

# L'epatite autoimmune

D. Villalta

Allergologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, A.O. "S. Maria degli Angeli", Pordenone

## Riassunto

L'epatite autoimmune (EAI) è una malattia cronica di origine sconosciuta, caratterizzata sul piano istologico da una epatite da interfaccia e a livello serico dalla presenza di ipergammaglobulinemia e di autoanticorpi circolanti, la quale, in genere, risponde bene alla terapia immunosoppressiva.

Classicamente viene suddivisa in due tipi sulla base del profilo immunologico: l'EAI di tipo 1 è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi anti-nucleo (ANA) e anti-muscolo liscio (ASMA), mentre l'EAI di tipo 2 si contraddistingue per la presenza di autoanticorpi anti-mitosomi epatici e renali (anti-LKM1) e autoanticorpi anti-citosol epatico di tipo 1 (anti-LC1). Gli autoanticorpi rivolti verso l'antigene epatico solubile (anti-SLA) sono stati originariamente associati a un terzo tipo di EAI, ma dal momento che tale sottotipo di EAI non si diversifica né per l'andamento clinico, né per quello prognostico rispetto agli altri 2 tipi non è stato riconosciuto come entità nosologica separata dall'*International Autoimmune Hepatitis Group*.

Anche se gli autoanticorpi hanno un ruolo fondamentale nella diagnosi e nella classificazione dell'EAI, essi, con la sola eccezione degli anti-SLA, mancano di specificità e non sembrano avere un ruolo prognostico.

Presenza e titolo autoanticorpale, infine, non sono in genere correlati con l'attività della malattia e con l'*outcome*, anche se alcuni studi avrebbero evidenziato una correlazione tra il titolo degli anti-recettore dell'asialoglicoproteina (anti-ASGPR) e l'attività della malattia, e tra la presenza degli anti-SLA e degli anti-LC1 e l'*outcome* della stessa. Tali dati, comunque, attendono conferma da ulteriori studi prospettici condotti su un'ampia casistica.

## Summary

### Autoimmune hepatitis

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic progressive disease of unknown origin, characterized by interface hepatitis, hypergammaglobulinemia and tissue autoantibodies, which is responsive to immunosuppressive therapy in most cases.

Classically AIH is subdivided in two types on the basis of the immunological profile; type 1 AIH is characterized by anti nuclear (ANA) and anti smooth muscle (SMA) antibodies, while type 2 AIH is marked by antibodies to liver and kidney microsomes (LKM1) and liver cytosol type 1 antigen (LC1). Anti-soluble liver-antigen (anti-SLA) antibodies were at the beginning associated with type 3 AIH, but it is now clear that most patients with anti-SLA in reality have either type 1 or type 2 AIH, and therefore type 3 AIH is not recognized by the International Autoimmune Hepatitis Group.

Even if serum autoantibodies have a central role in the diagnosis and classification of AIH, they generally lack both of disease and tissue specificity and their pathogenetic involvement remains unclear.

Finally, with the possible exceptions of anti-SLA, anti-LC1 and anti-asialoglycoprotein receptor (anti-ASGPR) antibodies, serum autoantibody positivity and titer do not seem to associate with disease activity and/or outcome.

*Key words.* Autoimmune hepatitis: AIH; anti-nuclear autoantibodies: ANA; anti-smooth muscle autoantibodies: ASMA; anti-liver and kidney microsomes: LKM; anti-cytosol type 1 antigen: LC1; anti-soluble liver antigen: SLA.

## Introduzione

L'epatite autoimmune (EAI) fu descritta per la prima volta da Waldenström<sup>1</sup>, quando riportò il caso di una giovane donna affetta da una forma cronica di epatite ed ittero, incremento delle  $\gamma$ -globuline e amenorrea, la quale progredì in cirrosi. In seguito risultò evidente come l'EAI si trovasse spesso associata ad altre malattie autoimmuni e, per il frequente riscontro della presenza di autoanticorpi anti-nucleo (ANA), fu definita "epatite lupoide"<sup>2</sup>. Tale termine fu in seguito abbandonato in quanto poteva generare confusione, dal momento che l'EAI non è parte delle manifestazioni d'organo del lupus eritematoso sistemico.

La identificazione e la caratterizzazione negli anni successivi di diversi autoanticorpi associati a tale malattia hanno rappresentato un importante avanzamento sia nella diagnosi che nella classificazione della EAI<sup>3</sup>. E' ora chiaro, infatti, che la EAI non rappresenta una entità omogenea e che i marcatori immunologici sono importanti per discriminare i vari sottotipi<sup>4</sup>.

## Definizione e cenni di epidemiologia, istologia e clinica

L'EAI viene definita come una epatite cronica caratterizzata da infiltrato infiammatorio prevalentemente periportale, con presenza di ipergammaglobulinemia e autoanticorpi circolanti, la quale, nella maggior parte dei casi, risponde al trattamento immunosoppressivo.

C'è una forte prevalenza del sesso femminile rispetto a quello maschile (3.5:1)<sup>5</sup> e una associazione con l'aplotipo HLA A1-B8-DR3 (DRB1\*0301, DRB3\*0101) o DR4 (DRB1\*0401, DRB4\*0103)<sup>6</sup>. Recentemente Czaja e coll. hanno riportato che anche l'allele HLA DRB1\*13 (DR 6) è un fattore di rischio indipendente per EAI in pazienti bianchi nordamericani<sup>7</sup>,

analogamente a quanto precedentemente dimostrato per la popolazione sudamericana<sup>8,9</sup>.

L'incidenza della EAI in Nord Europa è di 1.9 casi per 100.000 abitanti/anno e la prevalenza oscilla tra 13 e 20 casi per 100.000 abitanti<sup>10</sup>. Quest'ultima sembra essere decisamente più bassa in Giappone, con soli 0.08 – 0.15 casi per 100.000 abitanti<sup>11</sup>.

Istologicamente la EAI è caratterizzata dalla presenza della "epatite da interfaccia" in cui è presente un infiltrato infiammatorio linfoplasmacitico, che può estendersi dal tratto portale nel lobulo epatico. La presenza di plasmacellule viene considerata una caratteristica tipica della malattia, anche se circa 1/3 dei pazienti con EAI presenta solo poche o nessuna plasmacellula<sup>12</sup>. Altro elemento che frequentemente si riscontra nella biopsia è rappresentato dalla presenza delle "rosette di epatociti", costituite da epatociti rigonfi, separati da altri epatociti danneggiati da infiammazione e da stroma collassato.

Clinicamente l'EAI non è distinguibile da altre epatopatie. In circa il 25% dei casi si può riscontrare un inizio acuto e in rari casi addirittura fulminante<sup>13</sup>. Nella maggior parte dei casi, comunque, la presentazione clinica non differisce da quella di altre forme di epatite cronica, dove astenia e mialgia sono i sintomi più comuni, ma in cui altri sintomi quali, ittero, dolenza del quadrante superiore destro, eritema palmare, spider nevi o altri sintomi associati a cirrosi possono essere presenti. In una certa percentuale di casi, infine, il paziente può essere completamente asintomatico e la diagnosi di EAI posta in seguito a scoperta occasionale di alterazioni biochimiche e presenza di autoanticorpi in corso di accertamenti eseguiti per altri sospetti diagnostici.

## Diagnosi di EAI

In assenza di caratteristiche patogenomiche e di un

**Tabella I.** Criteri diagnostici dell'epatite autoimmune, secondo l'*International Autoimmune Hepatitis Group*<sup>14</sup>. ANA: autoanticorpi anti-nucleo; ASMA: autoanticorpi anti-muscolo liscio; LKM1: autoanticorpi anti-microsomi epatiti e renali, AMA: autoanticorpi anti-mitocondri.

Criteri diagnostici dell'epatite autoimmune	
Assenza di malattie genetiche del fegato	- Normale fenotipo dell' $\alpha$ 1-antitripsina - Normale concentrazione serica di ceruloplasmina, ferro e ferritina
Assenza di infezioni virali	- Assenza dei markers dell'infezione da virus A, B, C.
Assenza di possibile danno epatico da farmaci o da alcol	- Ingestione di alcol < 25 g/giorno - Non recente uso di farmaci epatotossici
Dati di Laboratorio	- Incremento delle aminotransferasi - $\gamma$ -globuline o livello delle IgG $\geq$ 1.5 volte il valore normale
Autoanticorpi	- ANA, ASMA o LKM1 a titolo $\geq$ 1:80 negli adulti e 1:20 nei bambini. - Assenza di AMA
Istologia	- Epatite da interfaccia - Assenza di lesioni delle vie biliari, granulomi o reperti suggestivi di altre patologie a interessamento epatico

**Tabella II.** Sistema di punteggio per la diagnosi di epatite autoimmune revisionato, secondo l'*International Autoimmune Hepatitis Group*<sup>15</sup>.

Condizione	Livello decisionale	Punteggio
<i>Sesso Femminile</i>		+2
<i>Ratio ALP:ALT</i>	<1.5 1.5 – 3.0 >3.0	+2 0 -2
<i>γ-globuline o IgG superiori alla norma</i>	>2 1.5 – 2.0 1.0 . 1.5 <1	+3 +2 +1 0
<i>ANA, ASMA o LKM1</i>	> 1:80 1:80 1:40 < 1:40	+3 +2 +1 0
<i>Positività AMA</i>		-4
<i>Marcatori di epatite virale</i>	Presenti Assenti	-3 +3
<i>Assunzione di farmaci epatotossici</i>	Si No	-4 +1
<i>Consumo di alcol giornaliero</i>	< 25 g/giorno > 60 g/giorno	+2 -2
<i>Istologia epatica</i>	Epatite da interfaccia Rosette delle cellule epatiche Nessuna delle due Alterazioni vie biliari Altre forme	+3 +1 -5 -3 -3
<i>Presenza di altre malattie autoimmuni</i>		+2
<i>Positività per altri marcatori immunologici</i>	(anti-SLA, anti-actina, anti-LC1, P-ANCA)	+2
<i>HLA DR3 o DR4</i>		+1
<i>Risposta alla terapia</i>	Completa Recidive	+2 +3
<b>Interpretazione dello score</b>		
<b>Pre-trattamento</b>	EAI definita EAI probabile	<b>&gt;15</b> <b>10-15</b>
<b>Post-trattamento</b>	EAI definita EAI probabile	<b>&gt;17</b> <b>12-17</b>

*gold standard*, la diagnosi di EAI viene posta dopo esclusione di altri possibili cause di epatopatia cronica e la verifica della presenza di alcuni criteri diagnostici, come stabilito dall'*International Autoimmune Hepatitis Study Group* (IAHG)<sup>14</sup> (Tab. I). Lo stesso Gruppo ha messo a punto un sistema di punteggio per la diagnosi di EAI<sup>15</sup>, rivisto nel 1999 (Tab. II). Originariamente proposto come sistema per selezionare gruppi omogenei di pazienti a scopo di ricerca clinica, il sistema di punteggio si è rivelato uno strumento utile nella pratica clinica per la diagnosi dei casi atipici o che presentano sovrapposizioni con altre patologie, in particolare con le patologie autoimmuni del tratto biliare, quali la cir-

rosi biliare primitiva (CBP) e la colangite sclerosante primitiva (CSP). Un punteggio complessivo >15 (o >17 in caso di pazienti in trattamento) è indicativo di una diagnosi certa di EAI; un punteggio <10 (o <12 nel caso di pazienti in trattamento) rende la diagnosi improbabile. Punteggi intermedi sono indicativi di diagnosi probabile.

La validità del sistema di punteggio proposto dall'IAHG è stato comprovato da diversi lavori<sup>15-21</sup>, dai quali risulta come la sensibilità per una diagnosi probabile o certa di EAI è compresa tra il 97% e il 100%, mentre la specificità nell'escludere la presenza di EAI in pazienti con epatite cronica C è compresa tra il 66%

e il 92%. Meno efficace, invece, appare il sistema nella sua capacità di discriminare tra EAI e altre patologie autoimmuni del fegato a impronta colestatica, con specificità non superiori al 60 – 65%.

### Gli autoanticorpi nella EAI

L'EAI è tradizionalmente associata a tre autoanticorpi principali, che sono gli ANA, gli autoanticorpi anti-muscolo liscio (ASMA), che definiscono la EAI di tipo 1 (EAI-1), e gli autoanticorpi anti-mitosomi del fegato e rene (anti-LKM), che definiscono la EAI di tipo 2 (EAI-2). Negli ultimi anni, inoltre, sono state identificate altre specificità autoanticorpali correlate con la EAI, quali gli autoanticorpi anti-recettore della asialoglicoproteina (anti-ASGPR), anti-citosol epatico di tipo 1 (anti-LC1) e anti-antigene epatico solubile (anti-SLA).

Dei singoli autoanticorpi verranno di seguito riportate le principali caratteristiche e il loro significato diagnostico e/o prognostico in corso di EAI.

#### Autoanticorpi anti-nucleo (ANA)

La positività ANA rappresenta un criterio chiave per la diagnosi e classificazione della EAI<sup>22</sup>. A titolo  $\geq 1:160$ , infatti, gli ANA si riscontrano nel 70-80% dei pazienti con EAI-1, spesso in associazione con gli ASMA. Dal momento che tali autoanticorpi possono essere rilevati in altre epatopatie autoimmuni quali la CBP, o non autoimmuni quali le epatiti farmaco-indotte, le epatiti alcoliche, l'epatite da HCV, anche se in genere a titolo basso, non sono un marcatore specifico.

Gli antigeni verso cui sono rivolti tali autoanticorpi nella EAI-1 sono molteplici, quali il DNA a doppia o singola elica (ssDNA, dsDNA), gli istoni, altri antigeni cromatinici, le piccole ribonucleoproteine nucleari (smRNP), i centromeri, la laminina e la ciclina A<sup>23-26</sup>. Il *pattern* fluoroscopico più frequente è quello omogeneo (circa il 70% dei casi), ma anche il *pattern speckled* o altri *pattern* possono essere rilevati in pazienti con EAI. Né il titolo, né il *pattern* ANA, però, sembrano correlare con il decorso, la prognosi e la progressione della malattia<sup>27</sup>.

#### Autoanticorpi anti-muscolo liscio (ASMA)

La associazione tra EAI-1 e ASMA è riconosciuta sin dal 1965, quando Johnson e coll.<sup>28</sup> identificarono questi autoanticorpi, tramite metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) su sezioni di tessuto di roditore. Gli ASMA si riscontrano nel 70-85% dei pazienti con EAI-1<sup>29</sup> e in circa il 70% dei casi sono associati agli ANA. Analogamente a quest'ultimi non sono specifici per EAI-1 in quanto si possono ritrovare in altre malattie epatiche, in alcune malattie reumatiche e in alcune forme infettive, sia acute che croniche, anche se generalmente a basso titolo<sup>30</sup>. Gli ASMA rappresentano una categoria eterogenea di autoanticorpi che possono riconoscere diversi autoantigeni quali vimentina, desmi-

na, citocheratine, tubulina, actina. La positività ASMA dovuta alla presenza di anticorpi diretti verso la forma filamentosa dell'actina (F-actina), sembra essere quella maggiormente specifica per EAI<sup>31-33</sup>. Non esiste, comunque, un *gold standard* per la loro determinazione e le varie metodiche di volta in volta proposte (IFI, ELISA, Immunodot, Western blot) non sembrano produrre risultati fra loro altamente concordanti, come anche da noi recentemente dimostrato<sup>34</sup>. In ogni caso la metodica IFI su sezioni criostatizzate di tessuto di roditore sembra rappresentare ancora la metodica d'elezione per lo screening degli ASMA. Il rilevamento di un *pattern* fluoroscopico a livello renale in cui, oltre alla positività dei vasi (ASMA-V), siano evidenti anche positività dei glomeruli (ASMA-G) e del peritubulo (ASMA-T) è infatti suggestivo per presenza di autoanticorpi anti-F actina<sup>22,35</sup>. La successiva conferma della positività per anti-F actina ottenuta con un metodo diverso (ELISA o IFI su cellule embrionali di aorta di ratto- VSM47) aumenta il valore predittivo positivo per EAI-1<sup>34</sup>.

Czaja e collaboratori<sup>36</sup> hanno suggerito che gli autoanticorpi anti-actina sono associati alla presenza dell'allele HLA DRB1\*0301, ad un più precoce inizio e ad un più severo decorso della malattia, ma tale osservazione attende ulteriori conferme. Anche se il titolo degli ASMA, infine, può decrescere fino a scomparire durante la terapia immunosoppressiva, né il titolo né la modifica dello stesso durante le prime fasi della terapia sembra essere in grado di predire il decorso e l'*outcome* della malattia<sup>37</sup>.

#### Autoanticorpi anti antigeni microsomiali e renali (anti-LKM)

La presenza di autoanticorpi anti-LKM fu descritta per la prima volta da Rizzetto e coll.<sup>38</sup> nel 1973. Studi successivi hanno dimostrato come essi rappresentino una famiglia eterogenea di autoanticorpi e, in base all'antigene bersaglio, vengono classificati in tre tipi chiamati anti-LKM1, 2 e 3. Nel 1981 il citocromo P4502D6 (CYP2D6)<sup>39,40</sup> fu identificato come l'autoantigene degli anti-LKM1. Successivamente il citocromo P4502C9 e l'UDP-glucosiltransferasi sono stati identificati rispettivamente come i bersagli degli anti-LKM2 e anti-LKM3<sup>41</sup>. Mentre gli anti-LKM2 sono stati associati ad epatiti farmaco-indotte, gli anti-LKM1 sono stati associati all'EAI-2 e ne rappresentano il marcatore caratteristico, usualmente non associato alla presenza di ANA e/o ASMA.

I pazienti affetti da EAI-2 non si contraddistinguono solo per il diverso profilo autoanticorpale, ma anche per le caratteristiche cliniche. Essi, infatti, sono spesso giovani e presentano una forma più aggressiva di epatite, la quale si associa frequentemente con altre patologie autoimmuni, dimostrando, quindi, come l'EAI-2 rappresenti un fenotipo distinto dall'EAI-1. Anche se l'EAI-2 è meno frequente dell'EAI-1, rappresentando il 20% delle EAI in Europa e solo il 4% di quelle

segnalate negli USA, nei bambini essa rappresenta 1/3 dei casi totali<sup>30</sup>.

Gli anti-LKM1 sono riscontrati in circa il 90% dei pazienti con EAI-2<sup>42</sup> e sono facilmente identificabili con test di IFI su tessuti murini, dove è evidente una colorazione omogenea del tessuto epatico e a livello renale una colorazione del terzo distale del tubulo prossimale. A differenza degli anticorpi anti-mitocondrio (AMA), essi non colorano le cellule parietali gastriche e quindi risulta abbastanza agevole distinguere le due diverse specificità autoanticorpali. Nei casi dubbi, comunque, è possibile eseguire la conferma con test ELISA e Immunodot, nei quali come substrato è utilizzato il CYP2D6. Gli anti-LKM1, comunque, non sono specifici dell'EAI-2, in quanto possono essere riscontrati nel 5-10% dei pazienti con epatite cronica da HCV<sup>43</sup>, dove rappresentano un marcatore di severità, nonché di predisposizione a reazioni avverse durante il trattamento con IFN<sup>44,45</sup>. L'identificazione di diverse specificità epitopiche nella molecola del CYP2D6, ha dimostrato come i profili autoanticorpali anti-LKM1 differiscano tra epatite cronica da HCV e EAI-2, e, in particolare, come la risposta verso l'epitopo localizzato tra gli aminoacidi 257 e 269 risulti più specifica per EAI-2 e quindi come tale sottogruppo di anti-LKM1 possa in futuro rappresentare un marcatore di specificità per EAI-2<sup>46</sup>.

L'omologia tra alcune sequenze aminoacidiche virali (HSV, CMV, HCV) e la molecola del CYP2D6 ha fatto ipotizzare un meccanismo di mimicrismo molecolare alla base della sintesi degli anti-LKM1<sup>29,47</sup>. L'espressione del CYP2D6 sulla membrana degli epatociti<sup>48</sup>, infine, ha fatto ipotizzare un ruolo patogenetico di tali autoanticorpi, sia tramite un meccanismo legato alla lisi cellulare successiva alla fissazione del complemento (ADCC), sia mediante un meccanismo cellulomediato, come dimostrato dalla presenza di linfociti T CD4+ LKM-specifici infiltranti il tessuto epatico nella EAI-2<sup>49,50</sup>. Ulteriori studi, comunque, sono necessari per convalidare tale ipotesi.

Gli anticorpi anti-LKM3, riscontrati in circa il 6-14% dei pazienti con epatite D<sup>51</sup> possono essere riscontrati nel 10-20% dei pazienti con EAI-2, spesso ad un titolo più alto che nella epatite D<sup>52</sup>. A differenza degli anti-LKM1, dove con il metodo della IFI si riscontra solo una colorazione del tessuto epatico e renale, gli anti-LKM3 possono essere responsabili di una colorazione anche del tessuto pancreatico, surrenalico, tiroideo e gastrico. Il metodo di Western blot, infine, rivela la presenza di più bande attorno ai 55 kDa.

#### **Autoanticorpi anti citosol epatico tipo 1 (anti-LC1)**

Gli anti-LC1 sono stati identificati alla fine degli anni '80<sup>53</sup> e sono distinguibili all'IFI su tessuti murini in quanto colorano solo il tessuto epatico, in maniera più intensa nella zona periportale. La zona adiacente alla vena centrolobulare, invece, è scarsamente o per nulla colorata, evidenziando una non uniforme distribuzione

dell'autoantigene, che è stato identificato nella Forminotransferasi-ciclodidaminasi (FTCD), un enzima bifunzionale dove gli epitopi autoantigenici sono localizzati prevalentemente sul dominio della FT<sup>54</sup>.

Gli autoanticorpi anti-LC1 sono stati riscontrati in circa il 50% dei pazienti con EAI-2, dove però la positività all'IFI è nella maggior parte dei casi coperta dalla positività anti-LKM, per cui, per una corretta identificazione di tale specificità autoanticorpale, è bene utilizzare metodi ELISA o di Immunodot. Meno frequentemente gli anti-LC1 si trovano associati ad ANA e ASMA in pazienti con EAI-1 oppure a pazienti con epatite cronica da HCV. Essi possono essere il solo marcatore sierologico nel 10% delle EAI<sup>29</sup>.

Pazienti anti-LC1 positivi tendono ad avere un'età più bassa alla diagnosi, nonché a presentare valori più elevati di AST. Il titolo anticorpale, infine, sembra correlare con l'attività della malattia e quindi per tali autoanticorpi può essere ipotizzato un ruolo patogenetico<sup>55</sup>.

#### **Autoanticorpi anti-antigene epatico solubile (anti-SLA)**

Gli autoanticorpi anti-SLA<sup>56</sup> e gli autoanticorpi specifici anti-fegato e pancreas (anti-LP)<sup>57</sup> furono inizialmente identificati come autoanticorpi distinti, finché Wies e coll.<sup>58</sup> dimostrarono che essi rappresentano la stessa specificità autoanticorpale e pertanto vengono anche definiti come anti-SLA/LP. Anche se più lavori hanno identificato nella *UGA suppressor tRNA-associated protein* il bersaglio di tale autoanticorpo<sup>58,59</sup>, uno studio più recente, utilizzando la tecnologia proteomica ha evidenziato che probabilmente il *target* di tale specificità autoanticorpale non è unico, ma anche molecole quali la sulfontransferasi, le  $\alpha$ -enolasi e le catalasi possono rappresentare possibili autoantigeni<sup>60</sup>.

Gli anti-SLA sono marcatori specifici di EAI-1 negli adulti, con una prevalenza variabile tra il 10 e il 50% dei casi, in base alle casistiche e ai metodi usati per la determinazione, mentre nella popolazione pediatrica sono riscontrati sia nella EAI-1 che nella EAI-2, con prevalenze oscillanti rispettivamente tra il 15 e il 50% e tra il 18 e il 44%<sup>61</sup>. La positività per anti-SLA è stata associata all'antigene HLA-DR3 e, secondo alcuni studi, i pazienti con anti-SLA presentano un andamento più grave della malattia, con un tasso più elevato di recidive dopo trattamento cortisonico<sup>62-64</sup>.

#### **Autoanticorpi anti-recettore dell'asialoglicoproteina (anti-ASGPR)**

ASGPR è una glicoproteina presente solo a livello della membrana cellulare degli epatociti. Autoanticorpi anti-ASGPR sono riscontrabili nell'88% dei pazienti con EAI<sup>65</sup>. Essi, tuttavia, non sono specifici in quanto riscontrabili anche nelle epatopatie croniche da HBV e da HCV, nelle epatopatie alcoliche e nella CBP.

A differenza di altri autoanticorpi, la presenza di anti-ASGPR sembra correlata all'attività istologica della

malattia e alla risposta al trattamento cortisonico<sup>66</sup> e, pertanto, può essere considerata come un marcatore addizionale per il monitoraggio dell'efficacia terapeutica. Nella pratica clinica, comunque, tali autoanticorpi sono scarsamente utilizzati.

### Altri autoanticorpi

Oltre a quelli sopra descritti nella EAI possono essere riscontrati altri autoanticorpi, fra i quali gli autoanticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA). Essi sono P-ANCA atipici, diversi da quelli riscontrati nelle vasculiti, in quanto in genere riconoscono autoantigeni diversi dalla mieloperossidasi e dalla proteinasi 3. Si possono riscontrare nel 70% dei casi di EAI, ma sono un marcatore aspecifico, dal momento che sono riscontrabili anche nelle epatopatie autoimmuni ad impronta colestatica, nelle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (IBD) e in altre patologie<sup>67</sup>. Essi, quindi, possono rivestire una qualche utilità diagnostica solo in caso di forte sospetto di EAI e assenza di altri marcatori autoanticorpali.

Un altro autoanticorpo che può essere rilevato nelle EAI è l'anticorpo rivolto verso l'antigene microsomiale epatico (anti-LM). Tale positività autoanticorpale, che si caratterizza per la presenza di un quadro fluoroscopico in cui è evidente la sola positività del citoplasma delle cellule epatiche e non di quelle renali, è dovuta ad autoanticorpi diretti verso il CYPIA2 e verso il CYP2A6 ed è associata alla EAI in corso di sindrome poliendocrina autoimmune di tipo 1 (APS-1). Tale patologia è legata a una mutazione del gene AIRE, il quale regola l'espressione di una moltitudine di antigeni a livello timico, tappa essenziale per il corretto svolgimento del processo di selezione clonale negativa delle cellule T-autoreattive<sup>68</sup>. Nell'APS-1 l'EAI è presente nel 10-18% dei casi e gli autoanticorpi rivolti contro il CYPIA2 sono specifici per tale malattia, anche se hanno una bassa sensibilità diagnostica<sup>69</sup>.

L'EAI *de novo* è una rara forma di epatite che insorge in trapiantati di fegato per una patologia epatica non autoimmune. Essa è stata descritta per la prima volta da Kerkar e coll.<sup>70</sup> e in essa, oltre ad autoanticorpi con specificità ANA, ASMA e LKM1, sono stati descritti degli autoanticorpi che al test IFI su tessuti murini si caratterizzano per dare a livello epatico una fluorescenza più marcata attorno alla vena centrolobulare e a livello renale per una fluorescenza "sporca" dei tubuli. Tali autoanticorpi sono stati definiti come LKM atipici (LKMA)<sup>71</sup>. Recentemente, con l'ausilio di una tecnica proteomica, Huguet e coll.<sup>72</sup> avrebbero identificato nell'anidrasa carbonica III e nella subunità  $\beta$ 1 del proteasoma i possibili *target* di tale specificità autoanticorpale.

### Conclusioni e prospettive future

Da quanto sopra riportato emerge chiaramente come il laboratorio svolga un ruolo centrale nella diagnosi

della EAI, in particolare rilevando le varie specificità autoanticorpali in essa presenti. Con la sola eccezione degli anti-SLA, comunque, tali autoanticorpi non sono specifici per EAI e non è ancora dimostrato se alcuni di essi possano rivestire un ruolo patogenetico.

E' probabile che in futuro, con l'impiego su larga scala delle tecnologie proteomiche, possano venir identificate nuove molecole bersaglio autoanticorpale<sup>73</sup> e che l'introduzione in diagnostica dei *microarray* possa concorrere a definire ampi profili autoanticorpali in grado di incrementare l'accuratezza diagnostica e di aumentare la predittività sull'*outcome* della malattia e/o sulla risposta alla terapia.

### Bibliografia

1. Waldenström J. Leber, Blutproteine und Nahrungseiweisse. Dtsch Gesellsch Verd Stoffw 1950; 15:113-9.
2. Mackay IR, Taft LI, Cowling DC. Lupoid hepatitis. Lancet 1956; 2:1323-6.
3. Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Manns MP. Autoimmunity in liver disease. Clin Rev Allergy Immunol 2000; 18:127-39.
4. Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. Gastroenterology 2001; 120:1502-17.
5. Johnson PJ, McFarlane IG, Eddleston ALWF. The natural course and heterogeneity-type chronic active hepatitis. Semin Liver Dis 1991; 11:187-96.
6. Manns MP, Krüger M. Genetics in liver diseases. Gastroenterology 1994; 106:1676-97.
7. Czaja AJ, Carpenter HA. HLA DRB1\*13 as a risk factor for type 1 autoimmune hepatitis in North American patients. Dig Dis Sci 2008; 53:522-8.
8. Fainboim L, Marcos Y, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong Association with a particular HLA DR6 (DRB1\*1301) haplotype. Hum Immunol 1994; 41: 146-50.
9. Goldberg AC, Bittencourt PL, Mougin B, Cancado ELR, Porta G, Carrilho, et al. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus. Hum Immunol 2001; 62:165-9.
10. Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H, et al. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. Scand J Gastroenterol 1998; 33:99-103.
11. Nishioka M, Morshed SA, McFarlane IG. Geographical variation in the frequency and characteristics of autoimmune liver diseases. Amsterdam: Elsevier; 1998.
12. Czaja AJ, Carpenter HA. Sensitivity, specificity, and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis. Gastroenterology 1993; 105:1824-32.
13. Nikias GA, Batts KP, Czaja AJ. The nature and prognostic implications of autoimmune hepatitis with acute presentation. J Hepatology 1994; 21:866-71.
14. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: international autoimmune hepatitis group. Hepatology 1993; 18:998-1005.
15. Alvarez f, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoim-

- mune hepatitis. *J Hepatology* 1999; 31:929-38.
16. Miyakawa H, Kitazawa E, Abe K, Kawaguchi N, Fuzikawa H, Kikichi K, et al. Chronic hepatitis C associated with anti-liver/kidney microsome-1 antibody is not a subgroup of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol* 1997;32: 769-76.
  17. Bianchi FB, Cassani F, Lenzi M, Ballardini G, Muratori L, Giostra F, et al. Impact of international autoimmune hepatitis group scoring system in definition of autoimmune hepatitis. An Italian experience. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 166-71.
  18. Boberg KM, Fausa O, Haaland T, Holter E, Mellbye OJ, Spurkland A, et al. Features of autoimmune hepatitis in primary sclerosing cholangitis: an evaluation of 114 primary sclerosing cholangitis patients according to a scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 23:1369-76.
  19. Czaja A, Carpenter HA. Validation of scoring system for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41:305-14.
  20. Dickson RC, Gaffey MJ, Ishitani MB, Roarty TP, Driscoll CJ, Caldwell SH. The international autoimmune score in chronic hepatitis C. *J Virol Hepatol* 1997; 4:121-8.
  21. Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, et al. Present status of autoimmune hepatitis in Japan: correlating the characteristic with international criteria in a area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26:1207-12.
  22. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, et al. Liver autoimmune serology: A consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004; 41:677-83.
  23. Strassburg CP, Alex B, Zindy F, Gerken G, Luttig B, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic autoimmune diseases. *J Hepatol* 1996; 25:859-66.
  24. Czaja AJ, Morshed SA, Parveen S, Nishioka M. Antibodies to single-stranded and double-stranded DNA in antinuclear antibody-positive type 1-autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; 26:567-72.
  25. Nishioka M, Morshed SA. Heterogeneity of anti-nuclear antibodies in autoimmune liver diseases. *Biomed Pharmacother* 1999; 53:293-300.
  26. Huguet S, Labas V, Duclos-Vallec JC, Bruneel A, Vinh J, Samuel D, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 identified as an autoantigen in autoimmune hepatitis by proteome analysis. *Proteomics* 2004; 4:1341-5.
  27. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB. Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42:1688-96.
  28. Johnson GD, Holborow EJ, Glyn LE. Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. *Lancet* 1965; 2:878-9.
  29. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 32:181-97.
  30. Meda F, Zuin M, Invernizzi P, Vergani D, Selmi C. Serum autoantibodies: A road map for the clinical hepatologist. *Autoimmunity* 2008; 41:27-34.
  31. Toh BH. Smooth muscle autoantibodies and autoantigens. *Clin Exp Immunol* 1979; 38:621-8.
  32. Pedersen JS, Toh BH, Mackay IR, Tait BR, Grust ID, Kastelan A, et al. Segregation of autoantibody to cytoskeletal filaments actin and intermediate filaments with two types of chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1982; 48: 527-32.
  33. Kurki P, Miettinen A, Linder E, Pikkarainen P, Vuoristo M, Salaspuro MP. Different types of smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis; Their diagnostic and prognostic significance. *Gut* 1980; 21:1068-73.
  34. Villalta D, Bizzaro N, Da Re M, Tozzoli R, Komorowski L, Tonutti E. Diagnostic accuracy of four different immunological methods for the detection of anti-F-actin autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis and other liver-related disorders. *Autoimmunity* 2008; 41:105-10.
  35. Bottazzo GF, Florin Christensen A, Faifax A, Iwana G, Doniach D, Groeschel-Stewart U. Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1976; 29:403-10.
  36. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 24:1068-73.
  37. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 30:394-401.
  38. Rizzetto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973; 15:331-44.
  39. Gueguen M, Meunier-Rotival M, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from IID subfamily. *J Exp Med* 1988; 168:801-6.
  40. Zanger UM, Hauri HP, Loeper J, Homberg JC, Meyer UA. Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8256-60.
  41. Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, et al. Recognition of uridine diphosphate glucuronisyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D. *Lancet* 1994; 344:578-81.
  42. Ma Y, Gregorio G, Gaken J, Muratori L, Bianchi FB, Mieli-Vergani G, et al. Establishment of a novel radioligand assay using eukariotically expressed cytochrome P450 2D6 for the measurement of liver kidney microsomal type 1 antibody in patients with autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1997; 26:1396-402.
  43. Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Selleri L, Volta U, et al. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990; 335:258-9.
  44. Giostra F, Manzin A, Lenzi M, Francesconi R, Solforosi L, Manotti P, et al. Low hepatitis C viraemia levels in patients with anti-liver kidney microsomal antibody type 1 positive chronic hepatitis J *Hepatol* 1996; 25:433-8.
  45. Vergani D. NOSA in HCV infection: markers of disease? *Gut* 1999; 45:328-9.
  46. Strassburg CP, Manns MP. Liver cytosol antigen type I autoantibodies, liver kidney microsomal autoantibodies, and liver microsomal autoantibodies. In: Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL, eds. *Autoantibodies*. 2<sup>nd</sup> Edition. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 463-71.
  47. Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos

- DP, Muratori L, et al. Cytochrome P4502D6<sup>193,212</sup>: A new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003; 170:1481-9.
48. Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, et al. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000; 46:553-61.
  49. Lohr HF, Schlaak JF, Lohse AW, Bocher WO, Arenz M, Gerken G, et al. Autoreactive CD4+ LKM specific and anticolonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 24:1416-21.
  50. Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterol* 2006; 130: 868-82.
  51. Crivelli O, Lavarini C, Chiaberge E, Amoroso A, Farci P, Negro E, et al. Microsomal autoantibodies in chronic infection with the HBsAg associated delta (delta) agent. *Clin Exp Immunol* 1983; 54:232-8.
  52. Fabien N, Desbos A, Bienvenu J, Magdalou J. Autoantibodies directed against the UDP-glucuronosyltransferases in human autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2004; 3:1-9.
  53. Martini E, Abyaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis Type 2. *Hepatology* 1988; 8:1662-6.
  54. Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 116:634-9.
  55. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentration in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998; 42:721-6.
  56. Manns M, Gerken G, Kyriarsoulis A, Staritz M, Meyer zum Buschenfelde KH. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987; 1: 293-4.
  57. Teifel M, Niessen KH, Berg PA. Chronic active hepatitis in children with detection of liver-pancreas-specific autoantibodies. *Eur J Pediatr* 1983; 1:292-4.
  58. Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000; 355:1510-5.
  59. Costa M, Rodriguez-Sanchez JL, Czaja AJ, Gelpi C. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:364-74.
  60. Ballot E, Bruneel S, Labas V, Johanet C. Identification of rat targets of anti-soluble liver antigen autoantibodies by serologic proteome analysis. *Clin Chem* 2003; 49:634-43.
  61. Vitozzi S, Djilali-Saiah I, Lapierre P, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002; 35:485-92.
  62. Ma Y, Okamoto M, Thomas MG, Bogdanos DP, Lopes AR, Portmann B, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2002; 35:658-64.
  63. Bares M, Herkel J, Czaja AJ, Wiest I, Kanzer S, Cancado EL, et al. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 2002; 51: 259-64.
  64. Czaja AJ, Donaldson PT, Loshe AW. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factor for type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:413-9.
  65. Portalle T, Trichel U, Löhr H, Fleischer B. The asialoglycoprotein receptor as target structure in autoimmune liver diseases. *Sem Liv Dis* 1991; 11:215-22.
  66. Trichel U, Gerken G, Rossol S, Rotthau HW, Meyer zum Buschenfelde KH, Portalla T. Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: effects of therapy in autoimmune and virus-induced chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993; 19:55-63.
  67. Claise C, Johanet C, Bouhnik Y, Kapel N, Homberg JC, Poupon R. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases. *Liver* 1966; 16:28-34.
  68. Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, Kaiser A, Barut A, Loges S, et al. Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy. *Gastroenterology* 2001; 121:668-77.
  69. Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Sem Liv Dis* 2002; 22: 339-51.
  70. Kerkar N, Hadzic N, Davies ET, Portmann B, Donaldson PT, Rela M, et al. De-novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Lancet* 1998; 351:409-13.
  71. Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, Bernardos A, Franco E, Garcia-Lozano JR, et al. Autoantibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001; 136:535-9.
  72. Huguet S, Vinh J, Johanet C, Samuel D, Gigou M, Zamfir O, et al. Identification by proteomic tool of atypical anti-liver/kidney microsome autoantibodies targets in de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1109:345-57.
  73. Lu F, Xia Q, Ma T, Yuan G, Yan H, Qian L, et al. Serum proteomic-based analysis for the identification of a potential serological marker for autoimmune hepatitis. *Biochem Bioph Res Com* 2008; 367:284-90.