

CLINICAL REPORTS

Inflammation and autoimmunity in patients anti-neutrophil nuclear antibodies positive

Caterina Defendenti¹, Corrado Avarino¹, Mariella Saudelli¹, Enrico Magliano², Raffaella Lopa³, Simone Saibeni⁴, Marco Pandolfi⁵

¹Laboratorio analisi, Ospedale Fatebenefratelli, Milano

²Dipartimento Sanità Pubblica, Microbiologia e Virologia, Università di Milano

³Laboratorio di Citometria, Fondazione PO.MA.RE, Milano

⁴Unità di Medicina Interna, Ospedale Fatebenefratelli, Milano

⁵Unità di Pediatria, Ospedale Fatebenefratelli, Milano

Key Word: pANNA, Anti-neutrophil nuclear antibody, Epatite autoimmune, Colangite sclerosante

Infiammazione ed autoimmunità in due casi di colangite sclerosante

SUMMARY

Two patients, female, with overlap syndrome AIH/PSC and pANNA positive, was placed at two extremities of the bimodal curve that characterised the AIH I° behaviour. Therefore they show difference of age (V.L. 76 years and E.G. 8 years) and different prognosis and therapy answer: the disease of the young patient has an aggressive outcome and fails the treatment more commonly. The more important theory to explain this different features was the "molecular footprint hypothesis" that considers decisive the type of HLA II°.

The two patients considered have the same HLADR3. The serological analysis and the recent pathogenically orientations show that the local motives regulate the features of disease: in the child the inflammatory component prevails and maintains a chronic granulomatous aggression, whereas in the old patient the non specific autoimmune IgG prevails and drives a fibrosis evolution and immunosuppressive therapy response. The common positive pANNA can be expression of common chronic auto-inflammatory granulomatous origin.

Received April 10, 2008

Accepted April 29, 2008

INTRODUZIONE

L'epatite autoimmune (AIH) di tipo I° viene diagnosticata in base allo scoring internazionale e presenta inequivocabili caratteristiche cliniche, biochimiche, istologiche e sierologiche (4, 5, 18). Per definizione essa è una infiammazione epatocellulare cronica di causa sconosciuta caratterizzata istologicamente da epatite dell'interfaccia (piecemeal necrosis) associata a ipergammaglobulinemia e autoanticorpi serici epato correlati.

Nella pratica clinica però non è raro osservare situazioni overlap, tra malattie ritenute a patogenesi differente. Un esempio non infrequente riguarda casi che manifestano aspetti di transizione tra epatite autoimmune (AIH) di tipo I° e colangite sclerosante (PSC).

La colangite sclerosante primitiva è probabilmente, secondo Chapman, una malattia immunomediata, piuttosto che immunologica. In effetti essa ha aspetti infiammatori granulomatosi cronici e potrebbe riconoscere come fattore scatenante l'ingresso di batteri o di altri metaboliti tossici nella circolazione portale in seguito ad alterazioni della

parete intestinale. In effetti in letteratura la colangite sclerosante, tipica della giovane età, è spesso descritta come concomitante a malattie infiammatorie intestinali (13) facendo presupporre un momento patogenetico simile. Secondo alcuni autori questa associazione, che non sembra dovuta ad un comune rischio genetico (8), è tanto stretta da rasentare l'80-100% (1, 10, 12, 19). Una recente ipotesi (10, 12) ritiene che queste forme siano il risultato di un danneggiamento dell'immunità innata riguardante le cellule della barriera mucosa ed elementi cellulari, comprendenti neutrofili e macrofagi, che interagiscono in modo patologico con la flora enterica. Nel 100% di dei casi di PSC sono presenti autoanticorpi definiti come pANNA (anti-neutrophil nuclear antibody), diretti verso i PMF e dei quali non è ancora stato identificato il pattern antigenico.

I quadri overlap AIH/PSC, sono spesso di difficile definizione e trattamento. Si discute ancora se ci si trovi di fronte a due differenti malattie o a differenti manifestazioni della stessa malattia (11). I criteri diagnostici di questa sindrome over-

Corresponding author: Caterina Defendenti

Tel.: 02.63632576 - E-mail: caterina.defendenti@fbf.milano.it

lap sono: alte IgG, presenza di autoanticorpi, epatite dell'interfaccia e anomalie al colangiogramma. Anch'essi sono pANNA positivi.

I due casi descritti in questo lavoro, oltre a presentare gli aspetti tipici della sindrome overlap AIH/PSC, possono essere considerati rappresentativi dei due aspetti della curva bimodale con cui sembra esprimersi l'andamento dell'epatite autoimmune di tipo primo. Secondo studi (2, 3) condotti su popolazione anglosassone, l'84% dei pazienti adulti caucasici con epatite autoimmune di tipo I° provenienti dall'Inghilterra e dagli Stati Uniti, è HLA DR3, HLA DR4 o sia HLA DR3 che HLA DR4. Nell'ambito di questa popolazione vengono distinti due gruppi: (6) un gruppo di pazienti adulti (>60aa) con alta frequenza di cirrosi alla presentazione rispetto ai pazienti con età inferiore a 30 anni ma con frequente remissione dopo trattamento steroideo e bassa incidenza di decessi causati dalla malattia epatica. Raramente necessitano di trapianto epatico. Essi presentano HLA DR4 più frequentemente che non i pazienti con età inferiore a 30 anni e, secondo gli autori, questa distinzione genetica può influenzare la frequenza di sviluppo di concomitante tiroidite o malattie reumatiche e la risposta al trattamento. Un secondo gruppo è costituito da pazienti più giovani, con fascia di età inferiore ai 30 anni, con HLADR3 e con remissione meno frequente, che spesso falliscono il trattamento e vanno sottoposti a trapianto di fegato.

Sulla base di queste osservazioni è stata formulata la "molecular footprint hypothesis" secondo la quale differenti alleli in differenti regioni geografiche e gruppi etnici possono favorire lo sviluppo della malattia attraverso la selezione naturale di pazienti con predisposizione genetica all'autoimmunità. La suscettibilità individuale prevista dagli alleli in una regione geografica può essere un "footprint".

Le due pazienti in esame hanno lo stesso fenotipo HLADR3. Interpretando i dati sierologici si è portati a ritenere, supportati dalle più recenti teorie patogenetiche, che il primum movens in ambedue i casi sia costituito da un difetto della reattività innata nei confronti di agenti infettivi che porta ad una flogosi non risolta. L'eccesso di antigene che si viene a creare stimola la formazione di autoanticorpi con varia specificità e bassa affinità. Nella forma dell'età adulta questa componente dell'immunità acquisita viene a prendere il sopravvento a livello locale.

MATERIALI E METODI

ANCA in immunofluorescenza indiretta:

Sono stati utilizzati vetrini di quattro pozzetti con adesi rispettivamente granulociti fissati in etano-

lo, granulociti fissati in formalina, tessuto epatico e cellule HP2; diluizione 1/80 (Granulocytes Mosaic; Euroimmun).

ELIA MPO, PR3

Per la determinazione delle due principali specificità anti neutrofili (MPO e PR3) è stato utilizzato un metodo immunoenzimatico con rilevazione in immunofluorescenza ELIA (Immunocap, Sweden).

ANCA-Combi

Test ELISA per la identificazione di ANCA atipici; riconosce elastasi, lattoferrina, lisozima, BPI, catepsina G (Chematil).

Immunoblot liver

Identificazione in contemporanea di antigeni correlati con epatopatie adesi a striscia di cellulosa: Gp210, sp100, LC1, M2, LKM1, PML SSA-Ro52 (Immunoblot Liver, Euroimmun);

Citometria a flusso

Il GIFT (Granulocyte Immunofluorescence Test) viene eseguito in citometria a flusso, utilizzando il FACSCalibur (Becton Dickinson) a quattro colori con software Cellquest.

Determinazione HLA II° con tipizzazione sierologica in linfocitotossicità.

RISULTATI

A) Reattività autoanticorpale

Paziente in età pediatrica: ANA speckled 1:160; ASMA G 1:160. Il tipo di pattern ed il basso titolo di questi autoanticorpi orientano verso una reattività aspecifica. Questa fluorescenza si è progressivamente ridotta fino a negativizzarsi nel corso della terapia corticosteroidica.

Paziente in età >50 aa: ANA nucleolare e nuclear lamins 1:320; ASMA G 1:320. I patterns evidenziati in questo caso non hanno subito modificazione nel corso della malattia e sono rimasti positivi anche dopo un anno di terapia immunosoppressiva (tabella1).

In ambedue i casi persiste tutt'ora una fluorescenza perinucleare a livello dei granulociti neutrofili fissati in etanolo, non supportata dalla positività ELISA per l'antigene tipico MPO. Alcuni autori (15) ritengono che la presenza di questi autoanticorpi nella sindrome overlap AIH/PSC sia del 100% e che in molti casi non sia possibile risalire al loro target antigenico; da qui la denominazione di anticorpi pANNA (anti-neutrophil nuclear antibody) come una entità a se stante.

La stretta associazione tra la flogosi cronica con

forte presenza granulocitaria a carico dell'albero biliare e la positività pANNA potrebbe essere spiegata dai più recenti orientamenti sulla patogenesi delle malattie autoimmuni: durante le infezioni vengono prodotti numerosi autoanticorpi come risultato di attivazione non specifica (6) di cellule B autoreattive a bassa affinità. Si potrebbe ipotizzare che la presenza di antigeni in eccesso sia in grado di indurre uno stimolo policlonale (7, 14) con produzione di autoanticorpi a bassa affinità, diretti verso più componenti dei polimorfonucleati. Questo tipo di risposta potrebbe essere causa del rilievo di pANCA in IFI senza che necessariamente sia possibile identificare un target antigenico specifico.

La positività pANNA in fluorescenza permane anche dopo trattamento immunosoppressore come permane la flogosi cronica che la sostiene.

B) Valutazione in ELISA degli ANCA atipici

Il basso indice ottenuto in ELISA per ANCA atipici conosciuti non permette, in ambedue i casi, di sciogliere il dubbio sulla natura dell'antigene coinvolto e tuttora classificabile come pANNA. È probabile che questo marker comune sia espressione di una comune origine autoinfiammatoria (tabella 2).

C) Confronto morfologico degli autoanticorpi anti citoplasma dei neutrofili

Dal confronto del quadro IFI per ambedue i casi di overlap AIH/PSC non emergono differenze deci-

sive (figura I). Si possono evidenziare sfumature nelle caratteristiche della fluorescenza che risulta più o meno marcata intorno al nucleo. In formalina si ha negatività per la paziente E.G. e positività molto debole per la paziente V.L.

Le variazioni morfologiche possono dipendere dalla debole differenza nella composizione degli ANCA atipici che mostrano bassa positività per anti-BPI nella paziente pediatrica e bassa positività per autoanticorpi anti-elastasi (antigene strutturalmente simile a MPO, con positività citoplasmatica in formalina) e anti-catepsina G nella paziente adulta.

D) Determinazione in citofluorimetria a flusso degli anticorpi anti-neutrofili

Il test in citometria a flusso è routinariamente finalizzato alla ricerca (9, 17) di anticorpi anti neutrofili in pazienti con neutropenia di sospetta natura allo o autoimmune. Tale test evidenzia l'eventuale sia presenza di anticorpi diretti verso antigeni espressi sulla membrana cellulare dei neutrofili che la presenza di anticorpi nel siero del paziente.

In particolare si esegue il test diretto per la ricerca di anticorpi di classe IgG e IgM adesi alle cellule (neutrofili) del paziente; il test indiretto ricerca gli anticorpi circolanti di classe IgG.

Il test diretto prevede l'incubazione di circa $100-200 \times 10^3$ neutrofili del paziente con un antisiero Fab anti-human IgG e con anti-human IgM. In seguito si effettua una seconda incubazione con un anticorpo monoclonale per la marcatura specifica dei granulociti neutrofili (caratterizzati dell'espressione dell'antigene CD16). Mediante il citometro a flusso viene valutata la quantità di IgG o IgM adese a queste cellule.

Contestualmente si esegue il test indiretto che consiste nell'eseguire il cross-match del siero del paziente con 5-10 campioni di neutrofili di soggetti sani. Segue poi un'incubazione con l'antisiero anti-human IgG. I risultati dei test vengono quindi valutati in riferimento ai valori di controllo della giornata.

La paziente in età adulta presenta negatività per il test diretto ma una marcata positività nel test indiretto. Questo dimostra la presenza di anticorpi circolanti contro antigeni presenti sulla membrana dei polimorfonucleati (test indiretto positivo). Questi ultimi non sono però in grado di legarsi stabilmente sulla superficie delle cellule (test diretto negativo) e quindi di sostenere una granulocitopenia o manifestazioni sistemiche; essi probabilmente contribuiscono alla evoluzione fibrotica della flogosi epatica (tabella 3).

Nella paziente in età infantile invece non sono presenti autoanticorpi anti-neutrofili, né adesi alle cellule né circolanti.

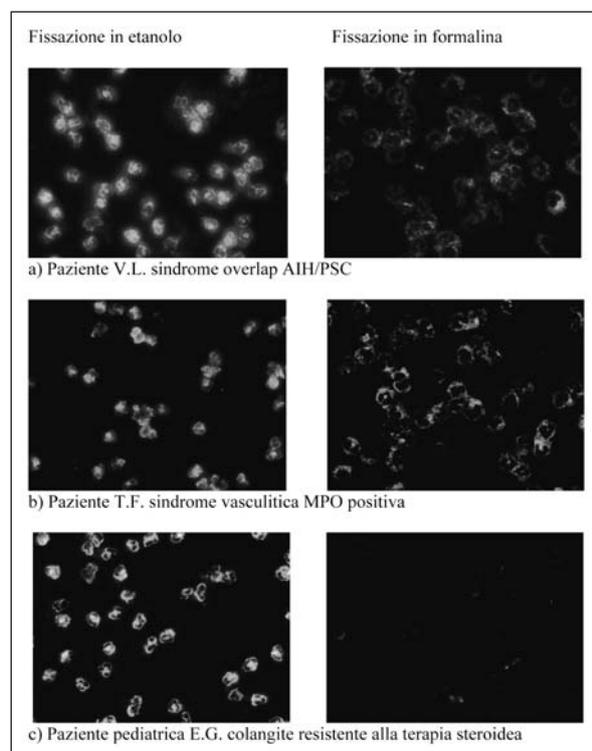


Figura I. Aspetto morfologico in IFI

Tabella 1. Schema riassuntivo degli aspetti autoimmunitari delle pazienti

	PAZIENTE PEDIATRICA		PAZIENTE >50 ANNI	
	ALL'ESORDIO	DOPO TRATTAMENTO	ALL'ESORDIO	DOPO TRATTAMENTO
autoanticorpi				
ANA	1:160 speckled	negativo	1:320 nuclear lamins e nucleolare	1:320 nuclear lamins e nucleolare
ASMA	1:160	negativo	1:320	1:320
APGA	negativo	negativo	negativo	negativo
AMA	negativo	negativo	negativo	negativo
LKM	negativo	negativo	negativo	negativo
LC1	negativo	negativo	negativo	negativo
SLA/LP BLOT	negativo	negativo	negativo	negativo
ANTI-MPO Metodo ELIA	negativo	negativo	negativo	negativo
ANTI-PR3 Metodo ELIA	negativo	negativo	negativo	negativo
ANCA ATIPICO IFI	pANCA +++	pANCA +++	pANCA +++	pANCA +++

Tabella 2. Schema riassuntivo degli ANCA atipici valutati in ELISA

		Campione V.L.	Campione E.G.
A	Miscela antigeni	Negativo	CUT-OFF
B	PR3	0,9	0,5
C	MPO	0,6	0,4
D	BPI	0,6	1,4
E	Elastasi	1,4	0,9
F	Catepsina G	1,1	0,6
G	Lisozima	0,8	0,7
H	Lattoferrina	0,5	0,5

Tabella 3. Schema riassuntivo della reattività antineutrofili in citometria a flusso

IgG-IgM antineutrofili in citometria a flusso	PAZIENTE PEDIATRICA	PAZIENTE >50 aa
TEST DIRETTO	NEGATIVO	NEGATIVO
TEST INDIRETTO	NEGATIVO	POSITIVO CONTRO TUTTE LE SOSPENSIONI CELLULARI

CONCLUSIONI

Le due pazienti prese in esame sono ambedue HLA DR3 ma dal punto di vista clinico e prognostico appartengono ciascuna a uno dei differenti gruppi della curva bimodale. Ambedue presentano un impegno colangitico e sono positivi per anticorpi pANNA.

Analizzando le caratteristiche di questi due casi sembra emergere l'ipotesi della presenza di due fasi patogenetiche: una, quella in età infantile, in cui l'aspetto prevalente è di tipo infiammatorio e l'altra, in età adulta, in cui assume maggiore importanza la componente autoimmunitaria che

mantiene però le caratteristiche di un'aggressione locale senza assumere connotati sistemici.

In effetti nella forma pediatrica il trattamento immunosoppressore, solo corticosteroidico, non si è dimostrato clinicamente efficace (persistenza di transaminasi e gamma GT elevate): la negativizzazione dei parametri immunitari valutati in IFI ed ELISA (xANCA in IFI è l'unico parametro che persiste positivo) dopo terapia è stata accompagnata da un miglioramento clinico solo parziale.

La paziente in età adulta manifesta invece un overlap autoimmune: sono presenti autoanticorpi con patterns differenti (nuclear lamins, nucleolare, ASMA, anti antigeni di superficie dei neutrofili, anti elastasi, anti catepsina G)

la maggior parte dei quali rimane rilevabile in laboratorio anche dopo remissione sintomatologica in seguito a trattamento con corticosteroidi e azatioprina. L'esito è una evoluzione fibrotica.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze la forma a prevalente componente infiammatoria è più difficilmente diagnosticabile e curabile.

La comune origine autoinfiammatoria potrebbe essere testimoniata dalla positività pANNA. È probabile che questo marker comune dia luogo ad espressioni patologiche diverse in relazione all'età delle pazienti con prevalente espressione infiammatoria nelle forme giovanile e progressivo maggiore coinvolgimento autoimmune nelle forme dell'adulto.

Il basso indice ottenuto in ELISA per ANCA atipici conosciuti e le caratteristiche in IFI non permettono, in ambedue i casi, di sciogliere il dubbio di un overlap tra le specificità riscontrate e un pattern sconosciuto e tuttora classificabile come pANNA (16). Nella forma in età adulta è però evidenziabile in citometria un parametro aggiuntivo costituito dalla presenza di anticorpi diretti contro marker di superficie dei granulociti neutrofili dotati di scarsa affinità; esso può essere interpretato come una conferma della tendenza alla estensione della risposta autoimmune verso determinanti antigenici sempre più vari senza che venga raggiunto un punto di rottura in grado di indurre una risposta sistemica.

I più recenti orientamenti sulla patogenesi delle malattie autoimmuni considerano fondamentale un'alterata capacità di risposta alle infezioni che induce un'importante flogosi cronica. Con il perdurare dello stimolo dell'immunità innata, vengo-

no prodotti numerosi autoanticorpi come risultato di attivazione non specifica (6) di cellule B auto-reattive a bassa affinità.

Si ipotizza che la presenza di antigeni in eccesso sia in grado di indurre uno stimolo policlonale (7, 14) con produzione di autoanticorpi a bassa affinità, diretti verso più componenti dei polimorfonucleati. Dal punto di vista laboratoristico sarebbe quindi possibile rilevare positività intensa pANCA senza poter identificare un singolo antigene coinvolto.

BIBLIOGRAFIA

1. Broomé U, Bergquist A. Primary sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease, and colon cancer *Semin liver dis.* 2006 feb; 26(1): 31-41.
2. Czaja AJ, Doherty DG, Donaldson PT. Genetic Bases of Autoimmune Hepatitis *Digestive Diseases and Sciences.* October 2002; 47(10): 2139-50.
3. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and live cell injury in autoimmune hepatitis *Immunological. Reviews* 2000; 174: 250-9.
4. Czaja AJ. Diverse manifestations and evolving treatments of autoimmune hepatitis. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51: 313-3.
5. Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 1998; 28: 360-5.
6. Gross WL, Trabandt A, et al. Pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Ann Med Interne (Paris).* 1998 Sep; 149(5): 280-6.
7. Harper H, Cockwell P, et al. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney International* 2001; 59: 1729-38.
8. Karlsen TH, Hampe J, Wiencke K, et al. Genetic polymorphisms associated with inflammatory bowel disease do not confer risk from primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 115-21.
9. Kieffhaefer K, et al. Detection of granulocyte antibodies by flow cytometry without the use of pure granulocyte isolates. *Trasfusione* 2000-vol. 40, supplement, 104 S
10. Korzenik JR. Is Crohn's disease due to defective immunity? *Gut* 2007; 56: 2-5.
11. La patologia epatica autoimmune oggi: dalla diagnosi al trapianto. Riunione monotematica A.I.S.F. 2006. Bologna, 5-6 ottobre 2006.
12. Levine AD, Fiocchi C. Immunology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 200 Jul; 16(4): 306-9.
13. Premoli A, Morello E, Bo S, Durazzo M. Diagnostic and Therapeutic questions in overlap syndromes of autoimmune hepatitis. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2007 Mar; 53(1): 79-82.
14. Soulas P, Woods A, et al. Autoantigen, innate immunity and T cells cooperate to break B cell tolerance during bacterial infection. *J Clin Invest* 2005; 115: 2257-67.
15. Terjung B. *Eur J Med Res* 2004; 9: 439-48.
16. Terjung B, Worman HJ, et al. Differentiation of anti-neutrophil nuclear antibodies in inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) using immunofluorescence microscopy; *Clinical & Experimental Immunology* October 2001; 126(1): 37-46.
17. *Trasfusione Medicine Methods for detection of neutrophil antigen/antibody reactions; Part VIII, 1976-1979.*
18. Vergani D, Mieli Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Autoimmunity Reviews* 2 (2003); 241-7.
19. Xiaofa Quin. Primary Sclerosing Cholangitis and Inflammatory Bowel Disease: Where is the link? *American Journal of Gastroenterology* 2007-1332.