

# “Importanza della determinazione sierologica degli ANCA in nefrologia”

L. Furci, A. Di Felice

Cattedra di Nefrologia, Università degli Studi di Modena

**G**li anticorpi anti citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono una classe di autoanticorpi circolanti diretti contro componenti del citoplasma dei neutrofili presenti nel siero di pazienti affetti da vasculite sistemica e da glomerulonefrite rapidamente progressiva idiopatica (GNRPI) (Fig. 1). Mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) e mediante Immunoperossidasi (IP), usando neutrofili umani normali fissati in alcool e incubati con il siero-test del paziente, sono state identificate due categorie di ANCA: una a localizzazione citoplasmatica, C-ANCA (Fig. 2), e l'altra a localizzazione perinucleare, P-ANCA (Fig. 3). Nella pratica diagnostica routinaria viene prevalentemente utilizzata la IFI, essendo la IP tecnicamente più complessa e di più lunga esecuzione. Gli autoanticorpi sono stati inizialmente suddivisi in due classi di specificità molecolare: anti-proteinasi 3 (PR3), per il pattern “C”, e anti-mieloperossidasi (MPO), per il pattern “P”. Successivamente si è tuttavia documentata la presenza di autoanticorpi diretti contro componenti citoplasmatiche diverse dalla MPO (lisozima, elastasi, lactoferrina ecc.) e che, in IF si distribuiscono anch'esse secondo un pattern periferico (1-4). Si è quindi convenuto che l'iniziale criterio di distinzione di specificità molecolare rispetto alla IFI possa ritenersi valido solo per il pattern “C”, stretta-

mente associato con la granulomatosi di Wegener (WG) e specifico per la PR3 (5-7). Tale criterio non è applicabile al “P” che può essere prodotto da anticorpi diretti contro componenti citoplasmatiche anche diverse dalla MPO (Tab. I). È importante sottolineare comunque che solo con tests RIA (Radio Immuno Assay) o ELISA (Enzyme Lynked Immuno adsorbent Assay), che utilizzano antigeni purificati, è possibile determinare la specificità anticorpale (1-4).

È importante inoltre rilevare che la metodica di IFI per la ricerca sierologica di ANCA, pur avendo il vantaggio di essere di semplice e veloce esecuzione, e di facile interpretazione (il pattern “C” è

facilmente distinguibile da quello “P”), è purtroppo una lettura di tipo semiquantitativo. Essa quindi non consente il dosaggio degli autoanticorpi, per il quale è necessario avvalersi di metodiche quantitative, quali RIA, ELISA e Western blot analysis.

## ANCA e vasculiti sistemiche

Autoanticorpi ANCA sono riscontrabili nel siero di pazienti affetti da vasculiti sistemiche, gruppo vastissimo ed eterogeneo di sindromi cliniche che hanno in

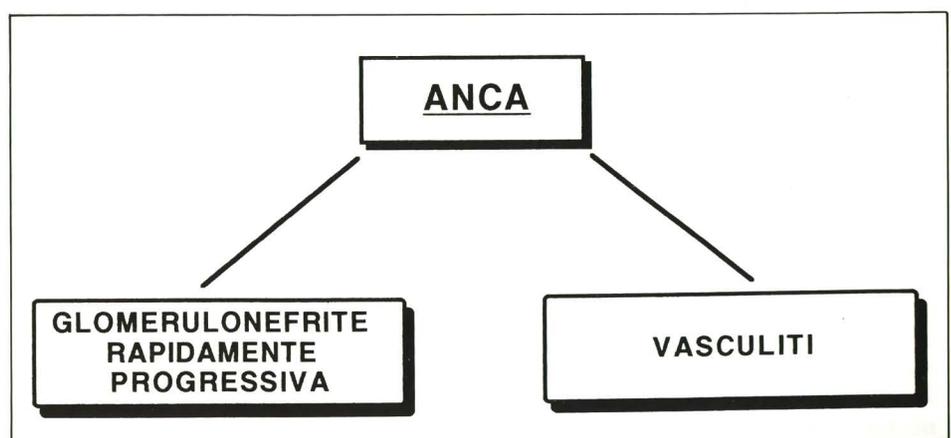
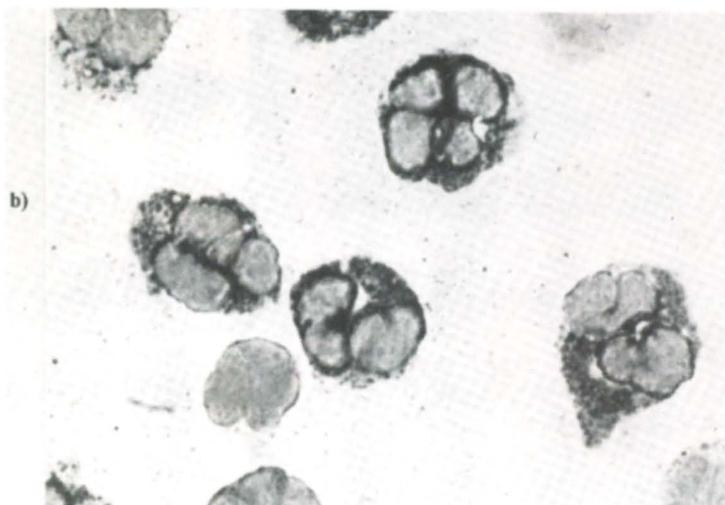
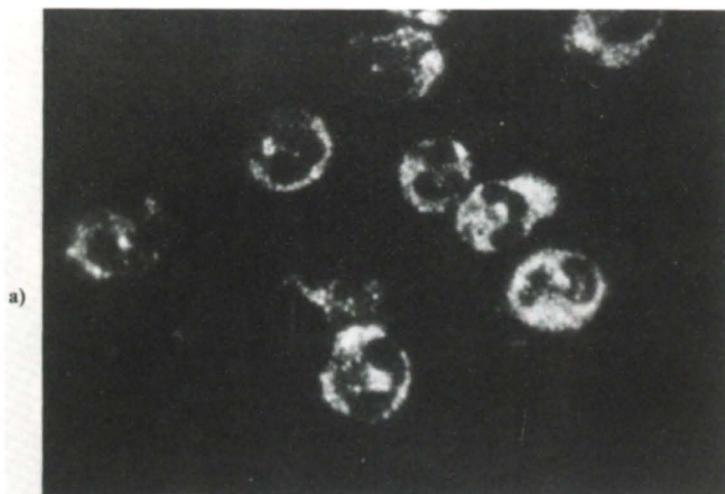
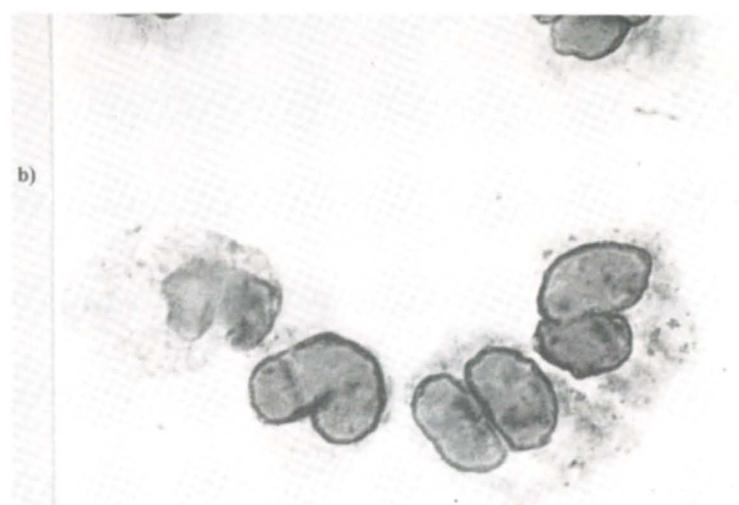
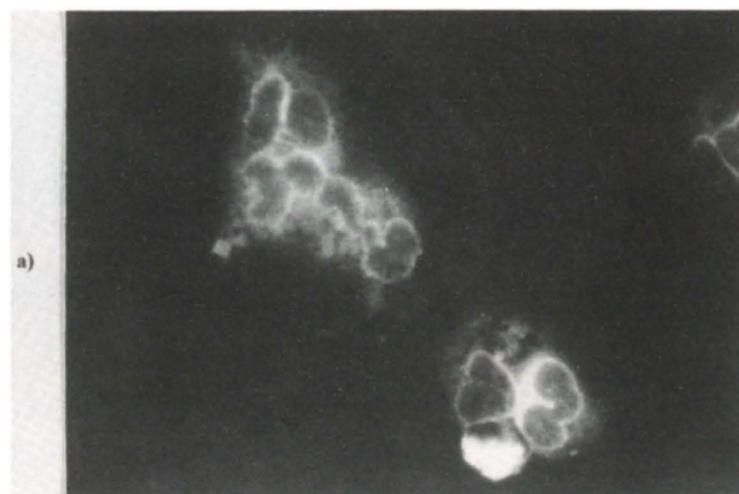


Fig. 1 – Quadri clinici più frequentemente associati alla presenza di ANCA nel siero.



**Fig. 2 – C-ANCA:** pattern citoplasmatico in immunofluorescenza indiretta (a) e in immunoperossidasi (b)  
 a) Immunofluorescenza, 100 x  
 b) Immunoperossidasi, microscopia ottica, 100 x.



**Fig. 3 – P-ANCA:** pattern periferico in immunofluorescenza indiretta (a) e in immunoperossidasi (b)  
 a) Immunofluorescenza, 100 x  
 b) Immunoperossidasi, microscopia ottica, 100 x.

comune, nella fase acuta, una lesione infiammatoria e necrotizzante a carico della parete dei vasi sanguigni (arteria e/o vena) (Tab. II). La necrosi si associa ad una reazione infiammatoria perivascolare che può essere di tipo leucocitoclastico, ossia costituita da polimorfococleati con presenza di residui nucleari (PAN macro-microscopica), oppure di tipo granulomatoso, quando la reazione flogistica è costituita da cellule epitelioidi e/o giganti (granulomatosi di Wegener) (Fig. 4). La necrosi vascolare, clinicamente, produce quadri molto diversi tra loro, che dipendono dalla sede delle lesioni necrotizzanti, dalla loro estensione, dal calibro dei vasi colpiti e dal tipo di reazione infiammatoria che le accompagna.

Sebbene si ritenga che queste malattie abbiano una patogenesi autoimmune tale meccanismo non è stato ancora provato; l'eziologia e i meccanismi patogenetici delle vasculiti restano ancora

sconosciuti o solo ipotizzabili. Le due maggiori classi di vasculiti ANCA-associate sono la *periarterite nodosa* nella sua forma microscopica (o micro-poliarterite) e la *granulomatosi di Wegener*.

**TAB. I – ANCA: PATTERN DI IMMUNOFLUORESCENZA – SPECIFICITÀ MOLECOLARE – CORRELAZIONE CLINICA**

Immunofluorescenza	Antigene Citoplasmatico	Sindrome
C-ANCA	Proteinasi 3 (PR3)	Wegener
P-ANCA	mieloperossidasi	PAN micro GNRP
P-ANCA	lactoferrina elastasi lisozima	

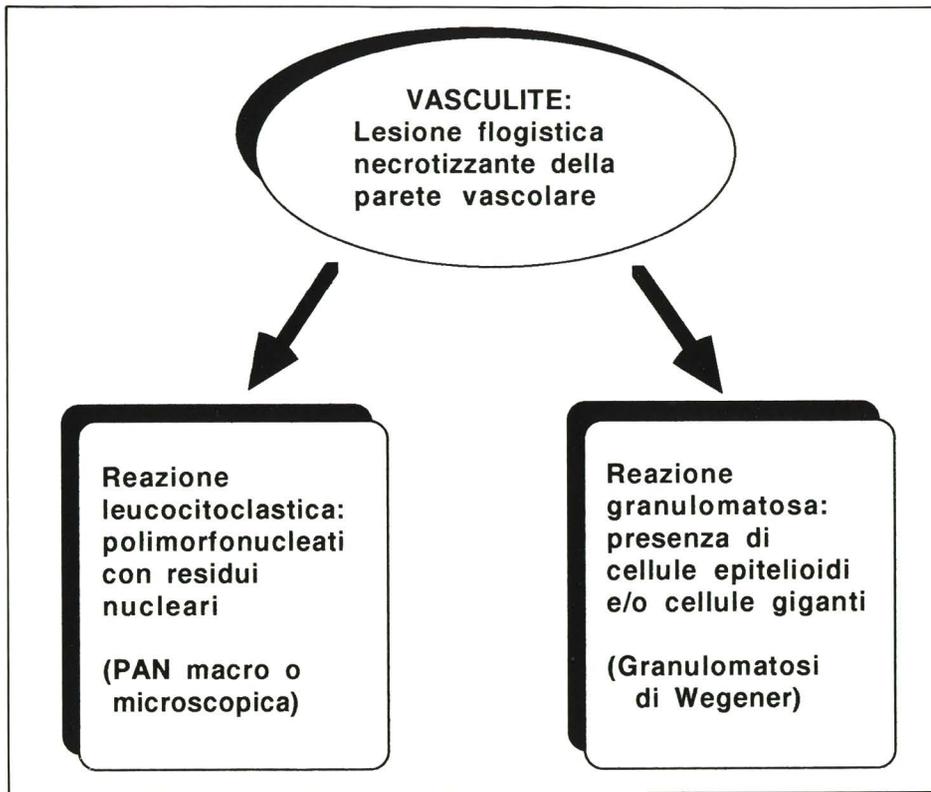


Fig. 4 – Vasculiti sistemiche: correlazioni clinico-istologiche.

ner (WG). La periarterite nodosa classica (PAN), o forma macroscopica, che a livello renale colpisce le arterie arciformi e interlobari, si associa con scarsa frequenza a positività ANCA (8-10).

#### PAN-microscopica

La definizione di micropoliarterite (micro-PAN) è basata su un criterio istologico: lesione infiammatoria e necrotizzante della parete dei piccoli vasi (arteriole, capillari, venule) che colpisce vari distretti dell'organismo. A livello renale questa lesione si traduce in una glomerulonefrite necrotizzante con semilune senza depositi immuni (11), espressione del coinvolgimento dei capillari glomerulari nel contesto di una vasculite sistemica. I limiti e i criteri nosologici per la diagnosi di micro-PAN spesso sono artificiosi per cui essa risulta essere prevalentemente una diagnosi di esclusione. Attualmente la micro-PAN è inserita, insieme alla WG e alla glomerulonefrite necrotizzante extra capillare, nel gruppo delle "vasculiti ANCA-associate" avvenuti in comune l'aspetto istologico e la reversibilità clinica se trattate precocemente (10, 12, 13). In questa malattia

così ambigua nei suoi aspetti clinici, la presenza di ANCA è di rilevante utilità in quanto prova comunque l'esistenza di una patologia "ANCA-associata" sensibile alla terapia, che deve pertanto essere iniziata precocemente, senza dover attendere la progressiva definizione del quadro clinico.

#### Granulomatosi di Wegener

Il pattern C-ANCA, specifico per la PR3 si associa strettamente con la condizione clinica di granulomatosi di Wegener tanto da costituire ormai un test di alta specificità per la conferma diagnostica della malattia (5-7).

La WG è una sindrome costituita da angioite necrotizzante granulomatosa che colpisce essenzialmente le prime vie respiratorie, il polmone e il rene. È una malattia rara ma ben definita rispetto al vasto e intricato gruppo delle vasculiti. Prima della scoperta degli ANCA la diagnosi di WG si basava su criteri clinico-patologici, di cui quattro raccomandati dall'American Rheumatology Associa-

#### TAB. II – CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE VASCULITICHE RENALI

- A. Gruppo della Poliarterite Nodosa (PAN)
  1. PAN Classica (malattia di Kussmaul-Maier, PAN macroscopica)
  2. PAN Microscopica (poliarterite nodosa con glomerulonefrite)
  3. Sindrome sovrapposta
- B. Vasculiti da ipersensibilità (vasculiti cutanee, vasculiti leucocitoclastiche, vasculiti allergiche)
  1. Primaria: Idiopatica
  2. Secondaria: farmaco-indotta, Porpora di Schoenlein-Henoch, Lupus eritematoso sistemico
- C. Granulomatosi di Wegener
- D. Granulomatosi linfomatoide
- E. Angioiti e Granulomatosi allergiche (Malattia di Churg-Strauss)
- F. Arterite a cellule giganti
  1. Arterite temporale
  2. Arterite di Takayasu
- G. Varie: Sindrome di Beçet, Policondrite recidivante, Vasculite ipocomplementemica, Vasculiti associate a neoplasie
- H. Glomerulonefriti proliferative focali, necrotizzanti e con crescents senza depositi immuni\*

\* Correlazione con le vasculiti sospetta ma non dimostrata

(Da: Schrier RW and Gottschalk CW "Diseases of the Kidney", 4th Edition, Little Brown & Co., 1988)

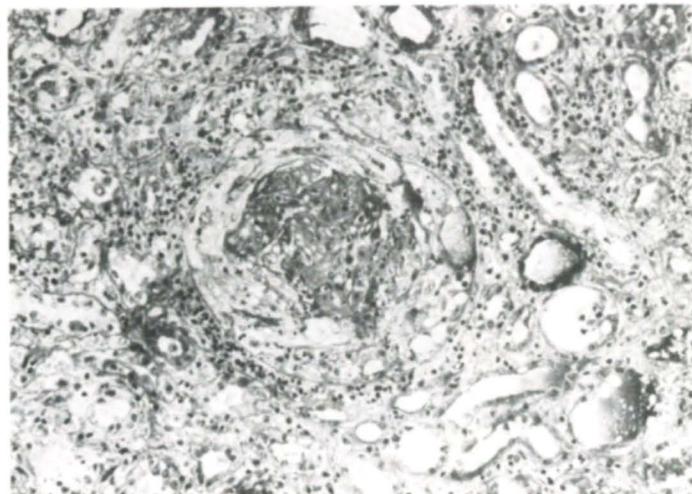
tion (ARA): alterazioni del sedimento urinario (cilindri ematici o > 5 emazie-campo); interessamento polmonare (noduli, cavità, infiltrati); ulcere del cavo orale e/o rinorea purulenta; granulomi alla biopsia. Quando, due o più criteri dei quattro ARA per la diagnosi di WG sono presenti, l'ipotesi diagnostica viene ritenuta valida secondo un parametro di sensibilità pari all'88,2% e una specificità del 92% (15). In realtà, secondo l'esperienza delle maggiori casistiche, è la presenza di granulomi all'esame istologico che riesce a separare la WG dalle altre vasculiti meglio di ogni altro criterio; purtroppo i granulomi vengono riscontrati solo in 1/3 delle biopsie di pazienti affetti da WG (15, 16). Nei casi in cui la presenza di manifestazioni cliniche compatibili con WG e la mancanza istologica di granulomi lasciano grossi dubbi sull'intervento terapeutico da attuare, il riscontro di anticorpi ANCA è determinante. L'eventuale positività del test, infatti, pone l'indicazione alla terapia precoce, essenziale ai fini prognostici, in particolare per prevenire l'evoluitività della malattia verso sezioni irreversibili.

## **ANCA e Glomerulonefrite Rapidamente Progressiva Idiopatica**

Le Glomerulonefriti Rapidamente Progressive (GNRP) sono nefropatie caratterizzate da proliferazione extracapillare diffusa con formazione di semiluna (crescents) (Fig. 5). Il termine "rapidamente progressiva" deriva dalla rapida evoluzione clinica della malattia verso l'insufficienza renale ed implica una perdita di funzione tale da portare all'uremia terminale in un periodo di tempo inferiore a tre mesi.

In base alle caratteristiche dei depositi immuni rilevabili con l'immunofluorescenza (IF) e le GNRP vengono suddivise in tre gruppi: **1)** GNRP da anticorpi anti-membrana basale glomerulare (anti-GBM); **2)** GNRP da immunocomplessi; **3)** GNRP pauci immuni o idiopatica (GNRPI) (Tab. III). Le forme extracapillari con IF positiva per depositi

**Fig. 5** – *Glomerulonefrite rapidamente progressiva: glomerulo con semiluna. Colorazione tricromica di Masson, microscopia ottica, 40 x.*



**TAB. III** – CORRELAZIONI CLINICHE, SIEROLOGICHE ED IMMUNOISTOLOGICHE DELLE GLOMERULONEFRITI RAPIDAMENTE PROGRESSIVE (GNRP)

Sierologia	Immunofluorescenza	Clinica
Anticorpi anti-GBM	depositi lineari	– S. di Goodpasture – GNRP Anti-GBM (senza emorragie polm.)
Immunocomplessi	depositi granulari	– LES – GNRP post-infettiva – Crioglobulinemia – Altre
ANCA	assenza di depositi immuni	– GNRP idiopatica

IgG lineari sono dovute alla presenza di anticorpi anti-GBM; se associate ad emorragia polmonare costituiscono la sindrome di Goodpasture. La presenza di depositi granulari si associa alle forme da immuno complessi circolanti quali LES, Glomerulonefrite acuta post infettiva ecc.. L'assenza di depositi immuni identifica la GNRPI. Quest'ultima forma di glomerulonefrite con crescents si associa a presenza di ANCA nel siero e questo permette di differenziarla sierologicamente dalle altre due forme di GNRP (Tab. III).

Il pattern P-ANCA è quello più frequentemente associato alla GNRPI, anche se non esclusivo; gli autoanticorpi corrispondenti sono anti MPO (Tab. I). Dopo la scoperta degli ANCA si è cominciato a pensare che le vasculiti possano avere una patogenesi autoimmune (15) ed essendo la GNRPI positiva per tali autoanticorpi al pari delle vasculiti

sistemiche, si tende oggi a ritenerla una forma di vasculite limitata al rene.

## **Utilizzazione clinica degli ANCA in nefrologia**

L'impiego di terapie antiinfiammatorie e immunosoppressive riesce a controllare molto spesso e con successo le manifestazioni patologiche nella maggior parte dei pazienti affetti da vasculite sistemica e da GNRP, ma il loro uso non è privo di effetti collaterali anche gravi. È intuibile l'utilità di poter disporre di parametri che consentano il monitoraggio del livello di attività della malattia e di valutarne la risposta al trattamento in modo da adeguare i dosaggi, o interrompere il trattamento stesso in caso di remissione

o di riprenderlo in caso di riattivazione. La positività degli ANCA nella forma attiva di queste malattie, e la caduta del loro tasso sierico nelle fasi di remissione durante il trattamento con corticosteroidi e ciclofosfamide nonché la loro scomparsa nelle fasi di quiescenza della malattia rende conto dell'importanza del test nella pratica clinica.

La diagnosi di vasculite sistemica è rimasta a lungo problematica, spesso una sintomatologia generale aspecifica è l'unica manifestazione della malattia nella fase iniziale. In una fase più avanzata, l'interessamento di organi vitali può portare alla diagnosi bioptica di vasculite sistemica, ma anche il materiale biopatico non sempre è rappresentativo ai fini diagnostici (15, 16). Prima che venisse introdotto il test di ricerca degli ANCA, la diagnosi e il monitoraggio degli indici di attività si basavano sui sintomi clinici e sull'andamento delle proteine della fase acuta della infiammazione, in particolare la Proteina C-Reattiva. La presenza di autoanticorpi contro costituenti del citoplasma dei neutrofili, facilmente determinabili in IFI ed ELISA, diviene un valido aiuto nell'identificazione dei soggetti affetti da vasculite sistemica, e costituisce un progresso diagnostico di grande importanza in questo settore della medicina.

Alcuni Autori ritengono che gli ANCA possano essere il fattore patogenetico alla base del danno vasculitico nelle malattie ANCA-associata; indipendentemente da questo, anche se fossero solo un epifenomeno patologico di accompagnamento, la loro utilità clinica resterebbe comunque incontestabile.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Schmitt WH, Csernok E, Flesch BK et al. Autoantibodies against lysozyme: a new target antigen for antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Proceedings of 4th ANCA International Workshop*; 1992 May; Lubeck.
- 2 Cohen-Tervaert JW, Huitema MG, Dolman KM et al. Clinical significance of autoantibodies to human leucocyte elastase. *Br J Rheumatol* (in press).
- 3 Lesavre P, Chen N, Nusbaum P et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) with anti-lactoferrin activity in vasculitis. *Kidney Int* 1990; 37: 442.
- 4 Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic antibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescent glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651-7.
- 5 Van der Woude FJ, van Dahamres LA. Review: the current status of neutrophil cytoplasmic antibodies. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 143-9.
- 6 Hauschild S, Schmitt WH, Csernok E et al. ANCA in Wegener granulomatosis and related vasculitides. *Proceedings of 4th ANCA International Workshop*; 1992 May; Lubeck.
- 7 Gaskin G, Turner AN, Ryan JJ et al. Significance of autoantibodies to purified proteinase 3 in systemic vasculitis. *Proceedings of 4th ANCA International Workshop*; 1992 May; Lubeck.
- 8 Daha MR, Falk RJ. Anti-myeloperoxidase antibodies and clinical associations. *Netherlands J Med* 1990; 36: 152-3.
- 9 Comm. Third International Workshop on ANCA, Washington, Nov 29-30, 1990.
- 10 Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: a review. *Am J Kidney Dis* 1990; 6: 517-29.
- 11 Couser WG. Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms and therapy. *Am J Kidney Dis* 1988; 6: 449-64.
- 12 Coward RA, Hamdy NAT, Shortland JS et al. Renal micro-polyarteritis: a treatable condition. *Nephrol Dial Transplant* 1986; 1: 31-7.
- 13 Ritz E, Andrassy K, Kuster S et al. Wegener's granulomatosis, microscopic polyarteritis and pauci-immune crescentic necrotizing glomerulonephritis. An overview. In: Sessa A, Meroni M, Battini G eds. *Renal Involvement in Systemic Vasculitis*. *Contrib Nephrol*: Basel: Karger 1991; 94: 1-12.
- 14 Ronco P, Bindi P, Mougenot B et al. Glomerulonephrites extra-capillaires et nécrosantes: aspects diagnostiques et thérapeutiques nouveaux. In: *Séminaires d'Uro-Néphrologie, Pitié Salpêtrière Paris*: Masson 1992.
- 15 Andrassy K. Rapidly progressive glomerulonephritis and Wegener granulomatosis. *Néphrologie* 1992; 13: 279-81.
- 16 Bindi P, Mougenit B, Mentre F et al. Glomérulonephrite extracapillaire nécrosante sans dépôt d'immunoglobuline. Localisation rénale d'une vasculite systémique avec anticorps anticytoplasme des polynucléaires. *Presse Méd* 1991; 20: 1939-43.