

# **Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica**

**Gruppo di Lavoro “Insufficienze Midollari”  
Coordinatore: Dr. Piero Farruggia**

## **RACCOMANDAZIONI DIAGNOSTICO-TERAPEUTICHE SULLE APLASIE MIDOLLARI ACQUISITE IN ETA' PEDIATRICA**

**Autori:** A. Barone,\* A. Lucarelli,\* D. Onofrillo,\* F. Verzegnassi,\* S. Bonanomi, S. Cesaro, C. Cugno, F. Fioredda, A.P. Iori, S. Ladogana, A. Locasciulli, D. Longoni, M. Lanciotti, A. Macaluso, R. Mandaglio, N. Marra, B. Martire, M. Maruzzi, G. Menna, L. Notarangelo, G. Palazzi, M. Pillon, U. Ramenghi, G. Russo, J. Svahn, F. Timeus, F. Tucci, M. Zecca, P. Farruggia,\*\* C. Dufour,\*\* P. Saracco.\*\*

\*Questi Autori hanno fornito il medesimo contributo alla stesura delle presenti Linee Guida e condividono la posizione di primo autore.

\*\*Questi Autori condividono la posizione di ultimo autore.

**Coordinatori: C. Dufour, P. Saracco.**

## INDICE

1	<a href="#">Abbreviazioni frequentemente usate nel testo</a> .....	4
2	<a href="#">Definizione, epidemiologia, fisiopatologia, clinica e classificazione</a> ....	7
2.1	Definizione.....	7
2.1.1	Nota sulle AA da sostanze chimiche.....	7
2.2	Epidemiologia.....	8
2.3	Fisiopatologia.....	8
2.4	Classificazione.....	9
2.5	Addendum: Anemia Aplastica Acquisita e PNH.....	9
3	<a href="#">Diagnosi</a> .....	11
3.1	Iter Diagnostico.....	11
3.2	Diagnosi Differenziale.....	12
4	<a href="#">Trattamento. Considerazioni generali</a> .....	16
5	<a href="#">Terapia Immunosoppressiva</a> .....	19
5.1	Globulina Antilinfocitaria.....	20
5.2	Ciclosporina.....	22
5.3	Steroidi.....	24
5.4	Fattore di Crescita Granulocitario.....	24
5.5	Terapie alternative immunosoppressive e non.....	26
6	<a href="#">Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche</a> .....	32
6.1	Trapianto Allogenico da Donatore Familiare HLA identico.....	32
6.2	Trapianto Allogenico da Donatore non Familiare.....	36
6.3	Trapianto Allogenico da Donatore Alternativo.....	39
7	<a href="#">Valutazione della Risposta Ematologica</a> .....	40
8	<a href="#">Follow-up</a> .....	41
8.1	Pazienti trattati con terapia immunosoppressiva.....	41
8.2	Pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche.....	45
9	<a href="#">Terapia di Supporto</a> .....	46
9.1	Trasfusione di Emocomponenti.....	46
9.2	Terapia Ferrochelante.....	47
9.3	Supporto Psicologico.....	48
9.4	Gravidanza.....	48
9.5	G-CSF.....	48
9.6	Supporto Anti-Infettivo.....	48

9.7	Vaccinazioni.....	50
10	<a href="#">Bibliografia.....</a>	51
11	<a href="#">APPENDICE 1 – Algoritmo terapeutico</a>	70
12	<a href="#">APPENDICE 2 – Sintesi della IST</a>	71
13	<a href="#">APPENDICE 3 – Sintesi dei controlli in corso di IST</a>	72
14	<a href="#">APPENDICE 4 – Nota AIFA del 31.12.2013</a>	73

## 1. ABBREVIAZIONI FREQUENTEMENTE USATE NEL TESTO

**AA** *Acquired Aplastic Anaemia*, Anemia Aplastica Acquisita

**AIDS** *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, Sindrome da Immunodeficienza Acquisita

**AIEOP** Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica

**AL** Acute Leukemia, Leucemia Acuta

**ALL-T** *Acute Lymphoblastic Leukemia T*, Leucemia Linfoblastica Acuta T

**AML** *Acute Myeloid Leukemia*, Leucemia Mieloide Acuta

**ATG** *Anti-Thymocyte Globulin*, Globulina Antilinfocitaria

**BOM** Biopsia Osteomidollare

**cAMT** *Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia*, Trombocitopenia Amegacariocitica Congenita

**cGy** CentiGray

**cMPL** Gene Codificante per il Recettore della Trombopoietina

**CMV** Citomegalovirus

**CsA** Ciclosporina A

**CSE** Cellule Staminali Emopoietiche

**CTX** Ciclofosfamide

**DDT** Dichlorodiphenyltrichloroethane

**DEB** Diepossibutano

**DKC** *Dyskeratosis Congenita*, Discheratosi Congenita

**DKC1** Dyskeratosis Congenita Gene 1

**EBMT** European Group for Blood and Marrow Transplantation

**EBV** Epstein Barr Virus

**EO** Expert Opinion

**FANS** Farmaci Antiinfiammatori Non Steroidei

**FISH** *Fluorescence in Situ Hybridization*, Ibridazione Fluorescente in Situ

**FKBP12** 12-kDa FK506-binding protein

**FLAER** fluorescent-labeled aerolysin

**GB** Globuli Bianchi

**G-CSF** *Granulocyte Colony Stimulating Factor*, Fattore di Crescita Granulocitario

**GDL** Gruppo di Lavoro

**GPI** Glicosilfosfatidilinositolo

**GITMO** Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo, Cellule Staminali Emopoietiche e Terapia Cellulare

**GVHD** *Graft Versus Host Disease*, Malattia del Trapianto verso l'Ospite

**Gy** Gray

**HAA** *Hepatitis-Associated Aplasia*, Aplasia Associata ad Epatite

**HAV** Virus dell'Epatite A

**HBV** Virus dell'Epatite B

**HCV** Virus dell'Epatite C

**HDV** Virus dell'Epatite D

**HEV** Virus dell'Epatite E

**HGV** Virus dell'Epatite G

**HHV6** Herpes Virus Umano 6

**HIV** Virus dell'Immunodeficienza Umana

**HLA** Antigene Umano Leucocitario

**HMGA2** High Mobility Group AT-Hook 2 Gene

**HSCT** *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche

**IgG** Immunoglobulina di Classe G

**IL2** Interleuchina 2

**INF-gamma** Interferon-gamma

**IST** *Immunosuppressive Therapy*, Terapia Immunosoppressiva

**LDH** Lattato Deidrogenasi

**LES** Lupus Eritematoso Sistemico

**MDMA** 3,4 Methylendioxyamphetamine

**MDS** *Myelodysplastic Syndrome*, Sindrome Mielodisplastica

**MMC** Mitomicina-C

**MMF** Micofenolato Mofetile

**MoAb** Anticorpo Monoclonale

**MPD** Metilprednisolone

**mTOR** Bersaglio della Rapamicina nei Mammiferi

**MUD** *Matched Unrelated Donor*, Donatore non Correlato di Midollo

**NIH** National Institute of Health

**NSAA** Non Severe Aplastic Anaemia, Anemia Aplastica Moderata

**OS** *Overall Survival*

**PDN** Prednisone

**PLT** Piastrine

**PNH** Emoglobinuria Parossistica Notturna

**PRES** Sindrome da Encefalopatia Posteriore Reversibile

**PTLD** Disordine Linfoproliferativo Post-Trapianto

**RAPA** Rapamicina

**RMN** Risonanza Magnetica Nucleare

**RT-PCR** Reazione a Catena della Polimerasi in Tempo Reale

**SAA** *Severe Aplastic Anaemia*, Anemia Aplastica Grave

**SAAWP** *Severe Aplastic Anaemia Working Party*

**SDS** Sindrome di Shwachman-Diamond

**TBC** Tubercolosi

**T-CGF** Fattore di crescita dei Linfociti T

**TERC** Telomerase RNA Component

**TERT** *Telomerase Reverse Transcriptase*

**TINF2** Proteina 2 Legante le Ripetizioni Telomeriche

**TNF-alfa** Fattore di Necrosi Tumorale-Alfa

**TPO** *Thrombopoietin*, Trombopoietina

**USA** Stati Uniti d'America

**VSAA** *Very Severe Aplastic Anaemia*, Anemia Aplastica Molto Grave

## 2. DEFINIZIONE, EPIDEMIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA, CLINICA E CLASSIFICAZIONE

### 2.1 DEFINIZIONE

Il termine **ANEMIA APLASTICA** o più propriamente **APLASIA MIDOLLARE** definisce una condizione patologica caratterizzata da pancitopenia periferica dovuta a ridotta o assente produzione di cellule ematiche da parte del midollo osseo, in assenza di infiltrato cellulare atipico e senza aumento di reticolina (1). La maggioranza (70-80%) dei casi è idiopatica; in alcuni casi si può identificare un farmaco, un agente chimico o un agente infettivo quale possibile causa precipitante l'insufficienza midollare.

Una possibile classificazione delle aplasie acquisite include:

- Idiopatiche (se causa non documentabile)
- Da cause infettive (virus epatitici, EBV, Parvovirus B19, HIV, Micobatteri etc.)
- Da esposizione tossica a radiazioni e agenti chimici (Tabella 1)
- Da GVHD post-trasfusionale
- In corso di gravidanza
- In corso di timoma
- In corso di emoglobinuria parossistica notturna (AA/PNH)

Nel 15-20% dei casi un'aplasia apparentemente acquisita può in realtà essere una forma costituzionale/ereditaria di:

- Anemia di Fanconi
- Discheratosi congenita
- Sindrome di Shwachman-Diamond
- Trombocitopenia congenita amegacariocitica
- Sindrome di Diamond-Blackfan
- Altra insufficienza midollare genetica a gene tuttora ignoto

Il presente documento si riferisce in modo specifico alla forma acquisita idiopatica.

#### 2.1.1 Nota su AA e sostanze chimiche

Riguardo agli agenti chimici, numerose sono le sostanze il cui uso è stato associato all'insorgenza di AA. Esse sono riassunte nella Tabella 1.

**E' in genere estremamente difficile provare il ruolo eziologico di una sostanza. Tuttavia, laddove il ruolo eziologico di un farmaco venga considerato altamente probabile, va valutata la possibilità di sospensione dello stesso, ove possibile.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

**Tabella 1.** Elenco delle sostanze per le quali è stata riportata associazione con l'insorgenza di AA

<b>Farmaci</b>	
Antibiotici	cloramfenicolo (non evidenza per colliri né compresse), sulfonamidi, cotrimossazolo, linezolid
Antireumatici	Sali d'oro, penicillamina
Antinfiammatori	indometacina, fenilbutazone, naproxene, diclofenac, piroxicam, sulfasalazina
Anticonvulsivanti	fenitoina, carbamazepina
Antitiroidei	carbimazolo (neutropenia), tiouracile
Antidepressivi	fenotiazine, dotiepina
Ipoglicemizzanti	clorpropamide, tolbutamide
Antimalarici	cloroquina
Altri	mebendazolo, allopurinolo, tiazidi
<b>Sostanze chimiche</b>	
Benzene e altri solventi	
Pesticidi	Organo-cloruri ed organo-fosfati, pentaclorofenolo, DDT e carbamati
Oli e agenti lubrificanti	
Droghe	ecstasy, MDMA, metilendiossi-metanfetamina
Altri	esposizione ad acqua non potabile, aghi non sterili, agricoltori e/o allevatori esposti ad animali aviari, fertilizzanti animali

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

L'incidenza di AA nel mondo occidentale è di 2 nuovi casi/anno/milione di abitanti mentre risulta di 2-3 volte superiore nell'est asiatico. Il rapporto maschi-femmine è di 1:1 e vi sono 2 picchi di incidenza, uno nel giovane adulto e l'altro nell'anziano (2, 3).

## 2.3 FISIOPATOLOGIA

Dal punto di vista patogenetico l'AA è una malattia multifattoriale in cui differenti meccanismi sono coinvolti, talora in modo associato.

Uno dei meccanismi prevalenti è quello autoimmunitario verso un antigene quasi sempre sconosciuto, per effetto del quale cloni T auto-reattivi si attivano liberando citochine mielosoppressive fra cui TNF-alfa e INF-gamma le quali, bloccando la mitosi e aumentando l'apoptosi, distruggerebbero le cellule staminali midollari (4, 5).

Un altro meccanismo potrebbe essere rappresentato da un difetto della cellula staminale ematopoietica. In favore di tale ipotesi depone la risposta che in soggetti AA multi-resistenti è stata ottenuta con gli agonisti di cMPL (6), espresso anche sui progenitori pluripotenti la cui proliferazione viene ad essere stimolata.

In molti studi l'antigene HLA DR2 è risultato iper-rappresentato in pazienti di varie etnie (anche europea e nordamericana) affetti da AA e PNH e in particolare da sindrome AA/PNH, ed è risultato predittivo di risposta alla IST (7, 8).



Nella forma da reazioni idiosincrasiche a farmaci è verosimile una tossicità diretta forse per aumentata suscettibilità individuale, geneticamente determinata, legata a deficit delle vie metaboliche di detossificazione: ad esempio il fenotipo null di alcune glutatione transferasi, iper-rappresentato nei pazienti aplastici asiatici, è risultato associato a un maggior rischio di sviluppare AA in queste popolazioni (9). Tale associazione non è stata confermata nei pazienti europei (10).

Un'altra caratteristica è l'accorciamento dei telomeri nei leucociti dei pazienti aplastici, imputabile secondo alcuni studi ad un meccanismo di stress replicativo (11). L'accorciamento del telomero può essere però anche dovuto a mutazioni nei geni di riparazione o protezione dei telomeri (DKC1, TERC, TERT etc.) che sono responsabili delle forme ereditarie (12, 13). Questo particolare meccanismo si realizza in quelle forme di aplasia che sono apparentemente acquisite ma in realtà sono forme genetiche in cui il fenotipo somatico extramidollare è molto attenuato o del tutto normale.

Di rilievo il fatto che la lunghezza dei telomeri è risultata essere il fattore predittivo principale di evoluzione clonale maligna in pazienti con AA e con MDS (14, 15). Nel complesso pertanto la patogenesi della AA appare multifattoriale e ancora non completamente definita in tutti i suoi aspetti.

## 2.4 CLASSIFICAZIONE

L'AA può essere differenziata, a seconda della gravità, in 3 forme (16, 17) (Tabella 2).

**Tabella 2.** Classificazione delle AA

MODERATA O NON GRAVE	GRAVE	MOLTO GRAVE
Cellularità emopoietica midollare <30% Neutrofili >500 ≤1000/mmc Oppure: non criteri delle altre 2 forme	Cellularità emopoietica midollare < 30% Almeno due delle seguenti condizioni: Neutrofili < 500/mmc Piastrine < 20.000/mmc Reticolociti < 20.000/mmc	Come grave ma: Neutrofili <200/mmc

## 2.5 ADDENDUM

### Anemia aplastica acquisita ed emoglobinuria parossistica notturna

Vi è una complessa relazione tra aplasia midollare acquisita e PNH, con possibilità di evoluzione dall'una all'altra forma. Un'emopoiesi alterata è presente nella maggioranza dei pazienti con PNH, alla diagnosi o nel corso della malattia (18). Metodiche citofluorimetriche ad alta risoluzione hanno permesso di evidenziare piccole percentuali di granulociti PNH+ in soggetti normali (19), nell'ordine di 20/10<sup>6</sup>. Lo studio delle mutazioni del gene *PIGA* nei soggetti normali indica tuttavia una policlonalità (20).

L'ipotesi più accreditata per spiegare l'espansione clonale nella PNH è che le cellule PNH+ possano selezionarsi in quanto resistenti ad un attacco immuno-mediato (21). Ciò spiega la frequente osservazione di cloni PNH nella aplasia midollare acquisita. Si tratta solitamente di cloni minori, la cui presenza è stata associata ad una migliore risposta alla terapia immunosoppressiva (7, 22, 23), anche se vi sono pochi studi che valutino la presenza e l'evoluzione di cloni PNH in pazienti pediatrici con AA (24, 25, 26).

L'osservazione in 2 pazienti PNH di un riarrangiamento del cromosoma 12 interessante il gene *HMGA2* ha suggerito che l'espansione dei cloni PNH possa essere un processo multistep con l'acquisizione da parte di cellule *PIGA* mutate di una minore suscettibilità all'apoptosi (27). Recentemente è stato ipotizzato che una deregolazione dell'espressione del gene *HMGA2* in pazienti con PNH e senza anomalie cromosomiche possa essere alla base dell'espansione del clone PNH (28).

### **La diagnosi citofluorimetrica**

Un sostanziale miglioramento nell'approccio diagnostico della PNH si deve all'impiego, dal 1996, da parte di Hall e Rosse (29), della citofluorimetria: con questa metodica è possibile valutare l'espressione di varie molecole GPI-linked sulla superficie delle diverse popolazioni cellulari.

L'analisi citofluorimetrica, fornendo un dato quantitativo anche in termini di intensità di espressione delle molecole GPI-linked, ha permesso di evidenziare popolazioni eritrocitarie PNH con deficit totale (PNH tipo III) o parziale (PNH tipo II), associate a diverso tipo di mutazione del gene *PIGA* (frame shift mutations versus point mutations).

Un passo successivo nella diagnosi citofluorimetrica di PNH è stato l'utilizzo della aerolisina batterica inattiva in grado di legarsi direttamente alla ancora GPI e dotata di maggiore sensibilità nell'evidenziare cloni PNH rispetto ai classici anticorpi monoclonali come l'anti-CD59 (30).

Attualmente i panels e le procedure consigliate per evidenziare un clone PNH in un paziente affetto da AA sono i seguenti (31):

- globuli rossi: analisi su sangue intero senza lisi dei globuli rossi, numero minimo di eventi da acquisire nel gate  $3 \times 10^5$ ; MoAb anti-CD59;
- granulociti e monociti: analisi dopo lisi dei globuli rossi, gating sequenziale, numero minimo di eventi da acquisire nel gate  $3 \times 10^5$ ; MoAb anti-CD45, CD33, CD15, CD14, CD24, FLAER.

### 3. DIAGNOSI

#### 3.1 ITER DIAGNOSTICO

Il work up diagnostico (Tabella 3) deve essere estensivo ed accurato al fine di:

- confermare la diagnosi e definire la gravità dell'aplasia;
- escludere altre possibili cause di pancitopenia con midollo ipocellulare;
- evidenziare o escludere forme costituzionali/ereditarie;
- evidenziare l'eventuale agente causale;
- evidenziare o escludere la presenza di coesistente clone citogenetico o PNH (32).

#### Esami fondamentali nell'iter diagnostico iniziale

**Anamnesi:** familiare e personale mirata a valutare eventuali esposizioni a sostanze ematotossiche (vedi Tabella 1) (1, 32) e/o infezioni. La principale infezione che può precedere una aplasia acquisita è un'epatite, la cui eziologia è stata attribuita sporadicamente a vari agenti virali epatitici (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV) e non (Parvovirus B19, CMV, EBV, HHV6, Transfusion Transmitted Virus, non-A-E Hepatitis Virus) (32, 33) ma, nella maggior parte dei casi, non viene identificato nessun agente virale.

**Esame Clinico:** deve includere lo stato di accrescimento staturale-ponderale e va mirato ad escludere la presenza di malformazioni, macchie cutanee, distrofia ungueale, microcefalia, ipogonadismo, alterazioni orofaringee (eritro/leucoplachia), tutti elementi caratteristici delle forme congenite (34).

I segni ed i sintomi della patologia sono legati alla gravità della pancitopenia (pallore, astenia, tachicardia, infezioni e/o febbre, petecchie, ecchimosi, emorragie, etc.), in assenza di epatosplenomegalia e linfadenomegalia.

**Esame emocromocitometrico:** caratterizzato da anemia normocromica normocitica o macrocitica, neutropenia e piastrinopenia; nelle fasi iniziali può esserci una citopenia isolata, in genere piastrinopenia, con piastrine di basso volume (32).

**Striscio di sangue periferico:** sono assenti i blasti, le emazie presentano anisopoichilocitosi e frequentemente macrocitosi; i neutrofili possono presentare granulazioni tossiche. In generale mancano le alterazioni morfologiche di monociti, neutrofili ed eritrociti tipiche della MDS (32).

**Conta reticolocitaria:** caratterizzata da marcata reticolocitopenia: reticolociti <20.000/mmc se metodo manuale, <60.000/mmc se con contaglobuli automatizzato, perché lo strumento può sovrastimare i valori bassi (32).

**Aspirato midollare:** non consente, da solo, una corretta valutazione della cellularità emopoietica del midollo osseo, in quanto un midollo osseo ipocellulare può essere legato a problemi tecnici di aspirazione e, raramente, può anche accadere di osservare una cellularità normale, qualora il prelievo sia stato fatto in una delle isole di ematopoiesi ancora conservate.

**Biopsia osteomidollare:** è l'esame diagnostico elettivo che evidenzia riduzione delle cellule emopoietiche globali a meno del 30%, con aumento diffuso e uniforme delle cellule adipose. Al contrario dell'aspirato midollare, offre la possibilità di valutare comparativamente la componente cellulare emopoietica e non (grasso, stroma, reticolo), mostrando così una effettiva riduzione delle cellule emopoietiche; ciò aiuta a differenziare le AA dalle leucemie ipocellulari dove sono presenti i blasti e dalle MDS in cui sono in genere presenti dis-eritro/dis-mielo e dis-megacariocitopoiesi (35).

### 3.2 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Mira ad escludere le leucemie e le MDS ipocellulari, le forme di aplasia in un contesto di malattia autoimmune definita e le forme genetico-costituzionali.

**Leucemia ipocellulare:** una AA può essere simulata da leucemie acute sia mieloidi sia linfatiche con esordio a bassa carica blastica (fenomeno che può perdurare anche per alcune settimane). Generalmente non vi è aumento del tessuto adiposo che è invece tipico nelle AA. In caso di sospetto esordio ipocellulare di leucemia si raccomanda la ricerca di marcatori molecolari di monoclonalità. Un altro criterio orientativo verso la leucemia è la presenza di cellule CD34+ e CD117+. La biopsia ossea può consentire diagnosi di AL in caso di aspirazione inefficace.

**Mielodisplasia ipocellulare:** circa il 20% delle MDS si presenta con midollo ipocellulare. La differenziazione fra MDS ipocellulare e AA può essere molto difficoltosa. La maggiore accentuazione delle stimate displastiche all'aspirato, la presenza di ALIP (anormale localizzazione centrolacunare delle cellule della serie bianca in maturazione), di isolotti di eritropoiesi immatura insieme con la dimostrazione di fibrosi e la distribuzione disomogenea del tessuto adiposo alla biopsia ossea, sono marcatori caratteristici anche se non tassativi delle MDS (36).

**Nota sullo studio citogenetico midollare:** in circa la metà dei casi di MDS pediatriche ipocellulari sono riscontrabili anomalie citogenetiche (monosomia del cromosoma 7, trisomia del cromosoma 8 o del cromosoma 21, altre anomalie complesse o più di 2 alterazioni). Generalmente nelle aplasie midollari lo studio citogenetico è normale anche se in circa il 10-12% dei casi può individuarsi un clone citogenetico patologico. Nel midollo aplastico spesso è difficile ottenere materiale sufficiente per l'analisi del cariotipo per cui si consiglia, in caso di materiale insufficiente, di ripetere più volte il prelievo. In alternativa l'analisi FISH permette di visualizzare anomalie cromosomiche specifiche nelle cellule in interfase (37, 38).

**Aplasie genetiche e/o costituzionali:** sono in genere associate a segni e sintomi somatici (ritardo di accrescimento staturo-ponderale, dispigmentazione cutanea, distrofia di unghie ed annessi, malformazioni viscerali, alterazioni scheletriche, alterazioni metaboliche) che le rendono identificabili. Può però accadere che alcune forme genetiche presentino un fenotipo sfumato o normale (Anemia di Fanconi, alcune forme di DKC, trombocitopenia amegacariocitica congenita, Anemia di Blackfan-Diamond, Sindrome di Shwachman-Diamond).

Soggetti con mutazioni TERT o TERC spesso sono asintomatici e con familiarità negativa. Le mutazioni TERT e TERC sono considerate piuttosto fattori di rischio anziché fattori genetici di insufficienza midollare; i soggetti con mutazioni di tali geni tendono ad avere ipocellularità midollare, ridotto numero di cellule CD34+ e di progenitori emopoietici, ma l'emocromo è normale o con solo lievi anomalie quali la macrocitosi. Pertanto lo studio della lunghezza dei telomeri sarebbe auspicabile in tutti i casi di insufficienza midollare; inoltre in caso di trapianto lo studio genetico dei potenziali donatori familiari è cruciale al fine di evitare di scegliere un donatore con la stessa mutazione e quindi una inadeguata riserva di cellule staminali.

**Il work-up per le AA prevede una serie di esami biochimici, genetici e strumentali, alcuni identificati come obbligatori, altri come ancillari. Di seguito le tabelle di riferimento (Tabella 3a, 3b). (Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)**

**Tabella 3a.** Work-up diagnostico per la diagnosi di Anemia Aplastica (32)

<b>ESAMI DIAGNOSTICI OBBLIGATORI</b>	<b>Forniscono informazioni su:</b>
<b>Esame emocromocitometrico completo</b>	Diagnosi e definizione di gravità
<b>Conta dei reticolociti</b> (con contaglobuli automatico o microscopio)	Diagnosi e definizione di gravità
<b>Striscio di sangue periferico</b>	Diagnosi differenziale
<b>Esami di funzionalità epatica</b>	Associazione con infezione epatica
<b>Indagini per la ricerca di virus epatitici</b> (sierologia e ricerca genoma DNA/RNA). L'RNA genomico dei virus ad RNA (HCV, HDV, HEV ed HGV) può essere qualitativamente valutato mediante tecnica di RT-PCR; il DNA del Parvovirus B19 può essere valutato mediante Nested-PCR. Tutte le suddette indagini, insieme a quelle per EBV, CMV ed altri virus, possono essere eseguite anche su midollo osseo	Associazione con epatite o altra infezione
<b>Aspirato midollare</b> per analisi morfologica, analisi citogenetica con esecuzione opzionale di FISH (per monosomia 7, trisomia 8, delezione del 5q, etc.), analisi immunofenotipica, e colorazioni per il ferro	Diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
<b>Biopsia osteomidollare</b> con immuno-evidenziazione degli antigeni CD34 e CD117	Diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
<b>Ricerca di cloni PNH</b> mediante citofluorimetria multiparametrica. Valutazione di campioni di sangue periferico con ricerca dei cloni PNH nelle popolazioni dei neutrofilii, dei monociti e degli eritrociti (se non trasfusi)	Associazione con cloni PNH. Diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
<b>Analisi citofluorimetrica dell'aspirato midollare:</b> ricerca di popolazioni monoclonali B- o T-cellulari, popolazioni di blasti. Ricerca di pattern anomali di maturazione/differenziazione come segno di displasia	Diagnosi differenziale con neoplasie mieloidi Associazione con linfoma
<b>Screening per autoanticorpi</b> (pannello in funzione della presentazione clinica). Inclusi anticorpi anti-nucleo ed anti-DNA se sospetto LES sottostante	Associazione con malattie autoimmuni
<b>Dosaggio di vitamina B12, acido folico</b>	Esclusione di deficit vitaminico
<b>Fibrinogeno, Ferritina</b>	Diagnosi differenziale con la sindrome emofagocitica
<b>Elastasi pancreatica fecale, amilasi e lipasi sieriche</b>	Diagnosi differenziale con sindrome di Shwachman
<b>Dosaggio di bilirubina sierica ed LDH</b>	Indici aspecifici. Possono aumentare in caso di eritropoiesi inefficace di modesta entità
<b>Rx-torace</b>	Esclusione di infezioni
<b>Ecografia addome ed ecocardiogramma</b>	Diagnosi differenziale: 1) Aumento di volume di milza e/o linfonodi (malattia ematologica maligna); 2) Malformazione o malposizione di organi (Anemia di Fanconi).

<b>ESAMI DIAGNOSTICI ANCILLARI</b> <i>(continuazione della tabella 3a)</i>	
<b>Ricerca di infezioni micobatteriche</b> (soprattutto micobatteri atipici, meno frequentemente TBC).	Se infezione sospetta. Colture di sangue midollare, colorazioni per bacilli acido-alcol resistenti su campioni istologici.
<b>Test in vitro sulle colonie</b> (risultati non ben standardizzati, non eseguibili in tutti i centri)	Il pattern di crescita può essere utile nella diagnosi differenziale tra insufficienza midollare e MDS.
<b>RMN della colonna vertebrale</b>	Midollo uniformemente sostituito da tessuto adiposo nella AA vs chiazze miste di midollo ipo- ed iper-cellulare nella MDS.

*(tabella 3a, continua)*

**Tabella 3b.** Screening per la ricerca dei disordini ereditari

<b>SCREENING PER LA RICERCA DI DISORDINI EREDITARI OBBLIGATORI</b>	<b>Forniscono informazioni su:</b>
<b>La sensibilità cromosomica alla MMC o al DEB test rappresenta il golden standard per la diagnosi di Anemia di Fanconi.</b>	1) In pazienti di età < 50 anni se si sospetta una Anemia di Fanconi; 2) In paziente candidato ad HSCT (rilevante per la scelta del regime di condizionamento).
<b>Analisi delle mutazioni di TERC</b>	Diagnosi differenziale con forme nascoste di DKC autosomica dominante. L'1-10% di tutte le forme idiopatiche sono positive.
<b>Analisi delle mutazioni di TERT</b>	In pazienti non rispondenti a IST.
<b>SCREENING PER LA RICERCA DI DISORDINI EREDITARI ANCILLARI</b>	<b>Forniscono informazioni su:</b>
Indagini su TINF2, NHP2, NOP10, DKC1	Quando riconoscibile un fenotipo DKC.
Indagini su cMPL	Tutti i pazienti con Trombocitopenia Amegacariocitica Congenita hanno mutazioni "loss of function" nel gene <i>c-Mpl</i> per il recettore della TPO. Utile nella diagnosi differenziale con la anemia aplastica nei primi anni di vita e per identificare potenziali non candidati all'uso di agonisti della TPO.
Geni SDS	Su sospetto clinico
Misurazione della lunghezza dei telomeri	Esame di screening se sospetto di forme congenite. Esame obbligatorio se sospetta DKC. Marker di evoluzione clonale nelle forme acquisite.

**E' raccomandata la tipizzazione HLA alla diagnosi sia del paziente sia dei familiari (anche per DRB1\*15 che potrebbe essere predittiva di risposta alla immunosoppressione nei pazienti con AA).**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consenso 8.7; livello del consensus B)**

**Se non è disponibile un donatore familiare HLA identico, è consigliato avviare nel work-up iniziale la ricerca di un donatore nei registri internazionali per fornire ai pazienti destinati a non rispondere alla IST (valutati al giorno +120 dall'inizio della suddetta terapia) la migliore possibilità terapeutica, nel minor tempo possibile.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)**

### **Nota ai test diagnostici**

Nel network GDL Insufficienze Midollari dell'AIEOP sono disponibili le seguenti diagnostiche centralizzate:

- Geni Discheratosi Congenita (*TERC*, *TERT*, *TINF2*, *DKC1*, *C16orf57/USB1*) e *cMPL*: Laboratorio di Ematologia, Istituto Gianna Gaslini, Genova.
- Analisi di complementazione per Anemia di Fanconi: Laboratorio di Ematologia, Istituto Gianna Gaslini, Genova.
- Studio telomeri (in collaborazione con l'Università di Aquisgrana): Laboratorio di Ematologia, Istituto Gianna Gaslini, Genova.
- Analisi di mutazione per Anemia di Fanconi: Genetica Medica, Burlo Garofolo, Trieste.
- Citofluorimetria PNH: Laboratorio di Ematologia, Ospedale Regina Margherita, Torino.
- Ciclo cellulare: Laboratorio di Ematologia, Istituto Gianna Gaslini, Genova.

## 4. TRATTAMENTO

### CONSIDERAZIONI GENERALI

Il trattamento dei pazienti pediatrici con AA va effettuato in centri specialistici di comprovata competenza nella gestione di pazienti con insufficienza midollare.

Il centro deve garantire servizi e presidi idonei ad un rapido approvvigionamento di farmaci immunosoppressori specifici, una ottimale terapia di supporto trasfusionale ed anti-infettivo, un'adequata gestione medico/infermieristica (39, 40).

L'iter diagnostico-terapeutico da intraprendere in un paziente pediatrico con pancitopenia idiopatica è estremamente complesso. In attesa di stabilire con certezza la diagnosi di AA ed il grado di severità è indicato un periodo di osservazione durante il quale va praticata la sola terapia di supporto. E' inoltre raccomandabile che le condizioni cliniche del paziente, in termini di controllo emorragico e trattamento delle infezioni, vengano stabilizzate prima dell'avvio del trattamento.

Il trattamento specifico si basa sul ripristino della ematopoiesi attraverso il trapianto di cellule staminali emopoietiche o l'avvio di terapia immunosoppressiva.

L'HSCT da donatore familiare HLA compatibile è l'opzione di prima scelta perché rappresenta una possibilità di cura definitiva ed il suo impiego si associa ad un tasso di sopravvivenza superiore al 90% (39, 41, 42).

L'impiego della IST trova il suo razionale nella possibilità di sopprimere la disregolazione immune, presente nelle AA, utilizzando farmaci ad azione immunosoppressiva antilinfocitaria (siero antilinfocitario, ciclosporina ed eventuali altri agenti), con elevate percentuali di successo e di sopravvivenza a lungo termine, così da farne la terapia di prima scelta nei pazienti con AA severa privi di un donatore familiare (1, 43).

Di recente, grazie all'utilizzo di regimi di condizionamento a ridotta intensità, vi è stato un significativo miglioramento dei risultati ottenuti anche con l'HSCT da donatore compatibile non familiare (70% di sopravvivenza se effettuato entro 2 anni dalla diagnosi in pazienti di età <20 anni) (44, 45, 46, 47); uno studio prospettico multicentrico pediatrico ha confermato che l'HSCT da donatore non familiare offre una più alta sopravvivenza libera da malattia rispetto ad ulteriore IST nei pazienti con AA non responsivi alla prima linea di immunosoppressione (44).

Va ricordato che negli ultimi anni alcuni studi retrospettivi hanno dimostrato sopravvivenze nei trapianti da donatore non familiare comparabili a quelle dei trapianti da familiare (48). Non si può escludere che tale opzione, nel caso si renda rapidamente disponibile un donatore non familiare HLA identico, possa diventare terapia di prima linea nei pazienti privi di donatore familiare.

**E' raccomandato che i pazienti con AA vengano seguiti nel percorso diagnostico-terapeutico e di follow-up da centri di comprovata esperienza nella gestione di bambini e adolescenti affetti da AA.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)**

### **Pazienti con Anemia Aplastica Grave o Molto Grave e pazienti con Anemia Aplastica Non Grave Trasfusione-Dipendenti**

In questi pazienti la remissione spontanea è estremamente rara ed un intervallo di tempo superiore ad uno o due mesi tra diagnosi e trattamento può associarsi ad un peggioramento della prognosi (49). Pertanto, una volta confermata la diagnosi, effettuata la tipizzazione HLA e stabilizzate le condizioni cliniche, la terapia va intrapresa prima possibile (39, 42).



Esiste un accordo generale da parte della comunità scientifica sul fatto che pazienti che dispongano di un donatore familiare HLA identico debbano essere avviati a HSCT, utilizzando, ove possibile, cellule staminali emopoietiche midollari (50).

In caso di mancanza di donatore familiare HLA identico il trattamento di prima linea è la IST combinata con siero antilinfocitario di cavallo e ciclosporina.

Il trapianto da donatore non familiare HLA compatibile trova indicazione nei pazienti privi di donatore familiare compatibile con forme severe o trasfusione-dipendenti non responsive o recidivate dopo IST (1, 39).

### **Pazienti con Anemia Aplastica Non Grave Trasfusione Indipendenti**

I pazienti con NSAA sono trasfusione-indipendenti in circa un terzo dei casi e possono presentare remissione spontanea senza trattamento specifico (51).

I restanti casi possono progredire verso la forma severa o presentare un quadro ematologico stabile per mesi o anni.

In un recente studio (52) su 284 pazienti pediatrici con NSAA trasfusione-indipendenti, trattati con CsA ed androgeni (stanozololo 0.1 mg/Kg/die), è stata osservata, dopo un follow-up mediano di 49 mesi, una progressione verso la trasfusione-dipendenza e/o la forma grave nel 13% dei casi, una persistenza di NSAA non trasfusione-dipendente nel 69.7% dei casi ed una remissione completa nel 16.8% dei casi. L'analisi dei fattori di rischio ha messo in evidenza come una conta di neutrofili inferiore a 1.000/mmc e di reticolociti inferiori a 60.000/mmc sia un fattore associato in maniera significativa alla progressione di malattia. Gli Autori concludono affermando che l'avvio precoce di terapia con CsA e stanozololo è efficace nel trattamento dei pazienti pediatrici con NSAA trasfusione-indipendenti.

Uno studio tedesco (53), su pazienti pediatrici con AA, evidenzia una migliore risposta alla IST nelle forme VSAA rispetto alle forme SAA e NSAA.

Un altro studio (54) riporta un rischio di recidiva di malattia a 10 anni dalla prima IST maggiore nei pazienti con NSAA (35%) rispetto a quelli con SAA o VSAA (12%).

La minor efficacia della IST nelle forme di NSAA potrebbe anche derivare dall'aver trattato pazienti affetti da altre patologie quali le telomeropatie o forme costituzionali che non traggono beneficio dalla terapia immunosoppressiva.

**Data la potenziale tossicità della IST e la mancanza di alto livello di evidenza circa i benefici di un avvio precoce della stessa nei pazienti con NSAA trasfusione-indipendenti, appare ragionevole un periodo di osservazione e supporto, seguito da un trattamento specifico (IST combinata o HSCT da familiare compatibile) soltanto in caso di progressione della malattia.**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.3; livello del consensus B)**

### **Pazienti con Aplasia Associata ad Epatite**

Uno studio pediatrico su 44 bambini con HAA trattati con IST standard ha riportato una sopravvivenza a 10 anni dell'88% (55). Un recente studio EBMT conferma che la risposta al trattamento e le variabili predittive sono comparabili a quelle osservate nei pazienti con AA senza epatite (56).

## **Pazienti con Anemia Aplastica Acquisita in gravidanza**

L'AA e la gravidanza sono eventi che possono tra loro esercitare influenze reciproche. L'AA può esordire in gravidanza (il primo caso descritto in letteratura è stato diagnosticato in una donna gravida nel 1888) (57) e la gravidanza può peggiorare una AA e indurre la recidiva con effetti negativi sull'outcome della gravidanza stessa.

Il supporto trasfusionale rappresenta il cardine del trattamento della citopenia in corso di gravidanza ma non è esclusa la possibilità di una terapia immunosoppressiva. La CsA si è dimostrata sicura ed efficace in questo setting di pazienti (58).

## 5. TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA

La IST combinata, ovvero l'associazione di ATG e CsA, costituisce il trattamento di prima linea più efficace per i pazienti affetti da AA che non dispongano di un donatore familiare HLA identico. Nella SAA la terapia combinata ha consentito di raggiungere una percentuale di risposte ematologiche ed un tasso di sopravvivenza libera da eventi significativamente superiore rispetto a quanto ottenuto nei pazienti trattati con la sola ATG (59, 60); anche nel setting di pazienti con NSAA trasfusione-dipendente la combinazione di ATG e CsA è risultata più efficace della CsA in monoterapia (61, 62).

Nella popolazione adulta con AA la terapia combinata garantisce una percentuale di risposte del 60-80% ed una sopravvivenza a 5 anni del 75-85% (52, 58, 63, 64, 65); nei pazienti pediatrici è stata riportata una sopravvivenza a 10 anni del 90% (66).

In uno studio retrospettivo su 316 pazienti con SAA sono risultati altamente predittivi di risposta a sei mesi dalla terapia combinata i seguenti fattori: la giovane età, un numero elevato di reticolociti e linfociti all'esordio di malattia (nei pazienti con reticolociti > 25.000/mmc e linfociti > 1.000/mmc la risposta è stata pari all'83% rispetto al 41% dei pazienti con conte più basse) (67).

La maggior parte dei pazienti ottiene una risposta stabile nel tempo; il tasso di recidiva è intorno al 30% (65, 68).

Un tapering più lento e graduale della CsA è stato associato ad una riduzione del tasso di recidiva sia nella popolazione adulta, come segnalato in uno studio EBMT (63), sia nella popolazione pediatrica nell'ambito della quale è stata riportata una incidenza cumulativa di ricaduta, a 10 anni, inferiore al 15% (53).

Nello studio prospettico USA di un ciclo prolungato di CsA (2 anni, con tapering dopo 6 mesi dalla dose piena) la ricaduta è stata solo ritardata ma non prevenuta; peraltro lo stesso studio suggerisce che basse dosi di CsA possono consentire un adeguato mantenimento della risposta (N. Young, ASH Education Session 2013).

I pazienti in recidiva dopo una iniziale risposta al primo ciclo di IST possono giovare nuovamente dell'immunosoppressione, la quale offre una possibilità di sopravvivenza del 75%; anche un terzo ciclo di IST può costituire una opzione ragionevole, in assenza di un donatore HLA identico, nei pazienti che hanno precedentemente risposto a suddetta terapia (69).

I pazienti che non rispondono ad un primo ciclo IST possono rispondere ad una seconda IST. La possibilità di risposta ad un secondo ciclo è del 30-60% (70, 71), sia con un secondo ciclo di ATG di cavallo (69) sia con ATG di coniglio dopo mancata risposta ad ATG di cavallo (71, 72).

Un recente studio giapponese ha esaminato prospetticamente 52 bambini non responsivi al primo ciclo di ATG di coniglio che hanno ricevuto un secondo ciclo di ATG di coniglio o un trapianto da donatore non correlato. La risposta al secondo ciclo è stata solo dell' 11% con una sopravvivenza libera da ricaduta a 5 anni di solo il 9.5%; tre pazienti hanno sviluppato anafilassi secondaria alla somministrazione di ATG (44). Non esistono dati comparati conclusivi sulla risposta ad un secondo ciclo di ATG di cavallo dopo primo ciclo con ATG di coniglio.

In caso di fallimento al secondo ciclo la probabilità di risposta ad una terza IST è molto ridotta.

I pazienti refrattari alla IST presentano, verosimilmente, una malattia con fisiopatologia differente, ma al momento non sono disponibili strumenti e parametri sufficienti a distinguerli dai pazienti responsivi. Una identificazione precoce dei casi sicuramente refrattari alla immunosoppressione sarebbe auspicabile al fine di avviarli precocemente a HSCT da donatore alternativo.

**Per i pazienti privi di un donatore non familiare HLA identico (inteso come con al massimo 1 antigene mismatched/10) e che sono refrattari ad un secondo ciclo di IST vanno valutate le seguenti opzioni terapeutiche: un terzo ciclo di IST oppure un HSCT da donatore familiare aploidentico oppure un HSCT da sangue cordonale. La scelta dell'HSCT da donatore aploidentico o da sangue cordonale, quale alternativa alla terza IST, dovrebbe dipendere dalla entità della neutropenia e/o dalla refrattarietà trasfusionale e/o dal rischio clonale e/o dal rischio infettivo del singolo paziente. L'HSCT da donatore familiare aploidentico o da sangue cordonale sono ad oggi da considerare terapie sperimentali e dovrebbero essere eseguite nell'ambito di studi clinici prospettici.**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)**

## 5.1 GLOBULINA ANTILINFOCITARIA

L'ATG, globulina policlonale, è la frazione purificata di IgG ottenuta da sieri di animali (cavallo o coniglio) immunizzati con timociti umani o con linee T-cellulari.

La sua azione immunosoppressiva è legata principalmente alla deplezione dei linfociti circolanti attraverso la lisi complemento-mediata, l'attivazione T-cellulare e l'apoptosi; altri potenziali meccanismi d'azione includono la modulazione di molecole di adesione o l'espressione di recettori chemochinici e l'induzione di cellule T regolatrici (Treg CD4+CD25+).

In Europa la preparazione standard di ATG è stata, sino ad alcuni anni fa, la ATG di cavallo (Horse ATG, Lymphoglobuline, Genzyme), impiegata in tutti gli studi cooperativi sino al 2009.

Negli USA è stata utilizzata una preparazione di ATG di cavallo (ATGAM, Pfizer) ad un dosaggio leggermente diverso (40 mg/kg x 4 giorni) rispetto alla Lymphoglobuline che era impiegata a 15 mg/kg x 5 giorni.

Nel 2007 in Europa la preparazione equina è stata ritirata dal commercio e sostituita con ATG di coniglio (Rabbit ATG, Thymoglobuline, Genzyme), spesso utilizzata, in precedenza, nella terapia immunosoppressiva di seconda linea.

La ATG di coniglio e quella di cavallo hanno un analogo metodo di produzione, si legano ad epitopi simili e sono in grado di determinare una deplezione dei Linfociti T Citotossici CD8+ sovrapponibile. Tuttavia l'impiego di ATG di coniglio si associa ad una deplezione più profonda dei Linfociti T CD4+. Rispetto all'ATG di cavallo, Thymoglobuline ha una maggiore emivita, una maggiore affinità per i linfociti umani, determina un periodo di linfopenia più lungo (73) ed ha pertanto un potere immunosoppressivo maggiore (74).

Diversi studi, pilota e retrospettivi, hanno confrontato gli outcome dei pazienti trattati con ATG di cavallo con quelli dei pazienti trattati con ATG di coniglio.

In un recente studio prospettico randomizzato (75), condotto su pazienti pediatrici ed adulti affetti da AA, è stato dimostrato che la risposta ematologica dopo trattamento con ATG di coniglio è nettamente inferiore a quella ottenuta con ATG di cavallo (37% vs 68%). Anche la sopravvivenza nel braccio di ATG di coniglio è stata largamente inferiore (76%) a quella osservata nel braccio trattato con ATG di cavallo (96%).

Uno studio multicentrico europeo ha confrontato i risultati di una terapia immunosoppressiva con ATG di coniglio (Thymoglobulin, Genzyme) e CsA nel trattamento di prima linea di 35 pazienti con AA con i risultati ottenuti in 105 pazienti, del registro EBMT, trattati con ATG di cavallo e CsA. Il trattamento con ATG di coniglio e CsA rispetto ad ATG di cavallo ha mostrato una percentuale di risposta inferiore (60% vs 67%), una sopravvivenza complessiva (68% vs 86%) e libera da successivo trapianto (52% vs 76%) minori ed una risposta tardiva simile (76).

Non sono però al momento disponibili in letteratura studi ad alto livello di evidenza che dimostrino superiorità dell'ATG di coniglio rispetto a quello di cavallo.

Si conferma pertanto che l'associazione di ATG di cavallo con CsA resta la terapia di prima linea più efficace per la cura dei pazienti affetti da anemia aplastica acquisita grave che non dispongono di donatore familiare HLA identico.

**Si raccomanda, per il primo ciclo immunosoppressivo l'utilizzo di ATG di cavallo. L'uso di ATG di coniglio (Thymoglobuline) va limitato solo ai casi di assoluta indisponibilità di ATG di cavallo (ATGAM), data la documentata inferiorità in termini di efficacia.**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 7.8; livello del consensus C)**

### **Dose e modalità di somministrazione**

La dose giornaliera di ATG di cavallo (ATGAM) è di 40 mg/kg/die per 4 giorni (64, 77) mentre quella di ATG di coniglio (Thymoglobulin) è 3.75 mg/kg/die per 5 giorni; entrambe vengono somministrate per via endovenosa tramite CVC in un tempo non inferiore alle 12-18 ore.

Nella scheda tecnica viene riportata l'indicazione ad eseguire un test cutaneo per valutare l'eventuale ipersensibilità al farmaco e avviare un protocollo di desensibilizzazione nei soggetti con test positivo; tuttavia l'esperienza maturata in ambito pediatrico ha portato a considerare tale test non strettamente necessario. Si raccomanda, invece, un'adeguata premedicazione antiallergica ed antipiretica con steroide, acetaminofene e difenilidramina.

Durante il trattamento il numero delle piastrine dovrebbe essere mantenuto sopra 30.000/mmc; le stesse non vanno infuse contemporaneamente alla somministrazione di ATG a causa di un'attività anti-piastrinica dell'ATG.

In caso di refrattarietà alla trasfusione piastrinica si devono ricercare gli alloanticorpi per determinare la necessità di prodotti piastrinici sprovvisti dell'antigene contro cui è diretto l'alloanticorpo (vedi Terapia di supporto capitolo 9, capo 9.1).

Vanno utilizzate, allo scopo di ridurre le reazioni trasfusionali, piastrine filtrate e irradiate in accordo con le recenti raccomandazioni di uno studio EBMT (78).

I pazienti devono essere ricoverati in ambiente protetto. In caso di febbre, anche se verosimilmente secondaria ad infusione di ATG, è consigliato, in via precauzionale, trattamento con antibiotici ad ampio spettro: la terapia va sospesa prontamente se il paziente appare clinicamente stabile e gli esami colturali risultano negativi (79).

Per ridurre il rischio di reazioni dovute all'infusione dell'ATG (sindrome acuta da rilascio di citochine e malattia da siero che tipicamente insorge tra il settimo ed il quattordicesimo giorno dall'inizio dell'ATG) è indicato l'impiego di metilprednisolone 1-2 mg/Kg/die endovena (in aggiunta a paracetamolo) per 14 giorni dopo l'inizio del siero, somministrandolo almeno 30 minuti prima di ciascuna dose di ATG, dimezzando la dose ogni 7 giorni a partire dal giorno +15 fino allo stop il giorno +28.

Dopo i primi 7 giorni il prednisone per via orale può sostituire la somministrazione endovenosa. Se durante l'infusione dell'ATG si osservano gravi reazioni (brividi scuotenti, broncospasmo, ipotensione) si può sospendere l'infusione di ATG che può, a reazione superata, essere riavviata ad una velocità inferiore (superando anche le 24 ore d'infusione continua). I sintomi più comuni della malattia da siero sono artralgie, mialgie, rash, febbre, ipertransaminasemia, proteinuria e piastrinopenia da consumo.

L'ipertransaminasemia tende a normalizzarsi in alcuni giorni e un aumento lieve-moderato delle transaminasi non è una controindicazione all'infusione di ATG.

In caso di grave tossicità secondaria a somministrazione di ATG non vi è indicazione al passaggio da una formulazione ad un'altra (da ATG di cavallo ad ATG di coniglio e viceversa).

## Immunodepressione e riattivazione virale

La riattivazione dei virus EBV e CMV, senza sviluppo di malattia, è frequente dopo ATG. Nello studio di Scheinberg (73) su 78 pazienti trattati con diversi regimi di IST la riattivazione di EBV è stata osservata nell'87% dei casi con un picco di copie più elevato e maggior durata della riattivazione nei pazienti trattati con ATG di coniglio; la riattivazione di CMV dopo ATG di cavallo è stata meno frequente (33% dei casi) ma superiore come durata.

Nessun paziente ha sviluppato malattia linfoproliferativa, nemmeno nei casi in cui il numero di copie era tanto elevato da preludere, in altri contesti di malattia, ad una PTLD. Tali dati avvalorano la pratica di non monitorare la riattivazione virale nei pazienti con AA trattati con la sola ATG, mentre tale monitoraggio è raccomandato nel caso si aggiungano altri agenti immunosoppressivi.

## 5.2 CICLOSPORINA

La CsA inibisce l'immunità cellulo-mediata, la produzione T-dipendente di anticorpi e la produzione ed il rilascio di linfocine (IL- 2, TCGF). Dati sperimentali mostrano che la CsA blocca i linfociti quiescenti in fase G0 all'inizio della fase G1 del ciclo cellulare. Agisce sui linfociti in modo specifico e reversibile, non deprime l'emopoiesi e non altera la funzione dei fagociti.

La CsA è utilizzata nel trattamento delle SAA e delle NSAA trasfusione-dipendenti in associazione con ATG; la terapia di combinazione, come già detto, si è dimostrata più efficace rispetto al trattamento con la sola CsA (59).

Nei pazienti con NSAA trasfusione-indipendenti la CsA trova impiego sia in monoterapia sia in associazione con gli androgeni (52). Infine, nei paesi in via di sviluppo, l'uso di CsA in monoterapia è a volte una scelta obbligata per il trattamento dei pazienti con AA (80).

### Dose

Ad oggi non è noto quale sia la dose ottimale di CsA nel trattamento delle AA; nella maggior parte degli studi ed in tutti i protocolli europei viene utilizzata, sia negli adulti sia nei pazienti pediatrici, la dose di 5-7 mg/kg/die suddivisa in due somministrazioni (53, 54) mentre negli USA si somministra una dose nettamente superiore, pari a 15 mg/kg/die.

Non esistono dati certi neppure sui livelli ematici da raggiungere. Il target di livello ematico misurato prima della somministrazione della CsA ("trough level") è di 150-250 ng/ml nei protocolli europei (81) e di 200-400 ng/ml in quelli statunitensi (75).

Uno studio pediatrico AIEOP non ha mostrato alcuna evidenza che il mantenimento di livelli ematici più elevati migliori i tassi di risposta mentre ha rilevato un aumento del rischio di tossicità da ciclosporina (82). Anche nei protocolli pediatrici giapponesi si utilizza la dose di 5 mg/kg e un target di livello ematico pre-dose di 100-250 ng/ml (54).

Mutuando l'esperienza dal trapianto di rene (83), un indice più attendibile dei livelli ematici terapeutici potrebbe essere quello a due ore dall'assunzione della CsA poichè il picco massimo di concentrazione plasmatica si osserva tra la prima e la terza ora dopo l'assunzione orale (800 ng/ml dopo 180 mg in adulti).

In attesa di uno studio di validazione dei livelli ematici ottimali, sia basali sia dopo due ore, in pazienti pediatrici con AA, si raccomanda di mantenere i livelli basali tra 100-250 ng/ml e di utilizzare il dosaggio a due ore nei pazienti con livelli sub-ottimali ai fini di documentare l'assorbimento e la reale concentrazione del farmaco durante la fase di picco (84).

Concludendo, la CsA viene somministrata per os dal primo giorno di ATG alla dose di 5 mg/kg/die; aggiustamenti successivi della posologia andranno effettuati al fine di mantenere i livelli ematici pre-dose nel range 100-250 ng/ml.

**Nel trattamento immunosoppressivo la dose raccomandata di CsA per os è 5 mg/Kg/die, mantenendo i livelli ematici basali tra 100 e 250 ng/ml.**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.3; livello del consensus B)**

### **Durata del trattamento**

In molti studi la durata del trattamento con CsA prevista dal protocollo è di sei mesi. In caso di risposta completa la sospensione può essere rapida o graduale ma quest'ultima strategia è la più comune e logica da seguire anche se mancano adeguati studi prospettici comparativi. Uno studio retrospettivo pediatrico italiano ha dimostrato un più elevato rischio di recidiva effettuando un tapering rapido della CsA e gli autori raccomandano di continuare la ciclosporina a dose terapeutica per almeno 12 mesi dopo l'ottenimento della massima risposta ematologica (82), per poi avviare un tapering lento e graduale (5-10% della dose ogni mese; vedi Appendice 2 di pag. 71) sino alla sospensione in non meno di 24 mesi in caso di risposta completa (1, 82). L'efficacia di tale strategia nel ridurre il numero di recidive nei pazienti pediatrici con SAA è stata confermata in altri studi pediatrici (54).

**Si raccomanda di continuare la ciclosporina a dose terapeutica per almeno 12 mesi dopo la risposta massima, con successivo graduale e lento tapering (5-10% della dose ogni mese) sino alla sospensione non prima di 24 mesi dopo la massima risposta.**

**(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 7.8; livello del consensus C)**

### **Tossicità**

**Nefrotossicità:** l'insufficienza renale è dose-correlata e spesso associata ad ipertensione. La CsA determina una riduzione reversibile del flusso ematico renale e della filtrazione glomerulare e pertanto la sua nefrotossicità è ascrivibile alla vasocostrizione delle arteriole afferenti. Una nefrotossicità lieve-moderata risponde in genere alla riduzione della dose. Dosi cumulative elevate o elevati livelli ematici basali possono associarsi allo sviluppo di fibrosi interstiziale e quindi determinare una nefrotossicità cronica progressiva non reversibile.

La funzionalità renale deve essere sempre monitorata durante il trattamento, ma altre potenziali cause di nefrotossicità (ad esempio altri farmaci quali i FANS) vanno escluse prima di modificare le dosi della CsA.

**Neurotossicità:** effetti collaterali di tipo neurologico possono verificarsi in oltre il 40% dei pazienti trattati con CsA. La Sindrome da Encefalopatia Posteriore Reversibile (PRES) rappresenta la complicanza neurologica più grave, caratterizzata da cefalea, alterazione dello stato mentale, convulsioni, cecità corticale, altri disturbi del visus ed ipertensione arteriosa. Lo studio neuroradiologico mostra caratteristiche alterazioni di segnale a carico della sostanza bianca, generalmente ma non sempre nella regione posteriore dell'encefalo.

Altri effetti neurotossici della CsA includono cefalea, tremori, encefalopatia diffusa, sindrome cerebellare, sindrome extrapiramidale, sofferenza piramidale, neuropatia periferica, crisi convulsive, stato psicotico.

L'utilizzo di steroidi ad alte dosi, l'ipertensione arteriosa, l'ipomagnesemia, l'ipertrigliceridemia e la presenza di un danno endoteliale con aumento della permeabilità della barriera emato-encefalica potrebbero favorire lo sviluppo di neurotossicità da CsA.

Una correlazione tra l'evento avverso e livelli basali di CsA elevati o sospetti per tossicità si riscontra solo nel 60% dei casi; in genere la sospensione temporanea e la riduzione della dose sono sufficienti alla risoluzione del quadro neurologico.

**Alterazioni dermatologiche:** includono ipertricosi, acne, prurito, follicolite, cisti epidermiche e neoplasie cutanee. Sono stati riportati rari casi di follicolodistrofia, pseudoporfiria ed eritrodermia.

**Epatotossicità:** le complicanze epatiche sono comuni (50% dei pazienti) ma generalmente lievi e autolimitanti: aumento di bilirubina, transaminasi e fosfatasi alcalina, talvolta ittero colestatico. Sono stati segnalati casi di epatite ed insufficienza epatica grave.

**Effetti collaterali gastrointestinali:** iperplasia gengivale, diarrea, nausea, vomito, anoressia e dolore addominale; raramente pancreatite. L'incidenza di iperplasia gengivale è minore con la formulazione microemulsione e risponde talvolta a terapia con metronidazolo.

**Effetti cardiovascolari:** le problematiche a carico dell'apparato cardiovascolare sono, per lo più, secondarie ad ipertensione arteriosa indotta da CsA. Inoltre è stata documentata, in corso di terapia con CsA, una ridotta produzione di ossido nitrico basale e sotto stimolo alla quale consegue disfunzione endoteliale ed aumentato rischio di aterosclerosi prematura.

**Alterazioni endocrino-metaboliche:** ipertrigliceridemia, iperprolattinemia, riduzione di testosterone, ginecomastia, iperglicemia ed ipertricosi.

**Disturbi oculari:** sono stati riportati pseudotumor cerebri, edema del disco ottico e cecità tossica retinica (un solo caso).

**Neoplasie:** lo sviluppo di neoplasie, in particolare tumori cutanei e linfomi, è più frequente nei pazienti immunodepressi e il ruolo reale della CsA resta speculativo. In un ampio studio è stata riscontrata una aumentata incidenza di linfomi e sarcomi di Kaposi nei pazienti trattati con CsA rispetto a quelli trattati con azatioprina e prednisone (85).

**Alterazioni immunologiche:** la CsA determina aumentata suscettibilità alle infezioni opportunistiche. Sono riportati casi di infezioni ingravescenti epatiche da virus B e C, polmoniti da *Pneumocystis* e altre infezioni virali, batteriche e fungine. Uno studio in vitro ha dimostrato l'aumento della produzione intracellulare di CMV e della sua replicazione, evidenziando pertanto un rischio aumentato di infezione da CMV nei pazienti trattati con CsA.

In conclusione, durante il trattamento con CsA devono essere monitorate regolarmente la pressione arteriosa, la funzionalità renale ed epatica.

### 5.3 STEROIDI

MPD/PDN sono utilizzati esclusivamente quali farmaci di supporto nella prevenzione e nel trattamento delle manifestazioni allergiche acute e della malattia da siero. In tutte le forme di AA sono sconsigliati sia l'impiego dello steroide in prima istanza ed in monoterapia sia l'uso prolungato oltre i primi trenta giorni dalla diagnosi (43, 1).

### 5.4 FATTORE DI CRESCITA GRANULOCITARIO

L'impiego del G-CSF, dopo trattamento con ATG e CsA, ha trovato una sua giustificazione sia nel tentativo di ridurre il rischio infettivo nei tre mesi che solitamente intercorrono tra IST e risposta ematologica sia nell'ipotesi di migliorare la risposta ematologica sfruttando la stimolazione delle CSE indotta dalla combinazione del G-CSF con fattori di crescita emopoietici endogeni.



Alcuni studi sia prospettici che retrospettivi sembrano indicare, soprattutto nei pazienti pediatrici, un vantaggio in termini di risposta terapeutica (con più rapido incremento dei neutrofili) nelle forme VSAA e SAA (53).

Vi sono preoccupazioni circa il costo derivante dall'impiego di G-CSF a lungo termine e ad alte dosi e il potenziale aumento dei disturbi clonali tardivi ad esso secondari (86, 87, 88, 89). Tuttavia finora né gli studi di meta-analisi né i trials randomizzati hanno dimostrato un aumento del rischio di malattia clonale associato all'uso di G-CSF, cosa che è stata osservata soltanto in studi retrospettivi.

In uno studio pediatrico giapponese è stato riscontrato un aumento del rischio di evoluzione clonale nei pazienti trattati con G-CSF, più evidente nel sottogruppo dei non responders (86).

Uno studio pediatrico italiano ha riportato un'associazione tra dose media di G-CSF, refrattarietà alla IST e rischio di sviluppare una MDS/AML (82).

Il Severe Aplastic Anaemia Working Party dell'EBMT ha recentemente riportato i risultati di un ampio studio retrospettivo su 840 pazienti pediatrici trattati con ATG e CsA dei quali oltre il 43% ha ricevuto anche G-CSF. L'uso del G-CSF è risultato associato ad un aumentato rischio di MDS/AML. L'incidenza di MDS/AML è stata del 10.9% negli esposti a G-CSF e del 5.8% nei non esposti (90).

Vi sono però studi che non hanno evidenziato un aumento del rischio di evoluzione clonale con l'uso del G-CSF.

Uno studio pilota su 100 pazienti trattati con ATG più CsA e G-CSF per tre mesi ha mostrato una bassa mortalità, un tasso di risposta di quasi l'80% con una sopravvivenza a 5 anni del 87% (53).

Uno studio italiano non ha mostrato aumento del rischio di sviluppare disordini clonali anche quando le dosi di G-CSF erano utilizzate per un periodo superiore ai sei mesi (91); tuttavia in questo studio il follow-up dei pazienti trattati con G-CSF (3.8 anni) non è tale da escludere l'occorrenza tardiva di eventi clonali.

Un altro studio di confronto tra ATG più CsA e G-CSF verso ATG e CsA, questa volta randomizzato prospettico, pur se relativamente piccolo, non ha dimostrato alcuna differenza in termini di risposta al trattamento e sopravvivenza tra i due gruppi né ha mostrato un aumento di eventi clonali. Anche in questo caso però il follow-up è stato troppo breve per una corretta valutazione dei risultati (92).

In una recente meta-analisi pubblicata nel 2009 (93) sull'uso del G-CSF nei pazienti con AA (lo studio includeva sei trials randomizzati) è stato messo in evidenza come l'aggiunta di fattori di crescita ematopoietici non influenzi la mortalità, il tasso di risposta o le complicanze infettive (92, 94, 95, 96, 97, 98).

Un recente studio prospettico randomizzato su 101 pazienti adulti giapponesi ha mostrato una maggiore percentuale di risposta a 6 mesi (ma non a 3 e 12 mesi) e un tasso di recidiva inferiore nel braccio in cui è stato utilizzato il G-CSF, ma non è stata registrata nessuna differenza in termini di sopravvivenza. Sebbene non ci fosse alcuna differenza nell'incidenza di MDS e AML a 4 anni, anche in questo caso il follow-up è troppo breve per una adeguata valutazione del rischio di evoluzione clonale (94).

Uno studio pediatrico retrospettivo, non ha mostrato tassi di risposta differenti tra pazienti trattati con o senza G-CSF (99).

Un recente studio multicentrico randomizzato dell'EBMT su 192 pazienti adulti e pediatrici ha riscontrato una sopravvivenza globale a 6 anni del 76% (+/- 4%) e una sopravvivenza libera da eventi del 42% (+/- 4%) senza differenze tra i pazienti randomizzati a ricevere o no il G-CSF, né nell'intera coorte né nei sottogruppi stratificati per età e gravità di malattia (100). Inoltre nel braccio G-CSF la mancata risposta dei neutrofili al giorno +30 è risultata predittiva di minore risposta e sopravvivenza. Minori sono risultati i giorni di ospedalizzazione e gli episodi infettivi nei pazienti VSAA che hanno ricevuto G-CSF. La valutazione del rischio clonale è ancora in corso. Solo un

altro trial randomizzato ha mostrato una riduzione negli episodi infettivi nei pazienti trattati con G-CSF (92).

Il recente studio di Marsh et al. (76) suggerisce, visto l'alto rischio di infezioni (100), di considerare l'uso del G-CSF quando si utilizzi ATG di coniglio nella terapia di prima linea.

## 5.5 TERAPIE ALTERNATIVE IMMUNOSOPPRESSIVE E NON

La terapia immunosoppressiva combinata standard (ATG/CsA) è gravata da effetti collaterali a breve e lungo termine e da un significativo rischio di refrattarietà, recidiva ed evoluzione clonale (54, 101).

Per i pazienti refrattari al trattamento o in recidiva, non candidabili ad un trapianto di cellule staminali, restano poche opzioni terapeutiche; questo ha portato alla sperimentazione di numerosi regimi immunosoppressivi alternativi.

Due sono le strade percorse dai diversi gruppi di studio:

- intensificazione del regime standard ATG/CsA con l'aggiunta di un terzo agente immunosoppressore, possibilmente con un diverso meccanismo d'azione per sfruttare la sinergia tra farmaci;
- impiego di agenti con spiccata attività immunosoppressiva, possibilmente con un miglior profilo di tossicità.

### Micofenolato Mofetile

Il MMF inibisce la proliferazione dei linfociti B e T ed è stato utilizzato nel trattamento e nella prevenzione del rigetto del trapianto di organi solidi così come nel trattamento di malattie autoimmuni come rettocolite ulcerosa, artrite reumatoide e sclerosi multipla (1).

L'impiego del MMF nel trattamento dei pazienti con anemia aplastica severa è stato testato in uno studio prospettico di fase II del National Institutes of Health (NHI) statunitense. Tra il 1999 ed il 2003, 104 pazienti (26% di età inferiore a 20 anni, range mediano 3-76 anni) con nuova diagnosi di anemia aplastica severa sono stati trattati con ATG di cavallo/CsA/MMF; il confronto con lo storico (ATG di cavallo/CsA) non ha mostrato alcun vantaggio né in termini di risposta al trattamento (62% a 6 mesi) né in termini di prevenzione delle recidive (37%, nonostante il mantenimento con MMF) (102).

Pertanto il MMF non sembra essere efficace quale farmaco aggiuntivo alla CsA nel trattamento di prima linea né verosimilmente in caso di refrattarietà.

### Rapamicina/Sirolimus

Il Sirolimus (RAPA) è un antibiotico macrolide inibitore di mTOR, una serina treonina chinasi multifunzionale. Il Sirolimus lega la immunofillina FKBP12 bloccando l'attivazione IL-2 dipendente dei linfociti T; inoltre il complesso FKBP12/RAPA inibisce mTOR bloccando la progressione del ciclo cellulare dalla fase G<sub>1</sub> a S (103). Il Sirolimus attiva anche i Linfociti T regolatori. Il sinergismo della combinazione Sirolimus/CsA è stato studiato in vitro ed in clinica, soprattutto nel setting del trapianto di organi solidi (104, 105).

Il NIH statunitense ha condotto, tra il 2003 ed il 2005, uno studio randomizzato che confrontava il regime standard ATG/CsA con il nuovo regime ATG/CsA/sirolimus. Sono stati arruolati 77 pazienti con SAA di età compresa tra 4 e 78 anni. Il tasso di risposta è stato, a tre mesi, del 37% per ATG di cavallo/CsA/sirolimus e del 50% per ATG di cavallo/CsA e, a sei mesi, del 51% per ATG/CsA/sirolimus e del 62% per ATG di cavallo/CsA. L'arruolamento è stato chiuso dopo i primi 30 casi valutabili per l'impossibilità di documentare una differenza che fosse statisticamente significativa ed un beneficio connesso all'aggiunta del Sirolimus. Il tasso di recidiva, evoluzione

clonale e sopravvivenza non differiva in maniera statisticamente significativa tra i due gruppi (106). Complessivamente l'aggiunta del sirolimus alla CsA non è risultata efficace né nel trattamento di prima linea né verosimilmente in caso di refrattarietà.

### **Alte dosi di Ciclofosfamide**

La ciclofosfamide (CTX) ad alte dosi ha un potere immunosoppressivo elevato e, per tale ragione, è stata utilizzata nel trattamento delle malattie autoimmuni (107,108).

Nel 1996 è stato pubblicato un primo studio pilota condotto al John Hopkins Hospital (Baltimora, MD, USA) su 10 pazienti con SAA e VSAA con un'età mediana di 19 anni (range 7-38; 6 pazienti con età ≤19 anni) trattati con alte dosi di ciclofosfamide (45 mg/Kg/die e.v. per 4 giorni consecutivi). Sette pazienti hanno ottenuto una risposta ematologica completa: di questi uno è deceduto per AIDS dopo 44 mesi di follow-up mentre i restanti sei non hanno presentato recidive né evoluzione clonale in un follow-up di durata compresa tra 9 e 19 anni al momento della pubblicazione (109).

L'entusiasmo per l'impiego della ciclofosfamide è venuto meno negli anni successivi a seguito dei risultati di uno studio prospettico randomizzato, condotto su 31 pazienti di età compresa tra 18 e 67 anni. Lo studio, che confrontava ATG/CsA con CTX/CsA (CTX alla dose di 50 mg/Kg/d per 4 giorni), è stato interrotto precocemente a causa dell'aumento di infezioni fungine e morti precoci nel braccio sperimentale, verosimilmente secondarie alla prolungata neutropenia dovuta all'impiego di CTX (110). Gli autori non hanno confermato neppure l'osservazione che l'impiego di CTX potesse ridurre il rischio di evoluzione clonale (111).

Nonostante ciò l'esperienza del John Hopkins Hospital continua a mostrare risultati sorprendenti. In un recente update su 67 pazienti con SAA, di età compresa tra 2 e 68 anni, il tasso di risposta è stato del 70.5% nei pazienti naïve e del 47.8% nei pazienti refrattari con una tossicità non trascurabile (incidenza d'infezioni fungine pari al 18.2% nei naïve e al 43.5% nei refrattari, con un 7.5% di mortalità precoce) pur se con una buona sopravvivenza a lungo termine (quella complessiva a 10 anni e quella libera da malattia nei pazienti naïve sono state dell'88% e 58% rispettivamente, mentre nei non responders sono state del 61.8% e 27.7% rispettivamente) (112).

L'alto rischio infettivo, in conclusione, non consente di collocare la CTX ad alte dosi nella terapia di prima linea per i pazienti che non hanno un donatore familiare HLA identico. Il 47.8% di risposte ottenute nei soggetti refrattari porta a considerare la CTX una possibile opzione per coloro che non hanno risposto o hanno avuto una recidiva dopo la IST tradizionale, non dispongano di un donatore e non siano infetti.

### **Androgeni**

Gli steroidi anabolizzanti, derivati sintetici del testosterone, sono stati ampiamente impiegati nel trattamento dell'AA soprattutto prima che divenissero disponibili ATG e ciclosporina.

L'Ossimetolone è un agente stimolante l'eritropoiesi, in grado di determinare anche risposte ematologiche trilineari. E' indicato nel trattamento dei pazienti affetti da sindrome da insufficienza midollare congenita non candidabili a trapianto di midollo osseo (113). E' stato impiegato, in associazione con ATG, nel trattamento dell'AA con risultati migliori rispetto all'uso della sola ATG (114). In uno studio retrospettivo francese, condotto su 87 pazienti con nuova diagnosi di AA, la risposta alla terapia di combinazione (ATG/Ossimetolone) è stata del 77% con una sopravvivenza a 5 anni del 78% (115). La conclusione di tale studio è stata che i risultati sono simili a quelli ottenuti con ATG/CsA con un minor tasso di evoluzione clonale. Mancano studi prospettici randomizzati di confronto tra le due combinazioni terapeutiche. Tuttavia l'uso di Ossimetolone, soprattutto in età pediatrica, è gravato da importanti effetti collaterali quali virilizzazione, prematura chiusura dell'epifisi, ittero, sviluppo di adenomi epatici, aumento delle transaminasi, cambiamenti

del comportamento (1). E' richiesto un regolare monitoraggio ecografico e laboratoristico della funzionalità epatica durante il trattamento.

Il Danazolo è un androgeno non virilizzante con proprietà simili a quelle dei corticosteroidi. Inibisce la produzione di interleuchina-1 e TNF-alfa (116); è stato utilizzato nel trattamento dei pazienti affetti da porpora trombocitopenica immune, anemia emolitica ed aplasia pura della serie rossa. Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi sul suo impiego nel trattamento di pazienti con AA. Nel 2007 è stato pubblicato uno studio giapponese su 16 pazienti con AA refrattari o in recidiva trattati con Danazolo alla dose di 300 mg/die (117) per 12 settimane. Il trattamento è risultato non virilizzante ed associato ad una epatotossicità di grado lieve/moderato, risoltasi al termine della terapia. Il 31.3% dei pazienti ha ottenuto una remissione parziale entro la 12<sup>a</sup> settimana di terapia. Nel 2011 è stato pubblicato uno studio messicano sull'impiego del Danazolo nel trattamento di prima linea di pazienti con AA (118); il tasso di risposta è stato del 45.9% con una sopravvivenza a 5 anni del 60%. Da uno studio retrospettivo giapponese su una popolazione pediatrica è emerso che l'aggiunta del Danazolo alla terapia immunosoppressiva standard determina un tasso di risposta più elevato rispetto all'impiego delle sole ATG e CsA (67.9% vs 57.1%). Tuttavia anche il tasso di recidiva risulta significativamente più alto (29.0% vs 9.8% a 10 anni) (54). Gli autori concludono affermando la necessità di una conoscenza più approfondita del meccanismo d'azione degli androgeni per dare loro una collocazione adeguata nel trattamento delle anemie aplastiche.

## **Rituximab**

E' un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro l'antigene CD20, una proteina di membrana espressa sui linfociti B. Il farmaco determina una deplezione del comparto B linfocitario attraverso l'induzione di apoptosi, citotossicità cellulo-mediata e attivazione del complemento. E' utilizzato nel trattamento dei linfomi non Hodgkin e di diverse malattie autoimmuni. L'impiego del Rituximab nel trattamento dell'anemia aplastica, caratterizzata da un'alterazione immunologica prevalentemente a carico dei linfociti T, potrebbe essere giustificato da un effetto indiretto del farmaco sui linfociti T (119). Al momento l'efficacia clinica del Rituximab nei pazienti con AA è riportata soltanto in pochi case reports. Il farmaco è stato utilizzato con successo nel trattamento di un paziente affetto da fascite eosinofila e SAA refrattario alla terapia standard con ATG e CsA (120). Un piccolo paziente di 12 mesi affetto da anemia aplastica associata ad epatite, non responsivo ad ATG e CsA, ha ottenuto la remissione completa dopo terapia con Rituximab alla dose di 17.5 mg/Kg/die, somministrato una volta al mese per tre mesi (121). Una donna di 73 anni con anemia aplastica di nuova diagnosi (122) ed una paziente di 68 anni con leucemia linfatica cronica che aveva sviluppato un'insufficienza midollare dopo terapia con ciclofosfamide e fludarabina hanno ottenuto una risposta ematologica completa dopo trattamento con Rituximab (123).

E' in corso il primo studio pilota con basse dosi di Alemtuzumab e Rituximab nella terapia di prima linea dei pazienti con anemia aplastica (124).

In conclusione, al momento, il Rituximab potrebbe essere impiegato come terapia pre-emptiva nei pazienti pluritrattati candidati ad ATG o ad IST combinata che abbiano sviluppato refrattarietà alla terapia di supporto ed in particolar modo alla trasfusione di piastrine.

## **Alemtuzumab**

L'Alemtuzumab (Campath 1H) è un anticorpo (IgG1 kappa) monoclonale umanizzato anti CD52 che provoca la morte di tutte le cellule esprimenti la glicoproteina CD52 sia attraverso la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente che la lisi cellulare complemento-mediata (125). Dato che l'antigene CD52 è ampiamente espresso sulla membrana dei linfociti B e T ma non su quella delle cellule staminali emopoietiche e dei progenitori emopoietici committed, l'Alemtuzumab svolge

un'importante azione linfolitica determinando una profonda e prolungata deplezione soprattutto dei linfociti CD4+ e CD8+ mentre risparmia il comparto staminale emopoietico.

Il farmaco è stato inizialmente impiegato nella cura delle neoplasie linfoidi e successivamente utilizzato, con successo, nel trattamento di patologie quali la sclerosi multipla (126) e le citopenie autoimmuni (119, 127, 128) nonché in diversi regimi di condizionamento per il trapianto di cellule staminali.

L'impiego di Alemtuzumab nel trattamento dei pazienti con anemia aplastica trova il proprio razionale nell'estremo potere immuno-ablativo dimostrato in vivo; la deplezione linfocitaria è completa ed il recupero linfoide richiede molti mesi soprattutto per i linfociti CD4+, tanto da rendere l'azione di questo anticorpo monoclonale comparabile a quella di ATG con un profilo di tossicità accettabile.

Esiste comunque una certa riserva sull'uso di Alemtuzumab nel setting dei pazienti con insufficienza midollare per il timore di complicanze infettive, inclusa la possibile tossicità midollare secondaria a riattivazione citomegalica, frequente nei pazienti con disordini linfoproliferativi (129).

Di seguito sono riportati gli studi che hanno testato l'Alemtuzumab nei pazienti con anemia aplastica.

- Nel 2009 è stato pubblicato uno studio dose escalation coreano nel quale veniva testata l'efficacia e la sicurezza di Alemtuzumab a due differenti dosaggi (60 e 90 mg) somministrati in tre giorni consecutivi ad una coorte di 17 pazienti con anemia aplastica, in combinazione con CsA (1.5 mg/Kg bid per sei mesi) (130). Il tasso di risposta globale è stato del 35% con un 23% di risposte complete ed un 12% di risposte parziali; sorprendentemente tutti i pazienti che hanno risposto al trattamento appartenevano alla coorte che ha ricevuto il dosaggio più basso. Nello studio non sono state sollevate preoccupazioni relative alla sicurezza del trattamento; la sopravvivenza a 2 anni è stata dell'81% e non sono stati segnalati casi di evoluzione clonale. Quattro pazienti arruolati avevano un'età compresa tra 16 e 19 anni: 2 hanno ottenuto una risposta inizialmente parziale e poi completa e al follow-up risultano vivi in remissione mentre gli altri 2, risultati non responder, sono vivi ed in remissione dopo trapianto allogenico.
- Nel 2010 il Working Party Severe Aplastic Anemia dell'EBMT ha pubblicato i risultati di uno studio di fase II che ha testato efficacia (in termini di migliore risposta ottenuta) e sicurezza di Alemtuzumab sottocute (dose totale 103 o 73 mg in pazienti con AA moderata) associato a più basse dosi di CsA (1 mg/Kg) nel trattamento dei pazienti con aplasia midollare o insufficienza midollare su base autoimmune (131). Lo studio ha arruolato 13 pazienti con anemia aplastica di cui 9 non precedentemente trattati. Nove dei 13 pazienti (69%) hanno ottenuto una risposta ematologica (probabilità cumulativa di risposta a 12 mesi pari al 78%): vi sono state 5 risposte complete (38%) e 4 risposte parziali (31%). I risultati migliori sono stati ottenuti sui 9 pazienti naïve: 3 hanno ottenuto una risposta completa e 3 una risposta parziale molto buona. La recidiva è stata un evento frequente, verificatosi in 7 pazienti su 9, tuttavia il ritrattamento con Alemtuzumab ha consentito una seconda risposta ematologica. Il follow-up a 4 anni ha mostrato una sopravvivenza globale del 67% e una sopravvivenza libera da malattia del 37%. La mortalità precoce per infezioni è risultata nel range dell'atteso mentre il profilo di sicurezza a lungo termine è stato soddisfacente. Il trattamento è stato effettuato senza necessità di ricovero ospedaliero. Lo studio non ha arruolato pazienti pediatrici.
- L'efficacia biologica di Alemtuzumab nei pazienti con anemia aplastica è stata confermata da uno studio messicano nell'ambito del quale, tra il 2005 ed il 2007, 14 pazienti naïve sono stati trattati con Alemtuzumab sottocute alla dose di 50 mg (10 mg/die per 5 giorni consecutivi) in combinazione con CsA (2 mg/Kg bid) (119). Il follow-up mediano è stato di 20 mesi, il tasso di risposte del 57% con un 14% di risposte complete ed un 43% di risposte

parziali. Il profilo di sicurezza è stato buono e non sono state segnalate morti precoci per infezioni correlate al trattamento né riattivazioni citomegaliche. L'età mediana dei pazienti arruolati era di 20 anni, con 6 pazienti di età compresa tra 6 e 19 anni. Nell'ambito di questo gruppo sono state ottenute una risposta completa e 3 risposte parziali; vi è stato un solo decesso, una paziente di 7 anni, non responder.

- Tra il 2003 ed il 2010 anche il NIH statunitense (132) ha saggiato l'efficacia di Alemtuzumab in monoterapia (10 mg/die endovena per 10 giorni) su 68 pazienti con anemia aplastica di cui 16 naïve, 25 in recidiva e 27 refrattari ad una prima linea di IS con ATG. Il gruppo dei pazienti refrattari era randomizzato ad Alemtuzumab (n=27) versus ATG di coniglio + CsA (n=27). Il tasso di risposta è stato del 37% nel gruppo Alemtuzumab versus il 33% nel gruppo ATG di coniglio; la sopravvivenza a 3 anni è stata dell'83% e 60% rispettivamente (P= 0.16). Nell'ambito dei 25 pazienti in recidiva il tasso di risposta ad Alemtuzumab è stato del 56% con una sopravvivenza a 3 anni dell'86%. I risultati ottenuti in seconda linea non si sono confermati nel gruppo naïve, nell'ambito del quale la percentuale di risposta è stata soltanto del 19%, cosa che ha portato all'interruzione dello studio. Il trattamento è stato ben tollerato senza alcun incremento di morbilità o morbidità per infezioni. In ognuno dei tre gruppi sono stati inclusi pazienti di età inferiore a 18 anni: in totale sono stati arruolati circa 14 pazienti pediatrici ma risulta complesso estrapolare i dati dei singoli pazienti.

Gli studi condotti negli ultimi anni dimostrano che Alemtuzumab costituisce un'alternativa al regime immunosoppressivo classico nei pazienti con aplasia midollare. I dati disponibili supportano il concetto che Alemtuzumab presenta un profilo di sicurezza accettabile e attenuano le preoccupazioni circa un elevato rischio infettivo secondario a trattamento. I dati sull'efficacia dimostrano che è biologicamente attivo come agente immunosoppressore anche se i risultati ottenuti in piccoli studi andrebbero confermati in trial più ampi ed in setting di pazienti nella stessa fase di malattia (133). Alemtuzumab è stato utilizzato in gruppi non uniformi di pazienti, a dosi diverse, con modalità d'infusione differenti, in monoterapia o in associazione con CsA a diversi dosaggi. Un protocollo comune potrebbe essere utile a comprendere il ruolo di questo farmaco nel panorama più ampio della IST e a ridefinire dosi, modalità di somministrazione e subset di pazienti che potrebbero maggiormente beneficiarne (131).

Attualmente Alemtuzumab è un farmaco utilizzabile in terza linea con un profilo di sicurezza verosimilmente superiore a quello della CTX.

## Eltrombopag

Eltrombopag è una molecola sintetica non peptidica, biodisponibile per via orale, appartenente alla classe degli agonisti dei recettori della TPO, il principale regolatore endogeno della produzione piastrinica. Eltrombopag lega selettivamente il dominio trans-membrana del recettore della TPO (c-Mpl) attivando i pathways JAK-STAT (Janus-associated kinase-signal transducers) e MAPK (mitogen-activated protein kinase) con effetto positivo su proliferazione e differenziazione dei megacariociti a partire dai precursori mieloidi.

I recettori di TPO sono presenti sulla superficie cellulare delle cellule staminali e dei progenitori emopoietici ed il signaling TPO/c-Mpl, nell'uomo, partecipa ai meccanismi di regolazione delle cellule staminali quiescenti. L'importanza del recettore *c-Mpl* per la normale emopoiesi è confermata dal fatto che mutazioni bi-alleliche del gene *c-Mpl* determinano la cAMT, malattia caratterizzata dalla scarsità/assenza di megacariociti nel midollo osseo e da un aumentato rischio di anemia aplastica. E' stato anche riportato che mutazioni nonsense del gene *c-Mpl* in omozigosi si associano ad anemia aplastica familiare (134).

Nel luglio 2012 è stato pubblicato il primo studio clinico non randomizzato di fase II sull'impiego dell'Eltrombopag in pazienti con anemia aplastica e piastrinopenia severa persistente, resistenti ad almeno una IST (6). Il 44% dei pazienti (11/25) ha ottenuto una risposta ematologica dopo le prime

12-16 settimane di trattamento con effetti tossici minimi. Nove pazienti non hanno più necessitato di supporto trasfusionale piastrinico; sei pazienti hanno avuto un incremento dei livelli di emoglobina (mediana d'incremento 4.4 gr/dl) e tre di loro non hanno più necessitato di supporto eritrocitario. Nove pazienti hanno presentato incremento della conta dei neutrofili. Le biopsie ossee, eseguite ogni 6 mesi per 30 mesi, hanno mostrato nei pazienti responsivi una normalizzazione trilineare dell'emopoiesi senza incremento della fibrosi midollare (6).

Il recettore della TPO sulle cellule staminali emopoietiche costituisce un nuovo target terapeutico per il trattamento dell'anemia aplastica acquisita ed Eltrombopag appare fra i nuovi farmaci decisamente promettente.

I nuovi studi in corso al NIH e in ambito EBMT stanno esplorando l'efficacia di Eltrombopag in combinazione con ATG e/o CsA e permetteranno di stabilire il suo ruolo nell'algoritmo terapeutico delle AA che non possono andare a trapianto.

### **Nuovi agenti immunosoppressori**

Negli ultimi anni è stato valutato l'impiego di diversi farmaci biologici con azione immunosoppressiva nel trattamento della AA. Uno di questi è il Daclizumab, un anticorpo monoclonale anti CD25 che inibisce il pathway di attivazione linfocitaria dipendente da interleuchina-2. Nel 2003 è stato pubblicato dal NIH uno studio pilota sull'impiego di Daclizumab in pazienti con AA moderata; il tasso di risposta è stato del 38% (135). L'efficacia del farmaco è stata confermata in una coorte più ampia di pazienti affetti da AA moderata (n=45). La risposta globale al trattamento è stata del 42% con un 14% di risposte complete. Il 25% dei pazienti trasfusione-dipendente ha ottenuto l'indipendenza trasfusionale che è stata mantenuta dopo un follow-up di circa 5 anni (136).

Un'altra categoria di farmaci occasionalmente testata nel trattamento dell'AA è quella degli inibitori di citochine quali ad esempio gli anti-TNF. Il loro potenziale impiego nella pratica clinica è motivato dal ruolo che le citochine hanno nel sopprimere l'ematopoiesi in corso di aplasia midollare acquisita (137). Tuttavia l'esperienza clinica risulta estremamente limitata e circoscritta a singoli casi (138).

Un ipotetico ruolo potrebbero avere i nuovi immunosoppressori biologici con azione selettiva contro il subset T cellulare, come l'Alefacept che blocca attivazione e proliferazione dei linfociti T e causa apoptosi selettiva degli stessi (139). Molti di questi farmaci sono impiegati nella terapia sperimentale delle più svariate patologie autoimmuni (140) e per questo potrebbero trovare il loro utilizzo anche nel trattamento dell'anemia aplastica acquisita (131).

## 6. TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

### 6.1 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE FAMILIARE HLA IDENTICO

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche rappresenta il trattamento di prima scelta nei bambini con aplasia midollare grave o molto grave che dispongano di un familiare HLA compatibile, con probabilità di sopravvivenza a lungo termine di circa il 90% (141, 142, 143).

Dopo i primi lavori pionieristici del gruppo di Seattle sull'impiego del trapianto di midollo osseo allogenico nel trattamento dei pazienti con aplasia midollare grave e molto grave (SAA e VSAA) (144,145), la prima esperienza relativa ad una casistica di 24 pazienti con età mediana di 19 anni (range 3-60) fu pubblicata, dallo stesso gruppo, nel 1974 (146): 18 pazienti ricevettero un condizionamento pre-trapianto con CTX alla dose di 50 mg/Kg per 4 giorni e 6 pazienti furono condizionati con 10 Gy di TBI. Per la profilassi della GVHD venne impiegato MTX alla dose di 15 mg/m<sup>2</sup> al g +1 e 10 mg/m<sup>2</sup> nei giorni +3, +6, +11 e +18, quindi settimanalmente fino a 102 giorni post trapianto (long-course). Il lavoro non aveva i caratteri di uno studio randomizzato, né di confronto tra i due regimi di condizionamento impiegati, tuttavia emerse che 10 su 18 pazienti trattati con CTX erano sopravvissuti, rispetto ad 1 su 6 dei pazienti che avevano ricevuto TBI.

In considerazione dei risultati ottenuti, della buona tolleranza del regime di condizionamento con CTX e del fatto che non tutti i centri trapianto avevano la possibilità di impiegare TBI, il regime di condizionamento pre-trapianto con CTX venne considerato il trattamento di scelta per i pazienti con AA. In particolare, poiché esperienze in modelli canini avevano mostrato un ritardo nell'accrescimento dell'osso con l'impiego della TBI mentre animali trattati con CTX crescevano normalmente (147) e l'uso della radioterapia si associava ad un elevato rischio di sterilità, gli autori definirono la CTX come il trattamento di scelta nel condizionamento pre-trapianto dei pazienti pediatrici con SAA.

Su questa piattaforma chemioterapica (CTX 200 mg/Kg) sono state pubblicate successivamente altre esperienze (148, 149, 150). In tutte il rigetto risultava essere una delle cause principali di insuccesso della procedura trapiantologica (30-60%). Per ridurre il rigetto ed incrementare la sopravvivenza, sono stati tentati vari approcci quali l'impiego della total lymphoid irradiation, della thoracoabdominal irradiation o l'infusione, insieme al midollo osseo, delle cellule del buffy coat del donatore, nell'ipotesi che le cellule periferiche del donatore potessero essere una potenziale sorgente di cellule staminali totipotenti e di linfociti in grado di "scavalcare" il rigetto (151-156). Di fatto, alcune esperienze mostrarono una riduzione di questa complicità, ma anche gravi effetti collaterali, quali l'incremento della GVHD con l'impiego del buffy coat o la sterilità, la riduzione dell'accrescimento e l'insorgenza di tumori secondari con l'impiego della radioterapia.

Sulla base di studi su modelli animali, che mostravano un effetto sinergico immunosoppressivo di ATG associato ad agenti alchilanti, tra i quali procarbazine e CTX, nei trapianti di cute e di midollo osseo (157), l'ATG è stato introdotto, in associazione alla CTX ed alla procarbazine, nel regime di condizionamento pre-trapianto (158) con risultati contrastanti: solo il 10% di rigetto è stato osservato nell'esperienza pubblicata da Smith et al (158); nessun vantaggio dell'associazione dei tre farmaci rispetto alla CTX da sola è emerso dallo studio randomizzato, condotto dal gruppo di Seattle (159).

La prima esperienza dell'uso dell'ATG (ATGAM 30 mg/Kg x 3 giorni) e della CTX venne pubblicata dal gruppo di Seattle nel 1987, in 16 pazienti affetti da SAA, sottoposti a secondo trapianto dopo rigetto di un primo trapianto di midollo osseo: 12 pazienti attecchirono confermando l'efficacia immunosoppressiva dell'associazione ATG/CTX (160). Sulla base di questi dati incoraggianti, nel 1994 lo stesso gruppo impiegò l'associazione CTX/ATG nel regime di condizionamento per il primo trapianto di midollo osseo allogenico di 39 pazienti con SAA. Furono osservati 2 rigetti ed una sopravvivenza a 3 anni del 92%.



Tali risultati furono superiori a quelli del gruppo storico di confronto rappresentato da 39 pazienti, comparati con il gruppo dei pazienti in studio per età e fattori di rischio per rigetto e GVHD, nei quali la probabilità di sopravvivenza era stata del 72% (161). In questa esperienza, per la profilassi della GVHD fu impiegata l'associazione di CsA, alla dose di 3 mg/Kg dal giorno prima l'infusione del midollo osseo, più MTX, somministrato a dosi intermittenti, durante i primi 11 giorni post trapianto, alla dose di 15 mg/m<sup>2</sup> al giorno +1 e 10 mg/m<sup>2</sup> nei giorni +3, +6, +11 (short-course). Questo schema fu scelto sulla base dei risultati ottenuti dallo studio randomizzato del gruppo di Seattle del 1986, che mostrava la maggiore efficacia dell'associazione dei due immunosoppressori rispetto al MTX da solo (162).

Lo studio era nato dall'esigenza di ridurre la GVHD che rappresentava, con il rigetto, l'altra grave causa di insuccesso del trapianto, soprattutto in un contesto di patologia ematologica non neoplastica dove non c'è nessun vantaggio dalla GVHD poiché non è richiesto un effetto di graft versus leukemia. Il background di supporto allo studio veniva da esperienze su modelli canini, nei quali si osservava una riduzione dell'incidenza della GVHD con l'associazione CsA/MTX, somministrata secondo lo schema short course, rispetto sia al MTX da solo, sia alla sola CsA (163, 164). Venne pertanto disegnato lo studio randomizzato: MTX "short course"/CsA verso MTX "long course". Il regime di condizionamento pre-trapianto prevedeva in tutti i pazienti l'impiego di CTX 200 mg/Kg. Lo studio mostrò una riduzione statisticamente significativa della GVHD di grado II-IV nei pazienti che avevano ricevuto MTX/CsA rispetto ai pazienti ricevuti solo MTX (18% vs 53%; p=0,012) (162).

Inoltre, nel 2000 uno studio prospettico randomizzato GITMO/EBMT, mostrò la superiorità dell'associazione MTX/CsA rispetto alla CsA da sola nel prolungare la sopravvivenza (94% vs 78%; p= 0.05), in 71 pazienti con SAA, condizionati prima del trapianto con CTX 200 mg/Kg, confermando ulteriormente l'efficacia nella prevenzione della GVHD con lo schema di associazione MTX/CsA (165). In questo studio lo schema di somministrazione del MTX differiva da quello originale dello short course di Storb (164) poiché il MTX era somministrato alla dose di 8 mg/m<sup>2</sup> nei giorni +1, +3, +6, +11.

La riduzione del dosaggio del MTX fu decisa sulla base dell'ipotesi che un più basso dosaggio di MTX avrebbe potuto accorciare il periodo della neutropenia e la gravità della mucosite, riducendo così il rischio di infezioni, pur mantenendo il controllo della GVHD, come osservato in uno studio su pazienti con leucemia acuta trapiantati da familiari compatibili, nei quali il MTX fu somministrato secondo lo schema "short course" ma a dosi ridotte (166). I risultati ottenuti da queste esperienze vennero confermati in uno studio multicentrico su 94 pazienti con età mediana di 26 anni (range 2-59) che ricevettero MTX/CsA nella profilassi della GVHD e CTX/ATG nel regime di condizionamento pre-trapianto: rigetti nel 4%, GVHD grado II-IV nel 29% e sopravvivenza dell'88% ad un follow-up mediano di 6 anni (167).

Se la maggiore efficacia dell'impiego dell'associazione CsA/MTX nel controllo della GVHD rispetto ai singoli immunosoppressori deriva da studi randomizzati, l'introduzione dell'ATG nel regime di condizionamento pre-trapianto in associazione alla CTX è originata da esperienze di singoli gruppi o da studi di confronto retrospettivi. Solo nel 2007 viene realizzato uno studio prospettico randomizzato su 134 pazienti per valutare l'efficacia dell'ATG in aggiunta alla CTX rispetto alla CTX da sola. Entrambi i gruppi di pazienti ricevettero MTX/CsA per la profilassi della GVHD. Con un follow-up mediano di 6 anni, la probabilità di sopravvivenza a 5 anni fu del 74% per il gruppo che ricevette CTX da sola e dell'80% per il gruppo CTX/ATG (ATGAM 30 mg/Kg x 3): la differenza non fu statisticamente significativa. Inoltre nessuna differenza fu osservata in termini di graft failure e GVHD.

Con il livello di sopravvivenza ottenuto, questo studio non era sufficientemente potente per definire differenze statisticamente significative tra i due gruppi (168).

Le linee guida inglesi del 2009 (1) confermano, per pazienti di età <30 anni, l'associazione CTX/ATG (1+1/2 fiala ogni 10 Kg di peso x 3 giorni) nel condizionamento pre-trapianto e raccomandano CsA/MTX (short course) per la profilassi della GVHD. Tuttavia gli autori sottolineano che il potenziale beneficio dell'uso combinato della CTX+ATG è poco chiaro, alla luce dei dati dello studio prospettico randomizzato di cui sopra (168).

Lo stesso schema è suggerito per bambini e giovani adulti (specificando la dose di ATG a 7.5 mg/Kg) nella terza Consensus Conference sull'aplasia midollare (169). Nel 2011, con l'obiettivo di ridurre l'incidenza della GVHD e gli effetti collaterali del MTX, sulla base di precedenti studi pilota (170, 171), il gruppo inglese ha introdotto l'Alemtuzumab per la profilassi della GVHD, associato alla CsA; inoltre, per la riduzione del rigetto, è stata impiegata la Fludarabina associata a basse dosi di CTX (300 mg/m<sup>2</sup>). Lo studio retrospettivo e multicentrico condotto su 50 pazienti ha mostrato una sopravvivenza a 2 anni del 95%, una graft failure del 9.5%, e, soprattutto, una bassa incidenza di GVHD sia acuta (13%) sia cronica (4%) (172).

Nel 2012 il gruppo pediatrico inglese (113) suggerisce di usare CTX 200 mg/kg nel regime di condizionamento pre-trapianto e considera opzionale la sieroterapia sulla base dello studio prospettico randomizzato del 2007 (167). Per la profilassi della GVHD consiglia CsA/MTX, con quest'ultimo da omettere nel caso venga impiegato l'Alemtuzumab.

Nello stesso anno il gruppo francese, su un lungo follow-up di osservazione, ribadisce l'efficacia dell'associazione CTX/ATG nel condizionamento pre-trapianto e l'associazione MTX/CsA per la profilassi della GVHD. Il siero antilinfocitario impiegato in questo studio è stato ATG di coniglio, l'unico disponibile in Europa dal 2007, alla dose di 2.5 mg/kg x 5 giorni; inoltre non è specificata la dose di MTX somministrata nei giorni 1, 3, 6, 11. Sono stati analizzati 61 pazienti, età mediana 21 anni (range 4-43), con un follow-up mediano di 73 mesi (range 8-233): la sopravvivenza a 6 anni è stata dell'87%, nel 21% dei pazienti è stata osservata necrosi asettica, 12 pazienti hanno mostrato disfunzioni endocrine e un solo paziente ha sviluppato una neoplasia secondaria (41).

Nel 2012 l'efficacia della stessa combinazione di condizionamento e profilassi della GVHD viene confermata in un contesto esclusivamente pediatrico. In questo studio retrospettivo sono stati confrontati tre gruppi di pazienti: nel gruppo 1, 98 pazienti trapiantati nel 1971-84, hanno ricevuto CTX seguita da MTX long term; nel gruppo 2, 19 pazienti, trapiantati nel 1981-1988, hanno ricevuto CTX, seguita dal MTX short course, secondo lo schema di Seattle (164); nel gruppo 3, 31 pazienti trapiantati nell'89-2010 hanno ricevuto CTX associata ad ATG (30 mg/Kg al giorno per 3 giorni), seguiti dall'associazione MTX/CsA, per la profilassi della GVHD. Con un follow-up mediano di 25 anni la sopravvivenza a 5 anni è stata del 66%, 95% e 100% per il gruppo 1, 2 e 3 (p <0.0001). Il rigetto è stato del 22%, 32% e 7%. La probabilità della GVHD acuta di grado III e IV è stata del 15%, 0%, 3%, nei gruppi 1, 2 e 3 mentre quella della GVHD cronica a 2 anni è stata del 21%, 21%, 10%, per ciascun gruppo (41).

Va considerato che sicuramente all'aumentata probabilità di sopravvivenza negli anni hanno contribuito non solo le diverse associazioni farmacologiche sia nella gestione del regime di condizionamento sia nella profilassi della GVHD, ma anche le migliori terapie di supporto che hanno accompagnato negli ultimi 40 anni il percorso trapiantologico.

Nel 2013 l'EBMT conferma nei bambini l'uso di CTX (200 mg/Kg) + ATG (coniglio 2.5 mg/Kg per 4 giorni; cavallo 30 mg/Kg per 5 giorni). Per la GVHD la profilassi suggerita è l'associazione di CSA + MTX (10 mg/m<sup>2</sup> nei giorni 1, 3, 6). Il range terapeutico consigliato per la CsA è 100-200 ng/ml fino a 9 mesi post trapianto, dopo di che si suggerisce di iniziare la riduzione fino alla sospensione da attuare, in assenza di GVHD, ad un anno dal trapianto (39).

In sintesi, studi prospettici randomizzati sono disponibili in letteratura solo per definire la terapia di profilassi della GVHD (162, 165). Tuttavia, questi studi, che hanno mostrato la superiorità dell'associazione MTX/CsA rispetto ai singoli immunosoppressori, non prevedevano l'uso della sieroterapia nel regime di condizionamento, ma solo CTX 200. Inoltre, benché in entrambi gli studi

prospettici il MTX sia stato infuso “short course”, le dosi impiegate sono state diverse: 15 mg/m<sup>2</sup> al giorno +1 seguiti da 10 mg/m<sup>2</sup> nei giorni +3, +6, +11 nell’esperienza del gruppo di Seattle (162), approccio ripreso dalle linee guida inglesi del 2009 (1) e dalla Consensus del 2011 (169), ed 8 mg/m<sup>2</sup> negli stessi giorni nell’esperienza GITMO-EBMT (165). Il dosaggio del MTX è stato ulteriormente modificato a 10 mg/m<sup>2</sup> nei giorni +1, +3, +6 nel management suggerito da Korthof nel 2013 (39).

Pur non esistendo studi prospettici randomizzati per il condizionamento pre-trapianto, l’associazione CTX/ATG è sicuramente lo schema più impiegato (1, 39, 160, 161, 167, 168, 169, 173). La maggior parte degli studi è relativa a popolazioni miste sia adulte sia pediatriche. Inoltre nei diversi studi pubblicati variano sia il tipo sia la dose di siero antilinfocitario impiegato o a causa di scelte strategiche locali o a causa della disponibilità in commercio dell’uno o dell’altro prodotto. In alcune esperienze viene impiegato o suggerito ATG di cavallo alla dose di 30 mg/Kg x 3 giorni (161, 167, 168) o per 5 giorni (39); in altre esperienze viene impiegato ATG di coniglio alla dose di 2.5 mg/Kg x 3 giorni (169) o per 5 giorni (173), oppure 1 + 1/2 fiala ogni 10 Kg di peso corporeo per 3 giorni (1).

Sulla base dei dati della letteratura, delle linee guida pubblicate e del parere degli esperti si raccomanda quanto segue:

**Il regime di condizionamento consigliato, nei pazienti che devono essere sottoposti a trapianto allogenico da familiare HLA compatibile, prevede l’associazione ATG/CTX (IV). La dose di ATG di coniglio consigliata è 2.5 mg/Kg nei giorni -4, -3, -2 (V), associato a ciclofosfamide al dosaggio di 50 mg/Kg nei giorni -5, -4, -3, -2 (V).**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

**Per la prevenzione della GVHD è indicato l’utilizzo di MTX/CsA (I). Le dosi di MTX più usate sono 8 mg/m<sup>2</sup> nei giorni +1, +3, +6, +11, oppure 15 mg/m<sup>2</sup> al giorno +1 seguiti da 10 mg/m<sup>2</sup> nei giorni +3, +6, +11 (V). La dose di CsA consigliata è 1.5 mg/Kg ogni 12 ore (V), mantenendo un livello ematico “trough” di 150-250 ng/ml (EO), fino a 9-12 mesi dopo il trapianto; successivamente la dose va ridotta lentamente in almeno 3 mesi ed in assenza di GVHD, eseguendo inoltre un monitoraggio periodico del chimerismo (EO).**

**(Livello di evidenza III; Forza del consensus 8.5; livello del consensus C)**

Nella pratica clinica i pazienti possono presentare un peso corporeo “reale” superiore al peso ideale. La necessità della modulazione della dose dei farmaci, nei pazienti sovrappeso è controversa (174, 175). Tuttavia si consiglia, per la Ciclofosfamide, di calcolare la dose sulla base del peso aggiustato:

- Peso aggiustato: (peso reale - peso ideale) x 0.4 + peso ideale.

Il peso ideale viene calcolato secondo le equazioni proposte da Devine nel 1974 (174):

- Peso ideale (maschio):  $45.4 + 0.89 \times (\text{altezza in centimetri} - 152.4) + 4.5$
- Peso ideale (femmine):  $45.4 + 0.89 \times (\text{altezza in centimetri} - 152.4)$

## 6.2 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE NON FAMILIARE

Nei pazienti pediatrici con aplasia midollare grave o molto grave o con aplasia midollare non grave ma trasfusione dipendente, che non dispongano di un donatore familiare compatibile, non rispondenti o recidivati dopo terapia immunosoppressiva, l'impiego del trapianto allogenico da donatore non familiare è entrato nella pratica clinica (1, 39, 113).

Le esperienze che introducono questa strategia nell'algoritmo terapeutico dei pazienti con aplasia midollare iniziano negli anni '80. Nel 1988, l'EBMT ha riportato i dati relativi a 46 pazienti con grave anemia aplastica sottoposti a trapianto di midollo osseo da familiari non compatibili (35 pazienti) o donatori non familiari (11 pazienti) (176). A quei tempi il livello di compatibilità era valutato sulla base dello studio del locus A, B e DR, a livello sierologico, e si integrava lo studio dell'HLA con il test delle colture miste linfocitarie. Nella popolazione in esame, 15 pazienti erano HLA compatibili 6/6 loci con il loro donatore, con colture miste linfocitarie negative, 9 pazienti erano compatibili 5/6 loci con il loro donatore, in 17 casi i loci incompatibili erano 2 o superiori a 2; in 5 casi i dati relativi alla compatibilità tra donatore e ricevente non erano completi.

La probabilità di sopravvivenza fu del 45% per i trapianti fenotipicamente identici, del 25% nei casi incompatibili per 1 locus e dell'11% nei casi di incompatibilità di grado superiore. L'impiego della CsA per la profilassi della GVHD ha influenzato in maniera statisticamente significativa la sopravvivenza: 34% vs 11%, per i pazienti che avevano ricevuto MTX, e 14% per i pazienti che avevano ricevuto CsA e midollo T depletato. Le principali cause di morte sono state il rigetto, la GVHD e le infezioni. Studi successivi hanno riportato risultati incoraggianti in popolazioni più strettamente pediatriche (177, 178, 179).

Tuttavia, poiché, in uno studio pilota del 1994, il gruppo americano aveva dimostrato l'inefficacia dell'associazione CTX/ATG in pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare (180), con l'obiettivo di migliorare la sopravvivenza, riducendo il rischio del rigetto e della GVHD, iniziarono le prime esperienze per testare l'efficacia di nuovi farmaci immunosoppressori quali la fludarabina, o definire il ruolo della TBI in un contesto di trapianto da donatore non familiare.

Agli inizi degli anni 2000 furono pubblicate due importanti esperienze (181, 182) sull'impiego della TBI. Nella prima (181) il gruppo americano disegnò uno studio prospettico, multicentrico per definire la minima dose di TBI sufficiente per ottenere l'attecchimento in pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare HLA compatibile. La dose individuata efficace, in combinazione con CTX/ATG fu 200 cGy. Nella seconda esperienza retrospettiva del gruppo giapponese (181), che includeva 154 pazienti, la TBI risultò essere un fattore favorevole per ridurre il rigetto e l'ATG per ridurre la GVHD acuta di grado III-IV.

Nel 2005 il gruppo europeo (183) elaborò un regime di condizionamento ad intensità ridotta traslato dall'esperienza di Houston (184), che prevedeva l'associazione di fludarabina+CTX+ATG (FCA) per ridurre il rischio di GVHD. In questa esperienza, considerando l'incremento dei secondi tumori con l'uso della radioterapia (185) non fu impiegata la TBI. I pazienti inclusi nello studio erano 38 ed avevano un'età mediana di 14 anni (range 3-37). L'incidenza della GVHD acuta e cronica fu, rispettivamente, dell'11% e del 27%. Il 18% dei pazienti mostrò una graft failure. Globalmente la sopravvivenza a due anni fu 73%. Fu osservato un vantaggio, nella riduzione della graft failure, per i pazienti con età uguale o inferiore a 14 anni: 5% vs 32%. La popolazione dei pazienti più giovani mostrò inoltre una migliore sopravvivenza (84% vs 61%).

Pertanto, l'esperienza di Seattle del 2001 (181), confermata da un update del 2006 (46), ha individuato nelle basse dosi di TBI, associata a CTX/ATG di cavallo, un fattore di controllo della graft failure. Nel 2005 il gruppo europeo ha riportato risultati incoraggianti nell'impiego di un regime di condizionamento ad intensità ridotta con l'associazione FCA (fludarabina 120 mg/m<sup>2</sup>; CTX 1200 mg/m<sup>2</sup>; ATG di coniglio 3.75 mg/Kg x 4 giorni).

Per analizzare il ruolo della TBI con un regime di condizionamento composto da FCA (fludarabina 120 mg/m<sup>2</sup>; CTX 1200 mg/m<sup>2</sup>; ATG di coniglio 3.75 mg/Kg x 4 giorni) nel 2010 il gruppo europeo

ha condotto uno studio su 100 pazienti, identificati nel data base dell'EBMT, che avevano ricevuto trapianto da un donatore volontario o da un familiare incompatibile per un locus, trattati o con la combinazione FCA o con FCA più una dose di TBI (2 Gy) al giorno -1 dal trapianto (47). Nello schema con TBI la dose di ATG fu ridotta a 3.75 mg/Kg per 2 giorni. Il gruppo dei pazienti che avevano ricevuto radioterapia aveva un'età mediana statisticamente più elevata del gruppo che aveva ricevuto solo FCA: 27 anni (7-53) verso 13 anni (3-51) ( $p < 0.001$ ). Tutti i pazienti ricevettero, per la profilassi della GVHD, CsA/MTX (MTX alla dose di 10 mg/m<sup>2</sup> al giorno +1 e 8 mg/m<sup>2</sup> ai giorni +3, +6 post-trapianto). Con una mediana di follow-up di 1665 e 765 giorni, la sopravvivenza attuariale a 5 anni fu 73% per il gruppo FCA e 79% per il gruppo FCA/TBI. Non furono osservate differenze nell'incidenza della GVHD acuta tra i due gruppi. Il gruppo FCA/TBI mostrò un'aumentata incidenza di GVHD cronica, anche se la differenza non raggiungeva la significatività statistica (27% vs 50%;  $p = 0.06$ ). L'incidenza cumulativa della graft failure fu 17%. L'effetto dell'età fu piuttosto forte nel gruppo FCA, ma non significativo nel gruppo FCA/TBI. Inoltre l'effetto di una migliore compatibilità tra donatore e ricevente fu più evidente nella popolazione dei pazienti che avevano ricevuto FCA rispetto all'altro gruppo. Pertanto il regime di condizionamento senza radioterapia sembrava più adatto nei pazienti più giovani, HLA compatibili con il loro donatore; per gli altri pazienti l'aggiunta della TBI offriva migliori risultati.

Altre esperienze hanno impiegato l'associazione CTX, ATG, Fludarabina con o senza TBI; tuttavia i dosaggi dei vari componenti del regime di condizionamento variano nelle diverse esperienze (186, 187) sia per quanto riguarda la TBI sia per quanto riguarda la fludarabina.

Nella maggior parte degli studi per la profilassi della GVHD è stata impiegata l'associazione MTX "short course" e CsA, tuttavia la dose di MTX, per ciascuna somministrazione, varia nelle diverse esperienze. È stato pubblicato un solo studio di confronto tra due regimi di profilassi della GVHD: CsA/MTX verso MTX/tacrolimus; nell'analisi è stato mostrato un vantaggio con l'impiego del tacrolimus.

Sulla base delle varie esperienze si vengono a delineare una serie di raccomandazioni in parte differenti. Nel 2009, le linee guida inglesi (1) suggeriscono quale regime di condizionamento per i pazienti giovani (< 30 anni) lo schema di condizionamento pre-trapianto non mieloablativo e fortemente immunosoppressivo con CTX 300 mg/m<sup>2</sup> per 4 giorni, Fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup> per 4 giorni e 1 + 1/2 fiala di ATG ogni 10 Kg di peso del ricevente. Quale profilassi della GVHD viene suggerita l'associazione CsA (dal giorno -6) ed MTX alla dose di 10 mg al giorno +1 ed 8 mg al giorno +3 e +6. Viene proposta l'opzione alternativa dell'uso dell'Alemtuzumab al posto del siero antilinfocitario, sulla base dei buoni risultati ottenuti dall'esperienza inglese del 2005 (70). In questo caso la profilassi della GVHD suggerita è la sola ciclosporina.

Nella terza consensus (169) del 2011 il gruppo europeo raccomanda quale regime di condizionamento pre-trapianto, in età pediatrica, l'associazione Fludarabina (120 mg/kg), CTX (120 mg/Kg) e ATG (7.5 mg/kg). In considerazione dell'elevato rischio della sindrome linfoproliferativa correlata alla riattivazione dell'EBV, viene consigliato l'uso del Rituximab.

La medesima consensus riporta i dati di uno studio giapponese su 301 pazienti che ha mostrato la superiorità dell'associazione FCA/TBI rispetto a CTX/ATG/TBI. Le linee guida giapponesi raccomandano nel regime di condizionamento pre-trapianto l'impiego della Fludarabina 100/m<sup>2</sup> + CTX 3000 mg/m<sup>2</sup> + ATG di coniglio (5 o 10 mg/Kg) + 3 Gy TBI (32); tuttavia, nello specifico, non si parla di popolazioni pediatriche.

Nel 2012 il gruppo pediatrico inglese ha condotto uno studio retrospettivo su 44 soggetti di età pediatrica che nella stragrande maggioranza avevano fallito l'IST ed erano stati sottoposti a trapianto da donatore non familiare impiegando l'Alemtuzumab al posto dell'ATG, in associazione a fludarabina/CTX (FCC). I risultati sono stati ottimi: graft failure 0%, GVHD acuta 38%, GVHD cronica 11%, OS 92% a 5 anni (188). Lo stesso gruppo, pertanto suggerisce l'FCC quale condizionamento di scelta pre-trapianto nei pazienti pediatrici con aplasia midollare (113).

Nel lavoro di review dell'EBMT (39) lo schema suggerito per il regime di condizionamento pre-trapianto in età pediatrica conferma l'uso della fludarabina (150 mg/m<sup>2</sup>) con CTX (150 mg/Kg) e ATG di coniglio alla dose di 2.5 mg/kg o di cavallo alla dose di 30 mg/Kg, per 4 giorni. Per la profilassi della GVHD è suggerita l'associazione di CsA ed MTX (10 mg/m<sup>2</sup> giorno +1, +3, +6)

In conclusione, anche nel setting del trapianto da donatore volontario, non ci sono studi randomizzati, relativi ai regimi di condizionamento pre-trapianto in pazienti pediatrici.

Sulla base dei dati della letteratura, delle linee guida pubblicate, del parere degli esperti si raccomanda quanto segue:

**Il regime di condizionamento consigliato nei pazienti affetti da AA che devono essere sottoposti a trapianto allogenico da MUD prevede l'utilizzo di fludarabina 120 mg/m<sup>2</sup> in associazione con ciclofosfamide 120 mg/Kg e ATG 7.5 mg/Kg (IV). Nel caso il paziente abbia più di 14 anni o sia politrasfuso (> 20 trasfusioni) o in caso di incompatibilità HLA, va considerata l'aggiunta di una dose di 2 Gy di TBI (IV).**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

**Per la prevenzione della GVHD è indicato l'utilizzo di MTX/CsA (V). La dose di CsA consigliata è 1.5 mg/Kg ogni 12 ore (V), mantenendo un livello ematico "trough" di 150-250 ng/ml (EO), fino a 9-12 mesi dopo il trapianto; successivamente la dose va ridotta lentamente in almeno 3 mesi ed in assenza di GVHD, eseguendo inoltre un monitoraggio periodico del chimerismo (EO). Le dosi di MTX più usate sono 10 mg/m<sup>2</sup> giorno +1, 8 mg/m<sup>2</sup> giorni +3, +6, oppure 10 mg/m<sup>2</sup> per ciascuna delle tre dosi (V).**

**(Livello di evidenza III; Forza del consensus 8.5; livello del consensus C)**

### **6.3 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE ALTERNATIVO: TRAPIANTO DA CORDONE NON FAMILIARE E TRAPIANTO DA FAMILIARE APLOIDENTICO**

Le seguenti procedure sono ad oggi considerate terapie sperimentali e dovrebbero essere eseguite solo in ambito di studi clinici prospettici.

#### **TRAPIANTO DA CORDONE NON FAMILIARE (CBT)**

Lo studio EUROCORD/EBMT Severe Aplastic Anemia Working Party sul trapianto CBT non familiare in 71 pazienti con SAA (età 2-68 anni) riporta un alto rischio di mancato attecchimento con solo il 38% di OS a 3 anni (189).

Il regime ottimale di condizionamento per il CBT non familiare nella SAA non è noto; si dovrebbe utilizzare un condizionamento ridotto comprendente fludarabina; per l'alto rischio di rigetto si raccomanda una dose cellulare più elevata rispetto a quella richiesta in caso di leucemia (almeno  $4 \times 10^7$  pro kg) e non più di 2/6 HLA mismatches nell'unità cordonale.

Un recente nuovo approccio proposto è la co-infusione di cellule CD34 aploidentiche per aiutare l'attecchimento dopo CBT (190).

#### **TRAPIANTO DA FAMILIARE APLOIDENTICO**

Questo approccio offre i vantaggi di una maggiore e più rapida disponibilità del donatore e potenzialmente di costi minori.

La presenza nel ricevente di anticorpi HLA diretti contro un donatore familiare aploidentico è il principale ostacolo all'attecchimento. Pertanto nei pazienti dovrebbero essere ricercati gli anticorpi HLA diretti contro il donatore e, se presenti, scegliere un donatore aploidentico familiare alternativo (191). Storicamente l'HSCT aploidentico nei pazienti AA è stato connotato da alta incidenza di rigetto e GVHD. Una recente review EBMT-SAAWP su 73 pazienti trapiantati prevalentemente dopo condizionamento non ablativo nel periodo 1976-2011 riporta una OS a 3 anni del 37% senza significativi miglioramenti dopo il 1999 (192).

Di recente in alcuni Centri è stato impiegato un approccio con un condizionamento non ablativo e con alte dosi di CTX post trapianto nei giorni +3 e +4 con l'obiettivo di ridurre la GVHD, secondo uno schema utilizzato in trapianti da donatore familiare in pazienti aplastici con malattia avanzata (193).

## 7. VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA EMATOLOGICA

Poiché la risposta ematologica alla terapia immunosoppressiva non si manifesta prima di 2 o 3 mesi, la valutazione della risposta al trattamento va effettuata al giorno +120. E' necessario che la stessa venga confermata su due o tre emocromi eseguiti in un periodo di almeno quattro settimane, senza concomitante uso di G-CSF.

### 7.1 Esami per la valutazione della risposta

**Giorno + 120:** Emocromo con reticolociti, aspirato midollare, BOM, cariotipo, ricerca cloni PNH.

### 7.2 Definizione di Risposta Completa, Risposta Parziale e Non Risposta nei pazienti SAA e VSAA

Per la definizione di **Risposta Completa** devono essere soddisfatti tutti e tre i seguenti criteri:

- Neutrofili  $\geq 1500/\text{mmc}$
- Livelli di emoglobina normali per età
- $\text{PLT} \geq 150.000/\text{mmc}$

Per la definizione di **Risposta Parziale** è necessaria una condizione di trasfusione-indipendenza (sia dal supporto piastrinico sia dal supporto eritrocitario) in assenza dei criteri ematologici che definiscono la risposta come completa o in assenza dei criteri per la definizione di Anemia Aplastica Acquisita Severa.

Per la definizione di **Non Risposta** devono coesistere due dei seguenti criteri:

- Trasfusione-dipendenza per necessità di supporto eritrocitario
- Trasfusione-dipendenza per necessità di supporto piastrinico
- Neutrofili  $< 500/\text{mmc}$

In alternativa viene considerata una Non Risposta la presenza di criteri diagnostici per SAA o VSAA

### 7.3 Definizione di Risposta Completa, Risposta Parziale e Non Risposta nei pazienti NSAA

Per la definizione di **Risposta Completa** devono essere soddisfatti tutti e tre i seguenti criteri:

- Neutrofili  $\geq 1500/\text{mmc}$
- Livelli di emoglobina normali per età
- $\text{PLT} \geq 150.000/\text{mmc}$

Per la definizione di **Risposta Parziale** è necessaria la presenza di uno dei seguenti criteri:

- Trasfusione-indipendenza nei soggetti precedentemente trasfusione-dipendenti
- Raddoppio dei valori o normalizzazione dei valori di almeno una linea cellulare
- Neutrofili  $> 500/\text{mmc}$  se all'esordio  $< 500/\text{mmc}$
- Piastrine  $> 20.000/\text{mmc}$  se all'esordio  $< 20.000/\text{mmc}$

Per la definizione di **Non risposta** deve verificarsi un peggioramento o l'assenza dei criteri per la risposta completa o parziale.



## 8. FOLLOW-UP

### SORVEGLIANZA DELLA RISPOSTA, DEL RISCHIO CLONALE E DELLA TOSSICITA' A LUNGO TERMINE

I pazienti con AA trattati con IST devono essere sottoposti a controlli clinici ed ematologici periodici al fine di monitorare il rischio di evoluzione clonale nonché il manifestarsi di effetti tossici a medio e lungo termine, legati al trattamento. Nella maggior parte dei casi la recidiva ematologica avviene entro 2-4 anni dall'esordio (64, 67, 71). Riguardo all'evoluzione clonale va però ricordato che il rischio di tumore secondario soprattutto nei pazienti trattati con IST, tende ad aumentare negli anni.

Nei pazienti con AA sottoposti a trapianto di CSE il programma di sorveglianza deve tener conto anche del rischio di rigetto, con o senza ricostituzione autologa, che in questi casi oscilla tra il 15 ed il 30%. Come per tutti i soggetti trapiantati è importante il monitoraggio delle complicanze a medio e lungo termine legate alla procedura trapiantologica.

#### 8.1 PAZIENTI TRATTATI CON TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA

##### Recidiva

Non vi è consenso sulla definizione di recidiva. Pragmaticamente si può definire recidiva la condizione che si verifica quando, dopo una risposta completa o parziale, sia necessario reintrodurre il trattamento immunosoppressivo a causa di una riduzione dei valori ematologici tale da richiedere, ma non sempre, la ripresa del supporto trasfusionale. Naturalmente non è sufficiente un unico riscontro laboratoristico ma la persistente tendenza al peggioramento della crasi ematica. Viene descritta una maggior incidenza di recidive nei pazienti con risposta precoce e in quelli con maggior intervallo tra diagnosi ed inizio del trattamento (68).

La ricaduta può avvenire allo scalo della CsA, dopo infezioni virali e durante la gravidanza (194) a causa del trigger immunogeno. Su 43 pazienti (adulti e bambini) trattati con ATG e CsA con un follow up di 11 anni la recidiva veniva registrata nel 45% dei casi (da 2 a 49 mesi dopo l'avvio dello scalo della CsA), e la dipendenza da ciclosporina era presente nel 14% dei casi (60).

L'analisi retrospettiva di 42 casi pediatrici trattati con IST (nella quasi totalità ATG/CsA/G-CSF) ha mostrato una percentuale di recidiva del 16% a 10 anni ed una correlazione tra recidiva e rapidità con cui era stata scalata la CsA (60% di recidive nei pazienti sottoposti a rapido scalo di CsA, pari a 0.8 mg/kg/mese) (82).

Uno studio multicentrico pediatrico (54) riporta un'incidenza di recidiva del 16% in 264 pazienti responsivi a IST standard con maggiore incidenza nelle forme NSAA rispetto alle SAA e VSAA. Il fattore significativamente correlato al rischio di recidiva è risultato l'uso di androgeni (danazolo). Gli autori ipotizzano che alcune forme costituzionali misconosciute e responsive all'androgeno abbiano presentato una ricaduta dopo la sospensione del farmaco.

Si ritiene che anche le vaccinazioni possano determinare una recidiva; tuttavia sono state riportate solo segnalazioni aneddotiche (195).

Nelle ragazze in età fertile un evento che può indurre la recidiva è la gravidanza. In uno studio retrospettivo (58) la recidiva di malattia è stata osservata nel 18% delle donne in remissione completa prima della gravidanza, nel 19% delle donne in remissione parziale e nel 25% delle donne con PNH.

Esistono poi diversi fattori che correlano con il rischio di recidiva, tra questi la cellularità periferica ma non quella midollare; pertanto un programma di sorveglianza della risposta ematologica e della recidiva non può prescindere dal controllo periodico dell'emocromo e della conta reticolocitaria.

In uno studio prospettico monocentrico è stato dimostrato che la valutazione periodica, mediante analisi citofluorimetrica, del numero assoluto e del grado di apoptosi delle cellule CD34+ circolanti (196) è un test valido per il monitoraggio della risposta al trattamento; infatti è stata osservata una riduzione dell'apoptosi delle cellule C34+ circolanti nei pazienti responsivi e un nuovo incremento in caso di recidiva o sviluppo di dipendenza da CsA (25).

Anche la misurazione della lunghezza dei telomeri dei leucociti nel sangue periferico può costituire un valido strumento predittivo sia di recidiva che di evoluzione clonale. In uno studio recente (14) è stato dimostrato che la lunghezza ridotta dei telomeri pre-trattamento, insieme ad un ridotto numero di reticolociti si associa ad un rischio aumentato di 2 volte di avere una recidiva.

Il test di misurazione della lunghezza dei telomeri potrebbe essere, in futuro, utilizzato non solo in fase diagnostica ma anche durante il follow-up per valutare la potenziale durata della risposta ematologica ed il rischio di recidiva.

Altri markers biologici o altri indicatori potrebbero emergere dalla valutazione globale della risposta immunitaria e da misurazioni più accurate della riserva e della funzionalità delle cellule staminali.

### **Esami per la valutazione della recidiva**

Emocromo con reticolociti, aspirato midollare, BOM, cariotipo, ricerca cloni PNH.

### **Trattamento della recidiva**

La recidiva va inizialmente trattata con la reintroduzione della CsA o l'aumento della dose allo scopo di tornare al dosaggio terapeutico (5 mg/Kg/die) per 2-3 mesi; in caso di risposta si prosegue la CsA sino alla stabilizzazione ematologica, con successivo lento e graduale tapering mantenendo la dose minima efficace necessaria per garantire una adeguata crasi ematica. Se non si ottiene risposta con la sola CsA è necessario ripetere un secondo ciclo di terapia immunosoppressiva combinata o procedere a trapianto se vi è disponibilità di donatore HLA compatibile. Come da enunciato di pagina 15, è raccomandato di avviare durante il work-up diagnostico la ricerca di un donatore non familiare HLA identico nei registri internazionali, per avere questa opzione disponibile al momento della ricaduta. Se la ricaduta consiste nella ripresa di grave pancitopenia è necessario, qualora sia disponibile un donatore HLA compatibile, procedere a trapianto, oppure ripetere prima possibile il secondo ciclo IST.

**Se la ricaduta si manifesta con un lento decremento dei valori ematologici va inizialmente trattata con la reintroduzione o l'aumento della dose di CsA per os a dosaggio terapeutico (5 mg/Kg/die) per 2-3 mesi; in caso di risposta si prosegue la CsA a dosaggio terapeutico sino alla stabilizzazione ematologica; seguirà un lento e graduale tapering, utilizzando la dose minima efficace al fine di mantenere conteggi ematologici adeguati.**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)**

**In caso di ricaduta caratterizzata dalla comparsa di una grave pancitopenia è necessario avviare il paziente a trapianto di midollo da donatore compatibile non familiare.**

**(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)**

**In caso di ricaduta caratterizzata dalla comparsa di una grave pancitopenia o in caso di mancata risposta alla terapia immunosoppressiva, in assenza di MUD 9/10 o 10/10, è consigliabile procedere con un II IST (non esiste una chiara evidenza se sia più adeguato ripetere ATG di cavallo o eventualmente utilizzare ATG di coniglio).**

**(Livello di evidenza III; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)**

## Evoluzione Clonale

### MDS/AML

L'evoluzione clonale ematologica è una nota complicanza dopo IST per AA.

A distanza di 11 anni dalla IST il rischio di sviluppare una MDS/AML è risultato in alcuni studi dell'8% (59, 89).

In uno studio giapponese è stato osservato lo sviluppo di MDS nel 20% dei pazienti trattati con IST a 10 anni di follow-up (95).

In uno studio più recente, condotto sempre su pazienti pediatriche, l'evoluzione clonale dopo IST è stata descritta nel 15% dei soggetti a 10 anni dal trattamento; nel 60% dei casi si è trattato di evoluzione in MDS o AML mentre nel restante 40% di evoluzione in PNH (82).

In uno studio retrospettivo su 144 pazienti pediatriche ed adulti è emerso che le anomalie citogenetiche erano comparse complessivamente nel 15% dei casi. Suddette anomalie sono risultate transitorie nel 40% dei casi e l'incidenza di MDS è stata del 5.5% (91).

Lo sviluppo di clonalità è stato posto in correlazione con un aumentato fabbisogno di trattamento immunosoppressivo (82) e con la non risposta alla terapia (197), mentre controversa risulta la relazione con una prolungata somministrazione di G-CSF (91, 197).

L'evoluzione clonale in senso mielodisplastico o leucemico si manifesta con un peggioramento delle conte periferiche, poco responsivo alla immunosoppressione, un aspetto francamente displastico del midollo osseo e la comparsa di anomalie citogenetiche.

La monosomia del cromosoma 7 e la trisomia del cromosoma 8 rappresentano le alterazioni citogenetiche di più frequente riscontro (96, 198): la monosomia 7 si accompagna a MDS franca, la sua comparsa è correlata a cattiva risposta alla terapia immunosoppressiva ed ha esito infausto se non trattata con trapianto allogenico di CSE.

Talvolta si possono riscontrare anomalie citogenetiche (es. del13q, trisomia 8, del20q) in assenza di segni di MDS all'esame morfologico del midollo osseo o di peggioramento della crasi ematica: l'interpretazione di tale reperto è poco chiara. Appare in questi casi ragionevole ripetere l'aspirato midollare dopo alcuni mesi, in quanto alcune anomalie clonali possono essere transitorie e non necessariamente precedere un'evoluzione in MDS/AML (43).

La trisomia 8 è stata riscontrata in casi con buona risposta alla terapia immunosoppressiva ed è risultata compatibile con buona sopravvivenza libera da malattia (197).

Come precedentemente ricordato lo studio della lunghezza dei telomeri pre-trattamento ha mostrato correlazione tra un accorciamento telomeri e un rischio 4-6 volte maggiore di evoluzione clonale con prognosi infausta (14).

Anche lo studio prospettico monocentrico sulla valutazione periodica del numero assoluto e del grado di apoptosi delle cellule CD34+ circolanti (196) si è mostrato utile nella valutazione del rischio di evoluzione clonale, mettendo in evidenza un aumento significativo del numero assoluto delle CD34+ circolanti ed una contemporanea riduzione della apoptosi nei pazienti con evoluzione mielodisplastica (25).

**Si raccomanda nei pazienti con AA responsivi all'IST l'esecuzione di: (I) emocromo ogni mese durante lo scalo della CsA; ogni 1-2 mesi per i primi 6 mesi dopo la fine della ciclosporina; ogni 2-3 mesi per i successivi 2 anni e mezzo (si arriva così, in caso di risposta stabile, a 5 anni dall'inizio ed a tre anni dalla fine dell'IST). (II) Aspirato midollare con citogenetica associato a BOM a +120 giorni. (III) Aspirato midollare con citogenetica a 12 mesi e almeno una volta all'anno per cinque anni dopo aver ottenuto una risposta stabile; dopo i primi cinque anni l'intervallo può essere prolungato se l'emocromo, controllato annualmente, è stabile.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.0; livello del consensus C)**

## PNH

Lo sviluppo di PNH dopo trattamento con IST è descritto nel 10-30% circa dei casi (59, 89). La sintomatologia clinica, nella forma conclamata, è caratterizzata da episodi di emolisi, eventi trombotici a carico soprattutto del circolo venoso profondo (sistema venoso profondo addominale, vene epatiche e seni cerebrali), ripresa della citopenia e rischio di evoluzione leucemica del 3-5%. Nella maggior parte dei pazienti con AA sono presenti cloni PNH minori non associati a sintomatologia clinica.

Il trattamento è il trapianto di CSE o la terapia specifica con Eculizumab.

In uno studio italiano monocentrico e nel successivo studio multicentrico, la comparsa e l'espansione di cloni PNH in pazienti pediatriche trattate con IST, precedentemente PNH negativi, è risultata associata allo scalo della CsA o alla recidiva di malattia (25); inoltre si è evidenziata una correlazione tra ampiezza del clone e aumento di LDH (26).

**Si raccomanda il monitoraggio dei cloni PNH, tramite test citofluorimetrico, e valutazione degli indici di emolisi ogni tre-sei mesi durante IST, ogni anno dopo sospensione della IST. (Livello di evidenza III; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

## Secondi tumori

La possibilità di sviluppare un tumore a distanza dal trattamento dell'anemia aplastica è correlato sia all'uso di farmaci immunosoppressori nei pazienti trattati con IST che alla terapia di condizionamento o alla TBI, quando usata, in coloro che vengono sottoposti a HSCT.

Nell'11% dei pazienti con AA trattati con la sola IST è stata documentata l'insorgenza di un secondo tumore dopo un follow-up di 11 anni (59). I tumori di più frequente riscontro sono risultati i carcinomi squamocellulari, notoriamente correlati all'immunodepressione da farmaci.

Il rischio di tumore secondario tende ad aumentare negli anni: in un recente studio EBMT su più di 500 adolescenti l'incidenza di secondi tumori è del 7% a 5 anni e 21% a 7 anni (199).

## Complicanze da CsA

Gli effetti avversi cronici più frequenti legati all'uso di CsA (60) sono risultati l'ipertricosi (38%), l'ipertrofia gengivale (15%), l'ipertensione (8,5%) e l'epatotossicità (4,8%). Soltanto nel 4,8% dei casi si è osservato un incremento significativo dei livelli di creatinina e in altrettanti casi è stato necessario sospendere il farmaco per gli effetti avversi. L'ipertensione è perdurata, nonostante la sospensione del farmaco, nel 15% dei pazienti con necessità di trattamento antiipertensivo protratto (200). E' importante pertanto la sorveglianza del rischio vascolare.

Concludendo è necessario che i pazienti con AA trattati con IST vengano inseriti in un programma di follow-up multidisciplinare che preveda la valutazione ematologica, la sorveglianza oncologica, la prevenzione primaria del rischio vascolare ed il monitoraggio degli effetti tossici a distanza.

Tale programma di follow-up e screening dovrà accompagnare il paziente per tutta la vita e pertanto i controlli andranno concordati con il pediatra di libera scelta prima e con i medici di medicina generale poi.

## 8.2 PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

### Rigetto e recidiva

Il rigetto di trapianto allogenico di CSE non seguito da ricostituzione ematologica autologa è stato osservato nel 32% dei casi di anemia aplastica trattata con trapianto. Da un'analisi retrospettiva su 1.205 allotrapianti è emerso che il rigetto si è verificato con prognosi sfavorevole nell'11.2% dei casi (201), mentre in un 4.2% dei casi al rigetto del trapianto ha fatto seguito la ricostituzione ematologica autologa, con prognosi buona e possibile risposta a successiva IST.

La presenza di chimerismo instabile progressivo è stata riscontrata nel 15% di 91 pazienti allotrapiantati, da 2 a 32 mesi dal trapianto e in questo gruppo di pazienti vi era stato rigetto del trapianto nel 50% dei casi (202).

La presenza di chimerismo instabile progressivo (già dopo il primo mese dal trapianto) è stato correlato ad un rischio di rigetto del 50% e la somministrazione di linfociti da donatore ha arrestato il processo e possibilmente prevenuto il rigetto in due successivi pazienti in cui l'evento era stato riscontrato (203).

**Si raccomanda il monitoraggio del chimerismo, dopo HSCT in pazienti con AA, una volta al mese durante il primo anno dal trapianto; ogni tre mesi nel secondo anno; ogni dodici mesi dal terzo anno in poi.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)**

### Secondi tumori

In 133 pazienti affetti da AA sottoposti a HSCT da fratello compatibile il rischio di neoplasia (incidenza cumulativa a 15 anni del 10.9%) è stato associato a età maggiore ed uso di CsA nella IST prima del trapianto (204). In un altro studio su 137 casi il 13% aveva presentato un tumore maligno a 1-31 anni di follow-up, con incidenza del 37% nei pazienti che avevano ricevuto TBI.

La maggior parte dei secondi tumori è risultata costituita da carcinomi squamocellulari, correlabili alla presenza di GVHD cronica, presente nel 70% dei casi, ma non alla TBI (205).

## 9. TERAPIA DI SUPPORTO

### 9.1 TRASFUSIONE DI EMOCOMPONENTI

#### Indicazioni alla trasfusione di concentrati eritrocitari

L'indicazione alla trasfusione di concentrati eritrocitari viene posta dal medico curante secondo le condizioni del singolo paziente e le diverse variabili che solitamente vengono considerate (comorbidità, fase di aplasia, previsione di evoluzione clinica, etc.).

**I criteri per la trasfusione di emazie sono rappresentati da (1, 73):**

- anemia con Hb < 8 g/dl nel paziente asintomatico
- anemia sintomatica (senza soglia)

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

#### Indicazioni alla trasfusione di concentrato piastrinico

L'indicazione alla trasfusione di concentrato piastrinico viene posta dal medico curante secondo le condizioni del singolo paziente e le diverse variabili che solitamente vengono considerate (comorbidità, fase di aplasia, previsione di evoluzione clinica, etc.).

**I criteri per la trasfusione di piastrine sono i seguenti (1):**

- PLT < 10.000/mmc
- PLT < 20.000/mmc nel paziente febbrile/settico
- Manifestazioni emorragiche (a giudizio del clinico)

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.3; livello del consensus B)**

#### Fonte del concentrato piastrinico

Il concentrato piastrinico da unico donatore ottenuto mediante piastrino-afèresi è da preferire ai concentrati random ottenuti dal buffy-coat, allo scopo di ottenere una "resa" trasfusionale migliore limitando al minimo l'esposizione ai donatori (206).

**(Livello di evidenza Review; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

E' preferibile che il concentrato piastrinico sia AB0 compatibile per prevenire l'emolisi, aumentare la resa e diminuire l'incidenza di refrattarietà (207).

**(Livello di evidenza V; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

I pazienti che divengono refrattari alla somministrazione di concentrato piastrinico dovrebbero essere sottoposti alla ricerca di anticorpi anti-HLA, e, se positivi, sottoposti a successive trasfusioni con concentrati piastrinici HLA-compatibili (1).

**(Livello di evidenza V; Forza del consensus 7.9; livello del consensus C)**

#### Indicazioni alla trasfusione di concentrato granulocitario

Nonostante la possibile disponibilità di questo emoderivato, il suo uso è molto limitato, soprattutto a causa dei gravi effetti avversi: alloimmunizzazione e TRALI (transfusion-related acute lung injury) (208).

L'uso del concentrato granulocitario va limitato ai casi di infezione in neutropenia che mettano a rischio la vita del paziente, situazione in cui i potenziali benefici bilanciano i rischi, e come trattamento “ponte” in prossimità della ripresa dei GB (1).  
(Livello di evidenza V; Forza del consensus 7.5; livello del consensus D)

#### Raccomandazioni per l'uso degli emoderivati da familiari

L'uso di emoderivati prelevati da familiari è controindicato per evitare la possibile sensibilizzazione del paziente verso antigeni HLA minori o leucocitari del donatore.  
(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

#### Leucodeplezione

I concentrati eritrocitari e piastrinici devono essere leucodepleti (209, 210, 211, 212, 213).  
(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 9; livello del consensus A)

#### Irradiazione

Tutti i pazienti con AA devono ricevere emoderivati irradiati con 25 Gy (1, 78, 214, 215).  
(Livello di evidenza V; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)

#### Prevenzione della trasmissione dell'infezione da CMV

Tutti gli emoderivati destinati a pazienti CMV-negativi candidati a HSCT dovrebbero essere CMV-negativi.  
(Livello di evidenza V; Forza del consensus 7.7; livello del consensus B)

In assenza di disponibilità di emoderivati CMV-negativi, una valida alternativa è costituita da emocomponenti in cui la leucodeplezione venga eseguita con filtri prestorage (211, 213).  
(Livello di evidenza V; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

## 9.2 TERAPIA FERROCHELANTE

Sebbene ci siano scarse evidenze in merito, nei pazienti con livelli di ferritina superiori a 1000 ng/ml esiste l'indicazione ad avviare il trattamento ferrochelante.  
(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8; livello del consensus B)

Il deferasirox alla dose di 20-30 mg/Kg/die è da considerarsi il ferrochelante di prima scelta.  
(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)

La ragione di ciò risiede nel fatto che il deferasirox è l'unico chelante testato su larga scala in soggetti con AA (216). Inoltre, il deferiprone non è suggerito nei pazienti con AA per il noto rischio di agranulocitosi e la deferoxamina pone problemi per la scarsa compliance (infusione s.c. o e.v.) e per il rischio di infezione da Yersinia.

Dato che la riduzione del carico marziale non avviene rapidamente, è necessario iniziare la ferrochelazione almeno 2-3 mesi prima del trapianto (EO).

Poiché il deferasirox può provocare tossicità renale, nei pazienti che ricevono l'associazione CsA-deferasirox, in caso di rialzo della creatinina, è necessario ridurre dapprima il dosaggio del

deferasirox e verificare se la creatinina sierica si normalizza, piuttosto che ridurre la dose di CsA, possibile causa di recidiva (EO).

Nei pazienti guariti che presentano sovraccarico marziale, è indicata la salasso-terapia.

### 9.3 SUPPORTO PSICOLOGICO

Si consiglia l'adozione di supporto psicologico come indicato per tutte le patologie oncoematologiche.

### 9.4 GRAVIDANZA

C'è un alto rischio di recidiva (33%) di AA durante la gravidanza.

Il trattamento della citopenia in gravidanza è principalmente il supporto trasfusionale mantenendo livelli di piastrine > 20.000/mmc (217); la ciclosporina è da considerare sicura in caso di elevato fabbisogno trasfusionale (58).

La terapia ferrochelante non è indicata in gravidanza, e deve essere sospesa al momento del riconoscimento dello stato di gravidanza.

La criopreservazione del liquido seminale e degli ovociti deve essere presa in considerazione in pazienti da sottoporre al trapianto di midollo per l'anemia aplastica (EO).

### 9.5 G-CSF

**E' consigliato l'uso continuativo del G-CSF per i primi 30 giorni nelle forme SAA e VSAA ed è accettato l'uso continuativo anche quotidiano dopo i primi 30 giorni e non oltre i 90 giorni nei pazienti con neutrofili < 200/mmc**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.8; livello del consensus C)**

**E' accettato anche come uso "on demand" dopo i primi 30 giorni in caso di neutropenia febbrile nelle forme SAA e VSAA e solo per il periodo della febbre.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.2; livello del consensus B)**

### 9.6 SUPPORTO ANTI-INFETTIVO

Pochi sono gli studi clinici controllati sulla efficacia e la sicurezza di molecole antimicrobiche nella terapia e profilassi anti-infettiva di pazienti pediatrici con AA.

Molte delle evidenze sull'uso delle molecole antimicrobiche derivano da studi clinici controllati e metanalisi di studi condotti prevalentemente su soggetti adulti oncologici con neutropenia febbrile. Va tuttavia ricordato che la suscettibilità alle infezioni e i meccanismi immunopatogenetici che ad essa sottendono sono differenti nei pazienti con AA rispetto a quelli con tumore. Ad esempio, l'integrità della barriera mucosale e la persistenza della neutropenia rendono i pazienti con AA più suscettibili verso infezioni da batteri Gram positivi (accessi vascolari) e funghi (specie filamentose) piuttosto che verso gli enterobatteri o le candidi. A questo va aggiunto che la profonda T-deplezione indotta dalla IST aumenta in quella fase il rischio di infezioni virali.



## **Profilassi antimicrobica**

In letteratura non ci sono dati sufficienti per fornire raccomandazioni precise (218, 219). Tuttavia, la frequenza con la quale vengono documentate batteriemie e micosi invasive in pazienti pediatriche con aplasia midollare è inferiore a quella riscontrata in pazienti oncologici trattati con chemioterapia intensiva (220). Pertanto, possono essere utilizzate sia una strategia di profilassi, sia una strategia di osservazione e trattamento degli episodi infettivi.

La mortalità infettiva è più elevata nei primi 30-90 giorni dalla diagnosi e le infezioni si concentrano nei pazienti con PMN < 200/mmc.

**Può essere presa in considerazione la profilassi antibiotica solo nei pazienti con PMN < 200/mmc nei primi 30-90 giorni dopo il siero antilinfocitario.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.3; livello del consensus C)**

**La profilassi antifungina può essere presa in considerazione nei pazienti con valori di PMN persistentemente < 200/mmc.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.1; livello del consensus C)**

**E' indicata la profilassi contro Pneumocystis Jirovecii con cotrimoxazolo per os o pentamidina per aerosol in presenza di valori di CD4+ < 400/mmc o di linfociti < 1000/mmc.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)**

**La profilassi antivirale può essere presa in considerazione in pazienti con grave linfocitopenia dopo siero antilinfocitario.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.1; livello del consensus C)**

## **Trattamento empirico delle infezioni batteriche e fungine**

In assenza di evidenze derivanti da studi clinici controllati e metanalisi di studi condotti su popolazioni di bambini febbrili con AA, è ragionevole considerare, sia pure con le riserve di cui sopra, le raccomandazioni indicate dalle linee guida per il management della neutropenia febbrile in pazienti con tumore e/o sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche e/o le indicazioni proposte per la terapia empirica in soggetti adulti con AA (1, 43, 221, 222, 223, 224).

**La terapia antibiotica empirica iniziale di un paziente pediatrico con anemia aplastica e febbrile deve essere ad ampio spettro e basata sui dati epidemiologici del singolo centro.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)**

**Le modifiche della terapia empirica iniziale non dovrebbero essere effettuate prima di 72-96 ore di trattamento a meno che i dati microbiologici e clinici non lo giustifichino.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.3; livello del consensus B)**

**Si raccomanda l'introduzione di un antifungino attivo sull'Aspergillo in terapia empirica se la febbre persiste oltre 96 ore e/o in caso di segni clinici, laboratoristici e strumentali suggestivi.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)**

## 9.7 VACCINAZIONI

Non esistono studi specifici in letteratura; vi sono solo alcune segnalazioni aneddotiche di AA esordita e/o recidivata dopo vaccinazione (195).

**Nei pazienti ancora in trattamento con ciclosporina non è raccomandata la somministrazione di alcun vaccino.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.8; livello del consensus B)**

**Nei pazienti guariti e in off-therapy dopo IST le vaccinazioni contro i virus non sono consigliate.**

**(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 5; livello del consensus D)**

*La data prevista per la revisione/aggiornamento delle Linee Guida di cui sopra è Giugno 2015*

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Marsh JC, Ball SE, Cavenagh J, Darbyshire P, Dokal I, Gordon-Smith EC, Keidan J, Laurie A, Martin A, Mercieca J, Killick SB, Stewart R, Yin JA; British Committee for Standards in Haematology. **Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia.** Br J Haematol. 2009;147:43-70.
2. Montané E, Ibáñez L, Vidal X, Ballarín E, Puig R, García N, Laporte JR; Catalan Group for Study of Agranulocytosis and Aplastic Anemia. **Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study.** Haematologica. 2008;93:518-23.
3. Young NS, Kaufman DW. **The epidemiology of acquired aplastic anemia.** Haematologica. 2008;93:489-92.
4. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. **Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia.** Blood. 2006;108:2509-19.
5. Dufour C, Ferretti E, Bagnasco F, Burlando O, Lanciotti M, Ramenghi U, Saracco P, Van Lint MT, Longoni D, Torelli GF, Pillon M, Locasciulli A, Misuraca A, La Spina M, Bacigalupo A, Pistoia V, Corcione A, Svahn J; Marrow Failure Study Group of the AIEOP. **Changes in cytokine profile pre- and post-immunosuppression in acquired aplastic anemia.** Haematologica. 2009;94:1743-7.
6. Olnes MJ, Scheinberg P, Calvo KR, Desmond R, Tang Y, Dumitriu B, Parikh AR, Soto S, Biancotto A, Feng X, Lozier J, Wu CO, Young NS, Dunbar CE. **Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia.** N Engl J Med. 2012;367:11-9.
7. Maciejewski JP, Follmann D, Nakamura R, Saunthararajah Y, Rivera CE, Simonis T, Brown KE, Barrett JA, Young NS. **Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome.** Blood. 2001;98:3513-9.
8. Saunthararajah Y, Nakamura R, Nam JM, Robyn J, Loberiza F, Maciejewski JP, Simonis T, Molldrem J, Young NS, Barrett AJ. **HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome.** Blood. 2002;100:1570-4.
9. Dirksen U, Moghadam KA, Mambetova C, Esser C, Fuhrer M, Burdach S. **Glutathione S transferase theta 1 gene (GSTT1) null genotype is associated with an increased risk for acquired aplastic anemia in children.** Pediatr Res. 2004;55:466-71.
10. Dufour C, Svahn J, Bacigalupo A, Longoni D, Varotto S, Iori AP, Bagnasco F, Locasciulli A, Menna G, Ramenghi U, Lanciotti M. **Genetic polymorphism of CYP3A4, GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NQO1 and the risk of acquired idiopathic aplastic anemia in Caucasian patients.** Haematologica. 2005;90:1027-31.
11. Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. **Progressive telomere shortening in aplastic anemia.** Blood. 1998;91:3582-92.
12. Aspesi A, Vallero S, Rocci A, Pavesi E, Lanciotti M, Ramenghi U, Dianzani I. **Compound heterozygosity for two new TERT mutations in a patient with aplastic anemia.** Pediatr Blood Cancer. 2010;55:550-3.
13. Fogarty PF, Yamaguchi H, Wiestner A, Baerlocher GM, Sloand E, Zeng WS, Read EJ, Lansdorp PM, Young NS. **Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA.** Lancet. 2003;362:1628-30.

14. Scheinberg P, Cooper JN, Sloand EM, Wu CO, Calado RT, Young NS **Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia.** JAMA. 2010;304:1358-64.
15. Calado RT, Cooper JN, Padilla-Nash HM, Sloand EM, Wu CO, Scheinberg P, Ried T, Young NS. **Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia.** Leukemia. 2012;26:700-7.
16. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Santos G, Gordon-Smith EC, Gale RP, Rapoport JM, Storb R. **Severe Aplastic Anemia: A Prospective Study of the Effect of Early Marrow Transplantation on Acute Mortality.** Blood. 1976;1:63-70.
17. Bacigalupo A, Hows J, Gluckman E, Nissen C, Marsh J, Van Lint MT, Congiu M, De Planque MM, Ernst P, McCann S, et al. **Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): a report of the EBMT SAA working party.** Br J Haematol. 1988;2:177-82
18. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF. **Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan.** Medicine (Baltimore). 2004;83:193-207.
19. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. **Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:5209-14.
20. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. **PIG-A mutations in normal hematopoiesis.** Blood. 2005;105:3848-54.
21. Karadimitris A, Manavalan JS, Thaler HT, Notaro R, Araten DJ, Nafa K, Roberts IA, Weksler ME, Luzzatto L. **Abnormal T-cell repertoire is consistent with immune process underlying the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.** Blood. 2000;96:2613-20.
22. Ishiyama K, Chuhjo T, Wang H, Yachie A, Omine M, Nakao S **Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells.** Blood. 2003;102:1211-6.
23. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S. **Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia.** Blood. 2006;107:1308-14.
24. Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, Yamamoto T, Liang J, Wang Y, Tanaka M, Hama A, Nishio N, Kobayashi R, Hotta N, Asami K, Kikuta A, Fukushima T, Hirano N, Kojima S. **Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia.** Br J Haematol. 2008;142:427-35.
25. Timeus F, Crescenzo N, Lorenzati A, Doria A, Foglia L, Pagliano S, Quarello P, Ramenghi U, Saracco P. **Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria Clones in Children with Acquired Aplastic Anaemia: A Prospective Single Centre Study.** Br J Haematol. 2010;4:483-5.
26. Timeus F, Crescenzo N, Doria A, Foglia L, Pagliano S, Lorenzati A, Quarello P, Decimi V, Svhan J, Locatelli F, Ruggero A, Martire B, Pillon M, Misuraca A, Longoni D, Dufour C,

- Ramenghi U, Saracco P. **Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones in Children with Acquired Aplastic Anemia: A Multicentric Study.** Blood, ASH Annual Meeting Abstracts 2012;120:1269.
27. Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Wittwer C, Chen Z, Babcock W, Frei-Lahr D, Parker CJ, Kinoshita T. **Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).** Blood. 2006;108:4232-6.
  28. Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Ohta R, Noji H, Maeda Y, Nishimura J, Kanakura Y, Kinoshita T. **Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.** Br J Haematol. 2012;156:383-7.
  29. Hall SE, Rosse WF. **The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.** Blood. 1996;87:5332-40.
  30. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, Borowitz MJ. **Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin.** Am J Clin Pathol. 2000;114:459-66.
  31. Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ; Clinical Cytometry Society. **Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry.** Cytometry B Clin Cytom. 2010;78:211-30.
  32. Rovo, A Tichelli and C Dufour. **Diagnosis of Aplastic anemia.** Bone Marrow Transplant. 2013;48:162–7.
  33. Rauff B, Idrees M, Shah SA, Butt S, Butt AM, Ali L, Hussain A, Irshad-Ur-Rehman, Ali M. **Hepatitis associated aplastic anemia: a review.** Virol J. 2011;8:87.
  34. Shimamura A. **Clinical approach to marrow failure.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:329-37.
  35. Niemeyer CM, Baumann I. **Classification of childhood AA and MDS.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:84-9.
  36. Bennett JM, Orazi A. **Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach.** Haematologica. 2009;94:264–68.
  37. Gupta V, Brooker C, Tooze JA, Yi QL, Sage D, Turner D, Kangasabapathy P, Marsh JC. **Clinical relevance of cytogenetic abnormalities at diagnosis of acquired aplastic anaemia in adults.** Br J Haematol. 2006;134:95-9.
  38. Hasle H. **Myelosidplastic and myeloproliferative disorders in children.** Curr Opin Pediatr. 2007;19:1-8.
  39. Korthof ET, Békássy AN, Hussein AA. **Management of acquired aplastic anemia in children.** Bone Marrow Transplant. 2013;4:191-95.
  40. Höchsmann B, Moicean A, Risitano A, Ljungman P, Schrezenmeier HSO. **Supportive care in severe and very severe aplastic anemia.** Bone Marrow Transplant. 2013;48:168-73.
  41. Burroughs LM, Woolfrey AE, Storer BE, Deeg HJ, Flowers ME, Martin PJ, Carpenter PA, Doney K, Appelbaum FR, Sanders JE, Storb R. **Success of allogeneic marrow transplantation for children with severe aplastic anemia.** Br J Haematol. 2012;158:120-8.

42. Kobayashi R, Yabe H, Hara J, Morimoto A, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Tsukimoto I, Kato K, Kigasawa H, Tabuchi K, Nakahata T, Ohga S, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Preceding immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and ciclosporin increases the incidence of graft rejection in children with aplastic anaemia who underwent allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical siblings.** Br J Haematol. 2006;135:693-6.
43. Scheinberg P, Young NS. **How I treat acquired aplastic anemia.** Blood. 2012;120:1185-96.
44. Kosaka Y, Yagasaki H, Sano K, Kobayashi R, Ayukawa H, Kaneko T, Yabe H, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Morimoto A, Otsuka Y, Ohga S, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem-cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia.** Blood. 2008;111:1054-9.
45. Gupta V, Ball SE, Sage D, Ortin M, Freires M, Gordon-Smith EC, Marsh JC. **Marrow transplants from matched unrelated donors for aplastic anaemia using alemtuzumab, fludarabine and cyclophosphamide based conditioning.** Bone Marrow Transplant. 2005;35:467-71.
46. Deeg HJ, O'Donnell M, Tolar J, Agarwal R, Harris RE, Feig SA, Territo MC, Collins RH, McSweeney PA, Copelan EA, Khan SP, Woolfrey A, Storer B. **Optimization of conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with aplastic anemia after failure of immunosuppressive therapy.** Blood. 2006;108:1485-91.
47. Bacigalupo A, Socie' G, Lanino E, Prete A, Locatelli F, Locasciulli A, Cesaro S, Shimoni A, Marsh J, Brune M, Van Lint MT, Oneto R, Passweg J. **Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA Working Party. Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** Haematologica. 2010;95:976-82.
48. Kennedy-Nasser AA, Leung KS, Mahajan A, Weiss HL, Arce JA, Gottschalk S, Carrum G, Khan SP, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Krance RA. **Comparable outcomes of matched-related and alternative donor stem cell transplantation for pediatric severe aplastic anemia.** Biol Blood Marrow Transplant. 2006;12:1277-84.
49. Passweg JR, Socié G, Hinterberger W, Bacigalupo A, Biggs JC, Camitta BM, Champlin RE, Gale RP, Gluckman E, Gordon-Smith EC, Hows JM, Klein JP, Nugent ML, Pasquini R, Rowlings PA, Speck B, Tichelli A, Zhang MJ, Horowitz MM, Bortin MM. **Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: has outcome improved?** Blood. 1997;90:858-64.
50. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E, Camitta BM, Champlin RE, Gale RP, Fuhrer M, Klein JP, Locasciulli A, Oneto R, Schattenberg AV, Socie G, Eapen M. **Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia.** Blood. 2007;110:1397-400.

51. Howard SC, Naidu PE, Hu XJ, Jeng MR, Rodriguez-Galindo C, Rieman MD, Wang WC. **Natural history of moderate aplastic anemia in children.** *Pediatr Blood Cancer.* 2004;43:545-51.
52. Wang S, Chen Y, Zou Y, Zheng Y, Zhu X. **The progression risk factors of children with transfusion-independent non-severe aplastic anemia.** *Int J Hematol.* 2013;97:210-5.
53. Führer M, Rampf U, Baumann I, Faldum A, Niemeyer C, Janka-Schaub G, Friedrich W, Ebell W, Borkhardt A, Bender-Goetze C. **Immunosuppressive therapy for aplastic anemia in children: a more severe disease predicts better survival.** *Blood.* 2005;106:2102-4.
54. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group.** *Haematologica.* 2011;96:814-9.
55. Osugi Y, Yagasaki H, Sako M, Kosaka Y, Taga T, Ito T, Yamamoto M, Ohara A, Sato T, Mimaya J, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Antithymocyte globulin and cyclosporine for treatment of 44 children with hepatitis associated aplastic anemia.** *Haematologica.* 2007;92:1687-90.
56. Locasciulli A, Bacigalupo A, Bruno B, Montante B, Marsh J, Tichelli A, Socié G, Passweg J; Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group (SAA-WP, EBMT). **Hepatitis-associated aplastic anaemia: epidemiology and treatment results obtained in Europe. A report of The EBMT aplastic anaemia working party.** *Br J Haematol.* 2010;149:890-5.
57. Ehrlich P. **Ueber einen Fall von Amie mit Bemerkungen uber regenerative Veränderungen des Knochenmarks.** *Charite-Annalen.* 1888;13:300-9.
58. Tichelli A, Socié G, Marsh J, Barge R, Frickhofen N, McCann S, Bacigalupo A, Hows J, Marin P, Nachbaur D, Symeonidis A, Passweg J, Schrezenmeier H; European Group for Blood and Marrow Transplantation Severe Aplastic Anaemia Working Party. **Outcome of pregnancy and disease course among women with aplastic anemia treated with immunosuppression.** *Ann Intern Med.* 2002;137:164-72.
59. Bacigalupo A, Brand R, Oneto R, Bruno B, Socié G, Passweg J, Locasciulli A, Van Lint MT, Tichelli A, McCann S, Marsh J, Ljungman P, Hows J, Marin P, Schrezenmeier H. **Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy--The European Group for Blood and Marrow Transplantation experience.** *Semin Hematol.* 2000;37:69-80.
60. Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H; German Aplastic Anemia Study Group. **Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia.** *Blood.* 2003;101:1236-42
61. Marsh J, Schrezenmeier H, Marin P, Ilhan O, Ljungman P, McCann S, Socie G, Tichelli A, Passweg J, Hows J, Raghavachar A, Locasciulli A, Bacigalupo A. **Prospective randomized multicenter study comparing cyclosporin alone versus the combination of antithymocyte globulin and cyclosporin for treatment of patients with nonsevere aplastic anemia: a report from the European Blood and Marrow Transplant (EBMT) Severe Aplastic Anaemia Working Party.** *Blood.* 1999;93:2191-5.

62. Jiang S, Wang Y, Shi W, Shao Y, Qiao X, Lin J, Kuang H, Xie X. **The benefit of ATG in immunosuppressive therapy of children with moderate aplastic anemia.** *Pediatr Hematol Oncol.* 2009;26:313-20.
63. Bacigalupo A, Bruno B, Saracco P, Di Bona E, Locasciulli A, Locatelli F, Gabbas A, Dufour C, Arcese W, Testi G, Broccia G, Carotenuto M, Coser P, Barbui T, Leoni P, Ferster A. **Antilymphocyte globulin, cyclosporine, prednisolone, and granulocyte colony-stimulating factor for severe aplastic anemia: an update of the GITMO/EBMT study on 100 patients.** *European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party on Severe Aplastic Anemia and the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo Osseo (GITMO).* *Blood.* 2000;95:1931-4.
64. Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O, Young NS. **Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome.** *JAMA.* 2003;289:1130-5.
65. Locasciulli A, Oneto R, Bacigalupo A, Socié G, Korthof E, Bekassy A, Schrezenmeier H, Passweg J, Führer M; Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group. **Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT).** *Haematologica.* 2007;92:11-8.
66. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. **Long-term outcome of pediatric patients with severe aplastic anemia treated with antithymocyte globulin and cyclosporine.** *J Pediatr.* 2008;153:814-9.
67. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. **Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia.** *Br J Haematol.* 2009;144:206-16.
68. Schrezenmeier H, Marin P, Raghavachar A, McCann S, Hows J, Gluckman E, Nissen C, van't Veer-Korthof ET, Ljungman P, Hinterberger W, et al. **Relapse of aplastic anaemia after immunosuppressive treatment: a report from the European Bone Marrow Transplantation Group SAA Working Party.** *Br J Haematol.* 1993;85:371-7.
69. Gupta V, Gordon-Smith EC, Cook G, Parker A, Duguid JK, Wilson KM, Yi QL, Marsh JC. **A third course of anti-thymocyte globulin in aplastic anaemia is only beneficial in previous responders.** *Br J Haematol.* 2005;129:110-7.
70. Tichelli A, Passweg J, Nissen C, Bargetzi M, Hoffmann T, Wodnar-Filipowicz A, Signer E, Speck B, Gratwohl A. **Repeated treatment with horse antilymphocyte globulin for severe aplastic anaemia.** *Br J Haematol.* 1998;100:393-400.
71. Scheinberg P, Nunez O, Young NS. **Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and ciclosporin for patients with relapsed or refractory severe aplastic anaemia.** *Br J Haematol.* 2006;133:622-7.
72. Di Bona E, Rodeghiero F, Bruno B, Gabbas A, Foa P, Locasciulli A, Rosanelli C, Camba L, Saracco P, Lippi A, Iori AP, Porta F, De Rossi G, Comotti B, Iacopino P, Dufour C, Bacigalupo A. **Rabbit antithymocyte globulin (r-ATG) plus cyclosporine and granulocyte colony stimulating factor is an effective treatment for aplastic anaemia patients unresponsive to a first course of intensive immunosuppressive therapy.** *Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO).* *Br J Haematol* 1999;107:330-4
73. Scheinberg P, Fischer SH, Li L, Nunez O, Wu CO, Sloand EM, Cohen JI, Young NS, John Barrett A. **Distinct EBV and CMV reactivation patterns following antibody-based**



- immunosuppressive regimens in patients with severe aplastic anemia.** *Blood.* 2007;109:3219-24.
74. Atta EH, Dias DS, Marra VL, de Azevedo AM. **Comparison between horse and rabbit antithymocyte globulin as first-line treatment for patients with severe aplastic anemia: a single-center retrospective study.** *Ann Hematol.* 2010;89:851-9.
75. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Biancotto A, Wu CO, Young NS. **Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia.** *N Engl J Med.* 2011;365:430-8.
76. Marsh JC, Bacigalupo A, Schrezenmeier H, Tichelli A, Risitano AM, Passweg JR, Killick SB, Warren AJ, Foukaneli T, Aljurf M, Al-Zahrani HA, Höchsmann B, Schafhausen P, Roth A, Franzke A, Brummendorf TH, Dufour C, Oneto R, Sedgwick P, Barrois A, Kordasti S, Elebute MO, Mufti GJ, Socie G. **European Blood and Marrow Transplant Group Severe Aplastic Anaemia Working Party. Prospective study of rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for aplastic anemia from the EBMT Severe Aplastic Anaemia Working Party.** *Blood.* 2012;119:5391-6.
77. Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, Young NS. **Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia.** *Blood.* 1995;85:3058-65.
78. Marsh J, Socie G, Tichelli A, Schrezenmeier H, Hochsmann B, Risitano AM, Fuehrer M, Bekassy AN, Korthof ET, Locasciulli A, Ljungman P, Bacigalupo A, Camitta B, Young NS, Passweg J; European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Severe Aplastic Anaemia Working Party. **Should irradiated blood products be given routinely to all patients with aplastic anaemia undergoing immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin (ATG)? A survey from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Severe Aplastic Anaemia Working Party.** *Br J Haematol.* 2010;150:377-9.
79. Dearden C, Foukaneli T, Lee P, Gordon-Smith EC, Marsh JC. **The incidence and significance of fevers during treatment with antithymocyte globulin for aplastic anaemia.** *Br J Haematol.* 1998;103:846-8.
80. Al-Ghazaly J, Al-Dubai W, Al-Jahafi AK, Abdullah M, Al-Hashdi A. **Cyclosporine monotherapy for severe aplastic anemia: a developing country experience.** *Ann Saudi Med.* 2005;25:375-9.
81. Passweg JR, Marsh JC. **Aplastic anemia: first-line treatment by immunosuppression and sibling marrow transplantation.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:36-42.
82. Saracco P, Quarello P, Iori AP, Zecca M, Longoni D, Svahn J, Varotto S, Del Vecchio GC, Dufour C, Ramenghi U, Bacigalupo A, Locasciulli A; Bone Marrow Failure Study Group of the AIEOP (Italian Association of Paediatric Haematology Oncology). **Cyclosporin A response and dependence in children with acquired aplastic anaemia: a multicentre retrospective study with long-term observation follow-up.** *Br J Haematol.* 2008;140:197-205.
83. Trompeter R, Fitzpatrick M, Hutchinson C, Johnston A. **Longitudinal evaluation of the pharmacokinetics of cyclosporin microemulsion (Neoral) in pediatric renal transplant recipients and assessment of C2 level as a marker for absorption.** *Pediatr Transplant.* 2003;7:282-8.

84. Levy GA. **C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation.** *BioDrugs.* 2001;15:279-90.
85. Sheil AG, Disney AP, Mathew TH, Livingston BE, Keogh AM. **Lymphoma incidence, cyclosporine, and the evolution and major impact of malignancy following organ transplantation.** *Transplant Proc.* 1997;29:825-7.
86. Ohara A, Kojima S, Hamajima N, Tsuchida M, Imashuku S, Ohta S, Sasaki H, Okamura J, Sugita K, Kigasawa H, Kiriya Y, Akatsuka J, Tsukimoto I. **Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia.** *Blood.* 1997;90:1009-13.
87. Kaito K, Kobayashi M, Katayama T, Masuoka H, Shimada T, Nishiwaki K, Sekita T, Otsubo H, Ogasawara Y, Hosoya T. **Long-term administration of G-CSF for aplastic anaemia is closely related to the early evolution of monosomy 7 MDS in adults.** *Br J Haematol.* 1998;103:297-303.
88. Marsh JC. **Hematopoietic growth factors in the pathogenesis and for the treatment of aplastic anemia.** *Semin Hematol.* 2000;37:81-90.
89. Socié G, Rosenfeld S, Frickhofen N, Gluckman E, Tichelli A. **Late clonal diseases of treated aplastic anemia.** *Semin Hematol.* 2000;37:91-101.
90. Socie G, Mary JY, Schrezenmeier H, Marsh J, Bacigalupo A, Locasciulli A, Fuehrer M, Bekassy A, Tichelli A, Passweg J. **Granulocyte-stimulating factor and severe aplastic anemia: a survey by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT).** *Blood.* 2007;109:2794-6.
91. Locasciulli A, Arcese W, Locatelli F, Di Bona E, Bacigalupo A; Italian Aplastic Anaemia Study Group. **Treatment of aplastic anaemia with granulocyte-colony stimulating factor and risk of malignancy. Italian Aplastic Anaemia Study Group.** *Lancet.* 2001;357:43-4.
92. Gluckman E, Rokicka-Milewska R, Hann I, Nikiforakis E, Tavakoli F, Cohen-Scali S, Bacigalupo A; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party for Severe Aplastic Anemia. **Results and follow-up of a phase III randomized study of recombinant human-granulocyte stimulating factor as support for immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anaemia.** *Br J Haematol.* 2002;119:1075-82.
93. Gurion R, Gafter-Gvili A, Paul M, Vidal L, Ben-Bassat I, Yeshurun M, Shpilberg O, Raanani P. **Hematopoietic growth factors in aplastic anemia patients treated with immunosuppressive therapy-systematic review and meta-analysis.** *Haematologica.* 2009;94:712-9.
94. Teramura M, Kimura A, Iwase S, Yonemura Y, Nakao S, Urabe A, Omine M, Mizoguchi H. **Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan.** *Blood.* 2007;110:1756-61.
95. Zheng Y, Liu Y, Chu Y. **Immunosuppressive therapy for acquired severe aplastic anemia (SAA): a prospective comparison of four different regimens.** *Exp Hematol.* 2006;34:826-31.
96. Kojima S, Hibi S, Kosaka Y, Yamamoto M, Tsuchida M, Mugishima H, Sugita K, Yabe H, Ohara A, Tsukimoto I. **Immunosuppressive therapy using antithymocyte globulin,**

- cyclosporine, and danazol with or without human granulocyte colony-stimulating factor in children with acquired aplastic anemia.** *Blood*. 2000;96:2049-54.
97. Shao Z, Chu Y, Zhang Y, Chen G, Zheng Y. **Treatment of severe aplastic anemia with an immunosuppressive agent plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin.** *Am J Hematol*. 1998;59:185-91.
  98. Gordon-Smith EC. **Bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia: cost/benefit of increased immunosuppression.** *Bone Marrow Transplant*. 1991;7 Suppl 2:103-5.
  99. Deyell RJ, Shereck EB, Milner RA, Schultz KR. **Immunosuppressive therapy without hematopoietic growth factor exposure in pediatric acquired aplastic anemia.** *Pediatr Hematol Oncol*. 2011;28:469-78.
  100. Tichelli A, Schrezenmeier H, Socié G, Marsh J, Bacigalupo A, Dührsen U, Franzke A, Hallek M, Thiel E, Wilhelm M, Höchsmann B, Barrois A, Champion K, Passweg JR. **A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin (ATG), cyclosporine, with or without G-CSF: a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** *Blood*. 2011;117:4434-41.
  101. Maciejewski JP, Risitano AM. **Aplastic anemia: management of adult patients.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:110-7.
  102. Scheinberg P, Nunez O, Wu C, Young NS. **Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil.** *Br J Haematol*. 2006;133:606-11.
  103. Abraham RT, Wiederrecht GJ. **Immunopharmacology of rapamycin.** *Annu Rev Immunol* 1996;14:483-510
  104. Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Chou TC, Stepkowski S. **Synergistic effect of the rapamycin-cyclosporine combination: median effect analysis of in vitro immune performances by human T lymphocytes in PHA, CD3, and MLR proliferative and cytotoxicity assays.** *Transplant Proc* 1991;23:1090-1.
  105. Stepkowski SM, Kahan BD. **Rapamycin and cyclosporine synergistically prolong heart and kidney allograft survival.** *Transplant Proc* 1991;23:3262-4.
  106. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Scheinberg P, Boss C, Sloand EM, Young NS. **Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study.** *Haematologica*. 2009;94:348-54.
  107. Brodsky RA, Petri M, Smith BD, Seifter EJ, Spivak JL, Styler M, Dang CV, Brodsky I, Jones RJ. **Immunoablative high-dose cyclophosphamide without stem-cell rescue for refractory, severe autoimmune disease.** *Ann Intern Med*. 1998;129:1031-5.
  108. Drachman DB, Jones RJ, Brodsky RA. **Treatment of refractory myasthenia: "rebooting" with highdose cyclophosphamide.** *Ann Neurol*. 2003;53:29-34.
  109. Brodsky RA, Sensenbrenner LL, Jones RJ. **Complete remission in severe aplastic anemia after high-dose cyclophosphamide without bone marrow transplantation.** *Blood*. 1996;87:491-4.

110. Tisdale JF, Dunn DE, Geller N, Plante M, Nunez O, Dunbar CE, Barrett AJ, Walsh TJ, Rosenfeld SJ, Young NS. **High-dose cyclophosphamide in severe aplastic anaemia: a randomised trial.** *Lancet.* 2000;356:1554-9.
111. Tisdale JF, Maciejewski JP, Nunez O, Rosenfeld SJ, Young NS. **Late complications following treatment for severe aplastic anemia (SAA) with high-dose cyclophosphamide (Cy): follow-up of a randomized trial.** *Blood* 2002;100:4668–4670.
112. Brodsky RA, Chen AR, Dorr D, Fuchs EJ, Huff CA, Luznik L, Smith BD, Matsui WH, Goodman SN, Ambinder RF, Jones RJ. **High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up.** *Blood.* 2010;115:2136-41.
113. Samarasinghe S, Webb DK. **How I manage aplastic anaemia in children.** *Br J Haematol.* 2012;157:26-40.
114. Bacigalupo A, Chaple M, Hows J, Van Lint MT, McCann S, Milligan D, Chessells J, Goldstone AH, Ottolander J, van't Veer ET, et al. **Treatment of aplastic anaemia (AA) with antilymphocyte globulin (ALG) and methylprednisolone (MPred) with or without androgens: a randomized trial from the EBMT SAA working party.** *Br J Haematol.* 1993;83:145-51.
115. Leleu X, Terriou L, Duhamel A, Moreau AS, Andrieux J, Dupire S, Coiteux V, Berthon C, Micol JB, Guieze R, Facon T, Bauters F. **Long-term outcome in acquired aplastic anemia treated with an intensified dose schedule of horse antilymphocyte globulin in combination with androgens.** *Ann Hematol.* 2006;85:711-6.
116. Mori H, Nakagawa M, Itoh N, Wada K, Tamaya T. **Danazol suppresses the production of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human monocytes.** *Am J Reprod Immunol.* 1990;24:45-50.
117. Chuhjo T, Yamazaki H, Omine M, Nakao S. **Danazol therapy for aplastic anemia refractory to immunosuppressive therapy.** *Am J Hematol.* 2008;83:387-9
118. Jaime-Pérez JC, Colunga-Pedraza PR, Gómez-Ramírez CD, Gutiérrez-Aguirre CH, Cantú-Rodríguez OG, Tarín-Arzaga LC, Gómez-Almaguer D. **Danazol as first-line therapy for aplastic anemia.** *Ann Hematol.* 2011;90:523-7.
119. Gómez-Almaguer D, Solano-Genesta M, Tarín-Arzaga L, Herrera-Garza JL, Cantú-Rodríguez OG, Gutiérrez-Aguirre CH, Jaime-Pérez JC. **Low-dose rituximab and alemtuzumab combination therapy for patients with steroid-refractory autoimmune cytopenias.** *Blood* 2010;116:4783-5.
120. de Masson A, Bouaziz JD, Peffault de Latour R, Benhamou Y, Moluçon-Chabrot C, Bay JO, Laquerrière A, Picquenot JM, Michonneau D, Leguy-Seguin V, Rybojad M, Bonnotte B, Jardin F, Lévesque H, Bagot M, Socié G. **Severe aplastic anemia associated with eosinophilic fasciitis: report of 4 cases and review of the literature.** *Medicine (Baltimore).* 2013;92:69-81.
121. Takamatsu H, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Saikawa Y, Yachie A, Koizumi S, Kojima S, Nakao S. **Aplastic anemia successfully treated with rituximab: the possible role of aplastic anemia-associated autoantibodies as a marker for response.** *Eur J Haematol.* 2011;86:541-5.
122. Hansen PB, Lauritzen AM. **Aplastic anemia successfully treated with rituximab.** *Am J Hematol.* 2005;80:292-4.

123. Castiglioni MG, Scatena P, Pandolfo C, Mechelli S, Bianchi M. **Rituximab therapy of severe aplastic anemia induced by fludarabine and cyclophosphamide in a patient affected by B-cell chronic lymphocytic leukemia.** *Leuk Lymphoma.* 2006;47:1985-6.
124. Gómez-Almaguer D, Jaime-Pérez JC, Ruiz-Arguelles GJ. **Antibodies in the treatment of aplastic anemia.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60:99-106.
125. Dumont FJ. **Alemtuzumab (Millennium/ILEX).** *Curr Opin Investig Drugs.* 2001;2:139-60.
126. CAMMS223 Trial Investigators, Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK. **Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis.** *N Engl J Med.* 2008;359:1786-801.
127. Willis F, Marsh JC, Bevan DH, Killick SB, Lucas G, Griffiths R, Ouwehand W, Hale G, Waldmann H, Gordon-Smith EC. **The effect of treatment with Campath-1H in patients with autoimmune cytopenias.** *Br J Haematol.* 2001;114:891-8.
128. Selleri C, Serio B, Risitano AM. **Novel immunosuppressive strategies for bone marrow failure syndromes: a focus on alemtuzumab.** *Mini Rev Med Chem.* 2011;11:536-43.
129. Elter T, Vehreschild JJ, Gribben J, Cornely OA, Engert A, Hallek M. **Management of infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with alemtuzumab.** *Ann Hematol.* 2009, 88:121-32.
130. Kim H, Min YJ, Baek JH, Shin SJ, Lee EH, Noh EK, Kim MY, Park JH. **A pilot dose-escalating study of alemtuzumab plus cyclosporine for patients with bone marrow failure syndrome.** *Leuk Res.* 2009;33:222-31.
131. Risitano AM, Selleri C, Serio B, Torelli GF, Kulagin A, Maury S, Halter J, Gupta V, Bacigalupo A, Sociè G, Tichelli A, Schrezenmeier H, Marsh J, Passweg J, Rotoli B; Working Party Severe Aplastic Anaemia (WPSAA) of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). **Alemtuzumab is safe and effective as immunosuppressive treatment for aplastic anaemia and single-lineage marrow failure: a pilot study and a survey from the EBMT WPSAA.** *Br J Haematol.* 2010;148:791-6.
132. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Wu CO, Young NS. **Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naive, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia.** *Blood.* 2012;119:345-54.
133. Risitano AM, Schrezenmeier H. **Alternative immunosuppression in patients failing immunosuppression with ATG who are not transplant candidates: Campath (Alemtuzumab).** *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:186-90.
134. Townsley DM, Desmond R, Dunbar CE, Young NS. **Pathophysiology and management of thrombocytopenia in bone marrow failure: possible clinical applications of TPO receptor agonists in aplastic anemia and myelodysplastic syndromes.** *Int J Hematol.* 2013;98:48-55.
135. Maciejewski JP, Sloand EM, Nunez O, Boss C, Young NS. **Recombinant humanized anti-IL-2 receptor antibody (daclizumab) produces responses in patients with moderate aplastic anemia.** *Blood.* 2003;102:3584-6.
136. Sloand EM, Olnes MJ, Weinstein B, Wu C, Maciejewski J, Scheinberg P, Young NS. **Long-term follow-up of patients with moderate aplastic anemia and pure red cell aplasia treated with daclizumab.** *Haematologica.* 2010;95:382-7.

137. Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Battilana N, Pistoia V. **Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia.** *Br J Haematol.* 2001;115:1023-31
138. Dufour C, Giacchino R, Ghezzi P, Tonelli R, Ferretti E, Pitto A, Pistoia V, Lanza T, Svahn J. **Etanercept as a salvage treatment for refractory aplastic anemia.** *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52:522-5.
139. Krueger GG. **Selective targeting of T cell subsets: focus on alefacept - a remittive therapy for psoriasis.** *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2:431-41.
140. Rosman Z, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. **Biologic therapy for autoimmune diseases: an update.** *BMC Med.* 2013;11:88.
141. Kojima S, Horibe K, Inaba J, Yoshimi A, Takahashi Y, Kudo K et al. **Long-term outcome of acquired aplastic anemia in children: comparison between immunosuppressive therapy and bone marrow transplantation.** *Br J Haematol* 2000;111:321–328.
142. Unal S, Cetin M, Tavit B, Caliskan N, Yetgin S, Uçkan D. **Favorable outcome with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric acquired aplastic anemia patients.** *Pediatr Transplant.* 2007;11:788-91.
143. Myers KC, Davies SM. **Hematopoietic stem cell transplantation for bone marrow failure syndromes in children.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:279-92.
144. Thomas ED, Rudolph RH, Fefer A et al. **Isogeneic marrow grafting in man.** *Exp Hematol* 1971;21:16-18
145. Thomas ED, Storb R, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Funk DD, Lerner KE. **Aplastic anaemia treated by marrow transplantation.** *Lancet.* 1972;1:284-9.
146. Storb R, Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, Johnson FL, Fefer A, Glucksberg H, Giblett ER, Lerner KG, Neiman P. **Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia.** *Blood.* 1974;43:157-80.
147. Storb R, Thomas ED. **Bone marrow transplantation in randomly bred animal species and in man** in: Schwarz MR (ed): *Proceedings of the Sixth Leucocyte Culture Conference.* New York, Academic Press, 1972, p 805.
148. Storb R, Thomas ED, Weiden PL, Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Fernando LP, Giblett ER, Goodell BW, Johnson FL, Lerner KG, Neiman PE, Sanders JE. **Aplastic anemia treated by allogeneic bone marrow transplantation: a report on 49 new cases from Seattle.** *Blood.* 1976;48:817-41.
149. UCLA Bone Marrow Transplant Team. **Bone-marrow transplantation in severe aplastic anaemia.** *Lancet.* 1976;2:921-3.
150. Van Bekkum DW, Bach F, Bergan JJ et al. **Bone marrow transplantation from donors with aplastic anemia. A report from the ACS/NIH bone marrow transplant registry.** *JAMA.* 1976;236:1131-5.
151. Elfenbein G, Kallman C, Braine H, Bias W, Tutschka P, Karp J, Burke P, Wharam M, Saral R, Kaizer H, Mellits E, Santos G. **Analysis of factors related to bone marrow graft rejection in aplastic anemia: usefulness of measures of broad alloimmunity as predictors.** *Transplant Proc.* 1981;13:1539-43.

152. Ramsay NK, Kim T, Nesbit ME, Krivit W, Coccia PF, Levitt SH, Woods WG, Kersey JH. **Total lymphoid irradiation and cyclophosphamide as preparation for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia.** Blood. 1980;55:344-6.
153. Feig SA, Champlin R, Arenson E, Yale C, Ho W, Tesler A, Gale RP. **Improved survival following bone marrow transplantation for aplastic anaemia.** Br J Haematol. 1983;54:509-17.
154. Bortin MM, Gale RP, Rimm AA. **Allogeneic bone marrow transplantation for 144 patients with severe aplastic anemia.** JAMA. 1981;245:1132-9.
155. Bacigalupo A, Giorgio FD, Congiu M et al. **Treatment of severe aplastic anemia in Europe 1970-1983. A report of the EBMT SAA working party.** Exp Hematol 1985;13:56 (suppl 17).
156. Storb R, Doney KC, Thomas ED, Appelbaum F, Buckner CD, Clift RA, Deeg HJ, Goodell BW, Hackman R, Hansen JA, Sanders J, Sullivan K, Weiden PL, Witherspoon RP. **Marrow transplantation with or without donor buffy coat cells for 65 transfused aplastic anemia patients.** Blood. 1982;59:236-46.
157. Storb R, Floersheim GL, Weiden PL, Graham TC, Kolb HJ, Lerner KG, Schroeder ML, Thomas ED. **Effect of prior blood transfusions on marrow grafts: abrogation of sensitization by procarbazine and antithymocyte serum.** J Immunol. 1974;112:1508-16.
158. Smith BR, Guinan EC, Parkman R, Ferrara J, Levey RH, Nathan DG, Rapoport JM. **Efficacy of a cyclophosphamide-procarbazine-antithymocyte serum regimen for prevention of graft rejection following bone marrow transplantation for transfused patients with aplastic anemia.** Transplantation. 1985;39:671-3.
159. Storb R, Thomas ED, Weiden PL, Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Fernando LP, Giblett ER, Goodell BW, Johnson FL, Lerner KG, Neiman PE, Sanders JE. **Aplastic anemia treated by allogeneic bone marrow transplantation: a report on 49 new cases from Seattle.** Blood. 1976;48:817-41.
160. Storb R, Weiden PL, Sullivan KM, Appelbaum FR, Beatty P, Buckner CD, Clift RA, Doney KC, Hansen J, Martin PJ, et al. **Second marrow transplants in patients with aplastic anemia rejecting the first graft: use of a conditioning regimen including cyclophosphamide and antithymocyte globulin.** Blood. 1987;70:116-21.
161. Storb R, Etzioni R, Anasetti C, Appelbaum FR, Buckner CD, Bensinger W, Bryant E, Clift R, Deeg HJ, Doney K, et al. **Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia.** Blood. 1994;84:941-9.
162. Storb R, Deeg HJ, Farewell V, Doney K, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Hansen J, et al. **Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease.** Blood. 1986;68:119-25.
163. Deeg HJ, Storb R, Weiden PL, Raff RF, Sale GE, Atkinson K, Graham TC, Thomas ED. **Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance.** Transplantation. 1982;34:30-5.
164. Deeg HJ, Storb R, Appelbaum FR, Kennedy MS, Graham TC, Thomas ED. **Combined immunosuppression with cyclosporine and methotrexate in dogs given bone marrow grafts from DLA-haploidentical littermates.** Transplantation. 1984;37:62-5.

165. Locatelli F, Bruno B, Zecca M, Van-Lint MT, McCann S, Arcese W, Dallorso S, Di Bartolomeo P, Fagioli F, Locasciulli A, Lawler M, Bacigalupo A. **Cyclosporin A and short-term methotrexate versus cyclosporin A as graft versus host disease pro-phylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling: results of a GITMO/EBMT randomized trial.** *Blood* 2000;96:1690–1697.
166. Zikos P, Van Lint MT, Frassoni F, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Mordini N, Berisso G, Bregante S, De Stefano F, Soracco M, Vitale V, Bacigalupo A. **Low transplant mortality in allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia: a randomized study of low-dose cyclosporin versus low-dose cyclosporin and low-dose methotrexate.** *Blood*. 1998;9:3503-8.
167. Storb R, Blume KG, O'Donnell MR, Chauncey T, Forman SJ, Deeg HJ, Hu WW, Appelbaum FR, Doney K, Flowers ME, Sanders J, Leisenring W. **Cyclophosphamide and antithymocyte globulin to condition patients with aplastic anemia for allogeneic marrow transplantations: the experience in four centers.** *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7:39-44.
168. Champlin RE, Perez WS, Passweg JR, Klein JP, Camitta BM, Gluckman E, Bredeson CN, Eapen M, Horowitz MM. **Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: a randomized controlled study of conditioning regimens.** *Blood*. 2007;109:4582-5.
169. Kojima S, Nakao S, Young N, Bacigalupo A, Gerard G, Hirano N, Maciejewski J, Deeg J, Marsh J, Zhang FK, Lee JW, Ozawa K. **The Third Consensus Conference on the treatment of aplastic anemia.** *Int J Hematol*. 2011;93:832-7.
170. Hamblin M, Marsh JC, Lawler M, McCann SR, Wickham N, Dunlop L, Ball S, Davies EG, Hale G, Waldmann H, Gordon-Smith EC. **Campath-1G in vivo confers a low incidence of graft-versus-host disease associated with a high incidence of mixed chimaerism after bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia using HLA-identical sibling donors.** *Bone Marrow Transplant*. 1996;17:819-24.
171. Gupta V, Ball SE, Yi QL, Sage D, McCann SR, Lawler M, Ortin M, Freires M, Hale G, Waldmann H, Gordon-Smith EC, Marsh JC. **Favorable effect on acute and chronic graft-versus-host disease with cyclophosphamide and in vivo anti-CD52 monoclonal antibodies for marrow transplantation from HLA-identical sibling donors for acquired aplastic anemia.** *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004;10:867-76.
172. Marsh JC, Gupta V, Lim Z, Ho AY, Ireland RM, Hayden J, Potter V, Koh MB, Islam MS, Russell N, Marks DI, Mufti GJ, Pagliuca A. **Alemtuzumab with fludarabine and cyclophosphamide reduces chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation for acquired aplastic anemia.** *Blood*. 2011;118:2351-7.
173. Konopacki J, Porcher R, Robin M, Bieri S, Cayuela JM, Larghero J, Xhaard A, Andreoli AL, Dhedin N, Petropoulou A, Rodriguez-Otero P, Ribaud P, Moins-Teisserenc H, Carmagnat M, Toubert A, Chalandon Y, Socie G, Peffault de Latour R. **Long-term follow up after allogeneic stem cell transplantation in patients with severe aplastic anemia after cyclophosphamide plus antithymocyte globulin conditioning.** *Haematologica*. 2012;97:710-6.
174. Griggs JJ, Mangu PB, Anderson H, Balaban EP, Dignam JJ, Hryniuk WM, Morrison VA, Pini TM, Runowicz CD, Rosner GL, Shayne M, Sparreboom A, Sucheston LE, Lyman GH; American Society of Clinical Oncology. **Appropriate chemotherapy dosing for obese**



- adult patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline.** J Clin Oncol. 2012;30:1553-61.
175. Devine 1974 citato in: Pai MP, Paloucek FP. **The origin of the "ideal" body weight equations.** Ann Pharmacother. 2000;34:1066-9.
  176. Bacigalupo A, Hows J, Gordon-Smith EC, Gluckman E, Van Lint MT, Congiu M, James DC, Barrett AJ, Gmur J, De Planque MM, et al. **Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia from donors other than HLA identical siblings: a report of the BMT Working Party.** Bone Marrow Transplant. 1988;3:531-5.
  177. Camitta B, Ash R, Menitove J, Murray K, Lawton C, Hunter J, Casper J. **Bone marrow transplantation for children with severe aplastic anemia: use of donors other than HLA-identical siblings.** Blood. 1989;74:1852-7.
  178. Casper JT, Truitt RR, Baxter-Lowe LA, Ash RC. **Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia in children.** Am J Pediatr Hematol Oncol 1990;12:434-448.
  179. Sanders JE, Storb R, Anasetti C, Deeg HJ, Doney K, Sullivan KM, Witherspoon RP, Hansen J. **Marrow transplant experience for children with severe aplastic anemia.** Am J Pediatr Hematol Oncol. 1994;16:43-9.
  180. Deeg HJ, Anasetti C, Petersdorf E, Storb R, Doney K, Hansen JA, Sanders J, Sullivan KM, Appelbaum FR. **Cyclophosphamide plus ATG conditioning is insufficient for sustained hematopoietic reconstitution in patients with severe aplastic anemia transplanted with marrow from HLA-A, B, DRB matched unrelated donors.** Blood. 1994;83:3417-8.
  181. Deeg HJ, Amylon ID, Harris RE, Collins R, Beatty PG, Feig S, Ramsay N, Territo M, Khan SP, Pamphilon D, Leis JF, Burdach S, Anasetti C, Hackman R, Storer B, Mueller B. **Marrow transplants from unrelated donors for patients with aplastic anemia: minimum effective dose of total body irradiation.** Biol Blood Marrow Transplant. 2001;7:208-15.
  182. Kojima S, Matsuyama T, Kato S, Kigasawa H, Kobayashi R, Kikuta A, Sakamaki H, Ikuta K, Tsuchida M, Hoshi Y, Morishima Y, Kodera Y. **Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program.** Blood. 2002;100:799-803.
  183. Bacigalupo A, Locatelli F, Lanino E, Marsh J, Socié G, Maury S, Prete A, Locasciulli A, Cesaro S, Passweg J; Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Fludarabine, cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin for alternative donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a report from the EBMT-SAA Working Party.** Bone Marrow Transplant. 2005;36:947-50.
  184. Khouri IF, Keating M, Körbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralto S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R. **Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies.** J Clin Oncol. 1998;16:2817-24.
  185. Pierga JY, Socie G, Gluckman E, Devergie A, Henry-Amar M, Bridier A, Girinsky T, Nguyen J, Cosset JM. **Secondary solid malignant tumors occurring after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia given thoraco-abdominal irradiation.** Radiother Oncol. 1994;30:55-8.

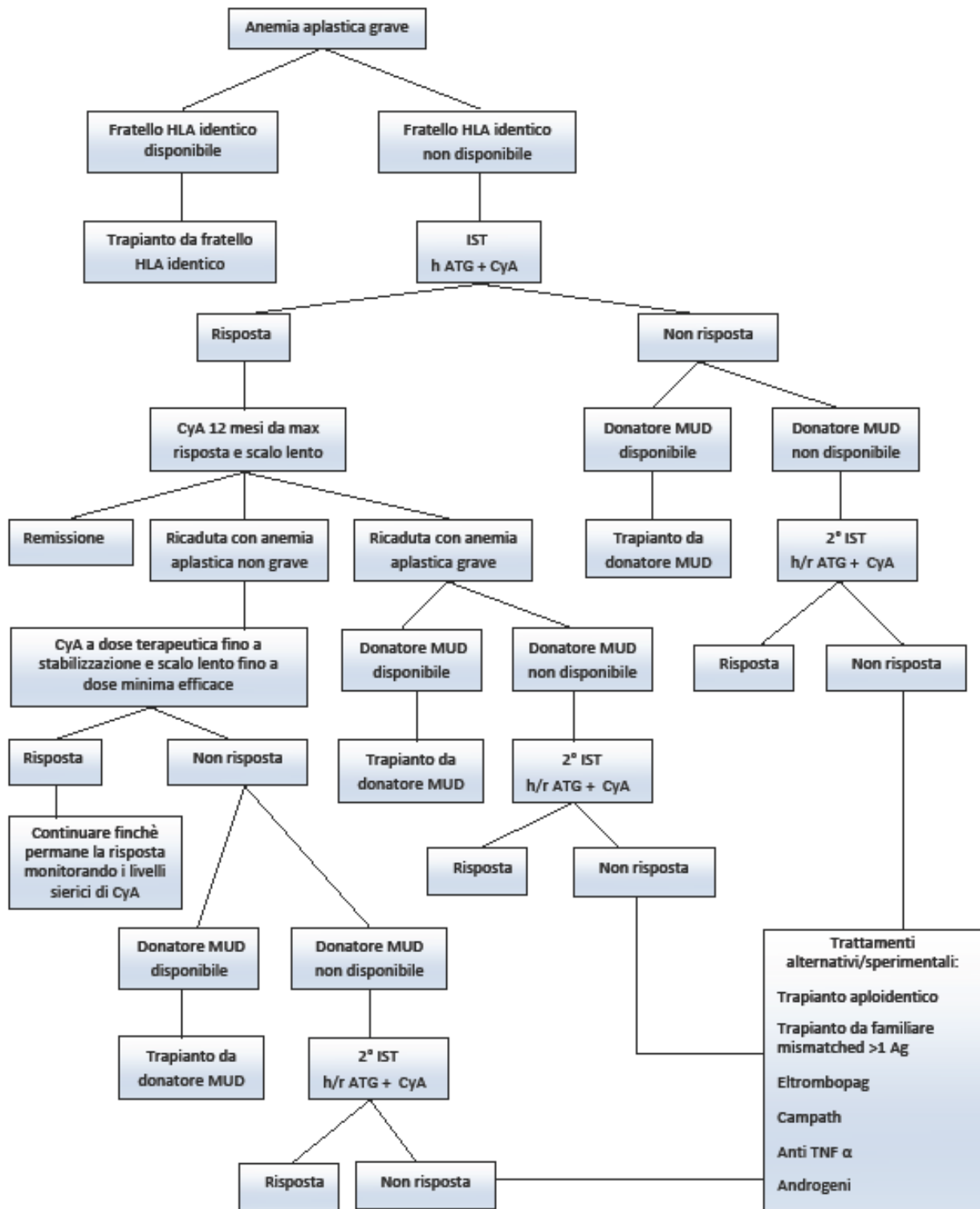
186. Tolar J, Deeg HJ, Arai S, Horwitz M, Antin JH, McCarty JM, Adams RH, Ewell M, Leifer ES, Gersten ID, Carter SL, Horowitz MM, Nakamura R, Pulsipher MA, Difronzo NL, Confer DL, Eapen M, Anderlini P. **Fludarabine-based conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in severe aplastic anemia: early results of a cyclophosphamide dose deescalation study show life-threatening adverse events at predefined cyclophosphamide dose levels.** Biol Blood Marrow Transplant. 2012;18:1007-11.
187. Kang HJ, Shin HY, Park JE, Chung NG, Cho B, Kim HK, Kim SY, Lee YH, Lim YT, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Im HJ, Seo JJ, Park SK, Ahn HS; Korean Society of Pediatric Hematology-Oncology. **Successful engraftment with fludarabine, cyclophosphamide, and thymoglobulin conditioning regimen in unrelated transplantation for severe aplastic anemia: A phase II prospective multicenter study.** Biol Blood Marrow Transplant. 2010;16:1582-8.
188. Samarasinghe S, Steward C, Hiwarkar P, Saif MA, Hough R, Webb D, Norton A, Lawson S, Qureshi A, Connor P, Carey P, Skinner R, Vora A, Pelidis M, Gibson B, Stewart G, Keogh S, Goulden N, Bonney D, Stubbs M, Amrolia P, Rao K, Meyer S, Wynn R, Veys P. **Excellent outcome of matched unrelated donor transplantation in paediatric aplastic anaemia following failure with immunosuppressive therapy: a United Kingdom multicentre retrospective experience.** Br J Haematol. 2012;157:339-46.
189. Peffault de Latour R, Rocha V, Socie G. **Cord blood transplantation in aplastic anemia.** Bone Marrow Transplant. 2013;48:201-202
190. Gormley NJ, Wilder J, Khuu H, et al. **Co-infusion of allogeneic cord blood with haploidentical CD34<sub>+</sub> cells improved transplant outcome for patients with severe aplastic anemia undergoing cord blood transplantation [abstract].** Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2011;118(21):654
191. Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson S, Haagenson M, Klein J, Flesch S, Vierra-Green C, Anasetti C. **The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure.** Blood. 2010;115:2704-8.
192. Ciceri F, Lupo-Stanghellini MT, Korthof ET. **Haploidentical transplantation in patients with acquired aplastic anemia.** Bone Marrow Transplant. 2013;48:183-185.
193. Dezern AE, Luznik L, Fuchs EJ, Jones RJ, Brodsky RA. **Post-transplantation cyclophosphamide for GVHD prophylaxis in severe aplastic anemia.** Bone Marrow Transplant. 2011;46:1012-1013.
194. Meletis J, Samarkos M, Mesogitis S, Meletis C, Mougiou A, Terpos E, Tsimberidou A, Andreopoulos A, Konstantopoulos K, Loukopoulos D. **Severe aplastic anaemia relapsing during a pregnancy; spontaneous remission following termination.** Haematologia (Budap). 1998;29:147-51.
195. Hendry CL, Sivakumaran M, Marsh JC, Gordon-Smith EC. **Relapse of severe aplastic anaemia after influenza immunization.** Br J Haematol. 2002;119:283-4.
196. Timeus F, Crescenzo N, Doria A, Foglia L, Linari A, Giaccone M, Pastore G, di Montezemolo LC, Ramenghi U, Saracco P. **Flow cytometric evaluation of circulating CD34<sup>+</sup> cell counts and apoptotic rate in children with acquired aplastic anemia and myelodysplasia.** Exp Hematol. 2005;33:597-604.

197. Kojima S, Ohara A, Tsuchida M, Kudoh T, Hanada R, Okimoto Y, Kaneko T, Takano T, Ikuta K, Tsukimoto I; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Risk factors for evolution of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after immunosuppressive therapy in children.** *Blood.* 2002;100:786-90.
198. Maciejewski JP, Risitano A, Sloand EM, Nunez O, Young NS. **Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia.** *Blood.* 2002;99:3129-35.
199. Dufour C. et al, **Outcome of Aplastic Anemia in adolescence. A survey of the severe aplastic anemia working party (SAAWP) of the European Blood and Bone Marrow Transplant Group (EBMT).** 55<sup>th</sup> ASH annual meeting and exposition (2013).
200. Pongtanakul B, Das PK, Charpentier K, Dror Y. **Outcome of children with aplastic anemia treated with immunosuppressive therapy.** *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:52-7.
201. Piccin A, McCann S, Socié G, Oneto R, Bacigalupo A, Locasciulli A, Marsh J, Schrezenmeier H, Tichelli A, Hand E, Lawler M, Passweg J; Aplastic Anaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Survival of patients with documented autologous recovery after SCT for severe aplastic anemia: a study by the WPSAA of the EBMT.** *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:1008-13.
202. Lawler M, McCann SR, Marsh JC, Ljungman P, Hows J, Vandenberghe E, O'Riordan J, Locasciulli A, Socié G, Kelly A, Schrezenmeier H, Marin P, Tichelli A, Passweg JR, Dickenson A, Ryan J, Bacigalupo A; Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group. **Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA.** *Br J Haematol.* 2009;144:933-45.
203. Hoelle W, Beck JF, Dueckers G, Kreyenberg H, Lang P, Gruhn B, Führer M, Niethammer D, Klingebiel T, Bader P. **Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia.** *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:219-23.
204. Ades L, Mary JY, Robin M, Ferry C, Porcher R, Esperou H, Ribaud P, Devergie A, Traineau R, Gluckman E, Socié G. **Long-term outcome after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia.** *Blood.* 2004;103:2490-7.
205. Sanders JE, Woolfrey AE, Carpenter PA, Storer BE, Hoffmeister PA, Deeg HJ, Flowers ME, Storb RF. **Late effects among pediatric patients followed for nearly 4 decades after transplantation for severe aplastic anemia.** *Blood.* 2011;118:1421-8.
206. Heddle NM, Arnold DM, Boye D, Weibert KE, Resz I, Dumont LJ. **Comparing the efficacy and safety of apheresis and whole blood-derived platelet transfusions: a systematic review.** *Transfusion.* 200;48:1447-58.
207. Shehata N, Tinmouth A, Naglie G, Freedman J, Wilson K. **ABO-identical versus nonidentical platelet transfusion: a systematic review.** *Transfusion.* 2009;49:2442-53.
208. Quillen K, Wong E, Scheinberg P, Young NS, Walsh TJ, Wu CO, Leitman SF. **Granulocyte transfusions in severe aplastic anemia: an eleven-year experience.** *Haematologica* 2009;94:1661-8.

209. Killick SB, Win N, Marsh JC, Kaye T, Yandle A, Humphries C, Knowles SM, Gordon-Smith EC. **Pilot study of HLA alloimmunization after transfusion with pre-storage leucodepleted blood products in aplastic anaemia.** *Br J Haematol.* 1997;97:677-84.
210. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. **Leukocyte Reduction and Ultraviolet B Irradiation of Platelets to Prevent Alloimmunization and Refractoriness to Platelet Transfusions.** *N Engl J Med.* 1997;337:1861-9.
211. Vamvakas EC. **Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of white cell reduction in preventing HLA-alloimmunization and refractoriness to random-donor platelet transfusions.** *Transf Med Rev.* 1998;12:258-70.
212. **Serious Hazards of Transfusion (SHOT) Annual Report 2006.** Website: [www.shotuk.org](http://www.shotuk.org).
213. Vamvakas EC. **Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis.** *Transfus Med Rev.* 2005;19:181-99.
214. Treleaven J, Gennery A, Marsh J, Norfolk D, Page L, Parker A, Saran F, Thurston J, Webb D. **Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force.** *Br J Haematol.* 2011;152:35-51.
215. Schrezenmeier H., Bacigalupo A., Aglietta M, Camitta B, Frickhofen N, Fuhrer M, Gluckam E, Gratwohl A, Heimpel H, Hows J, Kojima S, Locasciulli A, Marmont A, Marin P, Marsh J, McCann S, Passweg J, Pasquini R, Podesta M, Socie G, Storb R, Tichelli A, Torok-Storb B, Wodnat-Filipovicz A, Young N. **Consensus document for treating aplastic anaemia. Consensus document of a group of international experts.** In: *Aplastic Anaemia, Pathophysiology and Treatment* (ed. by H. Schrezenmeier & A. Bacigalupo) 2000, pp. 308–318. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
216. Lee JW, Yoon SS, Shen ZX, Ganser A, Hsu HC, Habr D, Domokos G, Roubert B, Porter JB; EPIC study investigators. **Iron chelation therapy with deferasirox in patients with aplastic anemia: a subgroup analysis of 116 patients from the EPIC trial.** *Blood.* 2010;116:2448-54.
217. Gernsheimer T, James AH, Stasi R. **How I treat thrombocytopenia in pregnancy.** *Blood.* 2013;121:38-47.
218. Cullen M, Baijal S. **Prevention of febrile neutropenia: use of prophylactic antibiotics.** *Br J Cancer.* 2009;101 Suppl 1:S11-4.
219. Robenshtok E, Gafter-Gvili A, Goldberg E, Weinberger M, Yeshurun M, Leibovici L, Paul M. **Antifungal prophylaxis in cancer patients after chemotherapy or hematopoietic stem-cell transplantation: systematic review and meta-analysis.** *J Clin Oncol.* 2007;25:5471-89.
220. Quarello P, Saracco P, Giacchino M, Caselli D, Caviglia I, Longoni D, Varotto S, Rana I, Amendola A, Misuraca A, Licciardello M, Paolucci P, Ladogana S, Rivetti E, Dufour C, Castagnola E. **Epidemiology of infections in children with acquired aplastic anaemia: a retrospective multicenter study in Italy.** *Eur J Haematol.* 2012;88:526-34.
221. Lehrnbecher T, Phillips R, Alexander S, Alvaro F, Carlesse F, Fisher B, Hakim H, Santolaya M, Castagnola E, Davis BL, Dupuis LL, Gibson F, Groll AH, Gaur A, Gupta A, Kebudi R, Petrilli S, Steinbach WJ, Villarreal M, Zaoutis T, Sung L; International Pediatric Fever and Neutropenia Guideline Panel. **Guideline for the management of fever and neutropenia**

- in children with cancer and/or undergoing hematopoietic stem-cell transplantation.** J Clin Oncol. 2012;30:4427-38.
222. Valdez JM, Scheinberg P, Young NS, Walsh TJ. **Infections in patients with aplastic anemia.** Semin Hematol. 2009;46:269-76.
223. Dezern AE, Brodsky RA. **Clinical management of aplastic anemia.** Expert Rev Hematol. 2011;4:221-30.
224. Girmenia C, Micozzi A, Gentile G, Santilli S, Arleo E, Cardarelli L, Capria S, Minotti C, Cartoni C, Brocchieri S, Guerrisi V, Meloni G, Foà R, Martino P. **Clinically driven diagnostic antifungal approach in neutropenic patients: a prospective feasibility study.** J Clin Oncol. 2010;28:667-74.

# APPENDICE 1. Algoritmo Terapeutico



## APPENDICE 2. Sintesi della IST

### Schema di Trattamento

#### TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA DI PRIMA LINEA

- **ATG di cavallo\*** (ATGAM): 40 mg/Kg/die e.v. (tramite CVC) in 500 ml di NaCl 0.9% in 12 h per 4gg
- **MPD:** 2 mg/Kg/die e.v. 30' prima del siero antilinfocitario per i primi 5 giorni, indi progressiva riduzione sino a sospensione al giorno +28
- **CsA:** 5 mg/Kg/die per os in due somministrazioni per almeno 12 mesi dal conseguimento di una risposta completa. Il trattamento va avviato in concomitanza o al termine della somministrazione di ATG. Aggiustamenti della dose giornaliera possono essere necessari al fine di mantenere i livelli ematici pre-dose fra 100-250 ng/ml. Ridurre la dose del 25-50% in presenza di effetti collaterali (ipertensione, aumento della creatinina sierica). Un tapering lento e graduale (0.25-0.5 mg/kg per mese pari al 5-10% della dose) va avviato dopo 12 mesi dalla risposta ematologica completa sino ad arrivare alla sospensione in non meno di 24 mesi .
- **G-CSF:** 5 µg/kg s.c. o ev, giorni 1-30. Modulazione della dose: dimezzare la dose se neutrofili  $\geq 5000/\text{mmc}$ , dimezzare ulteriormente o somministrare a giorni alterni se dopo una settimana persiste una conta di neutrofili  $\geq 5.000/\text{mmc}$ .

\*Qualora l'ATG di cavallo non fosse disponibile e fosse necessario utilizzare (con le limitazioni di cui sopra) l'**ATG di coniglio** (Thymoglobuline), la dose è la seguente: 3,5 mg/Kg/die e.v. (tramite CVC) in NaCl al 0.9% in 12 ore per 5 giorni.

#### TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA DI SECONDA LINEA

- **ATG di coniglio (Thymoglobulinei):** 3,5 mg/Kg/die e.v. (tramite CVC) in NaCl al 0.9% in 12 ore per 5 giorni.
- **MPD:** 2 mg/Kg/die e.v. 30' prima del siero antilinfocitario per i primi 5 giorni, indi progressiva riduzione sino a sospensione al giorno +28.
- **CsA:** 5 mg/Kg/die per os in due somministrazioni per almeno 12 mesi dal conseguimento di una risposta completa. Il trattamento va avviato in concomitanza o al termine della somministrazione di ATG. Aggiustamenti della dose giornaliera possono essere necessari al fine di mantenere i livelli ematici pre-dose fra 100-250 ng/ml. Ridurre la dose del 25-50% in presenza di effetti collaterali (ipertensione, aumento della creatinina sierica etc.). Un tapering lento e graduale (0.25-0.5 mg/kg per mese pari al 5-10% della dose) va avviato dopo 12 mesi dalla risposta ematologica completa sino ad arrivare alla sospensione in non meno di 24 mesi.

### APPENDICE 3. Sintesi dei controlli in corso di IST

1. **Emocromo con formula e conta reticolocitaria** mensilmente durante lo scalo della CsA. Ogni 1-2 mesi per i primi 6 mesi dopo la fine della ciclosporina. Ogni 2-3 mesi per i successivi 2 anni e mezzo (si arriva così, in caso di risposta stabile, a 5 anni dall'inizio ed a tre anni dalla fine dell'IST). Se la risposta si mantiene stabile, ogni 3-6 mesi per i successivi 2 anni (si arriva così a 5 anni dalla fine dell'IST). Raggiunti i 5 anni di follow-up dalla fine dell'IST, una volta all'anno.
2. **Aspirato midollare con citogenetica associato a BOM** a +120 giorni, aspirato midollare a 12 mesi e almeno una volta all'anno per cinque anni dopo aver ottenuto una risposta stabile; dopo i primi cinque anni l'intervallo può essere prolungato se l'emocromo, controllato annualmente, è stabile.
3. **Monitoraggio dei cloni PNH**, tramite test citofluorimetrico, e valutazione degli indici di emolisi ogni tre-sei mesi durante IST, ogni anno dopo sospensione della IST.
4. **Ciclosporinemia** basale o dopo due ore dall'assunzione: periodicamente, con controlli più frequenti soprattutto durante la somministrazione a dose piena (> 2 mg/kg/die).
5. **Glicemia, test di funzionalità renale ed epatica, controllo della pressione arteriosa** ad ogni controllo dopo terapia con ATG, mensilmente allo scalo della ciclosporina ed al bisogno.
6. **EBV-PCR, CMV-PCR** ogni mese per sei mesi dopo la somministrazione di ATG indi al bisogno.
7. **Virus trasmissibili (HIV, HBV, HCV)** periodicamente nei pazienti trasfusione-dipendenti.
8. **Protidogramma, dosaggio immunoglobuline sieriche, sottopopolazioni linfocitarie** ogni sei mesi ed al bisogno.



## APPENDICE 4. Nota AIFA del 31.12.2013

PQ/OTB/MD

AIFA/PQ/ P/136767



Roma, 31 DIC 2013

Alla Pfizer Italia S.r.l.  
Via Valbondione, 113  
Fax 06 33182238

Agli Assessorati alla Sanità presso  
le Regioni e le Province Autonome  
LORO SEDI

**OGGETTO: Autorizzazione all'importazione del medicinale "ATGAM (SIERO ANTILINFOCITARIO DI CAVALLO) STERILE SOLUTION 50MG/ML"**

Si trasmette in copia la determinazione AIFA prot. n.1219 del 31/12/2013, con la quale la Pfizer Italia S.r.l. è stata autorizzata ad importare il medicinale in oggetto.

Al fini del monitoraggio della distribuzione del medicinale, la Pfizer Italia S.r.l. e gli Assessorati alla Sanità dovranno trasmettere ad AIFA, su CD-rom e in formato Excel come da facsimile allegato, i dati riepilogativi delle confezioni del medicinale rispettivamente fornite e acquistate, come indicato nella Determinazione.

Si invita a darne massima diffusione alle strutture interessate

Il Dirigente

Mod.040/12 - Trasmissione autorizzazione azienda per importazione - Rev1 Data 08/03/13

Si richiama l'attenzione alla sezione del portale AIFA relativa alle carenze dei medicinali, nella quale sono fornite le informazioni relative ai medicinali carenti ed a quelli revocati a partire dal 1 gennaio 2008. Tale sezione è consultabile all'indirizzo: [www.agenziafarmaco.gov.it](http://www.agenziafarmaco.gov.it), seguendo il seguente percorso: homepage/Services AIFA/Carenze dei medicinali. NB: Il fax dell'Ufficio Qualità dei Prodotti è 06 59784313



*Agenzia Italiana del Farmaco*

**AIFA**

**AUTORIZZAZIONE ALL'IMPORTAZIONE DEL MEDICINALE:  
ATGAM (SIERO ANTILINFOCITARIO DI CAVALLO) STERILE SOLUTION 50MG/ML**

**IL DIRETTORE GENERALE**

**Visti** gli articoli 8 e 9 del D.L.vo 30 luglio 1999, n. 300 e s.m.i.;

**Visto** l'art. 48 del D.L. 30 settembre 2003, n. 269, convertito nella Legge 24 novembre 2003, n. 326, con il quale è stata istituita l'Agenzia Italiana del Farmaco – di seguito "AIFA";

**Visto** il D.L.vo 30 marzo 2001, n. 165 e s.m.i.

**Visto** il Regolamento di organizzazione, di amministrazione e dell'ordinamento del personale dell'AIFA pubblicato sulla G.U. n. 254 del 31 ottobre 2009 con il quale è stato istituito l'Ufficio Qualità dei Prodotti;

**Visto** il Decreto del Ministro della Salute dell'8 novembre 2011, registrato dall'Ufficio Centrale del Bilancio al Registro "Visti Semplici", Foglio n. 1282, in data 14 novembre 2011, con cui è stato nominato Direttore Generale dell'AIFA il Prof. Luca Pani, a decorrere dal 16 novembre del 2011;

**Visto** il R.D. 27 luglio 1934, n. 1265, recante il Testo Unico delle leggi sanitarie;

**Visto** il D.M. 11 febbraio 1997, concernente modalità di importazione di specialità registrate all'estero e s.m. i. , fatto salvo dall'art. 158, comma 6, del D.L.vo 24 aprile 2006, n. 219 e s.m.i.;

**Visto** il Decreto del Ministro della Salute dell'11 maggio 2001;

**Visto** il D.L.vo 24 aprile 2006, n. 219 e s.m.i.;

**Visto** il D.M. 12 aprile 2012, concernente *Disposizioni sull'importazione ed esportazione del sangue umano e dei suoi prodotti*;

---

**CONSIDERATO** che il medicinale è stato approvato dalla Food & Drugs Administration (USA)- National Drug Code (N.D.C.) 0009-7224-02.

**Tenuto conto** dei gravi motivi di necessità per i quali deve essere garantita la disponibilità, a tutela della salute pubblica, del medicinale **ATGAM (siero antilinfocitario di cavallo) Sterile solution 50mg/ml**, non autorizzato né commercializzato in Italia, non essendo disponibili valide alternative terapeutiche nel normale circuito distributivo;

**Visto** che il medicinale **ATGAM (siero antilinfocitario di cavallo) Sterile solution 50mg/ml** è stato incluso nell'elenco dei farmaci erogabili a totale carico del S.S.N. ai sensi della legge 648/96 per il trattamento dell'aplasia midollare acquisita, anche denominata anemia aplastica, dopo fallimento di trattamento con siero antilinfocitario di coniglio (Thymoglobuline®). G.U. n° 276 del 26.11.2011 e G.U. 07/12/2012 n. 286 (proroga)

**Vista** l'istanza presentata dalla **Pfizer Italia S.r.l.**, prot. AIFA 130690 del 11/12/2013, con la quale è stata richiesta alla scrivente Agenzia l'autorizzazione ad importare dal proprio sito di produzione, sito in **USA**, le confezioni del medicinale **ATGAM (siero antilinfocitario di cavallo) Sterile solution 50mg/ml** in confezionamento **inglese** (in lingua **inglese**), ai fini della fornitura alle strutture sanitarie che ne facciano richiesta;

adotta la seguente

#### **DETERMINAZIONE**

la **Pfizer Italia S.r.l.** è autorizzata ad importare il medicinale:

**ATGAM (siero antilinfocitario di cavallo) Sterile solution 50mg/ml**

n. 85 confezioni; n. lotto **G45674** con scadenza Agosto 2015

n. 100 confezioni; n. lotto **G76396** con scadenza Novembre 2015

in confezionamento **inglese** (in lingua **inglese**)

Prodotto da: **Pharmacia & Upjohn Company-7000 Portage Road, Kalamazoo, Michigan 49001 USA**. La **Pfizer Italia S.r.l.** dovrà far pervenire almeno un foglietto illustrativo in lingua italiana a ciascuna struttura ricevente il farmaco. Il medicinale deve essere preparato secondo quanto previsto dalla Farmacopea Europea presso la suddetta officina regolarmente autorizzata alla produzione in conformità alle Norme di Buona Fabbricazione. Il medicinale dovrà essere fornito alle strutture sanitarie ed ospedaliere richiedenti, al prezzo ex-factory (IVA esclusa), di €

---

2.250,00 (G.U. 07/12/2012 n. 286). Tale prezzo potrà subire delle variazioni trattandosi di un medicinale importato direttamente dagli USA.

Il trasporto deve essere effettuato nel rispetto delle norme di conservazione dei medicinali.

Il medicinale potrà essere depositato in Italia unicamente presso il seguente magazzino:

**UPS Healthcare Italia S.r.l., Via Formellese km 4.300, 00060 Formello (Roma).**

L'autorizzazione all'importazione viene rilasciata a condizione che siano soddisfatti i requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia analoghi a quelli dei medicinali registrati in Italia.

La richiesta da parte delle strutture sanitarie, dovrà essere elaborata da parte del personale sanitario in servizio presso le strutture stesse, sulla base del modulo allegato alla presente determinazione, che ne costituisce parte integrante, e trasmessa direttamente alla **Pfizer Italia S.r.l.** Le Strutture Sanitarie e i Servizi Farmaceutici delle Aziende Sanitarie Locali che hanno richiesto la fornitura dovranno verificare la corrispondenza del lotto autorizzato.

Ai sensi dell'art. 5 del D.M. del 11 maggio 2001, agli Assessorati alla Sanità presso le Regioni e le Province Autonome è consentita, fino a diverse indicazioni in tal senso, "temporanea autorizzazione" ad acquistare, per il tramite delle Strutture Sanitarie e dei Servizi di Farmacia Territoriale che ne necessitano, il medicinale **ATGAM (siero antilinfocitario di cavallo) Sterile solution 50mg/ml** in confezionamento inglese (in lingua inglese), importato dalla **Pfizer Italia S.r.l.**, allo scopo di assicurare la prosecuzione dei programmi di trattamento a beneficio dei propri pazienti. Ai fini del monitoraggio della distribuzione del medicinale, la **Pfizer Italia S.r.l.** e gli Assessorati alla Sanità dovranno trasmettere ad AIFA, su CD-rom in formato Excel, come da fac-simile allegato. I dati dovranno essere trasmessi entro i 30 giorni successivi al compimento dei termini indicati.

La presente autorizzazione all'importazione, che consente la fornitura del prodotto importato, ha validità di mesi **SEI**, rinnovabili, e potrà essere revocata in qualsiasi momento per motivazioni, circostanze e fattori diversi dagli attuali, che potrebbero determinarsi per variazioni dello stato di carenza o che potrebbero risultare in contrasto con gli interessi della collettività e la tutela della salute pubblica.

Roma, 31/12/2013

**Il Direttore Generale**

*(Luca Pani)*

