

Prevalenza e significato clinico degli anticorpi anti-catepsina G nella sclerosi sistemica

Prevalence and clinical significance of cathepsin G antibodies in systemic sclerosis

P. Grypiotis, A. Ruffatti, F. Cozzi, R.A. Sinico¹, M. Tonello, A. Radice¹, M. Favaro, S. Todesco

Cattedra e U.O. di Reumatologia, Università degli Studi di Padova;

¹Dipartimento di Allergologia e Immunologia Clinica, U.O. di Nefrologia, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano

SUMMARY

Objectives: To evaluate the prevalence and clinical significance of cathepsin G antibodies in patients affected with systemic sclerosis (SSc, scleroderma).

Methods: 115 patients affected by SSc, 55 (47,8%) with diffuse scleroderma (dSSc) and 60 (52,2%) with limited scleroderma (lSSc), were tested for cathepsin G antibodies by ELISA method. Moreover these sera were evaluated by indirect immunofluorescence (IIF) on ethanol and formalin fixed human neutrophils.

Results: By means of the ELISA method 16 (13,9%) patients were found to be sera positive for anti-cathepsin G, 2 (12,5%) of which showed a perinuclear fluorescence pattern (P-ANCA) and 4 (25%) an atypical ANCA staining, while 10 (62,5%) were negative on IIF. The IIF on scleroderma sera revealed 5 (4,3%) P-ANCA and 18 (15,7%) atypical ANCA patterns. The anti-cathepsin G antibodies significantly prevailed in scleroderma sera ($p=0.02$) when their frequency was compared with that of healthy controls; while they were not significantly associated to any clinical or serological features of SSc patients.

Conclusions: The anti-cathepsin G antibodies were significantly frequent in scleroderma sera; however, no clinical correlations were found. Thus, the significance of their presence in SSc still needs to be clarified.

Reumatismo, 2003; 55(4):256-262

INTRODUZIONE

Gli anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (ANCA) sono degli anticorpi diretti contro costituenti citoplasmatici dei neutrofili e dei monociti. Gli ANCA sono stati identificati per la prima volta nelle vasculiti sistemiche. Negli ultimi 10 anni gli ANCA sono stati associati con diverse patologie come la granulomatosi di Wegener, la poliangiite microscopica, la glomerulonefrite necrosante focale pauci-immune e in misura minore con la sindrome di Churg-Strauss e altre vasculiti (1, 2). Gli ANCA vengono determinati con l'immunofluorescenza indiretta (IFI) e la loro specificità viene definita con il test ELISA. Con l'utilizzo della meto-

dica standard dell'IFI è possibile distinguere almeno due quadri fluoroscopici: uno citoplasmatico granulare (C-ANCA) ed uno perinucleare (P-ANCA). Assieme ai due patterns principali è possibile inoltre riconoscere quadri fluoroscopici diversi definiti "ANCA atipico". Il quadro C-ANCA è associato principalmente alla presenza degli anticorpi anti-proteinasi 3 (PR3), mentre il P-ANCA agli anticorpi anti-mieloperossidasi (MPO) (3). È noto che gli anticorpi anti-PR3 sono diagnostici per la granulomatosi di Wegener, mentre gli anti-MPO sono strettamente associati con la poliangiite microscopica e la glomerulonefrite necrosante focale pauci-immune (4, 5). Il significato clinico degli altri ANCA specifici per antigeni come l'elastasi, la BPI (Bactericidal/Permeability Increasing protein), la lattoferrina, l' α -enolasi e la catepsina G è ancora non ben definito. In particolare gli anticorpi anti-catepsina G vengono ritrovati nelle malattie croniche infiammatorie intestinali come la rettocolite ulcerosa ed il morbo di Crohn (6-9), nonché nelle malattie croniche del fegato (10). Come illustrato

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Panagiotis Grypiotis

Cattedra e U.O. di Reumatologia, Università degli Studi di Padova

Via Giustiniani 2, 35128 Padova

E-mail: panos@libero.it

in tabella I, nell'ambito delle malattie reumatiche essi sono stati ritrovati con frequenza variabile nell'artrite reumatoide (11-15), nell'artropatia psoriasica (12), nelle artriti reattive (15), nella sindrome di Sjögren (14, 16), nella polimiosite/dermatomiosite (14), nelle vasculiti (9, 13, 21-23) e nel lupus eritematoso sistemico (LES) (12-14, 17-20). In questa ultima malattia sono state descritte le prevalenze anticorpali più diverse e precisamente variabili tra lo 0 (12, 17) ed il 62,1% (20). Nel LES gli anticorpi anti-catepsina G sono stati segnalati

con prevalenza più elevata nella malattia in fase attiva, senza peraltro associarsi ad alcun impegno clinico ben definito (18). Inoltre quando sono stati determinati in pazienti con glomerulonefrite lupica essi prevalevano significativamente nei pazienti con impegno renale in fase attiva rispetto a quelli con malattia renale non attiva (20).

Dal 1990 (24) gli ANCA vengono ricercati nei sierici di pazienti affetti da sclerosi sistemica (ScS, sclerodermia) con una prevalenza che varia tra 0 e 11,7% (25-35). Inoltre dal 1996 sono stati riporta-

Tabella I - Prevalenza degli anticorpi anti-catepsina G in pazienti affetti da malattie reumatiche.

	ScS (%)	LES (%)	SS (%)	PM/DM (%)	Vasculiti (%)	AR (%)	A. reattive (%)	A. psoriasica (%)
Locht H et al (2000)	-	-	-	-	-	4/30 (13,3)	1/50 (2)	-
Nishiya K et al (1999)	-	-	0/60 (0)	-	-	-	-	-
Zhao MH et al (1998)	-	65/95 (62,1)	-	-	-	-	-	-
Wong SN (1998)	-	-	-	-	4/12 (33,3)	-	-	-
Uesugi H et al (1998)	1/22 (4,5)	14/38 (36,8)	2/9 (22,2)	1/11 (9,1)	-	13/40 (32,5)	-	-
Nishiya K et al (1997)	-	1/31 (3,2)	-	-	-	-	-	-
Zhao MH et al (1996)	-	-	-	-	0/185 (0)	-	-	-
Spronk PE (1996)	-	10/84 (11,4)	-	-	-	-	-	-
Savage JA (1996)	-	4/15 (26,6)	-	-	0/52 (0)	3/20 (15)	-	-
De Bandt M et al (1996)	-	0/11 (0)	-	-	-	5/77 (6,5)	-	1/25 (4)
Kossa K et al (1995)	-	-	-	-	2/21 (9,5)	-	-	-
Schnabel A et al (1995)	-	0/120 (0)	-	-	-	-	-	-
Lesavre P et al (1993)	-	-	-	-	0/72 (0)	-	-	-
Mulder AHL et al (1993)	-	-	-	-	-	1/94 (1)	-	-

ScS: Sclerosi Sistemica, LES: Lupus Eritematoso Sistemico, SS:sindrome di Sjögren, PM/DM: polimiosite/dermatomiosite, AR: Artrite Reumatoide.

ti numerosi "Case Report" di pazienti affetti da ScS che risultavano positivi per gli ANCA (36-48).

In questi studi sono stati identificati gli anticorpi anti-PR3, anti-MPO ed anti- α -enolasi.

Nella ScS gli anticorpi anti-catepsina G sono stati ricercati da Uesugi et al. (14), che in una casistica di 22 pazienti hanno ritrovato una prevalenza anticorpale del 4,5%, peraltro non significativa rispetto a quella della popolazione sana di controllo. Inoltre in questo studio non è stato approfondito il significato clinico degli anticorpi anti-catepsina G nella ScS.

Ci siamo proposti di definire la prevalenza degli anticorpi anti-catepsina G in un gruppo di pazienti affetti da ScS, utilizzando il test ELISA con l'antigene purificato. Inoltre è stato valutato il significato clinico di tali anticorpi tramite la correlazione con i diversi impegni clinici della malattia.

MATERIALI E METODI

Abbiamo esaminato 115 pazienti affetti da ScS, 100 donne e 15 uomini di età media $54,3 \text{ aa} \pm 12,9 \text{ DS}$ (range 23-83); sulla base dell'impegno clinico 55 sono stati classificati come sclerodermia diffusa (ScSd) e 60 come sclerodermia limitata (ScSl). La diagnosi di ScS è stata fatta in accordo con i criteri ARA (American Rheumatism Association) (49). L'impegno polmonare, esofageo e cardiaco sono stati valutati in accordo con i criteri descritti in letteratura (50). L'interessamento renale, invece, è stato valutato sulla base dell'ipertensione (diastolica $>100 \text{ mmHg}$), dell'aumento della creatinemia ($>1,3 \text{ mg/dl}$), della presenza di proteinuria ($>0,5 \text{ g/24h}$) e di ematuria.

Per la ricerca degli anticorpi anti-catepsina G è stata utilizzata una metodica ELISA "home made" con diluizione sierica 1:100, usando come antigene catepsina G umana purificata (Calbiochem, UK) e come sistema rivelatore anticorpi anti-IgG umane coniugate con perossidasi (Sigma, USA). I risultati sono stati espressi come unità arbitrarie (UA) ottenute attraverso una curva standard, mentre il cut-off è stato calcolato come media di 100 soggetti sani più 2,5 DS ed è risultato 16,5 UA.

Come gruppo di controllo abbiamo testato i sieri di 100 donatori di sangue omogenei per sesso e per età con i pazienti. Tutti i sieri dei pazienti affetti da ScS sono stati testati anche con la tecnica dell'IFI su granulociti neutrofili umani fissati in etanolo ed in formalina (Menarini, Inova Diagnostics, San

Diego, CA, USA) in accordo con le procedure standard (51, 52), usando la diluizione sierica di 1:20. I quadri fluoroscopici sono stati interpretati come C-ANCA, P-ANCA, ANCA atipico e negativo secondo le linee guida internazionali (3).

La lettura veniva effettuata da tre esaminatori indipendenti e sono stati considerati positivi i sieri dove vi era concordanza.

Inoltre abbiamo ricercato gli anticorpi antinucleo (ANA) e gli anti-centromero (ACA) utilizzando la tecnica dell'IFI su cellule HEP-2000 (Immunoconcepts, Sacramento, CA, US), gli anticorpi specifici per topoisomerasi I ed altri antigeni nucleari estraibili (ENA) come Sm, U1-RNP, SSA/Ro, SSB/La, PM1, Jo1, PCNA, Ku ed SL con una controimmuno-elettroforesi "in house" e gli anticorpi anti-DNA nativo con l'IFI su *Crithidia luciliae* (Immunoconcepts).

La correlazione tra gli anticorpi anti-catepsina G e le forme cliniche, gli impegni sistemici, gli anticorpi anti-topoisomerasi I e anti-centromero è stata valutata con il test del χ^2 ; mentre la correlazione degli anti-catepsina G con l'età media e con la durata media di malattia è stata calcolata con il test U di Mann-Whitney. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

Con la tecnica ELISA sono risultati positivi per anticorpi anti-catepsina G 16 (13,9%) sieri di pazienti affetti da ScS, mentre i sieri di controllo sono risultati positivi in 4 (4%) casi. Le caratteristiche cliniche dei pazienti positivi sono riportate in tabella II. In particolare vi erano 14 donne e 2 uomini con età media di $54,6 \pm 11$, affetti rispettivamente 7 da ScSd e 9 da ScSl. Presentavano tutti il fenomeno di Raynaud, mentre l'impegno cardiaco era presente in 5/16 (31,2%), quello polmonare in 13/16 (81,2%), quello renale in 4/16 (25%) e quello esofageo in 9/13 (69,2%).

I 115 sieri di pazienti affetti da sclerodermia in IFI su granulociti neutrofili umani fissati in etanolo ed in formalina, sono risultati positivi per P-ANCA in 5 (4,3%) casi e per ANCA atipico in 18 (15,7%). Questo ultimo quadro fluoroscopico era caratterizzato da una intensa e grossolana colorazione perinucleare dei granulociti fissati in etanolo (fig. 1) e dall'assenza di fluorescenza nei granulociti fissati in formalina. Con il test dell'IFI i 16 sieri positivi per anti-catepsina G presentavano il quadro P-ANCA in 2/16 (12,5%) casi e il pattern AN-

Tabella II - Caratteristiche cliniche e sierologiche dei pazienti positivi per gli anticorpi anti-catepsina G.

Pazienti	Sesso	Età	Forma Diffusa	Forma Limitata	IMPEGNO CLINICO					Positività Anticorpale	ANCA (IFI)
					Raynaud	Cardiaco	Polmonare	Renale	Esofageo		
BA	F	41	-	+	+	+	+	-	+	Topo-I	P-ANCA
BI	F	48	-	+	+	-	+	-	+	ACA	neg
CA	F	72	-	+	+	+	+	-	+	Topo-I	neg
CL	F	53	+	-	+	-	-	-	+	Topo-I	neg
CE	F	41	-	+	+	-	+	-	-	Topo-I	neg
CP	F	63	+	-	+	-	+	-	+	Topo-I	neg
CA	M	66	+	-	+	-	-	+	+	Topo-I	P-ANCA
CC	F	50	-	+	+	-	+	+	-	Topo-I	ANCA atipico
CL	M	60	+	-	+	+	+	-	-	Topo-I	neg
CG	F	56	+	-	+	-	-	-	-	Topo-I	ANCA atipico
DF	F	42	+	-	+	+	+	-	+	Topo-I	neg
LL	F	52	-	+	+	+	+	-	-	ACA	neg
NQ	F	48	+	-	+	-	+	-	-	Topo-I	ANCA atipico
PA	F	75	-	+	+	-	+	-	-	Topo-I	ANCA atipico
RV	F	43	-	+	+	-	+	+	+	Topo-I	neg
VO	F	64	-	+	+	-	+	+	+	ACA	neg

CA atipico in 4/16 (25%), mentre 10/16 (62,5%) erano negativi.

Gli ANA sono risultati positivi in 113 (98,3%) pazienti sclerodermici. Tra questi 38 (33%) presentavano l'ACA, 76 (66,1%) l'anti-topoisomerasi I, 7 (6,1%) l'anti-SSA/Ro, 1 (0,9%) l'anti-SSB/La ed 1 (0,9%) l'anti-U1-RNP. Nessun altro anticorpo anti-ENA né l'anti-DNA nativo sono stati ritrovati nei pazienti con ScS. L'anticorpo anti-topoisomerasi I era positivo in 13/16 (81,2%) sieri positivi per anti-catepsina G e l'anti-centromero in 3/16 (18,7%).

Il confronto statistico tra la frequenza degli anticorpi anti-catepsina G nei pazienti con ScS e quella nei controlli sani è risultato statisticamente significativo ($p=0,02$).

I risultati delle correlazioni tra anticorpi anti-catepsina G e caratteristiche cliniche e sierologiche dei pazienti sono illustrati in tabella III, dove si può osservare che non è stata ritrovata alcuna correlazione significativa.

DISCUSSIONE

Questo lavoro ricerca e rileva gli anticorpi anti-catepsina G nella ScS. Si tratta di anticorpi specifici per una serin proteasi di peso molecolare 28,8 kDa, che si trova nei granuli azzurofilo dei neutrofili. La catepsina G è un enzima attivante diverse cellule

che esprimono recettori per la trombina come le piastrine e le cellule endoteliali. È stato dimostrato che questa proteina agisce riducendo la dilatazione vascolare con un meccanismo simile a quello della trombina e della tripsina (53), e che ha inoltre attività battericida (54).

Gli anticorpi anti-catepsina G sono stati da noi ritrovati per la prima volta con frequenza significativa nella ScS. A differenza degli ANCA maggiori specifici per PR3 ed MPO, essi non sono risultati associati significativamente ad alcun quadro fluoroscopico. Infatti il pattern C-ANCA non era presente in nessuno dei sieri positivi per anti-catepsina G, il P-ANCA è stato rilevato solo nel 12,5% dei casi e nel 25% si è evidenziato un particolare quadro caratterizzato da un'intensa e grossolana colorazione perinucleare dei granulociti fissati in etanolo e dall'assenza di fluorescenza nei granulociti fissati in formalina. In accordo con le linee guida internazionali quest'ultimo quadro è stato definito ANCA atipico. Questi risultati rispecchiano le osservazioni di altri autori (12-20) che come noi hanno ricercato ANCA diversi dall'anti-PR3 e dall'anti-MPO senza trovare corrispondenza con ben definiti quadri fluoroscopici. Inoltre tali dati attribuiscono all'ELISA il valore di metodo ideale per la determinazione degli ANCA minori. È interessante anche osservare che il quadro ANCA atipico, presente complessivamente nel 15,7% dei sieri di pazienti con ScS, per le sue particolari carat-

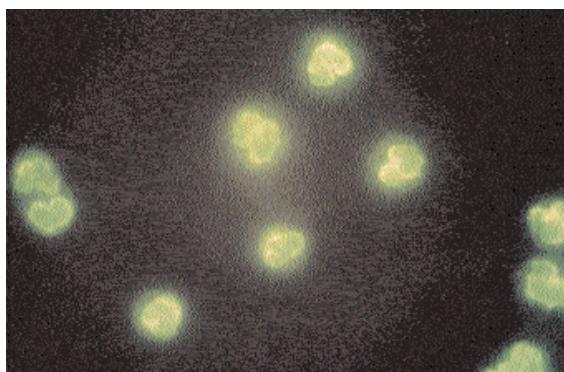


Figura 1 - IFI su granulociti neutrofili umani fissati in etanolo. È visibile un'intensa e grossolana colorazione perinucleare. (1000x)

teristiche fluoroscopiche (Fig. 1) potrebbe essere oggetto di ulteriore approfondimento nell'ambito dello studio degli ANCA nella ScS.

La prevalenza degli anticorpi anti-catepsina G ritrovata nei nostri pazienti è risultata maggiore rispetto a quella rilevata da Uesugi e coll. (14), probabilmente a causa del numero maggiore di pazienti da noi esaminati (115 *versus* 22). La nume-

rosità della casistica potrebbe anche aver contribuito a rendere significativa tale prevalenza anticorpale nella ScS.

Per quanto riguarda il significato clinico della presenza degli anti-catepsina G nella ScS, possiamo dire che essi non sono risultati associati significativamente né ad una forma clinica di ScS, né ad uno dei principali impegni della malattia come quello polmonare, esofageo, renale o cardiaco. Inoltre anche l'associazione con i più frequenti ANA specifici della ScS, vale a dire con l'anti-centromero e l'anti-topoisomerasi I, è risultata non significativa. In accordo con la letteratura, che ha evidenziato nel LES una correlazione degli anticorpi anti-catepsina G con l'attività della malattia (18,20), rimane da indagare l'eventuale associazione di tali anticorpi con la fase di attività della malattia sclerodermica. Tuttavia tale correlazione risulta attualmente difficile poiché gli indici di attività della sclerodermia non sono ancora ben definiti.

Al presente quindi possiamo solo sostenere che gli anticorpi anti-catepsina G sono significativamente frequenti nella ScS; rimane ancora da chiarire il significato della loro presenza in tale patologia.

RIASSUNTO

Scopi del lavoro: ci siamo proposti di valutare la prevalenza ed il significato clinico nella sclerosi sistemica (ScS) degli anticorpi specifici per la catepsina G.

Metodi: per la ricerca degli anticorpi anti-catepsina G è stata utilizzata una metodica ELISA "home made"; inoltre tutti i sieri sono stati testati anche con l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su granulociti fissati in etanolo ed in formalina.

Risultati: gli anti-catepsina G sono stati trovati in 16 (13,9%) sieri di pazienti con ScS, 7 affetti da forma diffusa e 9 da limitata. Tali anticorpi presentavano una prevalenza significativa ($p=0,02$) mentre non erano associati ad alcuna caratteristica clinica o sierologica. Con l'IFI sono stati rilevati 2 patterns (12,5%) P-ANCA, 4 (25%) ANCA atipico e 10 (62,5%) negatività.

Conclusioni: Gli anticorpi anti-catepsina G sono risultati significativamente presenti nella ScS. In considerazione della mancanza di associazione con caratteristiche cliniche ed autoanticorpali ben definite, rimane da chiarire il significato della loro presenza in tale patologia.

Parole chiave - Anti-catepsina G, sclerosi sistemica, ANCA.

Key words - *Anti-cathepsin G, systemic sclerosis, ANCA.*

BIBLIOGRAFIA

1. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Van Es LA. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: a new tool for diagnosis and a marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; ii: 425-9.
2. Hagen EC, Mohamed RD, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 1998; 53: 743-53.
3. Savige 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.
4. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651-7.
5. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, Lim-

- burg PC, van der Giessen M, Huitemsa MG, et al. Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different form of vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1264-72.
6. Kuwana T, Sato Y, Saka M, Kondo Y, Miyata M, Obara K, et al. Anti-cathepsin G antibodies in the sera of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2000; 35: 682-9.
 7. Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, Noel NH, Reumaux D, Erlinger S, Grunfeld JP, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 79-84.
 8. Sobajima J, Ozaki S, Okazaki T, Osakada F, Sumita S, Mori K, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in ulcerative colitis: anti-cathepsin G and a novel antibody correlate with a refractory type. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 120-4.
 9. Kossa K, Coulthart A, Ives CT, Pusey CD, Hodgson HJF. Antigen specificity of circulating anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 783-9.
 10. Lindgren S, Nilsson S, Nasberger L, Verbaan H, Wieslander J. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic liver disease: Prevalence, antigen specificity and predictive value for diagnosis of autoimmune liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 437-42.
 11. Mulder AHL, Horst G, Van Leeuwen, Limburg PC, Kallenberg CGM. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1054-60.
 12. de Bandt M, Meyer O, Haim T, Kahn MF. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis patients. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 38-43.
 13. Savige JA, Chang L, Wilson D, Buchanan RRC. Autoantibodies and target antigens in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. *Rheumatol Int* 1996; 16: 109-14.
 14. Uesugi H, Ozaki S, Sobajima J, Osakada F, Shirakawa H, Yoshida M, et al. Prevalence and characterization of novel P-ANCA, antibodies to the High Mobility Group non-histone Chromosomal Proteins HMG1 and HMG2, in systemic Rheumatic Diseases. *J Rheumatol* 1998; 25: 703-9.
 15. 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.
 16. Nishiya K, Chikazawa H, Hashimoto K, Miyawaki S. Antineutrophil cytoplasmic antibody in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1999; 18: 268-71.
 17. Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA, Mrowka C, Gross WL. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 18: 633-7.
 18. Spronk PE, Bootsma H, Horst G, Huitema MG, Limburg PC, Tervaert JW, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 625-31.
 19. Nishiya K, Chikazawa H, Nishimura S, Hisakawa N, Hashimoto K. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody in patients with systemic lupus erythematosus in unrelated to clinical features. *Clin Rheumatol* 1997; 16: 70-5.
 20. Zhao MH, Liu N, Zhang YK, Wang HY. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and their target antigens in Chinese patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2821-4.
 21. Lesarve P, Nusbaum P, Halbwachs-Mecarelli L. Methods of detection of anticathepsin G autoantibodies in human. *Adv Exp Med Biol* 1993; 336: 257-61
 22. Wong SN, Shah V, Dillon MJ. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Arch Dis Child* 1998; 79: 246-50.
 23. Zhao MH, Lockwood CM. Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 397-402.
 24. Nassberger L, Sjöholm AG, Jonsson H, Sturfelt G, Akesson A. Autoantibodies against neutrophil cytoplasmic components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 380-3.
 25. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: a Rheumatologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 175-9.
 26. Endo H, Hosono T, Kondo H. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in 6 patients with renal failure and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994; 21: 864-70.
 27. Akimoto S, Ishikawa O, Tamura T, Miyachi Y. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 1996; 134: 407-10.
 28. Kiraz S, Simsek H, Ertenli I, Benekli, Kadayifci A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 1996; 15: 519-23.
 29. Locke IA, Worrall JG, Leaker B, Black CM, Cambridge G. Autoantibodies to myeloperoxidase in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997; 24: 86-9.
 30. Merkel PA, Polisson RP, Chang Y, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann Intern Med* 1997; 126: 866-73.
 31. Choi HK, Slot MC, Pan G, Weissbach CA, Niles JL, Merkel PA. Evaluation of antineutrophil cytoplasmic antibody seroconversion induced by minocycline, sulfasalazine, or penicillamine. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2488-92.
 32. Chikazawa H, Nishiya K, Matsumori A, Hashimoto K. Immunoglobulin isotypes of anti-myeloperoxidase and anti-lactoferrin antibodies in patients with collagen diseases. *J Clin Immunol* 2000; 20: 279-86.
 33. Ruffatti A, Sinico RA, Radice A, Ossi E, Cozzi F, Tonello M, et al. Autoantibodies to proteinase 3 and myeloperoxidase in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2002; 29: 918-23.
 34. Pratesi F, Moscato S, Sabbatini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies specific for α -

- enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol* 2000; 27: 109-15.
35. Bellisai F, Morozzi G, Bacarelli MR, Radice A, Sinico RA, Wieslander J, et al. Anticorpi anti-proteinasi 3 nella sclerosi sistemica (ScS) diffusa con impegno renale normotensivo: possono essere suggestivi di una sovrapposizione tra ScS e vasculite idiopatica? *Reumatismo* 2001; 53: 33-9.
 36. Vázquez-Del Mercado M, Mendoza-Topete A, Best-Aguilera CR, Garcia-De La Torre I. Diffuse alveolar haemorrhage in limited cutaneous systemic sclerosis with positive perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Rheumatol* 1996; 23: 1821-3.
 37. Carvajal I, Bernis C, Sanz P, Garcia A, Garcia-Vadillo A, Traver JA. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and systemic sclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 576-7.
 38. Omote A, Muramatsu M, Sugimoto Y, Hosono S, Murakami R, Tanaka H et al. Myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies-related scleroderma renal crisis treated with double-filtration plasmapheresis. *Intern Med* 1997; 36: 508-13.
 39. Hillis GS, Khan IH, Simpson JG, Rees AJ. Scleroderma, D-penicillamine treatment, and progressive renal failure associated with positive antimyeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 279-81.
 40. Kyndt X, Ducq P, Bridoux F, Reumaux D, Makdassi R, Gheerbrant, et al. Glomérulonéphrite extra capillaire avec anticorps anti-myeloperoxidase chez 2 malades ayant une sclérodémie systémique traitée par D-penicillamine. *Presse Med* 1999; 28: 67-70.
 41. Anders HJ, Wiebecke B, Haedecke C, Sanden S, Combe C, Schlöndorff D. MPO-ANCA-Positive crescentic glomerulonephritis: A distinct entity of scleroderma renal disease? *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 3E.
 42. Villaverde V, Balsa A, Cabezas JA, Fernández-Prada M, Torre A, Mola EM. Normotensive renal failure in a patient with systemic sclerosis and p-antineutrophil cytoplasmic autoantibodies which developed into Paget's disease of bone after immunosuppressive therapy. *Rheumatology* 1999; 38: 190-1.
 43. Katrib A, Sturges A, Bertouch JV. Systemic sclerosis and antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated renal failure. *Rheumatol Int* 1999; 19: 61-3.
 44. Yamashita K, Yorioka N, Kyuden Y, Naito T, Tanji C, Ueda C, et al. A case of CREST syndrome and myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 2000; 53: 296-300.
 45. Maes B, Van Mieghem A, Messiaenen T, Kuypers T, Van Damme B, Vanrenterghem Y. Limited cutaneous systemic sclerosis associated with MPO-ANCA positive renal small vessel vasculitis of the microscopic polyangiitis type. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: E16.
 46. Harashima S, Yoshizawa S, Horiuchi T, Nakashima H, Niho Y, Kusaba T, et al. A case of systemic sclerosis with crescentic glomerulonephritis associated with perinuclear-antineutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA). *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 1999; 22: 86-92.
 47. Martinez Ara J, Picazo ML, Torre A, Pascual D, Diaz Rodriguez C, Rinon C. Progressive systemic sclerosis associated with anti-myeloperoxidase ANCA vasculitis with renal and cutaneous involvement. *Nephrol* 2000; 20: 383-6.
 48. Mizutani A, Tanaka I, Katayama M, Oshima H, Komatsu Y, Asano S, et al. A case of myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA) related glomerulonephritis associated with systemic sclerosis treated by steroid pulse therapy: a case report. *Ryumachi* 2000; 40: 828-32.
 49. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
 50. Medsger TA, Silman AJ, Steen VD, Black CM, Akeson A, Bacon PA, et al. A disease severity scale for systemic sclerosis: development and testing. *J Rheumatol* 1999; 26: 2159-67.
 51. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1989; 97 Suppl:12-3.
 52. Radice A, Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA. Contribution of immunofluorescence to the identification and characterization of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. The role of different fixatives. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 707-12.
 53. Goel MS, Diamond SL. Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 2093-8.
 54. Miyasaki KT, Bodeau AL, Pohl J, Shafer WM. Bactericidal activities of synthetic human leukocyte cathepsin G-derived antibiotic peptides and congeners against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga sputigena*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2710-5.