs granulocytic-vs-monocytic lineage determination and confers chemotactic function via Hlx*. Exp Hematol 2010;38:90-103.
- 6 Segal BH, Leto TL, Gallin JJ, et al. *Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease*. Medicine 2000;79:170-200.
- 7 Di Matteo G, Giordani L, Finocchi A, et al. IPINET (Italian Network for Primary Immunodeficiencies). *Molecular characterization of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease and identification of novel CYBB mutations: an Italian multicenter study*. Mol Immunol 2009;46:1935-41.
- 8 Matute JD, Arias AA, Wright NA, et al. *A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity*. Blood 2009;114:3309-15.
- 9 Martire B, Rondelli R, Soresina A, et al.; IPINET. *Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: an Italian multicenter study*. Clin Immunol 2008;126:155-64.

- <sup>10</sup> Lanza F. *Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency*. J Mol Med 1998;76:676-81.
- <sup>11</sup> Mansouri D, Adimi P, Mirsaeidi M, et al. *Inherited disorders of the IL-12-IFN-gamma axis in patients with disseminated BCG infection*. Eur J Pediatr 2005;164:753-7.
- <sup>12</sup> Gollob JA, Veenstra KG, Jyonouchi H, et al. *Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections*. J Immunol 2000;165:4120-6.
- <sup>13</sup> Etzioni A. *Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects*. Curr Opin Immunol. 2009;21:481-6.
- <sup>14</sup> Grimbacher B, Schäffer AA, Holland SM, et al. *Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4*. Am J Hum Genet 1999;65:735-44.
- <sup>15</sup> Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, et al. *Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome*. Nature 2007;448:1058-62.
- <sup>16</sup> Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, et al. *Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome*. J Allergy Clin Immunol. 2009;124:1289-302.
- <sup>17</sup> Minegishi Y, Saito M, Morio T, et al. *Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity*. Immunity 2006;25:745-55.
- <sup>18</sup> Freeman AF, Holland SM. *Clinical Manifestations, etiology, and pathogenesis of the Hyper IgE syndromes*. Pediatr Res 2009;65:32R-37R.
- <sup>19</sup> Miralles F, Visa N. *Actin in transcription and transcription regulation*. Curr. Opin. Cell Biol 2006;18:261-6.
- <sup>20</sup> Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica Comitato scientifico di disciplina infezioni. *Linee guida per il trattamento delle complicanze infettive in oncologia pediatrica: terapia empirica della neutropenia febbrile*. Disponibile al sito [www.aienp.it](http://www.aienp.it).
- <sup>21</sup> Seger RA. *Hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease*. Immunol Allergy Clin North Am 2010;30:95-208.
- <sup>22</sup> Thachil J, Caswell M, Bolton-Maggs PH, et al. *Non-myeloablative transplantation for severe congenital neutropenia*. Pediatr Blood Cancer 2008;50:20-1.
- <sup>23</sup> Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. *Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID*. Nat Rev Cancer 2003;3:477-88.
- <sup>24</sup> Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. *Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease*. Nat Med 2010;16:198-204.