

LAVORO ORIGINALE

Anticorpi contro gli antigeni granulocitari nelle IBD: dalla morfologia microscopica alla specificità antigenica

Antibodies anti granulocytic antigens in IBD: from microscopic morphology to antigenic specificity

E. Mainardi, A. Montanelli

Dipartimento di Patologia Clinica, A.O. "Ospedale Maggiore", Crema (CR)

SUMMARY

Objective: ANCA (*p*-ANCA and *x*-ANCA) have been documented to occur in many inflammatory disorders. The specific ANCA antigens and the clinical correlation of a positive ANCA test in these disorders are still for the most part obscure. The aim of the present study was to investigate the prevalence of and the target antigens for ANCA in patients with IBD.

Methods: 104 patients (67 age between 3-18 years, mean age 8+3 and 37 age between 25-70 years, mean age 48+15) clinically and histopathologically diagnosed as: 67 ulcerative colitis, 16 Crohn' disease, 21 other colitis (7 indeterminate colitis) were enrolled in our study. ANCA were determined by ELISA and IIF methods.

Results: We observed a good performance in terms of sensibility and specificity of ANCA, and a good correlation between the two methods used; as regard ELISA determination the antigen frequently found in our cases was lactoferrin (60%).

Conclusions: Is still unclear the role of these "minor antigens" in the diagnosis and pathogenesis of IBD, but is clear that only morphologic evaluation is no more sufficient.

Reumatismo, 2006; 58(2):127-131

INTRODUZIONE

Dal 1985, quando van der Woude descrisse per la prima volta la associazione tra la granulomatosi di Wegener e la positività per gli ANCA, (1) questi sono considerati un utile marker sierologico per la diagnostica delle vasculiti primarie sistemiche, quali appunto la granulomatosi di Wegener (GW) e la poliangiote microscopica (PAM), inclusa la sua variante limitata al rene (la glomerulonefrite necrotizzante extracapillare "pauci-immune") e, in misura minore, la sindrome di Churg-Strauss (SCS) (2, 3). Con il termine ANCA convenzionalmente si intende identificare autoanticorpi diretti verso co-

stituenti citoplasmatici dei granulociti neutrofili. La loro elevata sensibilità (>90%) e specificità (>90%) e, di conseguenza, l'alto valore predittivo positivo sono strettamente legati alla selezione clinica dei pazienti sottoposti all'indagine ed in particolare alla presenza in questi di manifestazioni cliniche che suggeriscono una diagnosi di vasculite sistemica ANCA-associata. L'identificazione degli specifici antigeni bersaglio in gioco in queste patologie autoimmuni (PR3 e MPO), ne ha ulteriormente accresciuto il loro valore diagnostico, fatto che a tutt'oggi ne giustifica ampiamente l'uso nella fase di diagnosi e di monitoraggio delle vasculiti sistemiche primitive (4, 5). Diversi sono i metodi disponibili per l'identificazione di tali anticorpi e il risultato fornito è quindi "metodologia" dipendente. L'uso di tecniche in immunofluorescenza indiretta su granulociti neutrofili fissati in etanolo (IFI) (ritenuta il gold standard) consente la valutazione morfologica e la classificazione di patterns di positività c- p- o ANCA atipici che, a tut-

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Elsa Mainardi
Dipartimento di Patologia Clinica
A.O. "Ospedale Maggiore" di Crema
Via Maccallè 13
26013 Crema (CR)
E-mail: elsa.mainardi@libero.it

pici che, a tutt'oggi, limitatamente all'ambito di vasculiti ANCA associate, è ritenuta indagine diagnostica dotata di buona specificità e sensibilità (c-ANCA positivi per PR3 nel 90-95% dei pazienti con granulomatosi di Wegener; p-ANCA positivi per MPO nel 70-80% dei pazienti con poliangiite microscopica (PAM) o glomerulonefrite extracapillare necrotizzante pauci-immune) (6). Queste procedure in IFI hanno però alcuni limiti: sono operatore dipendente, non forniscono risultati quantitativi, non consentono l'identificazione degli antigeni coinvolti e risentono della qualità dei preparati. Al fine di ottenere informazioni in merito agli specifici antigeni verso cui sono rivolti gli ANCA si utilizzano procedure analitiche in ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Queste nei kit diagnostici più diffusi mettono a disposizione pannelli operativi in grado di identificare PR3 ed MPO (specificità antigeniche "maggiori"), ma anche lattoferrina, elastasi, catepsina G ecc. (specificità antigeniche "minori") nei kit di ultima generazione. Sono tecniche analitiche facilmente automatizzabili e offrono la possibilità di esprimere una valutazione quantitativa, ma sono gravate da costi elevati (il numero di antigeni risulta fattore di moltiplicazione del costo).

Recentemente in letteratura sono comparse numerose segnalazioni a riguardo delle positività degli ANCA in patologie "non vasculitiche" (7, 8). In particolare la positività degli ANCA segnalata in soggetti con colite ulcerosa, ha suscitato l'interesse dei gastroenterologi che hanno visto in tale marcatore un possibile utile supporto nella fase diagnostica delle IBD (diagnosi differenziale tra UC e Crohn) (9, 10). Nei pazienti affetti da IBD, ed in particolare da RCU, sono stati descritti tutti e tre i pattern fluoroscopici (atipico, c- p-ANCA) osservabili con l'indagine in IFI: di conseguenza la valutazione morfologica non può essere criterio sufficiente ad orientare verso la diagnosi di IBD piuttosto che verso quella di "vasculite". Anche la ricerca in ELISA delle sole specificità antigeniche MPO e PR3 (che rimangono maggiormente accreditate di un ruolo diagnostico a favore delle vasculiti) risulta altresì insufficiente, in quanto tra gli antigeni proposti come possibili target e conseguentemente potenziali marker sierologici di IBD risultano prevalenti la catepsina G, la lattoferrina, il lisozima, la BPI, le proteine cromosomiche non istoniche HMG1 e 2 ed altre ancora. Per le proteine non istoniche pare importante sottolineare come in realtà siano un antigene non citoplasmatico, ma nucleare o nucleo-associato in quanto localiz-

zato a livello dell'eterocromatina disposta nella periferia del nucleo, per cui in questo caso il termine "ANCA" pare perlomeno inaccurato e dovrebbe forse più correttamente essere sostituito da quello di anticorpi anti-nucleo granulocita specifici (GS-ANA) o NANA (nuclear antigen neutrophil antibodies).

Scopo del presente lavoro è quello di esprimere mediante la ricerca in cieco dei marcatori sierologici ANCA in una casistica di pazienti con IBD una valutazione sulle performance diagnostiche delle diverse procedure di laboratorio e conseguentemente di realizzare un protocollo di indagine "ottimizzato" che possa essere un valido supporto agli accertamenti diagnostici invasivi quali la rettocolonscopia con indagine biotica.

MATERIALI E METODI

Abbiamo analizzato in cieco il siero di 104 pazienti (49 maschi, 55 femmine) sui quali era stata posta diagnosi di: RCU (67) età media 26 ± 22 , Crohn (16) età media 8 ± 2 e altre coliti (21 di cui 7 coliti indeterminate, età media 10 ± 4). La diagnosi era stata formulata sulla scorta di criteri clinici, radiologici, endoscopici e istopatologici.

Gli ANCA sono stati ricercati seguendo un protocollo diagnostico che prevede l'applicazione di due diverse metodologie di indagine; una indagine microscopica in immunofluorescenza indiretta (IFI) su neutrofili fissati in etanolo e in formalina (Kit ANCA (EG), Euroimmun) e una indagine in ELISA (ANCA-Combi, Chematil) per la ricerca e identificazione delle specificità antigeniche (PR3, MPO, Lattoferrina, Elastasi, Catepsina G, BPI, Lisozima).

Gli ASCA sono stati determinati con metodo ELISA (QUANTA Lite ASCA IgA, IgG INOVA, Menarini).

RISULTATI

Le performance diagnostiche dei marcatori sierologici derivanti dalla combinazione di tecniche IFI ed ELISA sono riportate in tabella I. Abbiamo osservato una buona concordanza tra i risultati ottenuti con le due metodiche; solo 1 caso ha presentato risultati discordanti (IFI positiva: pattern p-ANCA ed ELISA negativa, classificato come colite indeterminata e che verrà monitorato nel tempo).

Tabella I - Performance diagnostiche dei marcatori sierologici in 67 casi con diagnosi istopatologica di Rettocolite ulcerosa.

	ANCA+	ANCA+/ASCA-
Sensibilità	81%	68%
Specificità	89%	91%
VPP	86%	88%
VPN	84%	76%
Accuratezza	85%	80%

VPP: valore predittivo positivo
VPN: valore predittivo negativo

Tabella II - Frequenza di positività anticorpali contro antigeni granulocito-specifici in 67 Rettocolite ulcerosa.

	Positività anticorpali (N° di riscontri)	Frequenza %
Proteinasi III	21	31 %
Mieloperossidasi	0	0 %
Lattoferrina	40	60 %
Catepsina G	4	6 %
Lisozima	1	1 %
Elastasi	5	7 %
BPI	15	22 %

BPI: Bactericidal permeabilizing - increasing protein

I pattern fluoroscopici osservati, in accordo con i dati della letteratura, sono stati principalmente quadri p-(32%) e atipici-ANCA (56%), in percentuale inferiore quadri c-ANCA (12%).

La frequenza di positività anticorpale per gli antigeni granulocito specifici è rappresentata in tabella II. L'antigene bersaglio maggiormente interessato è risultato essere la lattoferrina coinvolto nel 60% dei casi. Nei casi classificati come morbo di Crohn e altre coliti, la frequenza delle specificità ELISA per gli ANCA è stata la seguente: 3 positivi per BPI (8%), 1 positivo per PR3 (2%) ed 1 positivo per lattoferrina (2%).

La positività anticorpale rivolta verso l'antigene PR3 (31%) è sempre stata osservata in associazione a quella di altri antigeni (principalmente lattoferrina e BPI).

DISCUSSIONE

Se nell'ambito delle vasculiti la determinazione degli ANCA ha una provata utilità diagnostica e la loro ricerca è suggerita da linee guida internaziona-

li, altrettanto non si può dire a tutt'oggi del loro ruolo e significato in altre patologie, dove peraltro sono ampiamente descritti. I dati contenuti nelle numerose segnalazioni comparse recentemente in letteratura sono spesso non confrontabili sia per le diverse modalità di selezione dei pazienti che per la diversità dell'approccio metodologico analitico (solo IFI, IFI + ELISA, solo ELISA PR3, MPO ecc.). Inoltre la ricerca degli ANCA, nel caso di sospetto clinico di IBD, viene spesso eseguita in combinazione con la ricerca degli anticorpi anti-Saccharomyces Cerevisiae (ASCA), in quanto tale associazione ha dimostrato di migliorare le performance diagnostiche degli accertamenti sierologici. Rispetto alla ricerca dei singoli marcatori, questa combinazione, che anche nella nostra casistica ha portato ad un miglioramento della specificità (91%) nella diagnosi di rettocolite ulcerosa, rende peraltro ancor più difficile un raffronto tra i dati provenienti dalle diverse casistiche e ne impedisce una valutazione conclusiva. Nell'ambito dei sieri risultati ANCA positivi, l'anticorpo ritrovato con maggiore frequenza (60%) è stato quello diretto contro l'antigene lattoferrina. La lattoferrina (LF) è una glicoproteina monomerica del peso di circa 80 kDa con una singola catena polipeptidica di 691 amminoacidi chelante il ferro che appartiene alla famiglia delle transferrine. La LF è stata isolata nel latte umano nel 1960 e successivamente nel latte bovino (11), è rilevabile nel latte, nella saliva, nelle lacrime, nel liquido seminale e in molte altre secrezioni; inoltre è presente nei granuli neutrofili dei leucociti. Possiede spiccate proprietà antibatteriche soprattutto contro Gram-negativi e presenta un ampio spettro di attività biologiche: è attiva nella risposta immunitaria promuovendo la maturazione e lo sviluppo funzionale delle cellule T e B, modulando le attività di diverse citochine come l'IL-1, TNF- α , GM-CSF e IL-6 e quella delle cellule natural killer (12, 13). La presenza di lattoferrina nell'intestino di soggetti con IBD è stata recentemente descritta da un gruppo americano che ha visto nella ricerca di tale proteina su preparati istologici un utile marcatore altamente specifico e sensibile, in grado di consentire di differenziare soggetti con IBD da quelli con sindrome da intestino irritabile. (14). Tale osservazione pare in linea con l'alta frequenza di anticorpi contro di essa rilevata nel siero dei nostri pazienti. La presenza di tali anticorpi inoltre supporta una delle teorie eziopatogenetiche proposte per le IBD, ovvero quella che chiama in causa infezioni ricorrenti a carico di questo apparato ad opera di diversi batteri

(*Pseudomonas*, anaerobi intestinali, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium kansasii*, *Yersinia enterocolitica*) che, in condizioni di immunodepressione e/o in soggetti geneticamente predisposti, stimolano il rilascio dei mediatori dell'infiammazione (tra i quali la lattoferrina) ad opera dei neutrofili reclutati in sede; questa stimolazione cronica avrebbe come conseguenza una alterazione della barriera intestinale ed una sintesi di anticorpi specifici (15).

Peraltro, se l'eziologia permane ancora da chiarire e non esiste un gold standard diagnostico universalmente accettato, la diagnosi di queste malattie risulta spesso difficile e fonte di discussione; è ormai accettato che si debba ricorrere a step multidisciplinari che prevedono il ricorso a metodiche diagnostiche sia invasive che non invasive. A tutt'oggi i marcatori sierologici proposti a completamento e a supporto della diagnostica non invasiva mostrano certamente ancora problemi di standardizzazione; proprio per questo si rendono necessari protocolli di laboratorio che, dopo aver raggiunto una corretta valutazione delle performance analitiche, consentano di raccogliere dati omogenei e facilmente confrontabili.

La proposta avanzata nel lavoro degli autori Segelmark, Westman e Wieslander (16) è certamente opportuna e sul piano diagnostico strategicamente vincente, ma a tutt'oggi pare difficilmente praticabile in quanto la condizio posta a monte della flow chart prevede una comunicazione al laboratorio del sospetto diagnostico e da parte di quest'ultimo l'allestimento di due distinte procedure: una a favore delle vasculiti e l'altra a favore delle IBD. A tutt'oggi al laboratorio di patologia clinica pervengono campioni biologici corredati di dati anagrafici e informazioni nosologiche ma ben difficilmente, se non su casistiche selezionate, accompagnati da specifica richiesta con formulazio-

ne del quesito diagnostico. Ne consegue che gran parte dei laboratori processa i campioni con procedure "standard" che si propongono di conciliare bassi costi e massime performance diagnostiche "aspecifiche": nel caso degli ANCA dopo lo step di indagine in immunofluorescenza gran parte dei laboratori ricerca in ELISA solo gli anticorpi anti-MPO e PR3.

L'esperienza da noi maturata sul campo con una procedura per lo step in ELISA rivolta alla ricerca di un pannello anticorpale più ampio (MPO, PR3, lattoferrina, BPI, elastasi, catepsina G, lisozima) ci ha suggerito alcune considerazioni:

in casistiche non selezionate, ovvero che reclutano pazienti senza informazioni circa il quesito diagnostico, la descrizione morfologica in immunofluorescenza indiretta risulta aspecifica; esprimere un risultato in termini di c-p o atipico-ANCA non può essere assolutamente indicativo nè di vasculite nè tanto meno di RCU

la valutazione morfologica deve peraltro necessariamente prevedere l'uso di un secondo preparato fissato in formalina ed eventualmente di un terzo fissato in metanolo; risulta pertanto gravata da un pesante impegno di materiali e di operatori a fronte di limitati vantaggi in termini di specificità diagnostica.

i protocolli diagnostici proposti dalle società scientifiche (es Gruppo FIRMA) si sono sino ad ora espressi soprattutto in merito alla diagnostica delle vasculiti, per le quali è necessario uno step in immunofluorescenza indiretta ed uno in ELISA per la ricerca delle sole specificità antigeniche PR3 e MPO; nelle altre patologie, quali le IBD, tale procedura operativa è certamente insufficiente, e resta pertanto in attesa di una puntuale ridefinizione.

in attesa che si addivenga ad una consensus che si esprima sulle linee guida della diagnostica sierologica delle IBD, nel nostro laboratorio applichiamo

RIASSUNTO

Scopo del lavoro: focalizzare l'attenzione sul ruolo dei marcatori sierologici ANCA in 104 pazienti clinicamente e istologicamente classificati come 67 RCU, 16 Crohn e 21 altre coliti.

Risultati: abbiamo osservato principalmente quadri fluoroscopici p-e x-ANCA e l'antigene maggiormente coinvolto è risultato essere la lattoferrina (60%).

Conclusioni: la ricerca dei soli anticorpi anti PR3 e MPO nella diagnostica delle IBD è insufficiente; non è peraltro ancora noto/i l'antigene/i bersaglio degli anticorpi ANCA in grado di assumere il ruolo di "marcatori" patognomnici di RCU; nella nostra casistica la positività degli anticorpi contro la lattoferrina e la BPI suggeriscono rinnovate ipotesi sul ruolo dei batteri nell'eziopatogenesi di questa patologia.

Parole chiave - Autoanticorpi, artrite reumatoide, spondilite anchilosante, infliximab.

Key words - Autoantibodies, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, infliximab.

un protocollo diagnostico che prevede in primis l'acquisizione, qualora possibile, di uno specifico quesito diagnostico che condiziona entrambi gli step procedurali successivi (IFI ed ELISA) e che ci consente di raggiungere buoni risultati in termini di sensibilità, specificità ed appropriatezza diagnostica (qualora avessimo utilizzato kit per la ricerca dei soli PR3 e MPO nella nostra casistica avremmo scotomizzato sino al 47% delle positività anticorpali in quanto rivolte verso antigeni "minori").

BIBLIOGRAFIA

1. van der Woude FJ, Rasmussen J, Lobatto S, Wiik A, Permin H, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 1: 425-9.
2. Hagen EC, Ballieux BEPB, van Es LA, Daha MR, van der Woude FJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: A review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenetic consequences. *Blood* 1993; 81: 1996-2002.
3. Hall JB, Wadham BMcN, Wood CJ, Ashton V, Adam WR. Vasculitis and glomerulonephritis: A subgroup with an antineutrophil cytoplasmic antibody. *Aust NZ J Med* 1984; 14: 277-8.
4. Kallenberg CGM, Brouwer E, Weening JJ, and Cohen Tervaert JW. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: Current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 1994; 46: 1-15.
5. Specks U, and Homburger HA. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Mayo Clin Proc* 1994; 69: 1197-8.
6. Savage J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 507-13.
7. Merkel PA, Polisson PA, Chang Y, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Disease. *Ann Int Med* 1997; 126: 866.
8. Locht H, Skogh T, Wiik A. Characterization of autoantibodies to neutrophil granule constituents among patients with reactive arthritis, rheumatoid arthritis, and ulcerative colitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 898-903.
9. Hardarson S, LaBrecque DR, Mitros FA, Neil GA, Goeken JA. Antineutrophil cytoplasmic antibody in inflammatory bowel and hepatobiliary diseases. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 277-81.
10. Oudkerk Pool M, Bouma G, Meuwissen SGM, von Blomberg BME, van De Merwe JP, Deville WLJM, et al. Serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Pathol* 1995; 48: 346-50.
11. Kanyshkova TG, Babina SE, Semenov DV, Isaeva N, Vlassov AV, Neustroev KN, et al. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3353-61.
12. Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 95-102.
13. Caccavo D, Pellegrino NM, Altamura M, Rigon A, Amati A, Amoroso A, et al. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 403-17.
14. Kane SV, Sandborn WJ, Rufo PA, Zholudev A, Boone J, Lyerly D, et al. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1309-14.
15. Landers C, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002; 123: 689-99.
16. Segelmark M, Westman K, and Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 629-35.