

Un soggetto con pancitopenia e febbre persistente

Daniela Avino, Anna Di Palma, Catello Califano, Emanuele Panella, Valentina Maglione, Maria Di Perna, Mariano Lucignano, Paolo Danise

UOC Ematologia, Presidio Ospedaliero "A. Tortora" Pagani, Salerno

Questo lavoro è stato in parte presentato al 52° Congresso Nazionale SIBioC, 6-8 Ottobre 2020, Virtual Edition, nella Sessione Casi Clinici

ABSTRACT

A subject with pancytopenia and persistent fever.

We report a case of a 75-years-old female with pancytopenia, fever unresponsive to antibiotic therapy and persistent cough, hepatosplenomegaly and lymphadenopathy. Bone marrow shows pathological cells; some of them showed "hand-mirror" morphology and numerous hemophagocytosis. Atypical T lymphocytes with CD3+CD5-CD7-CD2++CD8+CD56- immunophenotype are detected by flow-cytometric analysis. Based on this evidence, Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in lymphoproliferative disease is suspected and confirmed by biopsy. HLH is a rare and life-threatening hematologic disease caused by excessive activation of immune system resulting in a systemic hyperinflammation with tissue destruction and multiorgan failure. According to HLH-2004 diagnostic criteria, HLH can be diagnosed in a patient with mutations in HLH-related genes or with at least 5 out of 8 diagnostic criteria (fever, hemophagocytosis, splenomegaly, high ferritin, elevated soluble-CD25, cytopenia, low natural killer cell activity, and hypertriglyceridemia or hypofibrinogenemia). HLH diagnosis is very challenging and integration of clinical-anamnestic, instrumental and laboratory information are essential for diagnosis and therapeutic strategy.

Parole chiave: citopenia, sindrome emofagocitica, citofluorimetria

CASO CLINICO

La paziente è una donna di anni 75 che si rivolge al Pronto Soccorso dell'ospedale in quanto da 10 giorni presenta febbre non responsiva a terapia antibiotica e tosse stizzosa; è affetta da morbo celiaco, epatopatia cronica da HCV (attualmente HCV-RNA negativa), cardiopatia ipertensiva, vasculopatia cerebrale cronica, broncopatia cronica ostruttiva. All'esame obiettivo presenta fegato a circa 2 cm dall'arco costale dolente alla palpazione e milza a circa 1 cm dall'arco costale. Esibisce PET/TAC *total body* con mezzo di contrasto che mostra diffuso ed intenso accumulo del tracciante in sede splenica e multipli focolai linfonodali. Per riscontro laboratoristico di pancitopenia (leucociti: $2,7 \times 10^9/L$, i.r. 4,0-10,0; neutrofilii $1,37 \times 10^9/L$, i.r. 1,9-7,5; piastrine $63 \times 10^9/L$, i.r. 130-400) ed anemia (emoglobina: 74 gr/L, i.r. 120-160) viene ricoverata nel reparto di Ematologia. Viene effettuata una valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico che non evidenzia cellule immature; i neutrofilii presentano iposegmentazione e non sono

evidenti alterazioni morfologiche di linfociti e monociti (Figura 1 A). Gli esami ematochimici rilevano: funzionalità epatica e renale nella norma, aumento degli indici infiammatori (VES: 38; i.r. 2-15, proteina C reattiva: 27 mg/L; v.r. <5, e della ferritina 1049 ng/mL; i.r. 30-400, lieve ipertrigliceridemia (231 mg/dL; i.r. 20-200), e fibrinogeno nella norma. Risultano negativi i test infettivologici per epatite B, HIV, TORCH (*toxoplasmosi, rosolia, citomegalovirus e Herpes virus*), EBV (*Virus Epstein Barr*), VDRL (*Veneral disease Research Laboratory*) per la ricerca del *Treponema Pallidum*, le emocolture, le urinocolture, le coprocolture ripetute, l'esame dell'espettorato e il tampone faringeo, l'assetto autoimmunitario e i marcatori tumorali di neoplasie solide. Alla radiografia del torace non si riscontrano reperti significativi. Durante il ricovero alla paziente viene somministrata terapia antibiotica e antipiretica senza effetti sulla curva termica, con persistenza di febbre e profuse sudorazioni notturne. Contestualmente si verifica un peggioramento della pancitopenia (leucociti: $0,43 \times 10^9/L$; neutrofilii: $0,28 \times 10^9/L$; piastrine: $5 \times 10^9/L$) e

Corrispondenza a: Daniela Avino, UOC Ematologia, Presidio Ospedaliero "A. Tortora" Pagani (Sa) 84016, Via A. De Gasperi 1, Tel 081 9213581, E-mail daniela.avino77@gmail.com

Ricevuto: 25.03.2021

Revisionato: 24.05.2021

Accettato: 28.05.2021

Pubblicato on-line: 29.07.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.044

dell'anemia (emoglobina: 67 gr/L), con conseguente necessità di supporto trasfusionale. Si osserva anche un ulteriore aumento della ferritina (1791 ng/mL) e dei trigliceridi (370 mg/dL). Ad ogni picco febbrile vengono rieseguite emocolture con esito negativo. Clinicamente si osserva incremento di epatomegalia e splenomegalia, peggioramento del quadro respiratorio, comparsa di ascite, ed edemi colognari agli arti inferiori. In considerazione dei focolai linfonodali multipli riscontrati all'esame TAC, della mancata risposta alla terapia in atto e degli esami laboratoristici, viene effettuato un agoaspirato midollare per esame morfologico e citofluorimetrico e biopsia osteomidollare (BOM). Gli strisci di sangue midollare mostrano una cellularità ridotta con marcata ipoplasia megacariocitaria ed eritroide e presenza di una popolazione pari al 38% di cellule

atipiche di medio-grandi dimensioni, con rapporto nucleo-citoplasmatico ridotto, cromatina moderatamente addensata, abbondante citoplasma privo di granuli, talvolta a manico di specchio, di difficile attribuzione di linea (Figura 1B). Si osservano, numerosi istiociti con figure di emofagocitosi (Figura 1C e 1D). L'esame citofluorimetrico evidenzia una quota di linfociti T CD3+ con elevato *Forward Scatter* (FSC) indicativo di grandi dimensioni cellulari con aberrante assenza di CD5 e CD7, aumentata espressione di CD2, ridotta espressione di CD8 e assenza di CD56. L'integrazione del reperto morfologico e il riscontro di linfociti T con immunofenotipo aberrante hanno orientato il sospetto diagnostico di malattia linfoproliferativa T (Figura 2). Alla BOM il midollo appare marcatamente ipocellulare e caratterizzato dalla presenza di numerosi istiociti CD68+ con evidenza di

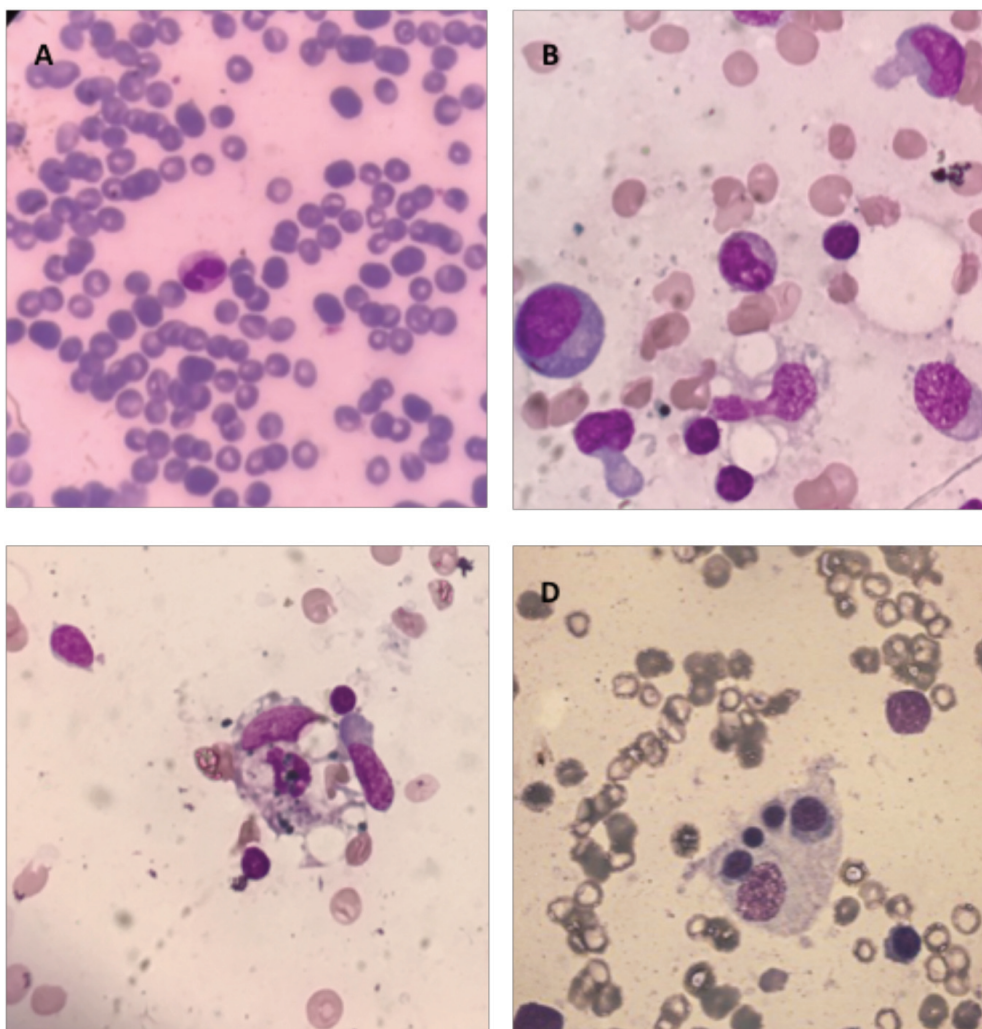


Figura 1

A, Sangue periferico. Un neutrofilo iposegmentato; le emazie non presentano alterazioni morfologiche di rilievo. B, Agoaspirato midollare. In alto a destra e in basso a sinistra due cellule atipiche di dimensioni medie, nucleo in posizione eccentrica leggermente indentato e citoplasma esteso in una propaggine allungata; al centro un macrofago con citoplasma vacuolato. C, istiocita che contiene un granulocita in apoptosi, un globulo rosso, diversi vacuoli e prodotti di degradazione cellulare; a destra dell'istiocita una cellula atipica simile a quella descritta in B. D, un istiocita nel cui citoplasma si osservano tre eritroblasti ben conservati e forse il nucleo di una cellula apoptotica.

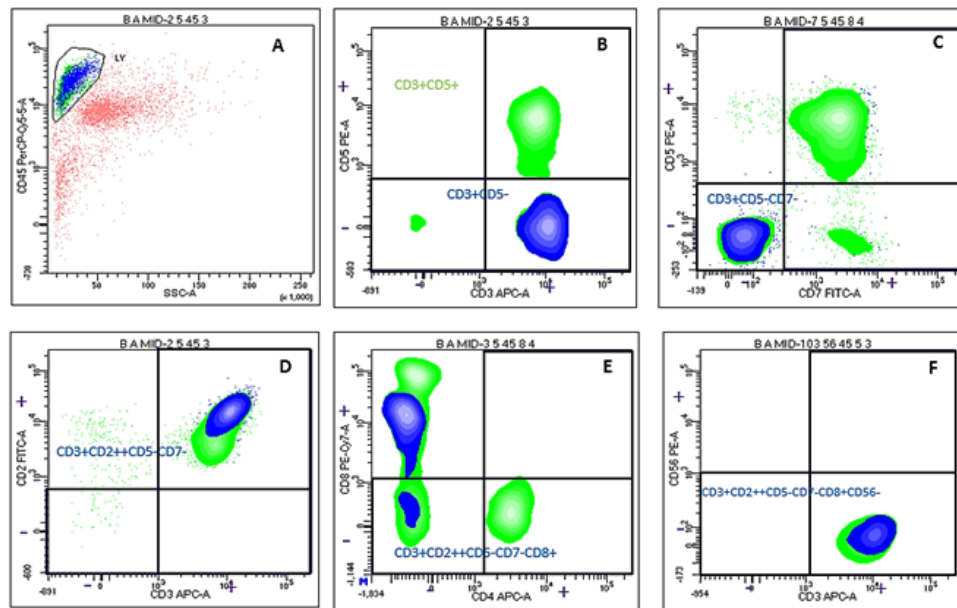


Figura 2
 Diagrammi dot-plot (A-F). Gate sui linfociti totali CD45+ (A). Nell'ambito dei linfociti T CD3+ è presente una quota patologica (in blu) con aberrante assenza di CD5 (B) e CD7 (C) maggiore intensità di espressione di CD2 (D) rispetto ai linfociti T normali, CD8+ (E) e CD56- (F).

eritrofagocitosi e da infiltrazione interstiziale (circa il 30% della cellularità totale) di linfociti prevalentemente di piccola taglia, a fenotipo T (CD20-CD3+CD5-CD4-CD8+CD30-), compatibili con la ipotizzata diagnosi clinica di sindrome emofagocitica e di concomitante sospetta malattia linfoproliferativa T cellulare. Viene posta diagnosi di linfoistiocitosi emofagocitica (HLH) essendo soddisfatti i seguenti criteri secondo protocollo HLH-2004 (8): febbre persistente; splenomegalia; citopenia trilineare, ipertrigliceridemia, iperferritinemia ed emofagocitosi su esame morfologico e su esame biotipico. Nonostante i trattamenti terapeutici in atto, le condizioni cliniche peggiorano ulteriormente con coinvolgimento multiorgano progressivo fino all'*exitus*.

DISCUSSIONE

La HLH, anche conosciuta come sindrome emofagocitica è un grave disordine della regolazione immunitaria, caratterizzato dall'iperattivazione di macrofagi e linfociti T citotossici che secernono grandi quantità di citochine responsabili di un'inflammatione sistemica incontrollata con danno tissutale progressivo e insufficienza multiorgano (1). L'attività fagocitica è un aspetto peculiare delle sindromi emofagocitiche (2) sebbene non esclusivo e il termine emofagocitosi si riferisce ai reperti caratteristici associati all'attivazione dei macrofagi, che inglobano eritrociti, leucociti, piastrine e loro precursori (1).

La HLH comprende forme primitive genetiche familiari (FHLH) e forme acquisite secondarie (sHLH). Le FHLH sono patologie a trasmissione autosomica recessiva che insorgono generalmente entro il primo anno di vita e sono causate da mutazioni genetiche che compromettono la funzione citotossica dei linfociti NK e T (3). Le sHLH, diagnosticate più frequentemente in età adulta invece, non si associano a difetti genetici noti e si sviluppano in condizioni di forte attivazione immunologica, come quelle correlate ad infezioni sistemiche (prevalentemente virali), stati di immunodeficienza o a neoplasie maligne sottostanti (4). Le neoplasie maligne sono tra i principali eventi scatenanti della HLH dell'adulto e più raramente del bambino. Fra le patologie oncoematologiche più frequentemente associate ad HLH nell'adulto sono compresi i linfomi a cellule T e NK, i linfomi a cellule B (soprattutto il linfoma B diffuso a grandi cellule), il linfoma di Hodgkin (in particolare quando associato a EBV) e le leucemie acute mieloidi e linfoidi (5). Indipendente dal fattore scatenante, il meccanismo patogenetico alla base dell'HLH è la persistente attivazione dei linfociti citotossici T CD8+ che rilasciano grandi quantità di interferone gamma (IFN-γ) in grado di attivare i macrofagi che a loro volta secernono citochine che sostengono l'inflammatione (fattore di necrosi tumorale o TNF, interleuchina-6 o IL-6, interleuchina-12 o IL-12) con conseguente emofagocitosi, danno tissutale, insufficienza d'organo e altre manifestazioni infiammatorie dell'HLH (1).

La HLH è una sindrome rara ma sicuramente sottostimata; per la FHLH si stima un'incidenza di 1/50 000 nati vivi (6) anche se sono descritte differenze in base alle aree geografiche in relazione alla distribuzione delle diverse mutazioni, all'etnia e alla frequenza dei fattori di rischio ambientali. I casi di HLH in età adulta attualmente ammontano a circa il 40% dei casi totali, con un'età mediana alla diagnosi compresa fra i 40 e 60 anni (7).

La diagnosi di HLH si basa su una serie di criteri clinici, di laboratorio e cito-istologici stabiliti dall'Histiocyte Society nel 1994 e poi revisionati nel 2004 (8). I criteri clinici comprendono: febbre ($\geq 38,5$ °C) e splenomegalia; i criteri di laboratorio comprendono: citopenie in almeno due linee (neutrofili $< 1,0 \times 10^9/L$, emoglobina < 90 g/L, piastrine $< 100 \times 10^9/L$), ipertrigliceridemia e/o ipofibrinogenemia (trigliceridi a digiuno ≥ 265 mg/dL, fibrinogeno ≤ 150 mg/dL), iperferritinemia (ferritina ≥ 500 ng/mL) e valori del recettore solubile dell'interleuchina-2 (sCD25 o sIL-2R) $\geq 2 400$ U/mL. I criteri cito-istologici comprendono: attività delle cellule NK ridotta o assente ed emofagocitosi nel midollo osseo, nel liquido cerebrospinale o nei linfonodi. La diagnosi di HLH può essere posta quando è dimostrata la presenza di un'alterazione genetica nota per indurre HLH o quando sono soddisfatti almeno 5 fra gli 8 criteri stabiliti.

La maggior parte dei segni e sintomi dell'HLH è imputabile alla presenza di elevati livelli di citochine circolanti. La febbre è indotta da alti livelli di interleuchine, la splenomegalia è il risultato diretto dell'infiltrazione di linfociti e macrofagi attivati, le citopenie periferiche sono dovute in parte alla mielosoppressione indotta da alte concentrazioni di TNF- α ed in parte all'emofagocitosi stessa, l'aumento dei trigliceridi è conseguente all'inibizione delle lipoprotein-lipasi deputate alla loro idrolisi e internalizzazione indotta dagli aumentati livelli di TNF- α , la riduzione del fibrinogeno è dovuta all'iperfibrinolisi indotta dall'attivatore tissutale del plasminogeno prodotto dai macrofagi, l'aumento della ferritina è dovuta al suo rilascio da parte dei macrofagi attivati, l'aumento del recettore solubile dell'interleuchina-2 (sCD25) è dovuta al suo rilascio da parte dei linfociti attivati (7).

La HLH è una condizione potenzialmente fatale; pertanto è fondamentale riconoscerla e avviare tempestivamente una terapia atta sia a ridurre l'iperinfiammazione sia ad eliminare gli eventuali fattori scatenanti. Il trattamento terapeutico prevede una combinazione di farmaci anti-linfoproliferativi, anti-infiammatori, linfocitolitici e immunosoppressori come gli steroidi, la ciclosporina A e l'etoposide con spiccata tossicità linfocitaria (8). Indipendentemente dalla causa di HLH, l'inizio tempestivo di una terapia efficace è di importanza fondamentale per la sopravvivenza del paziente. Inoltre, dove possibile, alla diagnosi è molto importante identificare gli eventuali fattori scatenanti che possano essere eliminati, così da ridurre il carico antigenico che stimola il protrarsi dello stato infiammatorio. Ad eccezione dei casi associati a

patologie autoimmuni o oncologiche, il trattamento iniziale (fase di induzione) è lo stesso per le forme genetiche e per quelle acquisite (9).

La HLH associata a neoplasie maligne rappresenta la forma a prognosi peggiore (7). Nella popolazione adulta non sono disponibili risultati di studi clinici che possano permettere di attuare trattamenti basati sull'evidenza e le decisioni diagnostico-terapeutiche sui singoli pazienti derivano prevalentemente dall'esperienza clinica.

Per la HLH genetica il trapianto di cellule staminale emopoietiche è l'unica terapia risolutiva.

È estremamente raro che un paziente sopravviva quando l'HLH è scatenata da una neoplasia (10). È probabile che il decorso clinico della paziente e la scarsa risposta alla somministrazione di cortisone ad alte dosi e di immunoglobuline, sia stato reso particolarmente infausto dalla patologia sottostante. I linfociti T citotossici CD3+CD8+ infatti, insieme ai monociti sono coinvolti nella patogenesi dell'HLH.

È verosimile che questi linfociti neoplastici sfuggendo ai meccanismi di regolazione abbiano potuto secernere una tempesta di citochine che ha reso ingravescente il quadro clinico della paziente. La diagnosi di HLH è complessa e richiede che siano soddisfatti una serie di criteri clinici, di laboratorio e cito-istologici stabiliti dall'Histiocyte Society. Nel caso descritto, il laboratorio ha avuto un ruolo fondamentale non solo nel fornire i valori dei parametri che soddisfacevano tali criteri (neutrofili, emoglobina, piastrine, trigliceridi, fibrinogeno, ferritina) ma anche nell'orientare la diagnosi sulla base del reperto morfologico di emofagocitosi nel midollo e di riscontro di cellule atipiche, nell'approfondimento mediante citofluorimetria che ha consentito di definire l'immunofenotipo di tali cellule e nella diagnosi differenziale con altre possibili cause di pancitopenia (infettive, autoimmuni, neoplastiche).

In conclusione, il percorso diagnostico nella HLH richiede un'accurata anamnesi con attenzione ai sintomi sistemici e d'organo e l'integrazione con i dati di laboratorio e strumentali. Una diagnosi precoce appare cruciale per l'attuazione di misure terapeutiche tempestive potenzialmente risolutive

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Astigarraga I, Gonzalez-Granado LI, Allende LM, et al. Haemophagocytic syndromes: The importance of early diagnosis and treatment. *An Pediatr (Engl Ed)* 2018 doi: 10.1016/j.anpedi.2018.05.003.
2. Jaffe R, Pileri S A, Facchetti F, et al. Histiocytic and dendritic cell neoplasm, Introduction. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press 2008:354-5.
3. Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu Rev Med* 2012;63:233-46.

4. Hayden A, Park S, Giustini D, et al. Hemophagocytic syndromes (HPSs) including hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in adults: A systematic scoping review. *Blood Rev* 2016;30:411-20.
5. Lehmsberg K, Sprekels B, Nichols KE, et al. Malignancy-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis in children and adolescents. *Br J Haematol* 2015;170:539-49.
6. Henter J-I, Soˆder O, Oˆst Aˆ, et al. Incidence and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Sweden. *Acta Paediatr Scand* 1991;80:428-35.
7. Nikiforow S, Berliner N. The unique aspects of presentation and diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015;2015:183-9.
8. Henter JI, Horne A, Aricˆo M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:124-31.
9. Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, et al. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2011;118:4041-52.
10. Otrˆock ZK, Eby CS. Clinical characteristics, prognostic factors, and outcomes of adult patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol* 2015;90:220-4.