

## Proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma nei neutrofili (ANCA)

**R.A. Sinico<sup>a</sup>, A. Radice<sup>a</sup>, E. Tonutti<sup>b</sup>, D. Villalta<sup>c</sup>, N. Bizzaro<sup>d</sup>, R. Tozzoli<sup>e</sup>, P. Rizzotti<sup>f</sup>,  
per il Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA)**

<sup>a</sup>*Divisione di Nefrologia, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano*

<sup>b</sup>*Istituto di Chimica Clinica, Azienda Ospedaliera S. Maria della Misericordia, Udine*

<sup>c</sup>*Servizio di Immunologia e Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone*

<sup>d</sup>*Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S. Donà di Piave (VE)*

<sup>e</sup>*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile, Latisana (UD)*

<sup>f</sup>*Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera, Verona*

### Introduzione

Questa proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili è stata messa a punto dal Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA), un gruppo italiano costituito da specialisti di diverse discipline cliniche (immunologi clinici, internisti, reumatologi, patologi clinici, nefrologi e dermatologi) esperti nel campo della diagnostica clinica e di laboratorio delle malattie autoimmuni. Le raccomandazioni contenute in queste linee guida sono derivate dalla più recente letteratura scientifica e dalle indicazioni fornite dal gruppo di esperti in una Consensus Conference tenutasi a Monteriggioni (Siena) dal 18 al 20 gennaio 2001.

### Indicazioni cliniche

Gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono degli autoanticorpi diretti verso costituenti citoplasmatici dei granulociti neutrofili (e monociti); sono considerati un utile marker sierologico per la diagnostica delle vasculiti primarie sistemiche, quali in particolare 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<sup>1,2</sup> (Tab. I). Le ragioni più frequenti per la richiesta di una determinazione degli ANCA sono appunto la diagnosi e/o il monitoraggio delle vasculiti sistemiche primitive<sup>3</sup>. In presenza di manifestazioni cliniche che suggeriscono una diagnosi di GW o PAM, quali una sindrome rene-polmone, un quadro di glomerulonefrite ra-

pidamente progressiva, una vasculite cutanea con sintomi sistemici, noduli polmonari multipli, stenosi tracheale, lesioni destruenti a carico delle alte vie respiratorie, masse retro-orbitarie, mononeurite multipla (Tab. II), la dimostrazione degli ANCA nel siero del paziente ha un'elevata sensibilità (> 90%) e specificità (> 90%) e, di conseguenza, un alto valore predittivo per queste malattie<sup>4,7</sup>. In altre situazioni cliniche ANCA-associate (es., malattie infiammatorie intestinali croniche, epatiti e colangiti autoimmuni, connettiviti), l'utilità diagnostica è inferiore<sup>8,9</sup>. L'identificazione degli ANCA potrebbe, tuttavia, rivestire un ruolo significativo nella diagnosi differenziale tra rettocolite ulcerosa (RCU) e morbo di Crohn (MC). Nelle vasculiti ANCA-associate il titolo degli ANCA correla, in genere, con l'attività della malattia, anche se non sono rare le eccezioni<sup>10</sup>.

### Test disponibili

Lo studio europeo di standardizzazione delle metodiche ha dimostrato che gli ANCA sono più correttamente rilevati mediante l'uso combinato di una metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) su leucociti umani normali fissati in etanolo e di tecniche ELISA per il dosaggio degli ANCA specifici per la proteinasi 3 (PR3) e la mieloperoxidasi (MPO). L'associazione dei 2 metodi consente di ottenere una specificità > 95%<sup>6</sup>. Nella fase di screening è consigliabile l'esecuzione di entrambe le metodiche, poiché esistono campioni positivi soltanto in uno dei due test (5%). Qualora non sia possibile eseguire sistematicamente entrambi i test, il loro uso combinato è comunque indispensabile nei casi con un forte sospetto clinico di vasculite ANCA-associata.

I sieri ANCA positivi da pazienti affetti da vasculiti sistemiche primitive producono all'IFI due patterns caratteristici:

- **C-ANCA**: colorazione citoplasmatica granulare diffusa, spesso con accentuazione dell'intensità della fluorescenza tra i lobi nucleari. Questo pattern è associato nel 90-95% dei casi alla presenza di autoanticorpi specifici per la PR3.

- **P-ANCA**: colorazione perinucleare e/o nucleare, causata nell'80% circa dei casi dalla presenza di MPO-ANCA (include i cosiddetti GS-ANA).

Nella maggior parte dei pazienti affetti da GW in forma attiva e generalizzata si riscontrano C-ANCA con specificità per la PR3, in circa il 20-30% si trovano invece P-ANCA con specificità per la MPO.

Circa il 70-80% dei pazienti affetti da poliangiote microscopica o glomerulonefrite extracapillare necrotizzante pauci-immune presenta P-ANCA specifici per la MPO mentre il 30% ha C-ANCA specifici per la PR3. Occasionalmente sono stati descritti quadri C-ANCA/MPO-ANCA e P-ANCA/PR3-ANCA<sup>11,12</sup>.

ANCA (sia C che P) sono presenti anche nel 40-60% dei pazienti affetti da sindrome di Churg-Strauss.

P-ANCA o patterns fluoroscopici atipici sono descritti, con diversa prevalenza, in pazienti affetti da malattie intestinali infiammatorie croniche, epatopatie e malattie reumatologiche<sup>8,9</sup>. Sono causati da anticorpi diretti contro antigeni (lattoferrina, elastasi, *bactericidal/permeability increasing protein*, beta-glicuronidasi, catepsina G, azurocidina, lisozima, *high mobility group proteins*, alfa-enolasi, actina, catalasi e altri non ancora identificati) diversi da quelli generalmente associati alle vasculiti (PR3 e MPO), il cui ruolo patogenetico e/o significato clinico sono ignoti.

P-ANCA e ANCA atipici possono essere rilevati in corso di alcune vasculiti iatrogeniche.

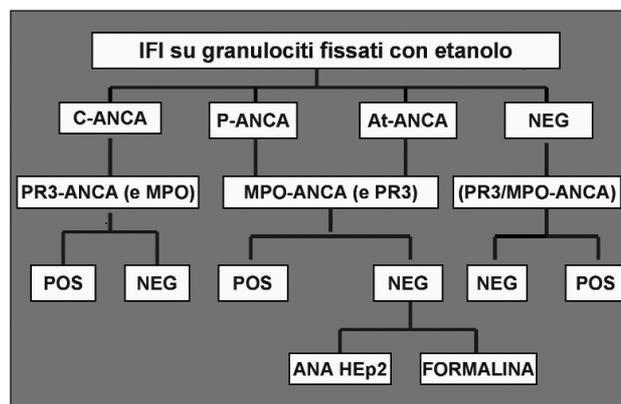
Deve essere ribadito che il solo riscontro di positività ANCA, in assenza di dati clinici indicativi, non può essere considerato diagnostico e motivare l'inizio di un trattamento terapeutico.

### Immunofluorescenza indiretta (IFI)

**Requisiti minimi** da rispettare per una corretta diagnostica (Fig. 1):

- Esecuzione del test IFI su tutti i sieri dei pazienti nuovi (circa il 10% degli ANCA nelle vasculiti è dimostrabile solo mediante questa metodica).
- Campioni di pazienti noti, positivi solo in IFI, possono essere successivamente testati solo con questa metodica anche se, talvolta, gli autoanticorpi possono diventare rilevabili anche in ELISA in un secondo tempo. Sieri che sono risultati positivi o nel PR3 o nel MPO-ELISA possono

**Figura 1.** Procedura diagnostica per la determinazione degli ANCA.



essere testati successivamente solo per l'antigene rilevante, dal momento che è un'evenienza assai rara un cambio di specificità antigenica.

- È opportuno utilizzare come substrato per l'IFI una preparazione contenente sia neutrofili che linfociti. P-ANCA e ANCA atipici reagiscono solo con neutrofili e monociti, mentre gli ANA reagiscono con i nuclei di tutte le cellule (per questo la presenza di linfociti nei citocentrifugati aiuta a discriminare tra ANCA e ANA). Talvolta, in presenza di un quadro P-ANCA, si può notare una fluorescenza nucleare dei linfociti vicini ai neutrofili positivi a causa del leakage (causato dal fissativo) di componenti citoplasmatiche dei granulociti che aderiscono successivamente ai nuclei dei linfociti vicini.

### Suggerimenti per una diagnostica ottimale:

- Tutti i campioni positivi in IFI e negativi nei test ELISA specifici per la PR3 e la MPO dovrebbero essere titolati.
- Titolare i sieri se, oltre agli ANCA, sono presenti ANA o altre positività non meglio caratterizzate, potenzialmente interferenti. In questi casi può essere utile testare e titolare nella stessa seduta, il campione nuovo e il positivo precedente dello stesso paziente. Se le uniche cellule fluorescenti sono granulociti e monociti (linfociti negativi quando presenti nel substrato) non è indispensabile la titolazione dei sieri.
- L'utilizzo di substrati cellulari fissati con formalina può essere utile in alcune circostanze sia per discriminare tra diverse condizioni patologiche che per descriverle in modo più esauriente. I P-ANCA mostrano un pattern citoplasmatico su vetrini fissati con formalina mentre gli ANA perdono in genere la loro reattività; gli ANCA atipici, che sono un gruppo molto eterogeneo, possono mostrare pattern citoplasmatico o diventare negativi<sup>13</sup>.

**Tabella I.** Percentuale di positività dei diversi pattern di fluorescenza e delle specificità antigeniche nelle malattie ANCA-associate (PR3, proteinasi 3; MPO, mieloperossidasi; LF, lattoferrina; ELA, elastasi; GS-ANA, anticorpi anti-nucleo granulocita-specifici).

	ANCA positività		Antigene bersaglio
	pattern	%	
<b>VASCULITI SISTEMICHE</b>			
1. Granulomatosi di Wegener (forme generalizzate)	<b>C-ANCA</b>	(80-90%)	<b>PR3 (70-80%)</b>
	P-ANCA		MPO (20-30%)
2. Poliangiote microscopica	C-ANCA	(80-85%)	PR3 (20-30%)
	<b>P-ANCA</b>		<b>MPO (70-80%)</b>
3. Sindrome di Churg Strauss	C-ANCA	(50%)	PR3 (30-40%)
	P-ANCA		MPO (60-70%)
4. Poliarterite nodosa classica	P-ANCA	(10%)	MPO (90%)
<b>GLOMERULONEFRITE NECROSANTE PAUCI-IMMUNE IDIOPATICA</b>			
	C-ANCA	(80%)	PR3 (20%)
	<b>P-ANCA</b>		<b>MPO (80%)</b>
<b>MALATTIE REUMATICHE</b>			
1. Artrite Reumatoide	GS-ANA/P-ANCA ANCA atipici	(30% ?)	LF, sconosciuto
2. Lupus Eritematoso Sistemico	P-ANCA	(<20%)	LF, ELA, MPO

**Tabella II.** Principali indicazioni cliniche per la ricerca degli ANCA

- sindrome polmonare-renale / emorragia polmonare
- glomerulonefrite rapidamente progressiva
- vasculite cutanea con sintomi sistemici
- noduli polmonari / lesioni croniche destruenti delle alte vie aeree
- sinusiti e otiti croniche
- stenosi tracheale subglottica / massa retro-orbitaria
- mononeuriti multiple

**Commenti:**

- I campioni di siero da testare non devono essere inattivati al calore; questa pratica può procurare risultati falsi-positivi.
- La diluizione ottimale dei sieri va stabilita in ogni laboratorio in base alle diverse variabili analitiche; generalmente essa varia tra 1: 20 e 1:40.
- L'aggiunta di sieroalbumina umana all'1% al tampone di diluizione e lavaggio (generalmente

PBS), può contribuire ad eliminare la fluorescenza di fondo.

- È preferibile utilizzare un antisiero secondario anti-IgG piuttosto che anti-Ig totali, perchè soddisfa le esigenze diagnostiche e riduce la fluorescenza di fondo, evitando risultati falsamente positivi.
- L'uso di controcoloranti quali l'Evans blue diminuisce l'intensità della fluorescenza e può mascherare i deboli positivi.
- È indispensabile la disponibilità di un sistema ottico efficiente, possibilmente calibrato con standards a diversa intensità di fluorescenza.

**ELISA**

## ANTIGENI

**Requisiti minimi:**

- I produttori dei kit commerciali devono sempre specificare la metodica di purificazione; se gli antigeni sono purificati "in house", deve essere

scelta una procedura che causi la minore denaturazione delle proteine antigeniche.

- Antigeni nativi (estrattivi) sono a tutt'oggi da preferire a quelli ricombinanti, la cui validità e utilità deve essere ancora verificata.
- Quando si utilizzano preparazioni antigeniche nuove, si cambiano le caratteristiche o la marca dei kit commerciali in uso, i risultati devono essere confrontati e validati in rapporto alla "vecchia preparazione".

### Requisiti ottimali:

La purezza degli antigeni preparati in laboratorio dovrebbe essere controllata in ELISA e/o Western-blot, con l'ausilio di antisieri policlonali e monoclonali specifici, per verificare un'eventuale contaminazione di antigeni ANCA minori, in particolare la lattoferrina.

### TEST

#### Requisiti minimi per una corretta diagnostica:

- I campioni devono essere esaminati in duplicato.
- I campioni positivi per ANCA in IFI, con fluorescenza tipica o atipica e tutti i sieri con ANA positività devono essere testati in fase solida per la ricerca di PR3-ANCA e MPO-ANCA.
- I campioni precedentemente positivi per PR3-ANCA o MPO-ANCA possono essere testati successivamente soltanto nell'appropriato ELISA (PR3-ANCA o MPO-ANCA) dal momento che un cambiamento della specificità antigenica bersaglio degli ANCA in pazienti affetti da GW o PAM è evenienza eccezionale.
- In ogni piastra devono essere sempre inclusi controlli positivi e negativi, eventuali controlli interni e "bianchi"; i risultati devono essere calcolati per estrapolazione da una curva costruita mediante diluizioni scalari degli standard (almeno 5 punti).

#### Suggerimenti per una diagnostica ottimale:

- Tutti i campioni di siero (anche quelli negativi all'IFI), in presenza di fondato sospetto clinico, dovrebbero essere testati in ELISA Ag-specifici per la ricerca di PR3-ANCA e MPO-ANCA poiché il 5% dei sieri di pazienti affetti da vasculiti ANCA-associate sono positivi soltanto nei test in fase solida.
- I test devono consentire determinazioni quantitative e con coefficienti di variabilità intra e inter-assay inferiori al 20%.
- La scelta del cut-off deve essere sempre verificata in ciascun laboratorio (anche per i kit commerciali); il valore deve essere calcolato dopo avere valutato un adeguato numero di controlli sani e patologici. Idealmente, per assicurare una sensi-

bilità e specificità ottimali, dovrebbero essere calcolate le *receiver operating characteristic curves* (ROC) per ciascun test ELISA, considerando almeno una specificità del 90% verso le patologie di controllo. In alternativa si può considerare un range di normalità calcolato come la media delle unità arbitrarie  $\pm 2$  deviazioni standard<sup>3</sup>.

- Talvolta può essere utile confrontare, nella stessa seduta analitica, campioni precedentemente positivi e campione nuovo positivi dello stesso paziente.

#### Commenti:

- E' disponibile un siero di riferimento per C-ANCA specifico per la PR3 (contattare Dr. A. Wiik. Statens Seruminstitut, Denmark, e-mail aw@ssi.dk).
- Un legame specifico dovrebbe essere sospettato quando nello stesso campione sono rilevati contemporaneamente PR3-ANCA e MPO-ANCA a basso titolo. Non ci sono standard per PR3 e MPO-ANCA, i risultati devono perciò essere espressi in unità arbitrarie.
- Nella routine diagnostica delle vasculiti ANCA-associate è necessario e sufficiente testare i sieri in sistemi ELISA PR3 e MPO-specifici, in quanto sono questi gli antigeni clinicamente rilevanti in termini di prevalenza e significato diagnostico. Non è consigliato l'utilizzo di test diagnostici per l'identificazione delle specificità minori ANCA-correlate (lattoferrina, lisozima, elastasi, BPI e altre), in quanto non è stata dimostrata finora una correlazione con patologie o quadri clinici peculiari.

#### Refertazione dei risultati degli ANCA

- Per una corretta interpretazione dei risultati complessivi, i risultati ottenuti nei test IFI ed ELISA dovrebbero essere comunicati contemporaneamente; se ciò non fosse praticabile, i risultati degli ELISA dovrebbero seguire il prima possibile i risultati dell'IFI.
- I risultati dei test ELISA vanno riportati in termini quantitativi come unità arbitrarie. Può essere utile una definizione quantitativa-discreta dei risultati, cioè in range, secondo lo schema: negativo, basso positivo, medio positivo e alto positivo.

#### Nomenclatura<sup>14</sup>

- C-ANCA: classica fluorescenza granulare citoplasmatica con accentuazione centrale o interlobulare.
- C-ANCA (atipico o omogeneo): fluorescenza diffusa omogenea senza accentuazione interlobulare.

- P-ANCA: fluorescenza perinucleare con o senza estensione nucleare; include gli ANA granulocita specifici.
- ANCA atipico: include tutte le altre fluorescenze granulocita o monocita-specifiche.

#### Commenti:

- L'utilizzo dei termini C-ANCA e P-ANCA invece di cANCA e pANCA è da preferire in quanto in conformità con lo stile utilizzato per la descrizione delle specificità antigeniche (PR3-ANCA e MPO-ANCA).
- L'intensità della fluorescenza dovrebbe essere riportata come negativa, debolmente positiva, positiva o fortemente positiva solo sulla base della diluizione di screening.

#### Bibliografia

- Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: a review. *Am J Kidney Dis* 1990; 15:517-29.
- Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW. What is new with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: diagnostic, pathogenetic and therapeutic implications. *Current Opinion Nephrology Hypertension* 1999; 8:307-15.
- Segelmark M, Westman K, Wieslander J. How and why should we detect ANCA? *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18:629-35.
- Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross W, et al. The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection. A report on the first phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods* 1993; 159:1-16.
- Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross W, et al. Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods* 1996; 196:1-15.
- Hagen EC, Daha MR, 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.
- Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int* 1998; 53:796-8.
- Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, Meucci G, Torgano G, et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis: sensitivity, specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994; 55:34-9.
- Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Disease. *Annals of Internal Medicine* 1997; 126:866-73.
- Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, Oost W, Hermans J, Kalleberg CG. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of anti-neutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2025-33.
- Segelmark M, Baslund B, Wieslander J. Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern. *Clin Exp Immunol* 1994; 96:458-65.
- Galeazzi M, Morozzi G, Bellisai F, Bacarelli MR, Radice A, Sinico RA, et al. Anti-proteinase 3 antibodies in diffuse systemic sclerosis (SSc): is it suggestive for an overlapping between SSc and idiopathic necrotizing vasculitis? *Reumatismo* 2001; 53:33-9.
- 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.
- Savice J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:507-13.