

## SINDROMUL DE ACTIVARE MACROFAGICĂ

Prof. Dr. Ioan Gherghina<sup>1,2</sup>, Prof. Dr. Dumitru Matei<sup>1,2</sup>, Dr. Constantin Pascu<sup>2</sup>,  
Dr. Mirela Covăcescu<sup>1,2</sup>, Dr. Alexis Cochino<sup>1</sup>, Dr. Georgiana Nache<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, București

<sup>2</sup>Institutul pentru Ocrotirea Mamei și Copilului „Alfred Rusescu“, București

### REZUMAT

**Metodă.** Scurtă prezentare de caz a unui sindrom de activare macrofagică (MAS) secundar unei infecții virale acute și prezentare a unei revizuirii a literaturii de specialitate pe această temă.

**Rezultate.** Pacient în vârstă de 7 ani spitalizat pentru febră ridicată, frisoane, alterarea stării generale, hepatosplenomegalie, adenopatii periferice și centrale, anemie și trombocitopenie cu debut brusc. Rezultatele de laborator au arătat, de asemenea, trigliceride și feritină crescute, VSH moderat crescut, CRP crescută, prezența virusului gripei B în exsudatul faringian (PCR). Leucemia acută mieloidă a fost exclusă pe baza biopsiei de măduvă osoasă. Tratamentul cu imunoglobuline intravenoase a fost început cu 400 mg/kg și a dus la normalizarea tabloului clinic și biologic, inclusiv la remiterea adenopatiei mezenterice. MAS secundar infecției cu virusul gripal B a fost un diagnostic în concordanță cu aspectul clinic, biologic și evolutiv al cazului. După cum este descris în literatura de specialitate, MAS reprezintă expansiunea țesutului macrofagic (sau a histiocitelor), care este adesea declanșată de infecție (EBV, CMV) sau de modificări în terapia unor boli reumatice cronice (boala Still, LES, sindroame vasculitice). Mecanismul patogenetic al MAS este caracterizat prin proliferarea macrofagelor, corelată cu scăderea funcției citotoxice a celulelor NK și a limfocitelor citotoxice – adesea determinate de mutații ale genei care codifică perforina, PRF1, sau mutații în MUNC 13-4, o altă genă care este implicată în eliberarea perforinei în sinapsa imunitară cu o celulă țintă.

**Concluzii.** Apariția MAS ca o complicație a unei boli subiacente (vasculită, LES) sau infecții acute este un element de agravare și de pericol iminent care ar trebui să fie imediat diagnosticat și viguros tratat.

**Cuvinte cheie:** activare macrofagă, copil

### PREZENTAREA CAZULUI

Pacient în vârstă de 7 ani spitalizat pentru febră ridicată, frisoane, alterarea stării generale, hepatosplenomegalie, adenopatii periferice și centrale, anemie și trombocitopenie cu debut brusc.

Rezultatele de laborator au arătat, de asemenea, trigliceride și feritină crescute, VSH moderat crescut, CRP crescută, prezența virusului gripei B în exsudatul faringian (PCR). Leucemia acută mieloidă a fost exclusă pe baza biopsiei de măduvă osoasă.

Tratamentul cu imunoglobuline intravenoase a fost început cu 400 mg/kg și a dus la normalizarea tabloului clinic și biologic, inclusiv la remiterea adenopatiei mezenterice. MAS secundar infecției cu virusul gripal B a fost un diagnostic în concordanță cu aspectul clinic, biologic și evolutiv al cazului.

### DEFINIȚIE

Sindromul de activare macrofagică este o complicație gravă care pune în pericol viața copilului, apărută mai frecvent la pacienții cu artrită juvenilă idiopatică sistemică (SJIA), lupus eritematos sistemic (SLE), dar și în variate sindroame vasculitice. Acesta are cele mai multe dintre caracteristicile clinice și biologice ale limfocitocitozei hemofagocitice (HLH).

MAS a fost considerat de unii autori ca fiind o formă dobândită, reactivă (secundară) de HLH. De remarcat că unii dintre copiii cu SJIA aveau expresia heterozigotă a mutațiilor genetice ale HLH. Observarea unor creșteri marcate de citokine solubile la unii copii cu MAS este dovada unor proliferări ale limfocitelor T citotoxice (CD8+) care este totodată și o caracteristică a HLH. Pentru că expansiunea

țesutului format din macrofage sau histiocite prezintă activitate hemofagocitică în MAS frecvent declanșată de o infecție sau chiar de modificări în terapia medicamentoasă (introducere de aspirină sau alt AINS, săruri de aur etc.), termenul de limfohistiocitoză hemofagocitică reactivă a fost preferat de unii autori pentru a încadra sau defini această manifestare patologică, ceea ce sugerează că MAS aparține grupului de boli denumite HLH. Cu toate acestea, o serie de alți autori preferă că MAS să fie denumirea pentru o altfel de boală (1,2,3,4).

HLH este un termen general care descrie un grup de boli caracterizate prin acumulare de celule mononucleare bine diferențiate, benigne histologic, cu fenotip de macrofage. Pentru că aceste macrofage reprezintă un substrat de histiocite care sunt diferite de celulele Langerhans, această entitate trebuie diferențiată de histiocitoză cu celule Langerhans, ca și de alte boli cu celule dendritice.

HLH este o boală agresivă și cu risc vital care afectează cel mai frecvent sugarii de la naștere și până la vârsta de 18 luni, dar care apare și la copiii mai mari și la adult.

HLH este cunoscută sub două forme:

- HLH primitivă sau familială (FLH), care are drept cauză un defect genetic; apare la 25% dintre copii și este frecvent asociată cu co-sangvinitate parentală;
- HLH secundară, în care HLH este o manifestare patologică ce survine secundar unei alte boli, ca de exemplu: o infecție virală, boală autoimună, proliferare malignă etc. Există însă situații în practică, când manifestările clinice de HLH la copiii care au defectul genetic să fie declanșată de o infecție virală etc., ceea ce face ca diferențierea celor două forme de HLH să fie dificilă, mai ales că au fost diagnosticate cazuri de HLH secundară care erau heterozigote pentru mutația genetică. La pacienții adulți, totuși, la majoritatea cazurilor, mutația genetică este virtuală întotdeauna, absența realizând adevăratele forme de HLH.

## INCIDENȚA

În Suedia, incidența HLH este estimată ca fiind 1,2 copii la 1 milion de persoane; în Texas de 1:100.000 copii. Mulți copii sunt probabil nediaagnosticați, astfel ca incidența bolii poate fi mai mare, ceea ce este argumentat de dificultatea a diagnosticului pozitiv care a fost realizat înainte de deces numai la 11 din 32 de pacienți cu HLH.

## Boli asociate cu HLH:

- Infecțiile: virale (EBV, CMV, v. gripale etc.), bacteriene (gram negativi, BK etc.), parazitare, fungice;
- Dereglările imune: LES, artrita reumatoidă, boala Still, poliarterita nodoasă, boala mixtă a țesutului conjunctiv, sarcoidoza pulmonară, scleroza sistemică, sindromul Sjögren;
- Imunodeficiențe (combinată dobândită, boala Kawasaki, sindrom Griscelli, sindrom Hermansky-Pudlak tip 2 etc.);
- Limfoame, leucemii etc.

## GENETICA ÎN HLH

Genele asociate cu HLH au fost descrise pe cromozomii 6, 9, 10 și 17. Mutații (defecte genetice) au fost descrise pe mai multe gene la pacienții cu HLH familială (FHL), după cum urmează:

FHL 1 – gena încă neraportată

FHL 2 – gena perforinei (PRF 1)

FHL 3 – MUNC 13-4 (UNC13D)

FHL4 – syntaxin (STX11)

FHL5 – MUNC19-2 (STXBP2)

Purtătorii genei PRF1 au risc mai mare pentru un debut mai precoce al bolii, sub 6 luni. Anomaliile genei MUNC13-4 sunt frecvent invocate drept cauză a unei forme de limfohistiocitoză hemofagocitică încadrată în sindromul de activare macrofagică. Polimorfisme ale genei MUNC 13-4 au fost identificate la 56% dintre pacienții cu SJIA/MAS, spre deosebire de 12% dintre pacienții din grupul de control sănătos și 8% la pacienții cu SJIA, dar fără MAS (5).

## FIZIOPATOLOGIE

Mecanismul patogenetic al MAS nu este complet înțeles. Manifestările clinice ale MAS similare cu cele ale HLH primare, proliferarea necontrolată a macrofagelor au fost explicate prin scăderea funcției limfocitelor NK și limfocitelor T citotoxice (CD8+), cel mai adesea determinate la rândul lor de mutații la nivelul genei care codifică sinteza perforinei (PRF1) (6,7). Perforina este o proteină pe care celulele citolitice o utilizează pentru a induce apoptoza celulelor țintă, respectiv celulele tumorale sau celulele infectate cu virusuri. Într-o proporție semnificativă dintre pacienții cu HLH primară, boala este determinată de mutații în altă genă, respectiv MUNC13-4 (8), care codifică sinteza unei proteine ce este implicată în eliberarea perforinei la nivelul sinapsei imune cu o celulă țintă. Ca urmare, deși celulele citolitice ale pacienților cu mutația

MUNC13-4 produc cantități suficiente de perforină, capacitatea lor de a distruge celulele țintă este mult diminuată.

Defecte în funcția citolică a limfocitelor au fost de asemenea, implicate și în alte boli cu determinism genetic asociate cu sindrom hemofagocitic. Cercetări recente sugerează că pacienții cu MAS, ca și în HLH, au o profundă depresie a funcției citolitice a celulelor NK, asociată deseori cu anomalii ale perforinei și, de asemenea, cu un polimorfism al genei MUNC13-4 (9,10). Rezultă foarte clar că MAS, ca și HLH primitive, face parte din grupul bolilor imunodeficitare primitive cu defect genetic identificat. Deși corelarea deficitului funcției citolitice a limfocitelor la acești pacienți cu proliferarea excesivă a macrofagelor nu este pe deplin clarificată, prezența acestui deficit al funcției citolitice a limfocitelor în mai multe boli asociate cu sindrom hemofagocitic arată importanța acestei funcții pentru restaurarea funcției sistemului imun la o stare de echilibru în cursul unei reacții inflamatorii.

Două ipoteze explică modul în care disfuncția citolică poate conduce la o activare excesivă a macrofagelor.

Pacienții cu HLH/MAS au o capacitate diminuată de a controla unele infecții, prin diminuarea funcției citotoxice a limfocitelor NK și a limfocitelor T citotoxice și, ca urmare, nu are loc citoliza celulelor infectate, deci nu este înlăturată sursa de stimulare antigenică (11). Persistența stimulării antigenice duce la persistența reacției de clearance a antigenului și, mai concret, de proliferare a limfocitelor T, cu o producție persistentă și excesivă de citokine care, la rândul lor, stimulează excesiv proliferarea macrofagelor.

A doua ipoteză se bazează pe observația că în unele circumstanțe celulele citotoxice pot fi direct implicate în inducția apoptozei macrofagelor activate și a limfocitelor T activate în timpul stadiului de stingere a reacției imune (12).

În ambele ipoteze, disfuncția citotoxică conduce la o expansiune persistentă a limfocitelor T și a macrofagelor, cu creșterea excesivă a producției de citokine proinflamatorii, ceea ce determină și manifestările clinice caracteristice din timpul fazei acute a bolii.

Creșterea intensă a feritinei în MAS este explicată prin creșterea complexelor haptoglobină – hemoglobină, care sunt apoi legate de macrofage și suferă un proces de degradare din care rezultă bilirverdină și, respectiv, bilirubină, monoxid de carbon și fier liber în cantitate mare. Fierul liber este utilizat fie în combinație cu feritina în interiorul celulelor, fie este transportat și distribuit celulelor precursorale ale eritrocitelor din măduva osoasă (13,14).

Creșterea captării complexelor haptoglobină-hemoglobină de către macrofage va duce la creșterea sintezei de feritină (15).

În MAS, creșterea eliberării de hemoglobină liberă asociată cu creșterea eritrofagocitozei necesită creșterea producției de feritină pentru a putea sechestra cantitățile excesive de fier liber rezultate. Rezultă un nivel seric foarte crescut al feritinei, care este un argument important pentru diagnostic atât în MAS, cât și în HLH.

## TABLOU CLINIC

MAS apare de obicei ca o complicație la copiii cu SJIA sau altă boală cronică (LES, vasculite sistemice etc.), în primele zile sau săptămâni de la începerea tratamentului cu aspirină, alte AINS, sulfasalazină sau săruri de aur; mai poate apărea și ca urmare a unei infecții virale (CMV, EBV) etc. Aceasta înseamnă că la un copil cu boală cronică în evoluție și sub tratament cronic apare relativ brusc o agravare uneori brutală, ca o boală acută, exprimată clinic printr-o simptomatologie severă (1):

- febră înaltă și persistentă;
- alterarea importantă a stării generale și a stării de conștiință;
- limfadenopatii în grupele externe și interne: ganglioni cervicali, axilari, mezenterici etc.;
- hepatosplenomegalie;
- disfuncție hepatică cu sindrom citolitic prezent, icter moderat, hipoalbuminemie, anemiemie normală sau ușor crescută;
- sindrom hemoragic asemănător CDI, care este caracteristic pentru MAS și se manifestă prin hemoragii cutanate (rash, petesii, echimoze extinse), epistaxis, enteroragii;
- starea de șoc ce se poate instala uneori de la debutul MAS sau la scurt timp de la debutul acestei complicații;
- evoluția poate fi letală, fiind raportate însă și cazuri de supraviețuire.

Aceste manifestări clinice se asociază întotdeauna cu o citopenie bruscă ce interesează cel puțin 2 sau 3 linii celulare: leucocitele, eritrocitele și trombocitele. Scăderea trombocitelor este un semn precoce; trombocitopenia este consecința distrugerii de celule prin fagocitoză sau/și consumului la nivelul focarelor de inflamație, pentru că medulograma arată hiper celularitate și nivel normal al megacariocitelor.

Prođușii de degradare ai fibrinei în circulația periferică sunt, în general, printre cele mai precoce semne ale MAS.

Deoarece pacienții cu SJIA au adesea trombocitoză și leucocitoză, scăderea nivelului seric al

acestora este mai frecvent decât trombocitopenia și leucopenia reală, așa cum se observă în HLH clinic.

Pacienții cu MAS au niveluri semnificativ crescute de macrofage activate, așa cum o arată nivelurile de CD163 solubilă (SCD163) și proliferarea de celule T indicată de creșterea nivelului de SIL-2R, care sunt mai mari decât la pacienții cu SJIA. Acești markeri pot fi utili pentru a identifica pacienții cu MAS în stadiul subclinic.

O altă caracteristică de laborator a MAS este scăderea precipitată a VSH în ciuda persistenței unei CRP ridicate care reflectă probabil gradul de hipofibrinogenemie secundară consumului de fibrinogen și disfuncției hepatice.

Alte investigații de laborator în MAS sunt:

- nivel ridicat al trigliceridelor;
- nivel foarte mare al feritinei, chiar peste 10.000 ng/ml, găsit la majoritatea pacienților, care evoluează în paralel cu gradul de activare al macrofagelor.

Diagnosticul de MAS este de obicei confirmat de demonstrarea hemofagocitozei în măduva hematogenă. Totuși, aceasta poate fi dificilă și în mod eronat să infirme diagnosticul de MAS, pentru că în stadiul precoce al MAS rezultatul poate fi negativ. În plus, se știe astăzi că macrofagele hemofagocitice pot infiltra și alte țesuturi, respectiv ficatul, ganglionii limfatici, pielea și plămânii.

Alte manifestări clinice care arată prezența acestei complicații și anume MAS:

- encefalopatia acută instalată este un alt aspect clinic frecvent raportat în MAS; se exprimă prin modificări ale stării de conștiență, convulsii și comă. Uneori, examenul LCR arată pleiocitoza cu nivel ușor crescut al proteinelor;
- insuficiența renală a fost diagnosticată în mai multe raportări, asociată de regulă cu mortalitate ridicată (16);
- participare pulmonară argumentată prin demonstrarea prezenței infiltratelor pulmonare și macrofagelor hemofagocitice în lichidul de lavaj bronho-alveolar;
- insuficiență multiplă de organe cu evoluție ireversibilă se poate instala la pacienții cu HLH/MAS la care s-a temporizat inițierea terapiei.

## DIAGNOSTIC

Nu există criterii validate pentru diagnosticul de MAS și, în consecință, diagnosticul precoce este deseori dificil (1). Din această cauză, la pacienții cu o boală cronică de bază, respectiv o boală reumatologică persistentă și activă, dacă survine la un

moment dat în evoluție o scădere rapidă a VSH și a trombocitelor și o creștere a produșilor de degradare ai fibrinogenului și feritinei, aceasta ar trebui să ne facă să suspectăm posibilitatea apariției MAS și să încercăm demonstrarea prezenței citopeniei și a macrofagelor hemofagocitice.

Ravelli A. și colab. (*J. Pediatr.* 2005-140:598), pe un studiu de 74 de cazuri de MAS raportate la copiii cu SJIA, a arătat posibilitatea de separare a pacienților cu MAS de cei fără MAS pe baza următoarelor date clinice și de laborator:

- date clinice: pacienții cu MAS au fost mai susceptibili de a avea sindrom hemoragic (purpură, sângerări prelungite, hematoame) și/sau disfuncții ale SNC (iritabilitate, dezorientare, letargie, cefalee, convulsii și/sau comă);
- date de laborator: pacienții cu MAS au fost mai susceptibili de a avea trombocitopenie (<15.000/mmc), leucopenie (<4.000/mmc), un nivel scăzut al fibrinogenului (<2,5 g/l) și un nivel crescut al AST (> 40 UI/l);

Asocierea a două sau mai multe din datele de laborator anormale menționate diferențiază cel mai bine acei pacienți cu MAS de cei fără MAS. Separarea celor două grupuri a mai fost dată și de prezența a două sau mai multe din criteriile clinice împreună cu una dintre anomalii de laborator.

Pentru diagnosticul de HLH, International Histiocyte Society a elaborat un protocol de diagnostic bazat pe următoarele criterii validate:

1. Diagnostic molecular, care este unul definitiv, bazat pe găsirea mutației specifice fie în gena PRF1 și/sau gena MUNC13-4, sau

2. Diagnostic clinic bazat pe următoarele criterii:

- febră persistentă;
- splenomegalie;
- citopenie ce implică cel puțin două linii hematologice;
- hipertrigliceridemie și/sau hipofibrinogenemie;
- hiperferitinemie;
- hemofagocitoza în măduva osoasă.

Mai recent, au mai fost adăugate două criterii de laborator:

- absența sau scăderea activității citolitice a celulelor NK;
- nivel seric crescut al SIL-2R.

Definirea diagnosticului clinic de HLH necesită prezența a cel puțin cinci criterii din cele opt. (Alexei Grom M.D., în *The Rheumatologist*, vol. 4, nr. 12, decembrie 2010, pag. 22-23,29).

Din păcate, aplicarea acestor criterii pentru diagnosticul de HLH la pacienții cu boli reumatologice



este problematică și limitată din următoarele motive:

- unele dintre criteriile pentru HLH cum sunt limfadenopatia, splenomegalia și hiperferitinemia sunt manifestări clinice și biologice comune pentru SJIA însăși și astfel nu se poate diferenția MAS de SJIA convențională pe baza acestor criterii;
- alte criterii pentru HLH, cum sunt citopeniile și hipofibrinogenemia, devin evidente abia în stadiile tardive, pentru că se știe că pacienții cu SJIA adeseori au crescută celularitatea (leucocitele) și fibrinogenul ca parte a răspunsului inflamator existent în această boală. În aceste condiții, când un astfel de pacient dezvoltă MAS, el poate atinge un grad de citopenie și hipofibrinogenemie observată în HLH numai în stadiile tardive ale bolii, când tratamentul devine dificil sau inoperant;
- aplicarea acestor criterii pare și mai problematică pentru diagnosticul de MAS la pacienții cu LES la care citopenia autoimună este comună și dificil de diferențiat de cea determinată de MAS. La acești pacienți prezența unei hiperferitinemii extreme și creșterea lactatdehidrogenazei ar trebui să ridice suspiciunea de MAS. Pentru aceasta s-a inițiat modificarea criteriilor de diagnostic pentru HLH, pentru a le crește sensibilitatea și specificitatea și pentru diagnosticul de MAS la pacienții cu boli reumatologice (17).

#### **Diagnosticul diferențial al MAS:**

- cu puseul acut al unei boli reumatologice în evoluție;
- cu alte entități care asociază disfuncție hepatică, coagulopatie, citopenie sau encefalopatie;
- cu sindromul Reye, din cauza combinației dintre disfuncția hepatică și encefalopatie;
- cu purpura trombotică trombocitopenică, din cauza manifestărilor hemoragice; totuși, în MAS nu avem anemie microangiopată cu hematii fragmentate;
- cu HLH asociat bolilor maligne care, de obicei, nu se observă în MAS;
- cu sepsis și unele reacții la medicamente.

### **TRATAMENT**

MAS este o boală cu risc vital care înregistrează o rată înaltă a mortalității, motiv pentru care se impune un diagnostic precoce care să atragă după sine un tratament aplicat de urgență.

Mulți cilinicieni recomandă ca tratamentul MAS să fie următorul:

- Corticoterapie i.v.: metilprednisolon în puls – terapie cu 30 mg/kg/zi, 3 zile consecutive, urmat de 2-3 mg/kg/zi în patru doze la 6 ore;
- Dacă răspunsul la corticoterapie nu este evident, în 24-48 ore se începe administrarea următorului medicament din schema terapeutică și anume:
- Ciclosporina A 2-7 mg/kg/zi, parenteral (2,3, 18).

Dacă pacienții nu răspund la corticoterapie și ciclosporină A, înseamnă că este o formă severă de boală și că trebuie luată în considerare utilizarea protocolului de tratament în HLH din 2004 propus de Societatea Internațională de Histiocitoză, care prevede în plus față de cele două medicamente menționate și:

- Etoposidul (VP16), care este un derivat de podophylotoxină, inhibă sinteza de ADN prin formarea unui complex cu topoizomeraza II și ADN; are serioase efecte adverse, în special la pacienții cu insuficiență hepatică, putând determina supresia severă a măduvei osoase și infecții fudroaiante care să ducă rapid la deces.

Recent s-a sugerat că la pacienții cu MAS care nu răspund la combinația corticoterapie-ciclosporina A și au și insuficiență hepatică și renală, o alternativă la etoposid poate fi (19):

- globulina antitimocitară (ATG), care a fost mai bine tolerată și care determină depleția limfocitelor CD4+ și a celor CD8+ prin liza celulară dependentă de complement, uneori și o depleție moderată a monocitelor.

Utilitatea medicamentelor biologice în tratamentul MAS nu este pe deplin clarificată:

- inhibitorul factorului de necroză tumorală (TNF) a fost raportat ca eficient la unii pacienți cu MAS; alte raportări au semnalat că, la alți pacienți, MAS a continuat să evolueze în ciuda acestui tratament;
- agenții biologici care neutralizează interleukina 1, o citokină care joacă un rol central în patogeneza SJIA, au fost utilizați de unii practicieni în ideea că recăderea bolii de bază poate determina apariția MAS, rezultatele fiind contradictorii;
- imunoglobulinele administrate intravenos au obținut unele succese în tratamentul HLH reactivă asociată cu infecția virală. Acestea trebuie avute în vedere și în tratamentul MAS declanșat de infecția virală.
- Rituximab, care poate fi luat în considerare dacă MAS este determinat de infecția cu EBV (20);
- tratamentul de susținere a funcțiilor vitale este necesar la majoritatea pacienților;

- Se va avea în vedere și administrarea de plasmă proaspătă sau congelată.

### PROGNOSTIC

Mortalitatea în MAS, conform raportărilor, atinge 20-30%. Totuși, datorită cunoștințelor actuale, MAS

este diagnosticat relativ precoce și evoluția este ameliorată. Un procent important dintre pacienții cu MAS prezintă episoade recurente, motiv pentru care aceștia necesită monitorizare permanentă.

## *Macrophage activation syndrome*

**Prof. Dr. Ioan Gherghina<sup>1,2</sup>, Prof. Dr. Dumitru Matei<sup>1,2</sup>, Dr. Constantin Pascu<sup>2</sup>,  
Dr. Mirela Covăcescu<sup>1,2</sup>, Dr. Alexis Cochino<sup>1</sup>, Dr. Georgiana Nache<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*“Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest*

<sup>2</sup>*The Institute for Mother and Child Protection “Alfred Rusescu”, Bucharest*

### ABSTRACT

**Methods.** Short case presentation of a possible macrophage activation syndrome (MAS) secondary to acute viral infections and presentation of a literature review on this subject.

**Results.** Seven year old boy hospitalized for high fever, chills, and alteration of general state, hepatosplenomegaly, peripheral and central adenomegaly, sudden onset of anemia and thrombocytopenia. Lab results also showed elevated triglycerides and ferritin, moderately high ESR, high CRP, presence of influenza B virus in faryngian swab (PCR). Acute myeloid leukemia was excluded on the base of bone marrow biopsy. Treatment was started with 400 mg/kg intravenous immunoglobulin and resulted in normalization of clinical and biological picture, including mesenteric adenopathy remission. MAS secondary to influenza B was a diagnosis consistent with the picture of the clinic, biologic and evolution pattern. As described in the literature, MAS represent the macrophage tissue expansion (or of the hystiocytes), which is often triggered by infection (EBV, CMV) or changes in drug therapy of chronic rheumatic diseases (Still's disease, SLE, vasculitic syndromes). Pathogenic mechanism of MAS is characterized by proliferation of macrophages, correlated with decreased cytotoxic function of NK cells and cytotoxic lymphocytes – often determined by mutations in the gene that encodes perforina, PRF1, or mutations in MUNC 13-4, another gene that is involved in the release of perforine into the immune synapse with a target cell.

**Conclusions.** The occurrence of MAS complicating an underlying disease (vasculitis, SLE) or acute infection is a vital element of aggravation and imminent danger that should be immediately diagnosed and vigorously treated.

**Key words:** macrophage activation, child

### CASE REPORT

Seven year old boy hospitalized for high fever, chills, and alteration of general state, hepatosplenomegaly, peripheral and central adenomegaly, sudden onset of anemia and thrombocytopenia.

Lab results also showed elevated triglycerides and ferritin, moderately high ESR, high CRP, presence of influenza B virus in faryngian swab (PCR). Acute myeloid leukemia was excluded on the base of bone marrow biopsy.

Treatment was started with 400 mg/kg intravenous immunoglobulin and resulted in normalization of clinical and biological picture, including

mesenteric adenopathy remission. MAS secondary to influenza B was a diagnosis consistent with the picture of the clinic, biologic and evolution pattern.

### DEFINITION

Macrophage activation syndrome is a serious complication that endangers the child's life. It occurs more frequently in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis (SJIA), systemic lupus erythematosus (SLE), but also in various vasculitic syndromes. It has most of the clinical and biological characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH).

MAS was considered by some authors the acquired, reactive (secondary) form of HLH. Note that some children with heterozygous expression of mutations were SJIA genetic HLH. Observation of marked increases in soluble cytokine in some children with MAS are evidence of proliferation of cytotoxic T lymphocytes (CD8 +) which is also a feature of HLH. Because the expanded macrophages or histiocyte present hemophagocytic activity in MAS frequently triggered by an infection or even changes in drug therapy (aspirin or other NSAIDs, gold salts), the term of reactive lymphohistiocytosis is preferred by some authors to classify or define the pathological manifestations, suggesting that MAS belongs to the group of diseases called HLH. However, a number of other authors prefer to call MAS a different disease (1,2,3,4).

HLH is a general term that describes a group of diseases characterized by accumulation of mononuclear cells well differentiated, histologically benign, with macrophages phenotype. For these macrophages is a type of histiocytes different from Langerhans cells, the entity must be differentiated from Langerhans cell histiocytosis, and other diseases as dendritic cells.

HLH is a life-threatening and aggressive disease that most commonly affects infants from birth to age 18 months but which occur in older children and adults.

HLH is known in two forms:

- primitive or familial HLH (FLH), which is due to a genetic defect, occurs in 25% of children and is frequently associated with parental consanguinity;
- secondary HLH is a pathological event that occurs secondary to other diseases such as viral infections, autoimmune disease, malignant proliferation. There are situations in practice when clinical manifestations of HLH in children with genetic defects are triggered by a viral infection, which makes the differentiation of the two forms of HLH to be especially difficult cases, especially when the patients are heterozygous for the genetic mutation. In most adult patients, however, the genetic mutation is virtually always absent, thus representing the true forms of HLH.

## INCIDENCE

In Sweden the incidence of HLH is estimated to be 1.2 children per 1 million people, Texas 1: 100.000 children. Many children are probably undiagnosed, so that disease incidence may be

higher, given the fact that only 11 of 32 patients with HLH are diagnosed *intra vitam*.

Diseases associated with HLH:

- infections: viral (EBV, CMV, flu), bacteria (gram negative, BK), parasitic, fungal;
- immune disorders: SLE, rheumatoid arthritis, Still's disease, polyarteritis nodosa, mixed connective tissue disease, pulmonary sarcoidosis, systemic sclerosis, Sjogren's syndrome;
- immunodeficiency (acquired combined, Kawasaki disease, Griscelli syndrome, Hermansky-Pudlak syndrome type 2)
- lymphoma, leukemia

## GENETIC OF THE HLH

Genes associated with HLH have been described on chromosomes 6, 9, 10 and 17. Mutations (genetic defects) have been described in several genes in patients with familial HLH (FHL) as follows:

FHL 1 – gene yet unreported

FHL 2 – perforin gene (PRF 1)

FHL 3 – MUNC13-4 (UNC13D)

FHL 4 – syntaxin (STX11)

FHL 5 – MUNC19-2 (STXBP2)

PRF1 gene carriers are at higher risk for early onset disease, at less than 6 months. Abnormalities of MUNC13-4 gene are frequently invoked as the cause of a form of lymphohistiocytosis hemophagocytic framed in the macrophage activation syndrome spectrum. MUNC 13-4 gene polymorphisms have been identified in 56% of patients with SJIA / MAS, in 12% of patients in the healthy control group and in 8% of patients with SJIA without MAS (5).

## PATHOPHYSIOLOGY

MAS pathogenic mechanism is not completely understood. Clinical manifestations of MAS similar to those of primary HLH, uncontrolled proliferation of macrophages, were explained by decreased function of NK lymphocytes and T cytotoxic lymphocytes (CD8 +), most often caused by mutations in the gene that encodes the perforin synthesis (PRF1) (6,7). Perforin is a cytolytic protein that cells use to induce apoptosis of target cells, i.e. tumor cells or cells infected with viruses. In a significant proportion of patients with primary HLH, the disease is caused by mutations in another gene, respectively MUNC13-4 (8), which encodes a protein involved in the perforin release into the immune synapse with the target cell. Therefore, although cytolytic cells of patients with mutation of

MUNC13-4 produce enough perforin, their ability to destroy target cells is greatly diminished.

Defects in cytolytic function of lymphocytes were also involved in other diseases associated with genetic determinism associated with hemophagocytic syndrome. Recent research suggests that patients with MAS, as in HLH, have a profound depression of NK cell cytolytic function, often associated with perforin abnormalities and also with a polymorphism of the MUNC13-4 gene (9,10). It results very clearly that MAS, as well as primary HLH are part of the primitive immunodeficiency diseases with identified genetic defect. Although the correlation between the lymphocytes cytolytic function deficit in these patients and excessive proliferation of macrophages is not fully clarified, the presence of this deficit in several diseases associated with hemophagocytic syndrome shows the importance of this function in restoring the immune function towards a state of balance during an inflammatory reaction.

Two hypotheses explain how cytolytic dysfunction can lead to excessive activation of macrophages.

Patients with HLH/MAS have a diminished capacity to control some infections, due to reduced NK cell and cytotoxic T lymphocytes cytotoxic function; therefore, there is no cytolysis of infected cells, so antigenic stimulation source is not removed (11). Persistent antigenic stimulation leads to increased clearance reactions, and more specifically, the proliferation of T lymphocytes, with a persistent and excessive production of cytokines that stimulate excessive proliferation of the macrophages.

The second hypothesis is based on the observation that in some circumstances cytotoxic cells can be directly involved in apoptosis induction of the activated macrophages and activated T lymphocytes during the contraction stage (decay) of the immune response (12).

In both assumptions, cytotoxic dysfunction leads to persistent expansion of the T lymphocytes and macrophages with an excessive production of proinflammatory cytokines, which determines the characteristic clinical manifestations during the acute phase of the disease.

Increased levels of ferritin in MAS is explained by the increased numbers of haptoglobin-hemoglobin complexes, which are then attached to macrophages and undergo degradation resulting biliverdin and bilirubin, carbon monoxide and free iron in large amounts. Free iron is used either in combination with ferritin within cells or is transported and distributed to precursor cells from bone marrow erythrocytes (13,14).

Increased haptoglobin-hemoglobin complexes uptake by macrophages will lead to increased synthesis of ferritin (15).

Increased release of free hemoglobin associated with increased erythrophagocytosis in MAS, require increased ferritin production, in order to sequester the excessive quantities of free iron that result during the process. The result is a very high level of serum ferritin, which is an important argument for diagnosis in both MAS and HLH.

## CLINICAL PICTURE

MAS usually occurs as a complication in children with SJA or other chronic illness, such as SLE, systemic vasculitis, in the first days or weeks after treatment start with aspirin, other NSAIDs, sulfasalazine and gold salts; it can also occur as result of viral infections (CMV, EBV). This means that in a child with a chronic disease and under treatment, a sudden worsening occurs, as an acute disease, clinically expressed as severe symptoms (1):

- high and persistent fever;
- important alteration of the general condition and consciousness;
- lymphadenopathy in internal and external groups: cervical lymph nodes, axillary, mesenteric;
- hepatosplenomegaly;
- cytolytic liver dysfunction syndrome presenting with moderate jaundice, hypoalbuminemia, normal or slightly elevated amoniemia;
- IDC (intravascular disseminated coagulation) similar hemorrhagic syndrome which is characteristic for MAS and is manifested by skin bleedings (rash, petechiae, extended ecchymosis), epistaxis, enterorrhagia;
- state of shock that may occur at the onset of MAS or sometimes shortly after;
- evolution can be lethal, but survival has been reported.

These clinical manifestations are always associated with a sudden cytopenia on at least 2 or 3 cell lines: leukocytes, erythrocytes and platelets. Decreased platelet count is an early sign, thrombocytopenia is a result of destruction of cells by phagocytosis and/or consumption in the foci of inflammation, as medulograma shows increased cellularity and normal level of megakaryocytes.

Degradation of fibrin in peripheral blood are generally among the early signs of MAS.

Because patients with SJA have often thrombocytosis and leukocytosis, decreased numbers are more than actual thrombocytopenia and leukopenia, as seen in clinical HLH.



MAS patients have significantly elevated levels of activated macrophages, as evidenced by levels of soluble CD163 (sCD163), and proliferation of T cells indicated by increased levels of SIL-2R, which are higher than in patients with SJIA. These markers can be useful to identify patients with subclinical stage MAS.

Another laboratory feature of MAS is precipitated decrease of ESR despite persistently high CRP, probably reflecting the degree of hypofibrinogenemia secondary to fibrinogen consumption and liver dysfunction.

Other laboratory investigations in MAS are:

- high levels of triglycerides;
- high levels of ferritin, even more than 10,000 ng/ml found in most patients; it evolves in parallel with the degree of activation of macrophages.

The diagnosis of MAS is usually confirmed by demonstrating hemophagocytosis in bone marrow. However, this can be difficult and can erroneously deny the diagnosis in early stages of MAS. In addition, it is known today that hemophagocytic macrophages can also infiltrate other tissues, such as the liver, lymph nodes, skin and lungs.

Other clinical manifestations showing the presence of this complication, namely MAS:

- acute encephalopathy installed is another frequently reported clinical MAS, expressed by changes in consciousness, convulsions and coma. Sometimes CSF examination shows pleocytosis with slightly increased level of proteins;
- renal failure was diagnosed in several reports, usually associated with high mortality (16);
- pulmonary participation demonstrated by pulmonary infiltrates and presence of hemophagocytic macrophages in the bronchoalveolar lavage;
- multiple organ failure with irreversible evolution may occur in patients with HLH / MAS and delayed initiation of therapy.

## DIAGNOSIS

There are no validated criteria for diagnosis of MAS and therefore early diagnosis is often difficult. For this reason, patients with a chronic disease, namely persistent and active rheumatologic disease, the occurring at some point in evolution of a rapid decrease in ESR and platelet counts and an increase of fibrinogen degradation products and ferritin, should raise the suspicion of complications (MAS) and should lead to an attempt to demonstrate the cytopenias and hemophagocytic macrophages.

A. Ravelli et al. (*J. Pediatr*: 2005-140:598) on a study of 74 cases reported in children with SJIA and MAS showed the possibility of separation of the patients with and without MAS based on the following clinical and laboratory data:

- clinical data: patients with MAS were more likely to have hemorrhagic syndrome (purpura, prolonged bleeding, hematoma) and/or CNS dysfunction (irritability, disorientation, lethargy, headache, convulsions and/or coma);
- laboratory data: MAS patients were more likely to have thrombocytopenia (<15.000/mmc), leukopenia (<4.000/mmc), low levels of fibrinogen (<2.5 g/l) and increased levels of AST (> 40 IU/l).

The combination of two or more of the abnormal laboratory data mentioned best differentiates those patients with MAS of those without. Separating the two groups has been also possible based on the presence of two or more clinical criteria together with one laboratory abnormalities.

For the diagnosis of HLH, International Histiocyte Society has developed a diagnostic protocol based on the following validated criteria:

1. Molecular diagnosis (definitely) based on finding of specific mutations in PRF1 gene and/or gene MUNC13-4, or

2. Clinical diagnosis based on the following criteria:

- persistent fever;
- splenomegaly;
- cytopenia involving at least two blood lines;
- hypertriglyceridemia and/or hypofibrinogenemia;
- hyperferritinemia;
- hemophagocytosis in bone marrow.

More recently two other laboratory criteria have been added:

- absence or decreased cytolytic activity of NK cell;
- increased serum level of SIL-2R.

Defining the clinical diagnosis of HLH requires the presence of at least five of the eight criteria. (Alexei Grom MD, in *The Rheumatologist*, vol. 4. No. December 12, 2010, pag. 22-23, 29).

Unfortunately the application of these criteria for the diagnosis of HLH in patients with rheumatologic diseases is problematic and limited by the following reasons:

- some of the criteria for HLH as lymphadenopathy, splenomegaly and hiperferritinemia are common clinical and biological manifestations of SJIA itself and thus they

can not differentiate the conventional SJIA from SJIA plus MAS;

- other criteria for HLH such as cytopenias and hypofibrinogenemia become evident only in late stages because it is known that SJIA patients often have increased cellularity (leukocytes) and fibrinogen as part of existing inflammatory response in this disease. In these circumstances, when such a patient develops MAS, it can achieve a degree of cytopenia and hypofibrinogenemia suggestive of HLH only in the late stages of disease when treatment becomes difficult or ineffective.

Applying these criteria seems even more problematic for the diagnosis of MAS in patients with SLE, in which autoimmune cytopenia is common and difficult to differentiate from that caused by MAS. In these patients the presence of extreme hyperferritinemia and increasing lactate should raise a suspicion of MAS.

Because of these difficulties, modifying diagnostic criteria for HLH has begun, in order to also increase their sensitivity and specificity for diagnosis of MAS in patients with rheumatic diseases (17).

#### **The differential diagnosis of MAS:**

- flare of a rheumatic disease in evolution;
- other entities associating liver dysfunction, coagulopathy, cytopenia or encephalopathy;
- Reye's syndrome due to a combination of hepatic dysfunction with encephalopathy;
- thrombotic thrombocytopenic purpura, on the base of hemorrhagic manifestations; yet in MAS there is no microangiopathic anemia with fragmented red;
- HLH associated with malignant disease, which is not usually seen in MAS;
- sepsis and some reactions to drugs.

## **TREATMENT**

MAS is a life-threatening disease with a high mortality rate which is why early diagnosis is needed, in order to make an emergency treatment possible.

Many clinicians recommend that MAS treatment should be:

– i.v. steroids: methylprednisolone pulse therapy with 30 mg/kg/day, 3 consecutive days, followed by 2-3 mg/kg/day in four doses (every 6 hours); if the response to corticosteroids is not clear within 24-48 hours start the next treatment step

– Cyclosporine A parenteral 2-7 mg/kg/day (2,3,18); a case who does not respond to steroids and cyclosporin A introduction is equivalent to a severe form of disease and the treatment protocol

HLH-2004 proposed by the International Society of Histiocytosis should be considered; this implies the use of supplemental drugs:

- Etoposide (VP16) which is a derivative of podophyllotoxin that inhibits synthesis of DNA by forming a complex with topoisomerase II and DNA; the drug has serious adverse effects, particularly in patients with liver failure – it can cause severe bone marrow suppression and overwhelming infections that lead to death.
- it has recently been suggested that in patients with MAS unresponsive to steroid and cyclosporin A combination and who also have liver and kidney failure, an alternative to etoposide may be antithymocyte globulin (ATG) (19) which was well tolerated and which causes depletion of CD4 + and the CD8 + cell by complement-dependent lysis. In some patients it can induce a moderate depletion of monocytes, too.

Usefulness of biological drugs in the treatment of MAS is not fully resolved.

- tumor necrosis factor (TNF) inhibitors have been reported as effective in some patients with MAS, other reports have noted that in other patients, MAS continued to develop in spite of treatment;
- biological agents that neutralize interleukin-1, a cytokine that plays a central role in the pathogenesis of SJIA, were used by some practitioners in the idea that original disease relapse can cause MAS but results are contradictory;
- intravenous immunoglobulins have achieved some success in treating reactive HLH associated with viral infection. Acute treatment should be taken into account in MAS triggered by viral infection.
- if MAS is caused by infection with EBV, treatment with rituximab may be considered (20)

Supportive treatment is necessary in most patients. This should also include to take into account the administration of fresh plasma congeleta.

## **PROGNOSIS**

Mortality is reported to be 20-30%. However, due to current knowledge, MAS is diagnosed relatively early and evolution is improved. A significant percentage of patients with MAS presents recurrent episodes, needing constant monitoring.

## REFERENCES

1. **Grom A.A., M.D.** – Macrophage Activation Syndrome. A review of diagnosis, treatment, and prognosis. *The Rheumatologist*, vol. 4 nr. 2 Decembre 2010 pg. 22, 29-30
2. **Hadchouel M., Prieur A.M. Griscelli** – Acute hemorrhagic hepatic and neurologic manifestation in juvenile rheumatoid arthritis. Possible relationship to drugs or infection. *J. Pediatr.* 1985. 106. 561-566
3. **Stephan J.L., Kone-Paul I., Galambrun C., et al.** – Reactive haemophagocytic syndrome in children with inflammatory disorders. A retrospective study of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)*, 2001; 40: 1285-1292
4. **Athereya B.H.** – Is macrophage activation syndrome a new entity? *Clin. Exp.*
5. **Zang K. et al.** – Genetics in HLH. *Arthritis Reum.* 2008; 58: 28-92
6. **Filipovich H.A.** – Hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 2002; 22: 281-300
7. **Stepp S.E., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist F., et al.** – Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphocytosis. *Sciens.* 1999; 286: 1957-1959
8. **Feldmann J., Callebot I., Raposo G., et al.** – MUNC 13-4 is essential for cytolytic grannules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell.* 2003; 115: 461-473
9. **Grom A.A., Villameva J., Lee S., Goldmmitz E.A., Passo M.H., Filipovich A.H.** – Natural killer cell dysfunction in patients with systemic – onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *J. Pediatr.* 2003. 142; 292-296
10. **Wastert S.J., van Wijk R.D., Urbano L.E., et al.** – Mutations in the perforin gene can be linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49: 441-449
11. **Menasche G., Feldmann J., Fischer A., de Saint Basile G.** – Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol. Rev.* 2005; 203: 165-179
12. **Kagi D., Odermatt B., Mak T.W.** – Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 3262-32 72
13. **Avcin T., Tse S.M.L., Schneider R., Ngan B., Silverman E.D.** – Macrophage activation syndrom, as the presenting manifestation of rheumatic disease in childhood. *J. Pediatr.* 2006.148: 683-686
14. **Schaer D.J., Schleiffeubaum B., Kurrer M., et al.** – Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001; 409: 198-201
15. **Kristiansen M., Graversen J.H. Iacobson., et al.** – Identification of the hemoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrom. *Eur. J. Hematol.* 2005; 74: 6-10
16. **Sawhney S., Woo P., Murray K.J.** – Macrophage activation syndrome. A potential fatal complication of rheumatic disorders. *Arch. Dis. Child.* 2001; 85: 421-426
17. **Ravelli A., Magni – Manzoni S., Pistorio A. et al.** – Preliminary diagnostic quidelines for macrophage activation syndrom. Complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. *J. Pediatr.* 2005; 598-604
18. **Ravelli A. De Benedetti F., Viola S. Martini A.** – Macrophage activation syndrome in systemic juvenile rheumatoid arthritis succefully treated with cyclosporine. *J. Pediatr.* 1996; 128: 275-278
19. **Coca A., Bundy K.W., Marston B., Huggins J., Looney R.J.** – Macrophage activation syndrome: serological markers and treatment with anti-thymocyte globulin. *Clin. Immunol.* 2009; 132: 10-18
20. **Balamuth N.J., Nichols K.E., Paessler M., Teachey D.T.** – Use of rituximab in conjunction with immunosuppressive chemotherapy as a novel therapy for EBV – associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J. Pediatr./Oncol.* 2007; 8: 569-573