

# Iper eosinofilia e sindromi ipereosinofile

Giovanni Rolla, Monica Fornero



Parole chiave: Eosinofilia, DRESS, sindrome ipereosinofila, polmonite eosinofila, gastroenterite eosinofila, strongiloidiasi, aspergillosi broncopolmonare allergica, mepolizumab

---

## Abstract

L'eosinofilia è motivo frequente di consulto medico, sia quando rappresenti un dato laboratoristico isolato, sia quando accompagni manifestazioni patologiche. Il significato clinico dell'eosinofilia è quanto mai variabile, dipendendo dalla sua entità e dalle eventuali concomitanti manifestazioni cliniche. Il percorso diagnostico dell'eosinofilia muove da una anamnesi accurata e strutturata, per articolarsi in indagini volte da una parte a definire eventuali patologie associate e dall'altra parte a valutare il danno d'organo prodotto dall'eosinofilia stessa. La review fornisce informazioni utili a guidare l'approccio clinico all'eosinofilia, suggerendo un percorso diagnostico-terapeutico che tiene conto delle più recenti acquisizioni sul tema.

L'eosinofilia periferica è frequente motivo di consulto medico, sia quando sia riscontrata occasionalmente in corso di accertamenti aspecifici, sia quando si presenti associata a patologie d'organo e/o sistemiche. Questa review si propone di fornire uno schema di approccio clinico e laboratoristico al paziente con ipereosinofilia, in accordo con le recenti raccomandazioni della letteratura internazionale.

## 1. Definizione di ipereosinofilia

Il limite superiore del range di normalità della con-

ta degli eosinofili nel sangue periferico è pari a un valore assoluto di 500 cellule/mm<sup>3</sup>. Un aumento dei valori degli eosinofili tra 600-1500 cellule/mm<sup>3</sup> viene classificato come lieve, tra 1500-5000 cellule/mm<sup>3</sup> moderato e al di sopra di 5000 cellule/mm<sup>3</sup> grave.

L'eosinofilia periferica può essere transitoria, episodica o persistente.

Nei pazienti in cui si riscontra un'eosinofilia persistente, l'infiltrazione tissutale e la produzione di molecole effettrici da parte degli eosinofili può risolversi in patologie clinicamente rilevanti con danno d'organo, talora irreversibile. Per contro, alcuni pazienti con pari ipereosinofilia persistente non sviluppano nessuna di-

Allergologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino e A.O. Ordine Mauriziano, Torino

giovanni.rolla@unito.it

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

sfunzione d'organo documentabile. In questi pazienti la storia naturale e la prognosi rimangono incerti ed è quindi opportuno che essi vengano regolarmente seguiti nel tempo.

Diverse patologie infettive, allergiche o neoplastiche possono essere associate a eosinofilia circolante e/o tissutale, di gravità molto variabile, che va dalla eosinofilia asintomatica, al danno d'organo, all'ipereosinofilia pericolosa per la vita.

La definizione di ipereosinofilia (HE) dovrebbe essere applicata qualora si riscontrino più di 1500/mm<sup>3</sup> eosinofili nel sangue periferico nel corso di due accertamenti intervallati da almeno 1 mese (escluse quelle condizioni cliniche che richiedano un intervento terapeutico immediato) e/o ipereosinofilia tissutale definita dai seguenti criteri:

1. percentuale di eosinofili > 20% di tutte le cellule nucleate in una sezione di midollo osseo e/o
2. estesa infiltrazione eosinofila del tessuto (secondo il referto istopatologico) e/o
3. una marcata deposizione extracellulare di proteine dei granuli eosinofili (come la proteina basica maggiore) nei tessuti analizzati, segno di un'importante e persistente attivazione eosinofila locale.

L'eosinofilia tissutale non è necessariamente sempre accompagnata da eosinofilia periferica, come bene esemplificato dalla polmonite eosinofila acuta, dalla cistite interstiziale eosinofila o dalla NARES (rinite eosinofila non allergica).

La valutazione completa del paziente consente di classificare l'ipereosinofilia (HE) in diversi cluster:

- HE secondaria o reattiva (HE<sub>R</sub>);
- HE ereditaria (HE<sub>FA</sub>);
- HE neoplastica (HE<sub>N</sub>);
- HE di incerto significato (HE<sub>US</sub>).

### 1.1. HE<sub>R</sub>

Classifica pazienti in cui l'ipereosinofilia è chiaramente reattiva a un processo infiammatorio, neoplastico o ad altra condizione/patologia collegabile a un aumento della conta eosinofila. È importante sottolineare che l'ipereosinofilia reattiva non deriva mai da espansione clonale degli eosinofili.

#### 1.1.1. Parassiti elmintici

L'eosinofilia è una manifestazione comune delle malattie parassitarie. Le infezioni parassitarie che determinano la comparsa di eosinofilia sono quelle sostenute dai parassiti pluricellulari, come gli elminti, che scatenano, attraverso la stimolazione di risposte Th2-like, una pro-

duzione di IL-4 e IL-5 che stimolano la differenziazione eosinofila delle cellule mieloidi. Contrariamente, le infezioni provocate da parassiti unicellulari non sono accompagnate da eosinofilia, a eccezione di due protozoi: *Dientamoeba fragilis* e *Isospora belli*.

Il livello di eosinofilia è solitamente proporzionale al grado di invasione dei tessuti da parte delle larve degli elminti o delle loro forme adulte. La migrazione delle larve o delle forme più mature nei tessuti è maggiore nelle fasi iniziali dell'infezione, periodo in cui l'entità dell'eosinofilia raggiunge i livelli maggiori.

A questo proposito, nelle infezioni croniche, l'infiltrazione tissutale eosinofila è limitata ai tessuti circostanti gli elminti, senza eosinofilia ematica significativa. L'eosinofilia può infatti mancare nelle infezioni elmintiche ben contenute all'interno dei tessuti (ad es., le cisti intatte di echinococco) o limitate al lume del tratto gastrointestinale (ad es., infezioni da tenie e da ascariidi, dopo la migrazione polmonare).

Tra gli elminti, i principali parassiti che devono essere considerati nei casi di grave ipereosinofilia sono lo *Strongyloides stercoralis*, l'*Anchilostoma* e la *Toxocara canis*, ma l'epidemiologia è alquanto varia a seconda dell'area geografica (Tab. I).

L'infezione da *Strongyloides stercoralis* è particolarmente importante da escludere, specie nei casi di grave ipereosinofilia, perché può evolvere in una diffusa e spesso fatale malattia (la sindrome da iperinfestazione) nei pazienti trattati con glucocorticosteroidi.

Nei bambini, per la loro propensione a mettere le dita in bocca, dopo aver toccato terreni frequentati da animali, è importante escludere l'infezione da *Ascaride* del cane o da *Toxocara canis*, anche mediante test sierologico ELISA.

È ancora dibattuto il trattamento ottimale dei pazienti con eosinofilia e sospetta parassitosi. Alcuni studi, partendo dalla osservazione che circa il 50% dei pazienti con infezione da elminti altamente probabile non riceve una diagnosi, nonostante test diagnostici esaustivi, suggeriscono di effettuare empiricamente una terapia antielmintica (più spesso l'albendazolo), valutandone l'effetto sull'eosinofilia.

#### 1.1.1.2. Infezioni da funghi

Due malattie fungine possono essere associate a eosinofilia. L'aspergillosi è accompagnata da eosinofilia caratteristicamente nella forma dell'aspergillosi broncopulmonare allergica (ABPA, vedi in seguito), mai nella forma invasiva, tipica dell'immunodepresso. La coccidioidomicosi si accompagna spesso a

**Tab. 1.** Le principali situazioni cliniche suggestive di una parassitosi intestinale (non tutte accompagnate da ipereosinofilia, vedi testo).

Situazione clinica	Parassiti
<p><b>Viaggiatori di ritorno da una zona tropicale</b> Dissenteria Diarrea cronica</p> <p>Malessere generale con sintomi dispeptici</p> <p>Quadro dispeptico</p>	<p>Amebiasi Giardiasi, amebiasi, strongiloidiasi, criptosporidiosi, distomatosi intestinali Ascaridiasi, anchilostomiasi, strongiloidiasi, trichinellosi, toxocariasi Giardiasi, ascaridiasi, anchilostomiasi, teniasi</p>
<p><b>Migranti</b> Dispepsia, diarrea, epatopatia, HE</p>	<p>Tutti i parassiti, più comunemente lo Strongyloides e lo Schistosoma.</p>
<p><b>Non evidenza di soggiorno in clima tropicale</b> Diarrea e deficit immunitario</p> <p>Sintomatologia generale severa e disturbi dispeptici in pazienti immunodepressi Sindrome pseudo occlusiva o pseudo ulcerosa Bambini</p>	<p>Giardiasi, criptosporidiosi, microsporidiosi, isosporiasi Trichinellosi, toxocariasi</p> <p>Anisakiasi</p> <p>Ossiuriasi, giardiasi</p>

ipereosinofilia, potendo causare anche una meningite eosinofila.

#### 1.1.1.3. HIV e infezioni retrovirali

L'eosinofilia, di solito modesta, può accompagnare talora l'infezione da HIV per diversi motivi: in modo spurio nei casi di leucopenia, dove ad aumentare è in realtà solo la percentuale di eosinofili rispetto al conteggio dei leucociti; per effetto di terapie granulocito-stimolanti, come GM-CSF; per effetto di reazioni avverse a farmaci, particolarmente antibiotici e sulfametossazolo (Bactrim). L'eosinofilia può associarsi inoltre alle infezioni da HTLV-1 e HTLV-2.

#### 1.1.2. Malattie allergiche associate a eosinofilia

Le patologie allergiche IgE-mediate, come la rinite e l'asma allergiche e alcune forme di dermatite atopica sono sostenute da una flogosi guidata da linfociti Th2, caratterizzati dalla produzione delle citochine IL-4 e IL-5, particolarmente importanti nel promuovere la differenziazione, la sopravvivenza e l'infiltrazione tessutale degli eosinofili. Generalmente nell'oculorinite e nell'asma allergiche, l'eosinofilia periferica è lieve (< 1500 cellule/mm<sup>3</sup>). Nei pazienti asmatici con maggiore eosinofilia (> 1500 cell/mm<sup>3</sup>) è necessario considerare altre patologie concomitanti, come l'ABPA o la sindrome di Churg-Strauss. L'ABPA è caratterizzata da asma non controllato, eosinofilia, netto aumento delle IgE totali, positività del prick-test per

Aspergillo e/o presenza di IgE specifiche per Aspergillo, presenza delle IgG (precipitine) specifiche per Aspergillo, infiltrati polmonari espressione di atelettasie secondarie a ostruzione bronchiale legata a tappi di muco, formazione di bronchiectasie dei grossi bronchi. La sindrome di Churg Strauss è una vasculite dei vasi di piccolo-medio calibro associata, nel 50% dei casi, alla presenza degli anticorpi anti citoplasma dei neutrofili (ANCA), più spesso del tipo perinucleare (p-ANCA), con presenza dell'anticorpo anti mieloperoxidasi (MPO). I criteri diagnostici della sindrome di Churg-Strauss prevedono, oltre all'eosinofilia, solitamente grave, l'asma, la rinosinusite, infiltrati polmonari legati a polmonite eosinofila e/o capillarite emorragica, polineuropatia ed evidenza di vasculite con infiltrazione eosinofila tessutale.

#### 1.1.3. Eosinofilia indotta da farmaci

È probabilmente la causa più comune di eosinofilia secondaria. I farmaci più frequentemente coinvolti sono l'aspirina, i sulfamidici, la nitrofurantoina, le penicilline e le cefalosporine.

L'eosinofilia si può sviluppare senza altre manifestazioni (ad es. in assenza di eruzioni cutanee o febbre), oppure può essere associata a quadri clinico-patologici che coinvolgono un singolo organo (ad es. nefrite interstiziale eosinofila da beta-lattamine, infiltrato polmonare semplice, il primo caso anche senza eosinofilia periferica, ma con eosinofilia) o più organi, in modo drammatico, come nel caso della DRESS (sin-

drome ipereosinofila con manifestazioni sistemiche correlata a farmaci, particolarmente gli anticonvulsivanti e l'allopurinolo).

#### 1.1.4. *Malattie immuno-reumatologiche*

L'eosinofilia può raramente accompagnare alcune malattie immunoreumatologiche, come la dermatomiosite, l'artrite reumatoide grave, la sclerosi sistemica progressiva, o la sindrome di Sjögren complicata da polimiosite e vasculite.

#### 1.1.5. *HE paraneoplastica*

Nel contesto di patologia neoplastica l'ipereosinofilia è un fenomeno reattivo alla liberazione di citochine eosinofiloipietiche rilasciate da cellule non mieloidi in maniera non regolata. Il 15% circa di pazienti con linfoma di Hodgkin e il 5% circa dei pazienti con linfoma non-Hodgkin presentano una lieve eosinofilia periferica. Nella sindrome di Sézary, dovuta a un linfoma T con manifestazione eritrodermica, l'ipereosinofilia e l'aumentata produzione di IgE sono dovute alla produzione di alti livelli di citochine Th2 (IL-5, IL-4). Anche alcuni tumori solidi possono essere associati a eosinofilia paraneoplastica; tra questi il carcinoma a cellule transizionali della vescica, l'adenocarcinoma dello stomaco, del colon e dell'utero, il carcinoma polmonare a grandi cellule e il carcinoma timico.

#### 1.1.6. *Miscellanea*

L'insufficiente sintesi di glucocorticoidi endogeni nell'insufficienza surrenalica da qualsiasi causa (morbo di Addison, emorragia surrenalica o secondaria a ipopituitarismo) si accompagna a eosinofilia, generalmente lieve. I glucocorticoidi, infatti, riducono il numero degli eosinofili stimolandone l'apoptosi. L'irritazione delle sierose può indurre eosinofilia, come nei casi di sindrome di Dressler, di eosinofilia cronica associata alla dialisi peritoneale e di eosinofilia secondaria a radioterapia. Una eosinofilia periferica, generalmente lieve, è infine riscontrabile anche nel corso di malattie infiammatorie croniche quali, ad esempio, le malattie infiammatorie intestinali.

#### 1.2. *HE<sub>FA</sub>*

Sono noti alcuni casi di ipereosinofilia a trasmissione autosomica dominante e in una famiglia il gene è stato mappato sul cromosoma 5q31-33. L'eosinofilia è presente alla nascita e nella maggior parte dei membri familiari affetti rimane asintomatica, sebbene sia stata segnalata, in alcuni soggetti, la progressione a fibrosi miocardica fatale.

#### 1.3. *HE<sub>N</sub>*

La variante mieloproliferativa delle sindromi ipereosinofile (vedi in seguito) costituisce una patologia chiaramente definita, caratterizzata da splenomegalia, incremento dei livelli sierici di vitamina B<sub>12</sub>, infiltrazione midollare eosinofila ed è considerata una patologia clonale eosinofila all'interno delle malattie mieloproliferative croniche.

La classificazione WHO del 2008 ha distinto quali forme a se stanti le neoplasie mieloidi caratterizzate da specifici riarrangiamenti genici:

- riarrangiamento del PDGFRA, gene che codifica la tirosina chinasi attivata dal recettore  $\alpha$  del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR $\alpha$ );
- riarrangiamento del PDGFRB, gene che codifica la tirosina chinasi attivata dal recettore  $\beta$  del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR $\beta$ );
- riarrangiamento del FGFR1, gene che codifica il recettore del fattore di crescita dei fibroblasti<sup>1</sup>.

I riarrangiamenti che coinvolgono i geni PDGFR $\alpha$  e  $\beta$  portano alla formazione di proteine con attività tirosin-chinasica che determinano un'attivazione costitutiva di vie di segnalazione intracellulare (tra cui la via di MAP chinasi, fosfatidilinositolo trifosfato e PKC $\gamma$ ) che sostengono la proliferazione cellulare.

L'aberrazione cromosomica meglio caratterizzata e più frequentemente osservata è una delezione sul cromosoma 4q12 con conseguente fusione di due geni: Fip1-like1 (FIP1L1) e PDGFRA; la prevalenza della fusione cromosomica FIP1L1-PDGFR $\alpha$  tra i pazienti che soddisfano i criteri HE<sub>N</sub> è stimata tra il 10 e il 14%.

Per ragioni ancora sconosciute, la maggior parte dei pazienti risulta di sesso maschile e il picco d'incidenza della malattia viene raggiunto verso la quarta decade. La complicanza più temuta è la fibrosi endomiocardica, con conseguente cardiomiopatia restrittiva. In alcuni di questi pazienti il disordine mieloproliferativo può evolvere in leucemia mieloide acuta o in leucemia linfoblastica.

La classificazione WHO del 2008 include inoltre, tra le neoplasie mieloproliferative, la leucemia eosinofila cronica (CEL-NOS), i criteri diagnostici della quale sono elencati di seguito:

1. eosinofilia periferica > 1500/mm<sup>3</sup>;
2. non evidenza del gene di fusione BCR-ABL (cromosoma Philadelphia) o di altra neoplasia mieloproliferativa (policitemia vera, trombocitemia essenziale, mielofibrosi, mastocitosi sistemica);
3. non evidenza del gene di fusione FIP1L1-PDGFR $\alpha$  o altro riarrangiamento che includa PDGFRA ed

esclusione del riarrangiamento di PDGFRB e di FGFR1;

- valore di mieloblasti nel sangue periferico e a livello del midollo osseo inferiore al 20% e assenza inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22) o altre caratteristiche diagnostiche della Leucemia mieloide acuta;
- riscontro di un valore di mieloblasti > 2% nel sangue periferico e > 5% nel midollo osseo.

### 1.3.1. L-HE

La variante linfocitaria clonale della HE è caratterizzata clinicamente da una predominanza di coinvolgimento della cute e dei tessuti molli. In questa variante, sono state identificate nel sangue periferico popolazioni di cellule T anomale, che producono IL-5. Il fenotipo delle cellule T più frequentemente riportato nelle L-HE è CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>.

### 1.4. HE<sub>US</sub>

Si riferisce a pazienti che presentano un'ipereosinofilia persistente e inspiegabile, che non si accompagna ad alcuna sintomatologia. Per questi pazienti la prognosi rimane incerta e risulta così appropriato definirli con la denominazione di ipereosinofilia di incerto significato, *HE of uncertain significance*. Questi pazienti soddisfano infatti i criteri per definire una HE, ma non hanno sintomi o dati di laboratorio che rivelino una patologia ereditaria, una risposta infiammatoria reattiva, una sottostante patologia immunologica o una neoplasia e non mostrano inoltre alcuna evidenza di danno d'organo eosinofilo-mediato. È importante sottolineare che questa condizione può perdurare anche per anni, in assenza di terapia, e che non sempre evolve verso una HES o verso una malattia ematologica o immunoreumatologica.

## 2. HES – sindrome ipereosinofila

Il termine *sindrome ipereosinofila* è stato coniato nel 1968 per definire vari quadri clinici, tutti caratterizzati da un incremento degli eosinofili circolanti e dai danni correlati all'infiltrazione tissutale eosinofila. Oggi si definisce sindrome ipereosinofila (HES) qualsiasi ipereosinofilia, riconducibile alle definizioni precedenti, che presenti la chiara evidenza di danno o disfunzione d'organo eosinofilo-mediata. La sindrome è classificata come HES<sub>FA</sub>, HES<sub>N</sub> o HES<sub>R</sub> a seconda dell'eziologia, rispettivamente familiare, neoplastica e

reattiva. Nel non raro caso (fino al 75%) di eziologia non accertata, la HES è definita idiopatica.

Nel caso si riscontri un danno e/o disfunzione interessante un singolo organo (ad es., polmonite, gastroenterite), la sindrome si classifica come HES associata al coinvolgimento di un singolo organo, o *eosinophil-associated single-organ disease*.

### 2.1. Epidemiologia

L'incidenza e la prevalenza della sindrome ipereosinofila non è nota con sicurezza, con una stima dell'incidenza intorno a 0.036 per 100.000 persone/anno. Sebbene la HES sia più frequentemente diagnosticata a un'età media compresa tra i 20 e i 50 anni, l'HES idiopatica o la HES<sub>N</sub> in particolare possono comparire a ogni età, inclusa quella pediatrica, sebbene questi ultimi casi siano decisamente infrequenti.

Alcune varianti di HES (quelle PDGFRA associate) si verificano quasi esclusivamente nei maschi, mentre le altre sembrano distribuirsi equamente tra i generi.

### 2.2. Caratteristiche cliniche

I pazienti possono presentare varie combinazioni di sintomi e di segni di danno d'organo mediato dagli eosinofili. In molti pazienti l'insorgenza dei sintomi è insidiosa e l'eosinofilia viene rilevata incidentalmente. Talora, per contro, le manifestazioni iniziali possono essere anche gravi e pericolose per la vita a causa della rapida evoluzione delle complicanze cardiache e/o neurologiche.

Le manifestazioni cliniche possono essere sia aspecifiche (tosse, sudorazione notturna, astenia, inappetenza, perdita di peso) che direttamente correlate all'organo e/o agli organi colpito/i.

Nel 1994 uno studio sulle manifestazioni cliniche dei pazienti con recente diagnosi di HES riportava che il 100% dei pazienti aveva manifestazioni ematologiche (per definizione), il 58% manifestazioni cardiovascolari, il 56% cutanee, il 54% neurologiche, il 49% polmonari, il 43% spleniche, il 30% epatiche, il 23% oculari e il 23% gastrointestinali (Fauci, 1982).

Nel 2009 uno studio multicentrico retrospettivo su 188 pazienti ha confermato le stesse percentuali di interessamento d'organo, a parte che per il coinvolgimento cardiovascolare, rilevato in questo studio solamente nel 5% dei pazienti (Ogbogu, 2009).

#### 2.2.1. Manifestazioni cardiache

La miocardite eosinofila è una causa importante di morbilità e mortalità nei pazienti con HES, soprattutto

in quelli che presentano la mutazione del gene PDG-FRA. Il coinvolgimento cardiaco nei pazienti con HES è imprevedibile, tanto più che la sua gravità non è chiaramente correlata con il grado di eosinofilia periferica. Alcuni pazienti con eosinofilia anche grave, ad esempio, non sviluppano mai un danno cardiaco. Il danno cardiaco nella HES avviene in tre fasi: una fase acuta necrotizzante, una fase intermedia caratterizzata dalla formazione di trombi a livello dell'endocardio danneggiato, e una terza fase fibrotica. I pazienti diventano più spesso sintomatici durante la fase trombotica e fibrotica. I sintomi più comuni includono dispnea, dolore toracico, segni di insufficienza ventricolare sinistra e/o destra, insufficienza valvolare mitralica, aortica o tricuspide, cardiomegalia e inversione dell'onda T all'elettrocardiogramma. L'aumento dei livelli di troponina correla con la presenza della cardiomiopatia e può essere considerato un indicatore di interessamento miocardico già nelle prime fasi di infiltrazione e infiammazione eosinofila del cuore.

### 2.2.2. Manifestazioni neurologiche

La HES può essere complicata da tromboembolie cerebrali, da encefalopatia, da neuropatia periferica o dalla trombosi dei seni venosi della dura madre.

La neuropatia periferica è la manifestazione neurologica più comune e rappresenta più della metà delle manifestazioni neurologiche dei pazienti con HES. La neuropatia può essere simmetrica o asimmetrica, può coinvolgere i nervi motori isolatamente o assieme ai nervi sensitivi, e può manifestarsi come mono-neurite multipla o come radicolopatia e atrofia muscolare.

La fisiopatologia della neuropatia periferica nei pazienti con HES rimane in gran parte inspiegata. Le biopsie dei nervi interessati in genere mostrano una neuropatia assonale con vari gradi di perdita assonale, ma senza evidenza di vasculite o di infiltrazione eosinofila.

Le tromboembolie cerebrali possono derivare da trombi intracardiaci e si manifestano come ictus embolico o come episodi ischemici transitori.

L'encefalopatia, probabilmente dovuta a occlusione microvascolare, si può presentare con alterazioni del comportamento, confusione, atassia e perdita di memoria. I pazienti affetti possono avere anche sintomi compatibili con lesioni dei motoneuroni superiori, quali l'aumento del tono muscolare, l'accentuazione dei riflessi tendinei profondi e il segno di Babinski.

### 2.2.3 Manifestazioni oculari

I sintomi oculari, in particolare l'offuscamento della vista, possono essere collegati a microemboli o a una trombosi locale.

### 2.2.4 Manifestazioni cutanee

Le manifestazioni cutanee più comuni nella HES sono l'eczema (che spesso coinvolge le mani o le zone di flessione), l'eritrodermia, la lichenificazione, il dermatografismo, l'orticaria ricorrente e l'angioedema. Le biopsie delle lesioni papulari o nodulari mostrano una infiltrazione perivascolare eosinofila associata a neutrofilia perivascolare lieve-moderata e a infiltrati di cellule mononucleate, ma senza segni di vasculite. Meno frequentemente si sviluppano ulcere della mucosa orale, nasale, faringea, esofagea o genitale, spesso difficili da trattare. La biopsia di queste ulcere dimostra la presenza di un infiltrato cellulare misto, senza eosinofilia, vasculite, o microtrombi.

### 2.2.5 Manifestazioni polmonari

Il coinvolgimento polmonare è comune nelle HES e può derivare da un'infiltrazione eosinofila del tessuto polmonare con conseguente fibrosi, insufficienza cardiaca o embolia polmonare. In uno studio retrospettivo su 49 pazienti, i sintomi respiratori sono stati riportati nel 63% dei pazienti con HES. I sintomi più comuni alla presentazione erano dispnea (45%), tosse (39%) e sibili (24%). Nel 43% dei pazienti sono state osservate alterazioni radiologiche (Dulohery, 2011).

### 2.2.6 Manifestazioni gastrointestinali

La gastrite eosinofila, l'enterite e/o la colite possono verificarsi in corso di HES e possono causare perdita di peso, dolori addominali, vomito e/o diarrea grave. Il coinvolgimento epatico può assumere la forma di epatite cronica attiva, di lesioni focali epatiche, di colangite eosinofila, o di sindrome di Budd-Chiari.

---

## 3. HES associata a coinvolgimento di singolo organo

I pazienti con sindrome ipereosinofila associata a coinvolgimento di singolo organo, definita da alcuni Autori come *HES overlap*, presentano spesso eosinofilia periferica  $\geq 1500/\text{mm}^3$  e il coinvolgimento flogistico eosinofilo di un singolo organo. Le sindromi ipereosinofile organo-specifiche caratteristicamente non si estendono oltre i tipici organi bersaglio, a differenza delle altre forme di HES, che tipicamente coinvolgono

molteplici organi. Inoltre, le eosinofilie organo-specifiche non causano danno cardiaco. Di seguito sono brevemente descritte alcune delle più frequenti HES organo specifiche.

### 3.1. Polmonite eosinofila

Sono riconosciute due forme di polmonite eosinofila idiopatica.

La polmonite eosinofila semplice (infiltrato polmonare di Loeffler) è caratterizzata dalla fugace comparsa di addensamenti polmonari (durata di 5-10 giorni, in assenza di terapia). La causa più comune è una reazione a farmaci, soprattutto FANS e antimicrobici. La prognosi è ottima. Il problema clinico può essere quello della diagnosi differenziale con le cause infettive degli addensamenti polmonari. La polmonite eosinofila acuta, per contro, che si manifesta con febbre, infiltrati polmonari e insufficienza respiratoria acuta, non rientra nelle HES, in quanto l'eosinofilia è solo tessutale. Questa forma di eosinofilia polmonare è diagnosticabile solo ricercando gli eosinofili nel liquido di lavaggio broncoalveolare o nella biopsia polmonare.

La polmonite eosinofila cronica è caratterizzata dalla comparsa di dispnea, tosse e febbre nell'arco di tempo che va da tre settimane a diversi mesi e dalla presenza di un marcato accumulo di eosinofili a livello polmonare. Raramente, la polmonite eosinofila cronica precede la sindrome di Churg-Strauss. L'eosinofilia periferica è presente nel 90% dei casi. Questa malattia, a eziologia sconosciuta, è sensibile ai corticosteroidi, raramente si risolve spontaneamente e spesso recidiva. Il lavaggio broncoalveolare è un'ulteriore conferma della diagnosi e spesso mostra una eosinofilia superiore al 25%.

### 3.2. Gastroenteriti eosinofile

I segni e i sintomi della gastroenterite eosinofila sono correlati al grado e al tipo di coinvolgimento della parete intestinale da parte dell'infiltrazione eosinofila.

La gastroenterite **mucosa** è la varietà più comune e si presenta con caratteristiche di malassorbimento e di enteropatia protido-disperdente. I sintomi più comuni sono il dolore addominale, la nausea, il vomito, la diarrea e la perdita di peso. Si possono anche riscontrare ritardo di crescita e anemia.

La gastroenterite può inoltre essere caratterizzata da interessamento flogistico eosinofilo coinvolgente prevalentemente lo strato **muscolare** del tratto gastrointestinale. L'infiammazione ha come risultato l'ispessi-

mento e la rigidità intestinale, con sintomi di ostruzione intestinale quali nausea, vomito e distensione addominale. Sono stati registrati anche alcuni casi di insorgenza con quadro clinico di addome acuto. La gastroenterite con interessamento prevalente della **sottosierosa** si presenta invece con ascite eosinofila isolata oppure associato con i sintomi caratteristici del coinvolgimento mucosale o muscolare. La colite eosinofila isolata non si accompagna a ipereosinofilia periferica.

L'esofagite eosinofila non è considerata tra le HES organo specifiche in quanto l'eosinofilia ematica è lieve o assente.

---

### 4. Sindromi specifiche accompagnate da HE

L'eosinofilia può accompagnare alcune sindromi di immunodeficienza primaria, tra le quali la sindrome iper-IgE, caratterizzata da deformità scheletriche, eczema e infezioni cutanee e polmoniti necrotizzanti da Stafilococco; la sindrome di Omenn, caratterizzata da grave immunodeficienza combinata, eritrodermia, linfadenomegalia, epatosplenomegalia ed espansione di un clone T linfocitario produttore di IL-5 e IL-4, che bene spiega l'eosinofilia e l'aumento delle IgE totali; la sindrome di Gleich, che consiste in ipereosinofilia ciclica (circa mensile) con imponente edema generalizzato e la vasculite di Churg Strauss, già precedentemente citata.

---

### 5. Approccio diagnostico

Un paziente che presenta eosinofilia  $> 1500/\text{mm}^3$  deve essere sottoposto con metodo ad accertamenti riguardanti da un lato l'eziologia dell'ipereosinofilia e dall'altro l'eventuale presenza di danno a carico di organi/apparati, che, laddove esista, conduce alla diagnosi di sindrome ipereosinofila. L'algoritmo diagnostico inizia con il considerare le cause che più comunemente sono responsabili dell'ipereosinofilia.

#### 5.1. Diagnosi di HE<sub>r</sub>

Prima di tutto vanno considerate le cause di ipereosinofilia reattiva mediante:

- anamnesi e/o studio della documentazione in possesso del paziente di condizioni patologiche tipicamente associate con HE, come la rinosinuitis/asma, ricercandone le complicanze che si as-

sociano a HE moderata/grave, come l'ABPA e la sindrome di Churg Strauss;

- anamnesi farmacologica, ricercando la correlazione cronologica tra l'assunzione del farmaco e l'insorgenza dell'HE, associata o meno ad altre manifestazioni sistemiche. I farmaci non essenziali dovrebbero essere sospesi;
- anamnesi di viaggi, recenti o meno recenti, in luoghi dove le infestazioni parassitarie associate a HE siano endemiche. La ricerca ripetuta (almeno 3 volte) di uova e parassiti nelle feci e la ricerca anticorpale mediante ELISA per parassiti specifici (es. Strongyloides) è imprescindibile per identificare eventuali infestazioni;
- evidenza di patologie che possono essere responsabili di HE reattiva, come linfomi, neoplasie solide e malattie infiammatorie intestinali.

### 5.2. Diagnosi di HE<sub>N</sub>

Escluse le cause di HE secondaria, il processo diagnostico deve considerare le neoplasie ematologiche. L'analisi dello striscio di sangue periferico può fornire indizi (anemia, cellule displastiche, blasti), come è di aiuto il riscontro di elevati livelli di triptasi e/o di vitamina B12, nel sospettare una mielodiplosia/neoplasia mieloide, che dovrà trovare conferma nella biopsia osteo-midollare. L'analisi morfologica, citogenetica e immunofenotipica di campioni di midollo osseo definirà la diagnosi differenziale, in accordo con la classificazione WHO, delle svariate mielodiplosie/neoplasie mieloidi associate a HE. Esempi sono la mastocitosi sistemica, la leucemia mieloide cronica, la leucemia mieloide acuta, la sindrome mielodisplastica, la leucemia mielomonocitica cronica.

La valutazione della presenza di eosinofilia clonale, HE<sub>N</sub>, dovrebbe iniziare con lo screening della presenza sul sangue periferico del gene di fusione FIP1L1-PDGFR $\alpha$  tramite RT-PCR o FISH durante l'interfase/metafase.

Le sonde FISH che legano la regione compresa tra i geni FIP1L1 e PDGFR $\alpha$  sono usate per evidenziare la presenza della delezione di una regione che fisiologicamente contiene il gene CHIC2, dimostrando così la fusione FIP1L1-PDGFR $\alpha$ . Il test è dunque clinicamente riconosciuto come "FISH per la delezione di CHIC2". Se lo screening sul sangue periferico per la mutazione FIP1L1/PDGFR $\alpha$  risulta negativo, il passo successivo è quello di effettuare la biopsia ossea, per poter effettuare gli studi di citogenetica per la ricerca di muta-

zioni e di riarrangiamenti dei geni PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  o FGFR1 compatibili con eosinofilia clonale.

Un risultato negativo per la ricerca di ri-arrangiamenti coinvolgenti i geni descritti, porta a prendere in considerazione la diagnosi di CEL-NOS, *chronic eosinophilic leukemia – non otherwise specified*, qualora ci sia l'evidenza citogenetica e/o morfologica della presenza di una neoplasia mieloide eosinofila non classificabile diversamente.

### 5.3. Diagnosi di L-HE

La variante linfocitaria, o L-HE, è caratterizzata dalla presenza di una popolazione di cellule T anormali; l'anormalia viene dimostrata tramite immunofenotipizzazione delle cellule T del sangue periferico e/o tramite lo studio dei riarrangiamenti dei geni che codificano per la catena gamma del recettore delle cellule T (TCR-gamma). La popolazione linfocitaria anomala produrrebbe elevati livelli di citochine eosinofilo-pietiche (es. IL-5). L'immunofenotipo di questi linfociti è variabile e include popolazioni doppio-negative, cellule T immature (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), doppio-positivo (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) o l'assenza del CD3 (CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>). Il clone di cellule T inoltre presenta spesso un immunofenotipo attivato, con espressione del CD5 e/o dell'HLA-DR.

Non vi è accordo sui criteri minimi per la diagnosi di L-HE. Attualmente si ritiene che il ritrovamento isolato di una clonalità delle cellule T mediante PCR del TCR-gamma, in assenza di anomalie immunofenotipiche, non sia sufficiente per porre la diagnosi di L-HE, a meno che vi sia dimostrazione della produzione di citochine Th2 *in vitro*.

In tabella II viene riportato uno schema che elenca gli elementi più suggestivi per la diagnosi di L-HE/L-HES.

### 5.4. Diagnosi di ipereosinofilia di incerto significato (HEUS)/HES idiopatica

Infine, se non è evidenziabile nessuna delle condizioni a ora descritte, la diagnosi è di Iper eosinofilia

**Tab. II.** Caratteristiche più comuni della variante linfocitaria di HE o HES.

#### Elementi a supporto della diagnosi

1. Aumentati livelli di TARC nel siero
2. Aumentati livelli di IgE nel siero
3. Se presenti, manifestazioni prevalentemente cutanee
4. Storia di atopia
5. HE responsiva alla somministrazione di corticosteroidi



di incerto significato; o, nel caso sia presente danno d'organo, di sindrome ipereosinofila idiopatica.

### 6. Accertamento del danno eosinofilo-correlato

L'algoritmo sino a ora proposto ha trattato dell'eziologia dell'ipereosinofilia. Parallelamente è necessario predisporre accertamenti per capire se siano presenti alterazioni di organi/apparati correlabili all'HE. Certamente l'anamnesi costituisce un buon punto di partenza, evidenziando l'eventuale sintomatologia lamentata dal paziente (dispnea, tosse, sinusite, dispepsia, diarrea, parestesie, astenia, ecc.).

Alcuni esami sono consigliabili in tutti i pazienti, sintomatici o meno, perché possono rilevare un'alterata funzione d'organo ancora clinicamente silente e sono riportati in Tabella III.

Se gli accertamenti dimostrano anomalie e/o il paziente lamenta sintomi organo specifici, ulteriori e specifici accertamenti saranno eseguiti a seconda dell'organo/apparato coinvolto (Tab. IV).

### 7. Storia naturale della HES

L'eterogeneità clinica è ampia e la prognosi è estremamente variabile per le diverse forme di HES. Sebbene la prognosi della HES fosse molto grave quando la sindrome venne descritta per la prima volta (88% di mortalità a 3 anni), i dati più recenti indicano una migliore sopravvivenza e qualità di vita. Esistono tuttavia quadri clinici fatalmente evolutivi, in cui l'exitus sopraggiunge per insufficienza cardiaca congestizia o leucemia acuta. La recente distinzione tra varianti mielo- versus linfoproliferative ha consentito di definire

**Tab. III.** Accertamenti di funzionalità d'organo da richiedere nei pazienti con ipereosinofilia, anche se asintomatici.

Valutazione d'organo	
Ematochimici di routine	Emocromo con formula leucocitaria, VES, QPE
Funzionalità epatica	ALT, $\gamma$ GT e ALP
Funzionalità renale	Creatinina, urea Esame urine (ev. proteinuria delle 24 h)
Funzionalità cardiaca	NT-proBNP e troponine cardiache Ecocardiogramma
Accertamenti utili per la diagnosi differenziale delle varianti di HE	Triptasi, vit. B <sub>12</sub> , IgE, ANCA
Funzionalità respiratoria	Spirometria, DLCO
Imaging (specie se indizi di coinvolgimento)	Rx/TC torace TC addome superiore e inferiore

**Tab. IV.** Ulteriori esami da richiedere sulla base della sintomatologia e/o delle anomalie riscontrate nei primi accertamenti.

Organo interessato	
Cuore	RMN nucleare
GI, pancreas, fegato	Endoscopia con biopsie
Polmone	BAL Broncoscopia con biopsie
SNC e/o SNP	RMN o TC con mezzo di contrasto Elettroencefalogramma Elettroencefalografia
Cute	Biopsia
Vasi sanguigni	Angiografia
Rene e/o vie urinarie	Biopsia di rene e/o vescica

sottogruppi prognosticamente più omogenei. Infatti, i pazienti con HES associata a riarrangiamenti F/P+ presentano spesso interessamento cardiaco e tendono a sviluppare forme cliniche a rilevante morbilità e mortalità e sono a rischio di sviluppare precocemente leucemie eosinofile o mieloidi, mentre i pazienti con L-HES presentano prevalentemente malattie meno gravi. Si può dire che la prognosi dipenda essenzialmente da due aspetti: il coinvolgimento cardiaco e lo sviluppo di un disordine mielo- o linfoproliferativo maligno.

## 8. Terapia

Nonostante l'algoritmo diagnostico presentato, la determinazione dell'esatta causa di ipereosinofilia non è spesso raggiunta, ma ciò non deve ritardare la decisione di iniziare un trattamento di riduzione dell'eosinofilia, quando indicato.

La necessità di iniziare il trattamento eosinofilo-riduttivo è data dal riscontro di eosinofili circolanti  $\geq 1500/\text{mm}^3$  e dall'evidenza di compromissione di organi/apparati in conseguenza dell'ipereosinofilia. È importante sottolineare che i pazienti che presentino isolata HE, in assenza cioè di danno d'organo, non devono essere trattati.

Ovviamente, nelle forme di HES<sub>R</sub> il trattamento consiste innanzitutto nel trattamento della causa dell'ipereosinofilia (ad es. trattamento della parassitosi, del linfoma o di altra neoplasia, sospensione del farmaco in causa, ecc.).

Per quanto riguarda le opzioni terapeutiche a disposizione, i **glucocorticosteroidi** rappresentano il trattamento di prima scelta. Il trattamento con glucocorticosteroidi garantisce una risposta (completa o parziale) nell'80-85% dei pazienti trattati, soprattutto nelle fasi di acuzie della malattia, con riduzione degli eosinofili spesso evidente fin dal primo giorno di terapia. La dose giornaliera iniziale raccomandata è di 0,5-1 mg/kg/die di prednisone, con dose media di mantenimento di circa 10mg/die. Le complicanze della terapia sono quelle note della terapia glucocorticosteroidea e dipendono dalla combinazione della dose media con la durata del trattamento, che è spesso necessariamente di anni.

Quando la dose di mantenimento di prednisone è > 10 mg/die, vengono prese in considerazione terapie dette *corticosteroid-sparing*. I farmaci di questa categoria più frequentemente usati sono l'idrossiurea e l'IFN $\alpha$ .

L'**idrossiurea** viene somministrata alla dose di 0,5-

2 g/die. Il farmaco agisce a livello della produzione midollare degli eosinofili, non interferendo sugli eosinofili periferici. Per questo motivo l'idrossiurea non deve essere usato come farmaco per ridurre rapidamente la conta eosinofila durante la fase di acuzie della HES. In associazione a basse dosi di prednisone, e più raramente in monoterapia, l'idrossiurea è impiegata durante la fase di mantenimento del trattamento della HES. Gli effetti collaterali principali che costringono a ridurre le dosi sono la mielotossicità e la tossicità gastrointestinale.

L'**IFN $\alpha$**  ha una latenza d'azione piuttosto prolungata, dovuta in parte alla necessità di raggiungere gradualmente la dose efficace, a causa della bassa tollerabilità del farmaco (provoca, come noto, una sindrome simil-influenzale). Le dosi di IFN $\alpha$  utilizzate nel trattamento delle HES sono di 1.000.000-8.000.000 unità per dose, 3-7 volte la settimana, somministrate per via sottocutanea. Non è raccomandata la somministrazione di IFN $\alpha$  in monoterapia nei pazienti con L-HES, dato che studi in vitro hanno dimostrato che IFN $\alpha$  impedisce l'apoptosi spontanea dei cloni T anomali.

Altri trattamenti segnalati in letteratura comprendono l'utilizzo di **citarabina**, **ciclosporina**, **metotrexate** e delle **immunoglobuline** ad alto dosaggio, oppure dell'anticorpo monoclonale anti-CD52, **alemtuzumab**. Alemtuzumab è stato impiegato in casi di HES con clonalità T linfocitaria o nelle HES idiopatiche. Tutti questi trattamenti sono considerati di seconda linea, meritevoli di utilizzo quando la terapia di prima linea fallisce.

Considerato il ruolo importante della citochina IL-5 per la differenziazione, lo sviluppo e la sopravvivenza degli eosinofili, numerosi studi clinici hanno valutato la potenzialità terapeutica di bloccare l'effetto, mediante anticorpi monoclonali.

Il **mepolizumab**, un anticorpo monoclonale anti-IL-5, si è dimostrato un ottimo farmaco *steroid-sparing*, privo di importanti effetti collaterali, nei pazienti con HES idiopatica e L-HES, ma non è ancora in commercio in Italia.

Il **reslizumab** è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-IL-5 tuttora in sperimentazione. Uno studio effettuato su quattro pazienti pediatrici diagnosticati con HES idiopatica rivelava che una singola dose di Reslizumab migliorava la sintomatologia clinica e riduceva la conta eosinofila (Klion, 2004).

Il **benralizumab**, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro la catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-5, *in vitro* ha mostrato una potente attività proapoptotica

su eosinofili in coltura ed è tuttora impiegato in due studi di fase 2 nei pazienti asmatici. Dopo somministrazione venosa è stata osservata una drammatica discesa della conta eosinofila, con un effetto duraturo fino a 12 settimane in tutti i pazienti. Al momento il benralizumab non è ancora stato testato nel trattamento della HES.

Per quanto concerne le neoplasie ematologiche presentanti HE nell'ultima decade sono stati identificati diversi target molecolari farmacologici.

Come detto, il difetto genetico più frequentemente rilevato è il gene di fusione FIP1L1-PDGFR $\alpha$ : il prodotto della fusione è un target per l'**imatinib mesilato** e per altri inibitori delle tirosin-chinasi (nilotinib, desatinib). L'imatinib mesilato lega la conformazione inattiva dei geni di fusione che includono ABL, c-KIT, PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$ , occupando il sito di legame dell'ATP, interferendo così con la fosforilazione. La risposta all'Imatinib è rapida, nel giro di una settimana si osserva in genere un miglioramento della sintomatologia e una riduzione significativa della conta eosinofila. Non sono stati riscontrati miglioramenti nei casi di interessamento cardiaco irreversibile (quali la fibrosi endomiocardica e le alterazioni valvolari), né nelle sequele degli eventi trombotici.

La remissione citogenetica viene raggiunta nella maggior parte dei pazienti con HES e riarrangiamento P/F<sup>+</sup>, in un periodo di tempo variabile da 1 mese a più di 1 anno.

La posologia ideale del trattamento è ancora in fase di definizione e, almeno in alcuni studi, sembra che possa essere efficace anche un dosaggio estremamente basso (100 mg/die, sebbene talora sia necessaria una dose di 400 mg/die), che comporta anche ridotti effetti collaterali. Tra questi è da segnalare la rara possibilità di insufficienza cardiaca acuta, che si instaura poco dopo l'inizio della terapia, dovuta probabilmente al drammatico rilascio di mediatori tossici da parte degli eosinofili. Tale complicanza è prevenibile, iniziando il trattamento con glucocorticosteroidi nei casi che presentino elevati livelli sierici di troponina. L'interruzione del trattamento comporta la ricomparsa del riarrangiamento P/F<sup>+</sup> e il riaccendersi delle manifestazioni dell'HES<sub>N</sub>.

Seppur meno frequenti, i casi di HES secondari a riarrangiamenti di PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  rispondono agli inibitori delle tirosin-chinasi, mentre sono resistenti i casi sostenuti da prodotti di fusione del gene FGFR1. Nei pazienti con neoplasie mieloidi associate con HE, il trattamento è quello della neoplasia mieloide.

### 8.1. Obiettivi della terapia di mantenimento

Quando viene raggiunta la remissione clinica e biologica della malattia, la terapia deve essere ridotta alla dose minima efficace per controllare la patologia. La conta degli eosinofili può guidare l'intensità del trattamento, tenendo conto che essa andrà mantenuta sempre ridotta nei casi con interessamento cardiaco, neurologico o con episodi tromboembolici ricorrenti, mentre nel caso di interessamento esclusivamente cutaneo la conta degli eosinofili potrà anche essere leggermente superiore alla norma.

---

### Bibliografia essenziale

- Dulohery MM, Patel RR, Schneider F, et al. *Lung involvement in hypereosinophilic syndrome*. *Respir Med* 2011;105:114-21.
- Fauci AS, Harley JB, Roberts WC, et al. *NIH conference. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. Clinical, pathophysiologic, and therapeutic considerations*. *Ann Intern Med* 1982;97:78-92.
- Gotlib J. *World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management*. *Am J Hematol* 2012;87:903-14.
- Klion AD, Law MA, Noel P, et al. *Safety and efficacy of the monoclonal anti-interleukin-5 antibody SCH55700 in the treatment of patients with hypereosinophilic syndrome*. *Blood* 2004;103:2939-1.
- Ogbogu PU, Bochner BS, Butterfield JH, et al. *Hypereosinophilic syndrome: a multicenter, retrospective analysis of clinical characteristics and response to therapy*. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1319.
- Mejia R, Nutman TB. *Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia*. *Semin Hematol* 2012;49:149-59.
- Roufosse F, Weller PF. *Practical approach to the patient with hypereosinophilia*. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:39-44.
- Tefferi A, Vardiman JW. *Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms*. *Leukemia* 2008;22:14-22.
- Valent P, Klion A, Horny HP, et al. *Contemporary consensus on criteria and classification of eosinophil disorders and related syndromes*. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:607-12.