

RIASSUNTO

Background. Le vasculiti necrotizzanti, delle quali fa parte la Granulomatosi di Wegener (GW), sono un gruppo di malattie infiammatorie della parete dei vasi di piccolo e medio calibro. In particolare, la GW compare molto spesso dopo persistenti infezioni delle prime vie respiratorie, coinvolge quasi sempre polmoni e reni, presenta periodi di remissione e di riesacerbazione e prevede una prolungata terapia dai molteplici effetti collaterali. E' caratterizzata dalla presenza in circolo di autoanticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA).

Gli ANCA sono autoanticorpi diretti contro antigeni enzimatici contenuti nei granuli primari dei neutrofili e nei lisosomi perossidasi-positivi dei monociti. I due antigeni principali sono rappresentati dalla serin proteinasi-3 (PR3), una proteina citoplasmatica, e dalla mieloperossidasi leucocitaria (MPO). L'immunofluorescenza indiretta permette di distinguere due pattern, citoplasmatico (c-ANCA) e perinucleare (p-ANCA), a seconda dell'antigene coinvolto, rispettivamente PR3 e MPO.

Entrambi i pattern di presentazione degli ANCA, in prevalenza p-ANCA, sono stati rilevati anche nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), termine con il quale si accomunano due entità cliniche: la Malattia di Crohn (MC) e la Colite Ulcerosa (CU).

Scopo dello studio. Valutare la prevalenza degli ANCA in una popolazione affetta da GW ed in una con MICI; il pattern di presentazione; la correlazione tra il titolo anticorpale, la fase di malattia con la sede di malattia; la correlazione tra gli ANCA e la risposta al trattamento; il ruolo degli agenti infettivi come fattori scatenanti la produzione degli ANCA.

Pazienti e metodi. Abbiamo valutato 13 pazienti affetti da GW afferiti al nostro Centro. Alcuni possiedono un follow-up di almeno 5 anni. In tutti i pazienti sono stati dosati gli ANCA al momento della diagnosi e durante le fasi di riesacerbazione, con esami colturali in caso di episodi infettivi.

Sono stati arruolati 37 pazienti affetti da MICI che sono afferiti alla Clinica Chirurgica I per eseguire la resezione colica o il trattamento degli ascessi e delle fistole perianali; 15 pazienti affetti da Crohn e 12 pazienti con colite ulcerosa. I pazienti sono stati valutati in due tempi: in fase preoperatoria e a distanza di 3 mesi dall'intervento.

Per ogni fase era prevista la titolazione degli ANCA, la valutazione dell'immunità umorale (indici di infiammazione sistemica: VES, PCR, fibrinogeno; emocromo con formula) e la determinazione diretta od anamnesticca di quadri infettivi. Per il dosaggio degli ANCA è stata utilizzata la metodica dell'immunofluorescenza indiretta; in caso di risultato positivo, il dato è stato riconfermato con metodica ELISA.

Risultati. Gli ANCA si sono dimostrati utili, se non determinanti, nel 85% dei pazienti affetti da GW, con titolo variabile da 1:160 a 1:1280. I c-ANCA presentano nei pazienti affetti da GW una specificità pari al 100%. Gli ANCA, positivi in tutti i pazienti all'esordio, sono ricomparsi nel follow-up soltanto in 3 di loro. Episodi infettivi sembrano essere il fattore scatenante le riacutizzazioni. La presenza di *Staphylococcus aureus* sembra indurre nei pazienti con GW la ricomparsa degli ANCA ed infezioni batteriche e/o virali possono essere responsabili delle riacutizzazioni ANCA-negative.

La percentuale di positività dei p-ANCA, nei pazienti affetti da colite ulcerosa, risulta essere del 83% nella fase pre-trattamento chirurgico, mentre risulta solo del 20% nei pazienti affetti da MC. Nella fase post-chirurgica, la prevalenza degli ANCA nella CU rimane del 75% e rimane invariata anche nei pazienti affetti da MC. Emerge soltanto, dopo l'intervento chirurgico, una riduzione del titolo anticorpale, soprattutto nei pazienti in cui questo risultava elevato prima del trattamento. Sia per il MC che per la CU, il confronto tra il titolo degli ANCA ed il dosaggio degli indici di flogosi considerati prima e dopo trattamento, non ha raggiunto comunque una significatività statistica

Conclusioni. Anche il nostro studio dimostra l'utilità della ricerca e dosaggio degli ANCA nella diagnosi e follow-up della GW. I p-ANCA hanno una netta prevalenza nella Colite Ulcerosa mentre sono di scarso riscontro nelle altre malattie. Pur non rivestendo un ruolo determinante nella diagnosi e predittivo nella prognosi delle malattie infiammatorie croniche intestinali, gli ANCA risultano dal nostro studio un utile test aggiuntivo nella diagnostica differenziale tra morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa.

ABSTRACT

Role of ANCA in necrotizing vasculitis and in chronic inflammatory intestinal disease.

Background: Wegener's granulomatosis (WG), Microscopic Polyangiitis and Churg-Strauss Syndrome, the necrotizing vasculitis, are a group of inflammatory diseases of the wall small-medium calibre blood vessels. This group of diseases are histologically characterized by the presence of necrotic tissue with a consequent inflammatory infiltration and the formation of granulomas. WG is a disease which has periods of remission and recurrence treated by therapeutic cycles associated with several side-effects. It is characterized by the presence in serum of anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). ANCA are auto-antibodies against enzymatic antigens found in primary granules of neutrophils and in peroxidase-positive lysosomes of monocytes. The two main antigens are serine proteinase-3 (PR3), a cytoplasmic protein and leucocyte myeloperoxidase (MPO). Indirect immunofluorescence permits to differentiate two distinct patterns, cytoplasmic (c-ANCA) and perinuclear (p-ANCA), according to the involved antigen, accordingly PR3 and MPO.

Both patterns of ANCA presentation, mainly p-ANCA, are found in chronic inflammatory intestinal disease (IBD), noticeably Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC).

Study goal: To evaluate the prevalence of ANCA in a population of patients with WG and one with CIID. In these two groups we studied: presentation pattern, correlation among antibody titer, clinical phase and disease localization; the role of infective agents as factors initiating ANCA production. Finally we correlated ANCA titers with response to treatment and disease complications.

Patients and methods: we studied 13 patients with WG, some of which we had treated for over 7 years. In all patients ANCA levels were titred at the moment of diagnosis and during recurrences. Cultures were performed during episodes of infectious disease.

37 patients with IBD admitted to a general surgical department for colic resection or for treatment of anal abscesses or fistulas were also studied, of these 12 had UC and 15 CD. Patients were studied in 2 different stages: preoperatively and 3 months after surgery. We evaluated: ANCA dosage, erythrocyte sedimentation rate, CRP, fibrinogen levels, direct or anamnestic determination of infectious episodes. Serum ANCA levels were dosed

according to indirect immunofluorescence and, if positive, their presence was confirmed by ELISA.

Results: ANCA were useful, if not decisive, in 85% of patients with WG, with titers ranging from 1:160 to 1:280. c-ANCA were 100% specific in patients with WG. ANCAs reappeared during follow-up in only 3 patients. Infectious episodes seemed to have been the factor causing recurrence. The presence of *Staphylococcus aureus* seems to favor the reappearance of ANCA in patients with WG while bacterial and/or viral infections may be responsible for ANCA-negative.

p-ANCA were detected in 83% of patients with CU and in only 20% of patients with MC before surgery. After surgical treatment, ANCA were detected in 75% of patients with CU, while remain 20% in MC patients, but with lower titer.

Conclusions: also our study demonstrates to the usefulness of the search and dosage of the ANCA in the diagnosis and follow-up of the GW. P-ANCA had a clean prevalence in the UC but they aren't useful in other chronic diseases. Also not playing a determining role in the diagnosis and not predicting in the prognosis of the IBD, ANCA turns out from our study a useful additional test in the diagnostic one differentiates them between UC and MC.

INTRODUZIONE

Gli AUTOANTICORPI ANTICITOPLASMA DEI NEUTROFILI (ANCA)

Nel 1982 Davies e collaboratori (1) pubblicarono il primo articolo riguardante un particolare tipo di autoanticorpi che reagivano contro il citoplasma dei granulociti neutrofili; tali autoanticorpi erano stati riscontrati in 8 pazienti affetti da glomerulonefrite necrotizzante e vasculite dei piccoli vasi. Due anni più tardi Hall (2) confermava questo dato in 4 pazienti anch'essi con vasculite dei piccoli vasi.

Questi autoanticorpi evidenziati negli anni ottanta dagli autori sopracitati erano stati di fatto scoperti e descritti ancora nel lontano '59 da Paul Calabresi e collaboratori (3) in un gruppo di pazienti con varie malattie reumatiche o politrasmici. Furono considerati come dei fattori antileucocitari e furono ritenuti responsabili, soprattutto in pazienti con sindrome di Felty, della leucopenia. Vennero anche tentati degli esperimenti in vivo per poter dimostrare la capacità di questi "fattori antileucocitari" di indurre una caduta della conta globale dei globuli bianchi. Le complicanze che seguirono a questi esperimenti ed il mancato riscontro di una sicura azione di questi autoanticorpi nei confronti dei globuli bianchi, non suscitarono grande interesse. Per questo motivo tali anticorpi rimasero negletti a lungo e non ebbero tanto successo neanche dopo la segnalazione di Davies.

Soltanto nel 1985 con Van der Woude (4) l'attenzione si riaccese, allorché questo autore ne suggerì un ruolo importante: infatti potevano essere considerati un utile marcatore diagnostico e prognostico per una particolare vasculite dei piccoli vasi, la Granulomatosi di Wegener (GW).

Da questo momento in poi fiorì un grosso numero di studi che contribuì ad associare strettamente gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) ad uno spettro di vasculiti necrotizzanti dei piccoli vasi che comprendono la GW, la Sindrome di Churg-Strauss (SCS) e la Poliangiote Microscopica (PM) (5, 6, 7, 8).

Gli ANCA sono anticorpi specifici rivolti contro molecole enzimatiche contenute nei granuli primari dei neutrofili e nei lisosomi perossidasi-positivi dei monociti. Tali autoanticorpi si possono riscontrare nel siero dei pazienti con tecniche di

immunofluorescenza indiretta, usando come substrato dei neutrofili di donatore fissati in alcol (9). In questo modo, qualora il campione esaminato fosse positivo, le caratteristiche morfologiche della colorazione possono apparire di due tipi: citoplasmatico (c-ANCA) e perinucleare (p-ANCA). I due antigeni principali sono rappresentati rispettivamente dalla serin-proteinasi3 (PR3), una proteina citoplasmatica di 29 kD e la mieloperossidasi leucocitaria (MPO), una proteina di 130 kD (10, 11, 12, 13, 14).

Altre molecole enzimatiche presenti nei polimorfonucleati sono state testate come possibili antigeni riconosciuti dagli ANCA: lattoferrina e lisozima (15, 16), costituenti dei granuli specifici, elastasi e catepsina G (17, 18), due altre serin-proteinasi contenute nei granuli azurofili, BPI (bacterial increasing protein) (19), h-lam2 ed azurocidina (20). Questi antigeni sono presenti però generalmente in patologie non vasculitiche come la colangite sclerosante, le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (15, 21), alcune infezioni come quella da HIV, malattie reumatiche come LES ed artrite reumatoide (16, 22) ed alcune neoplasie (23, 24).

Come precedentemente descritto, comunque, gli ANCA, rivolti contro i due principali antigeni PR3 e MPO, sono associati ad alcuni processi vasculitici dei piccoli vasi ed in questi sembra possano giocare un significativo ruolo patogenetico (25).

Già dai primi studi di Van der Woude (4), emergeva come gli ANCA comparissero più frequentemente e ad un titolo più elevato in quei pazienti in cui la malattia era in fase di attività rispetto a coloro in cui era quiescente. In seguito poi altre pubblicazioni misero in relazione la presenza di ANCA con il decorso clinico della malattia (26, 27, 28, 29).

L'evidenza clinica più probante per il ruolo degli ANCA come causa di vasculite è l'osservazione che alcuni farmaci, come propiltiouracile, idralazina e penicillamina sono in grado di indurre la formazione di ANCA e che questi sono associati allo sviluppo di vasculiti dei piccoli vasi, identiche sul piano anatomopatologico, alle vasculiti pauci-immuni ANCA-associate (30, 31, 32).

Le vasculiti ANCA-associate sono state definite anche pauci-immuni poiché nel vaso sede della lesione non è possibile riscontrare depositi di immunoglobuline. Le cellule che sembrano ricoprire il ruolo patogenetico più importante sono i neutrofili, anche se non è chiaro quale sia il *primum movens* del processo.

In seguito ad un evento patogenetico ancora sconosciuto, come potrebbe essere un'infezione, vengono liberate numerose citochine, tra cui IL-1, IL-8, TNF α che attivano

i neutrofili e li stimolano a degranulare (33); vengono così liberate dai granuli primari PR3 e MPO che in parte vengono rilasciate in circolo, in parte vengono trasportate sulla membrana cellulare. In questo modo diventano antigenicamente significative e stimolano la produzione di ANCA. Il legame degli ANCA ai propri antigeni espressi sulla membrana citoplasmatica dei neutrofili attivati induce l'attivazione completa di questi ultimi, provocando un'ulteriore degranulazione ed un incremento del "respiratory burst" (34); la conseguenza di tutto ciò è la liberazione di una grande quantità di enzimi tossici e litici per le cellule endoteliali circostanti (35, 36).

Da alcuni studi sperimentali eseguiti in vitro, risulta poi come le cellule endoteliali attivate siano in grado non solo di legare PR3 ed MPO alla superficie cellulare, ma anche di sintetizzare ed esporre PR3 sulla propria membrana (37, 38). Il legame degli ANCA alla PR3 endoteliale indurrebbe l'espressione di molecole di adesione e la produzione di citochine con conseguente reclutamento di polimorfonucleati, amplificazione della flogosi e del danno vascolare (39).

Questo, nel paziente con ANCA presenti nel siero, avverrebbe in particolar modo in quei siti in cui i leucociti sono in stretto contatto con la parete vasale, come nel glomerulo renale e nei capillari polmonari (40).

Le vasculiti ANCA-associate sono le più comuni vasculiti sistemiche dei piccoli vasi dell'adulto e comprendono la GW, la PM e la SCS (41). Le lesioni istologiche generalmente prediligono venule, capillari ed arteriole, ma possono anche colpire arterie e vene di calibro maggiore (42, 43).

La Granulomatosi di Wegener: epidemiologia, quadro anatomopatologico e clinico

La granulomatosi di Wegener è una vasculite necrotizzante che coinvolge i vasi arteriosi e venosi di piccolo calibro, specialmente del polmone e delle vie aeree superiori e del rene. È caratterizzata dalla presenza nella parete o a ridosso del vaso di un granuloma necrotizzante, distruttore del tessuto limitrofo (44, 45, 46).

La GW è una malattia non comune che interessa entrambi i sessi con una lieve prevalenza maschile (M/F 1.6:1). Può insorgere a tutte le età anche se interessa soprattutto l'età adulta (età media 50 anni) e la razza bianca (97%).

L'eziologia è sconosciuta. Non è documentata una familiarità e la ricerca di fattori genetici predisponenti non ha dato risultati sicuri, anche se alcune casistiche hanno evidenziato una certa correlazione con l'HLA-DR1 e l'HLA-DQw7. Altri studi hanno osservato come nei pazienti con GW siano maggiormente rappresentate varianti alleliche anomale di geni codificanti per l' α -1 antitripsina (α -1 protease inhibitor), potente inibitore di proteasi quali la PR3 (47, 48) e l'elastasi ed importante quindi nel limitare il potenziale distruttivo di questi enzimi. Nel corso degli anni molti tentativi sono stati fatti per dimostrare il nesso tra infezione e sviluppo della patologia. Numerose osservazioni hanno posto l'attenzione sulla maggior incidenza della GW nei mesi invernali, soprattutto in concomitanza di fenomeni epidemici di infezione delle alte vie respiratorie (49). Tuttavia, l'analisi del liquido di lavaggio broncoalveolare (BALF) in pazienti con recente insorgenza di GW non ha mai rivelato la presenza di batteri, micoplasmi o miceti. Studi di ibridizzazione in situ su biopsie polmonari di lesioni attive non hanno dimostrato la presenza di nessuna sequenza di acidi nucleici virali. Tutto ciò non ha però screditato l'ipotesi che possa esistere un fattore infettivo scatenante e che infezioni delle vie respiratorie possano giocare un ruolo preminente anche nell'insorgenza delle recidive (50, 51, 52). Nel 1985 Van der Woude ha descritto per primo l'associazione tra i c-ANCA e la GW. Da allora si è aperto il dibattito se gli ANCA abbiano un ruolo patogenetico o siano solamente degli epifenomeni della malattia (53). Gli ANCA sono in grado di legare i loro antigeni bersaglio sulla superficie dei neutrofili e delle cellule endoteliali attivate dall'interazione con alcune citochine (IL-1, TNF α , IL-8, ecc.). Tale evento, mediante la degranolazione dei neutrofili ed il rilascio di enzimi lisosomiali e

radicali liberi dell'ossigeno è potenzialmente dannoso per i vasi ed i tessuti interessati (54). Va sottolineato che la correlazione tra la presenza di c-ANCA e la GW è molto alta (85-90%) (55). Questi anticorpi inoltre sono sempre presenti nella GW generalizzata. Infine, data la natura granulomatosa della GW, sicuramente la risposta immunitaria cellulo-mediata risulta coinvolta nell'insorgenza e nello sviluppo delle lesioni (56).

Da un punto di vista anatomopatologico le tipiche lesioni infiammatorie della GW sono la necrosi, i granulomi e la vasculite. Tali reperti possono essere virtualmente riscontrati in ogni organo del corpo. Nelle fasi precoci della malattia, però, vanno ricercati con biopsie su tessuti delle alte vie respiratorie. A livello polmonare si configura generalmente un pattern serpiginoso a "carta geografica" con alternanza di aree di necrosi e vasculite. I foci necrotici ("microascessi") possono o meno evidenziare la presenza di granulomi e cellule giganti multinucleate (57). Gli eosinofili possono essere presenti nell'infiltrato infiammatorio ma non in maniera eclatante come si riscontra nella sindrome di Churg-Strauss. La vasculite può interessare sia i vasi arteriosi che venosi (58). Fenomeni trombotici di vasi di medio e grosso calibro possono contribuire alla necrosi ischemica del parenchima ed alla formazione di cavitazioni (reperto assai caratteristico all'Rx del torace). In più di un terzo dei pazienti è riscontrabile una capillarite capace di causare una emorragia alveolare diffusa, talvolta fulminante. Va ricordato che le biopsie transbronchiali raramente risultano diagnostiche (< 7%), mentre le biopsie a polmone aperto sono in grado di rilevare la presenza delle alterazioni istologiche, variamente combinate tra loro, nel 90% dei casi.

L'interessamento renale in corso di GW è caratterizzato nelle fasi precoci da una glomerulonefrite focale e segmentale che talvolta evolve in una glomerulonefrite necrotizzante rapidamente progressiva, spesso fatale. La necrosi e la tendenza alla proliferazione cellulare si possono presentare in vari gradi. La formazione di semilune e l'aumento di tessuto fibroso sono frequentemente osservabili. Raramente le lesioni evidenziano un carattere granulomatoso ed il riscontro di depositi di immunocomplessi è del tutto inusuale. Le biopsie renali pertanto forniscono un reperto compatibile piuttosto che diagnostico di GW.

L'introduzione degli ANCA nei test di screening ha sicuramente facilitato sia la diagnosi che il monitoraggio della GW, ma non ha eliminato la necessità di un riscontro istologico per giungere ad una diagnosi certa (59).

Nelle fasi iniziali della malattia, infatti, la diagnosi risulta piuttosto difficile in quanto dominano sintomi del tutto aspecifici, quali febbre, anoressia e calo ponderale. L'interessamento tipico delle alte vie respiratorie, caratterizzato da rinite crostoso-emorragica con epistassi ricorrenti e perforazione del setto, spesso non conduce ad una diagnosi corretta in quanto le biopsie della mucosa nasale mostrano nell'80% dei casi una flogosi aspecifica.

La radiografia, ma soprattutto una TAC dei seni paranasali è in grado di evidenziare gravi sinusiti e processi erosivi alle strutture ossee adiacenti. L'Rx del torace può rivelare la presenza di noduli, (singoli o multipli) di varie dimensioni, talvolta con cavitazioni o con infiltrati alveolari ed interstiziali generalmente localizzati. Raramente sono interessati i linfonodi ilari e parailari.

Altre sedi meno frequentemente interessate dalla vasculite sono l'occhio con cheratiti, congiuntiviti, uveiti, ostruzione del canale naso-lacrimale e propoli (pseudotumore retrorbitale, causato dall'infiltrazione di tessuto granulomatoso nello spazio retrorbitale) (60), la cute con una porpora palpabile, ulcere, noduli sottocutanei ed il sistema nervoso, con possibile formazione di granulomi all'interno del tessuto cerebrale (61) oppure una neuropatia sensitivo-motoria periferica.

Per quanto riguarda gli indici biumorali, l'emocromo evidenzia frequentemente un'anemia sideropenica da flogosi cronica, una leucocitosi neutrofila con eosinofili nella norma, una trombocitosi; sono aumentati gli indici di flogosi (VES, PCR). E' spesso presente un'ipergammaglobulinemia, generalmente policlonale. Quando vi è interessamento renale il reperto più frequente è una microematuria associata ad una lieve proteinuria con modesto aumento della creatininemia.

In presenza di un quadro compatibile con una vasculite sistemica, il riscontro di un titolo significativo di c-ANCA risulta molto probante per la diagnosi di GW (specificità 80-90%, in pazienti con GW generalizzato e 55-66% in pazienti con forma localizzata, ambedue in fase di attività) (62).

Terapia

La terapia corticosteroidea da sola, pur riducendo la flogosi e migliorando la sintomatologia, non è in grado di arrestare la progressione della malattia, tanto che le

recidive ricorrono molto frequentemente. Il trattamento viene cominciato con alte dosi di cortisone (prednisolone 1 mg/Kg/die), mantenuto per almeno un mese e quindi scalato gradualmente. Nei casi in cui la presentazione della malattia sia drammatica (glomerulonefrite rapidamente progressiva o emorragia alveolare diffusa), l'attacco può essere a bolo (metilprednisolone 1 gr/die per 3 giorni). Da quando negli anni '70 Fauci e Wolff introdussero la ciclofosfamide (CP) a basse dosi giornaliere in associazione con i glucocorticoidi, ottenendo un drastico miglioramento della prognosi, la somministrazione di questo immunosoppressore è ritenuta obbligatoria. La CP viene somministrata al dosaggio di 2 mg/Kg/die, mantenendola per almeno 6 mesi dopo la completa remissione dei sintomi, poi gradatamente ridotta di 25 mg ogni 2 mesi. E' molto importante monitorare la comparsa di effetti collaterali a breve e a lungo termine. Essendo la CP un agente alchilante, la crasi ematica va continuamente controllata ed ai primi segni di una mielosoppressione, la terapia va ridotta. I metaboliti del farmaco vengono eliminati per via urinaria. Uno di questi, l'acroleina, può causare cistiti emorragiche, firosi, mielodisplasia e talvolta carcinoma della vescica. Negli ultimi anni, la significativa morbilità riferita al trattamento con CP, ha indotto la ricerca di validi presidi terapeutici meno tossici. Buoni risultati sono stati ottenuti associando agli steroidi il methotrexate (15-20 mg/settimana), soprattutto nelle forme moderate. E' stata anche utilizzata l'azatioprina come terapia di mantenimento dopo remissione in pazienti che non tolleravano più la CP. Alcuni autori hanno riportato buoni risultati nella remissione e nella prevenzione delle recidive utilizzando il trimetoprim-sulfametossazolo in monoterapia. Tali dati però non sono uniformemente accettati. La ciclosporina e la terapia immunoglobulinica endovenosa (IVIg) non hanno sortito i risultati sperati (63, 64).

Le Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali

Con il termine malattie infiammatorie croniche intestinali si accomunano due entità cliniche: la malattia di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (CU). Nella MC, la flogosi interessa tutto lo spessore della parete intestinale e può colpire qualsiasi tratto dell'apparato gastro-enterico, dalla bocca all'ano. Nella CU l'infiammazione è confinata alla mucosa e alla sottomucosa ed interessa soltanto il colon a partenza dal retto. Nel 15% circa dei casi la flogosi interessa il colon ed istologicamente non è possibile fare una distinzione fra le due forme anche se è evidente la presenza di un'infiammazione cronica. In questi casi si parla di colite indeterminata e solo l'evoluzione della malattia nel tempo consentirà una distinzione in una delle due forme. L'andamento clinico di queste malattie è caratterizzato da remissioni e recidive. L'eziopatogenesi è sconosciuta (70). Numerosi sono stati gli agenti patogeni che sono stati considerati responsabili soprattutto della malattia di Crohn. Lo stesso Crohn nella sua prima descrizione che risale al 1932, ne sottolineava la differenza con la tubercolosi intestinale. Attualmente gli agenti trasmissibili ancora oggetto di indagine sono il *Mycobacterium paratuberculosis* (71) ed il virus del morbillo, ma più che ad un singolo agente causale oggi si ritiene che tali malattie siano dovute ad un'abnorme risposta immunologica nei confronti di agenti ubiquitari (72). Modelli sperimentali animali e studi su pazienti hanno messo di recente in evidenza che la normale flora batterica, in individui geneticamente predisposti, possa costituire uno stimolo per lo sviluppo di infiammazione cronica a livello della mucosa intestinale. Nella malattia di Crohn un'iperattivazione dell'immunità cellulo-mediata mucosale svolge un ruolo preminente nello sviluppo delle lesioni isto-patologiche e probabilmente media alcune delle manifestazioni sistemiche della malattia. Un ruolo centrale ha, a livello della mucosa intestinale, il linfocita T CD4 di tipo Th1 che produce interferon γ . Nella colite ulcerosa sembra invece predominare l'immunità umorale con la deposizione di immunocomplessi e la produzione di autoanticorpi come quelli rivolti verso il citoplasma dei neutrofili (ANCA). In entrambi le condizioni è presente un denso infiltrato di macrofagi, che producono citochine pro-infiammatorie come il TumorNecrosisFactor α (TNF α). La prevalenza delle malattie infiammatorie croniche intestinali presenta una notevole variabilità secondo il paese di origine, da meno di uno a più di 20 casi per 100.000 abitanti (73). Considerate molto più frequenti nei paesi del

Nord rispetto a quelli del Sud Europa, negli ultimi anni si è assistito ad un notevole aumento d'incidenza anche nell'Europa mediterranea e questo sembra correlato con il miglioramento delle condizioni socio-economiche. Si è poi verificato un rapido e progressivo aumento dei casi ad esordio in età pediatrica. Il 25% dei nuovi casi nella popolazione generale ha meno di 20 anni. La maggior parte delle diagnosi in età pediatrica viene effettuata fra i 10 e i 16 anni di vita. E' tuttavia possibile un esordio molto precoce nei primi anni di vita. Esiste una predisposizione genetica a sviluppare una malattia infiammatoria cronica intestinale e forse un'associazione con determinati aplotipi HLA di classe II (74) (75). I parenti di primo grado di pazienti affetti da malattia di Crohn presentano un rischio di contrarre la malattia dalle 12 alle 15 volte più elevato rispetto alla popolazione generale. Circa il 50-60% dei pazienti con malattia di Crohn presenta una localizzazione della flogosi all'ileo terminale con coinvolgimento del colon ascendente per un'estensione variabile. In un terzo dei casi la malattia coinvolge soltanto l'intestino tenue, nella maggior parte dei casi sotto forma di un'ileite terminale. Nel 10-15% dei casi è invece coinvolto solamente il colon. Anche in età pediatrica può essere presente una malattia perianale con ragadi, escrescenze carnose ("tags") e fistole. Nella malattia di Crohn la flogosi è discontinua e transmurale con coinvolgimento di tutti gli strati della parete intestinale con tendenza alla fistolizzazione. Istologicamente prevale un infiltrato mononucleato e la lesione tipica è il granuloma non caseoso che tuttavia non è sempre documentabile nelle biopsie endoscopiche. Nella colite ulcerosa la flogosi è diffusa e superficiale e interessa soltanto il colon per un'estensione variabile. Il retto è sempre coinvolto ed in età pediatrica sembrano prevalere le pancoliti. Istologicamente è tipica la distorsione delle cripte intestinali, l'infiltrato polimorfonucleato con formazione di ascessi criptici.

Aspetti clinici

Malattia di Crohn

La sintomatologia clinica della malattia di Crohn dipende dalla localizzazione dell'infiammazione intestinale. La triade sintomatologica dell'adulto: diarrea, dolori addominali e calo ponderale è presente anche nella maggior parte dei bambini. Tuttavia

aspetto peculiare dell'età pediatrica è il ritardo di crescita che può precedere di anni l'insorgenza di sintomi gastrointestinali. Spesso l'esordio della sintomatologia è subdolo ed il quadro clinico è dominato da manifestazioni extra-intestinali quali febbre, anoressia, scarsa crescita, artrite. Spesso la malattia viene confusa con altre condizioni quali anoressia mentale, febbre di origine sconosciuta, artrite reumatoide e ne consegue un considerevole ritardo nella diagnosi. E' da tenere presente che può essere presente una sovrapposizione di sintomi fra i diversi tipi di presentazione.

Colite ulcerosa

Nella colite ulcerosa la diarrea mucoematica spesso preceduta da dolori addominali è quasi sempre presente. Il ritardo di crescita si manifesta raramente, tuttavia sintomi extra-intestinali quali artrite, epatopatia, uveite e manifestazioni cutanee quali eritema nodoso e pioderma gangrenoso possono precedere l'insorgenza della sintomatologia colitica. Nella Tabella 2 è riportato il tipo di presentazione clinica della colite ulcerosa e la sua frequenza. La complicanza più grave della colite ulcerosa è il megacolon tossico che consiste in una massiva dilatazione del colon accompagnata da distensione addominale, febbre, tachicardia, ipoalbuminemia, disidratazione. Esso costituisce una vera emergenza medico-chirurgica in quanto il paziente è a rischio di perforazione, shock settico ed emorragia massiva. L'artrite si associa più frequentemente alla colite ulcerosa che alla malattia di Crohn, è di tipo migrante ed interessa una o più grandi articolazioni senza lasciare sequele distruttive. Quando è presente una spondiloartropatia, che può associarsi all'aplotipo HLA-B27, l'evoluzione della malattia articolare è indipendente dalla malattia intestinale. Anche la malattia epatica si associa più frequentemente alla colite ulcerosa che al Crohn e consiste in una colangite autoimmune che può evolvere in una colangite sclerosante.

Esami di laboratorio

Non esistono indagini di laboratorio specifiche. L'aumento degli indici di flogosi (velocità di eritro-sedimentazione, proteina C reattiva) risulta praticamente sempre presente nella malattia di Crohn mentre nella colite ulcerosa è presente nel 70% dei casi. Nelle forme attive è presente leucocitosi neutrofila, piastrinosi ed un'anemia. In questi casi il dosaggio della ferritina non costituisce più una spia di carenza dei depositi di ferro poiché risulta elevato per la presenza della flogosi. Nelle coliti gravi sono presenti squilibri elettrolitici ed ipoalbuminemia. Nel 60-80% dei casi di colite ulcerosa è stata riportata la presenza di anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili con pattern perinucleare (pANCA). Nel 15% dei casi di malattia di Crohn i pANCA sono positivi (76, 77). Si tratta in questi casi di malattia a localizzazione colica e caratteristiche cliniche, endoscopiche ed istologiche simili alla colite ulcerosa. Recentemente nella malattia di Crohn è stata documentata la positività degli anticorpi anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) nel 50-60% dei casi (78). Un aumento della permeabilità intestinale valutata ad esempio con l'escrezione urinaria del lattulosio-mannitolo, sembra correlare con le recidive di malattia ed anche predirle con un certo anticipo (79). Fondamentali infine, al momento della diagnosi, sono gli esami colturali delle feci per escludere la presenza di una colite infettiva o parassitaria. Importante è la ricerca della tossina del Clostridium difficile agente della colite pseudo-membranosa. E' da tenere presente che la positività per il C.difficile può coesistere con la presenza di una malattia infiammatoria cronica intestinale.

Indagini strumentali

La diagnosi delle malattie infiammatorie croniche intestinali si basa su procedure radiologiche ed endoscopiche. La pancolonscopia con ileoscopia retrograda è l'esame che consente la visualizzazione diretta delle lesioni. Nella Tabella 3 sono riportati i segni endoscopici che consentono un orientamento verso una delle due forme. Durante l'esame endoscopico i prelievi biotici multipli consentono l'esame istologico che può essere fondamentale ai fini della diagnosi. Quando l'istologia evidenzia segni tipici di una

malattia infiammatoria cronica intestinale senza una chiara distinzione fra le due forme si parla di colite indeterminata. Con l'avvento della colonscopia, il clisma del colon a doppio contrasto non viene quasi più utilizzato mentre molto utile è ancora il clisma del tenue che permette di evidenziare la localizzazione della malattia di Crohn al piccolo intestino. Negli ultimi anni, importanza crescente ha assunto l'ecografia con esame dello spessore della parete intestinale, indagine non invasiva ed altamente sensibile che costituisce un utile complemento nella fase diagnostica della malattia e consente di risparmiare esami endoscopici nel follow up della malattia. Anche la scintigrafia con leucociti marcati con ^{99}Tc consente di evidenziare aree di flogosi intestinale ed è un esame relativamente poco invasivo che può essere utilizzato soprattutto nelle forme in cui prevalgono i sintomi extra-intestinali prima di procedere ad esami più invasivi. Attualmente la TC spirale viene riservata ai casi più complessi per visualizzare la presenza di fistole ed ascessi, ma nei prossimi anni TC e RMN verranno probabilmente sempre più utilizzate ai fini diagnostici.

Terapia

Scopo della terapia delle malattie infiammatorie croniche intestinali è quello di indurre la remissione della malattia e di prevenire le recidive che sono spesso molto frequenti. In età pediatrica inoltre, obiettivo dell'intervento terapeutico è quello di consentire una crescita adeguata. Le opzioni terapeutiche sono essenzialmente tre: farmacologica, nutrizionale e chirurgica.

Terapia farmacologia

Si basa sull'utilizzazione dei corticosteroidi che nella maggior parte dei casi inducono la remissione della malattia. Nelle recidive viene utilizzato in genere il metil-prednisolone ad un dosaggio iniziale di 2 mg/Kg/die (non più di 60 mg/die) per un periodo di 2-4 settimane. Il dosaggio viene quindi gradualmente calato di 5 mg la settimana. Recentemente è entrata in commercio (ma non ancora in Italia) un preparato a base di budesonide, un cortisonico topico in una preparazione farmacologica che ne consente il

rilascio a livello distale ileo-colico. Il farmaco sembra essere risultato efficace nelle forme lievi-moderate di malattia di Crohn dell'adulto e presenta una frequenza molto minore degli effetti collaterali tipici dei cortisonici. Ai cortisonici vengono sempre associati dei derivati dell'acido 5-aminosalicilico (5-ASA) ad un dosaggio di 50 mg/Kg/die. La terapia con 5-ASA viene continuata nelle fasi di remissione della malattia in quanto è stata documentata la sua efficacia nel prevenire le recidive. La sulfasalazina è stata negli ultimi anni sostituita da composti farmacologici a minore assorbimento sistemico, che consentono la liberazione lenta del 5-ASA a livello ileo-colico (mesalazina, olsalazina, balsalazide). L'utilizzazione di clismi contenenti 5-ASA o idrocortisone e più di recente il cortisonico topico beclometasone risulta efficace nel trattamento delle proctiti e proctosigmoiditi. La terapia antibiotica con metronidazolo e più di recente ciprofloxacina risulta efficace nel trattamento delle lesioni perianali della malattia di Crohn. I farmaci immunosoppressori vengono utilizzati in caso di corticoidipendenza. Il farmaco di cui si ha una maggiore esperienza, anche in età pediatrica, è l'azatioprina ed il suo metabolita 6-mercaptopurina (6-MP). Nella maggior parte dei casi essa è ben tollerata e consente di discontinuare o ridurre il dosaggio degli steroidi. Di recente è stata proposta una sua utilizzazione precoce ai fini di evitare le conseguenze negative dei cortisonici soprattutto sulla crescita. Altri farmaci immunosoppressori utilizzati sono la ciclosporina, che risulta particolarmente efficace se somministrata in infusione continua nell'attacco grave di colite, il metotrexate, il tacrolimo.

Nelle forme gravi di malattia di Crohn in cui il trattamento farmacologico convenzionale (cortisonici-immunosoppressori) è risultato inefficace e nelle forme fistolizzanti studi controllati hanno messo in evidenza l'efficacia di una singola infusione di un anticorpo monoclonale umanizzato anti-TNF α . Sembra anche che dosi ripetute del farmaco siano risultate prive di effetti collaterali nella maggior parte dei pazienti. Restano comunque da verificare gli effetti a distanza e l'efficacia di tale trattamento nel mantenimento della remissione (80, 81).

Terapia nutrizionale

Ha trovato largo uso in età pediatrica in cui maggiore risulta l'esigenza di evitare l'utilizzazione dei cortisonici. Nella terapia della malattia di Crohn la nutrizione enterale esclusiva somministrata per periodi di 6-8 settimane non costituisce soltanto un supporto nutrizionale ma è risultata di per se efficace nell'indurre la remissione della malattia soprattutto quando la localizzazione è all'intestino tenue o ileo-colica. Nelle coliti di Crohn invece le percentuali di successo sono minori. Vengono utilizzate diete elementari o semi-elementari somministrate con sondino naso-gastrico e pompa peristaltica. Di recente è stata messa in evidenza una pari efficacia di diete polimeriche dotate di buona palatabilità che possono essere quindi somministrate per os, evitando al bambino l'applicazione del sondino naso-gastrico. Deve essere fornito il 120-130% del fabbisogno calorico teorico per la maggiore spesa energetica dovuta alla malattia. Quando è efficace nell'indurre la remissione di malattia, la terapia nutrizionale risulta superiore ai cortisonici nel mantenere una crescita adeguata.

Terapia chirurgica

E' da tenere presente che nella colite ulcerosa la colectomia totale è un intervento curativo in quanto elimina completamente la malattia. Nella malattia di Crohn invece è sempre possibile una recidiva e quindi la chirurgia deve essere in genere conservativa.

Nella colite ulcerosa l'intervento di urgenza è indicato in caso di perforazione, emorragia severa, megacolon tossico e negli attacchi gravi dopo 5 giorni di trattamento medico intensivo risultato inefficace. L'intervento di elezione è riservato alle forme che non rispondono al trattamento medico. Viene consigliata una ileo-ano anastomosi con o senza confezionamento di una tasca ileale (pouch). Quest'ultima consente una migliore continenza dopo l'intervento. L'intervento chirurgico d'urgenza nella malattia di Crohn trova le stesse indicazioni della colite ulcerosa ed anche l'intervento d'elezione viene effettuato quando la terapia medica è inefficace. E' da tenere presente che in età pediatrica quando la malattia di Crohn è resecabile, l'intervento chirurgico effettuato prima della pubertà consente un normale sviluppo (82).

SCOPO DELLA TESI

La diagnosi di Granulomatosi di Wegener è di solito difficoltosa e talvolta tardiva.

Normalmente viene posta in presenza di un particolare quadro clinico (impegno polmonare e renale) con segni bioumorali probanti.

L'elemento più importante è ritenuto però il reperto bioptico, che evidenzia le lesioni granulomatose pervasali.

L'avvento degli ANCA e soprattutto la specificità dei c-ANCA per la GW, sembra aver migliorato le capacità diagnostiche.

Per questo motivo abbiamo voluto valutare in quanti pazienti della nostra casistica gli ANCA fossero stati dirimenti.

Altro punto controverso è il loro utilizzo nel follow-up dei pazienti e la loro capacità di evidenziare una riacutizzazione della malattia.

Sono stati per questo scopo valutati i pazienti con GW che avessero presentato almeno una riacutizzazione in un follow-up di almeno 5 anni.

Gli ANCA sono stati descritti anche nelle due forme di malattie infiammatorie croniche intestinali, la colite ulcerosa ed il morbo di Crohn e sono stati rilevati entrambi i patterns di presentazione (perinucleare: p-ANCA e citoplasmatico: c-ANCA).

Abbiamo pertanto voluto determinare la prevalenza di questi autoanticorpi in una popolazione di pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali, il pattern di presentazione, la correlazione tra il titolo anticorpale, la fase e la sede di malattia.

E' stato inoltre ricercato un rapporto tra gli ANCA e la risposta al trattamento (colectomia totale, resezione ileo-cecale, fistulectomia, resezione ileale).

Ed infine valutare il possibile ruolo degli ANCA nelle vasculiti necrotizzanti, in particolare la GW e nelle MICI.

PAZIENTI E METODI

Pazienti

Abbiamo valutato 13 pazienti affetti da Granulomatosi di Wegener arrivati al nostro Centro. Tutti questi pazienti sono stati seguiti per un follow-up di almeno 5 anni. Di questi pazienti, 10 sono di sesso maschile, 3 di sesso femminile; l'età media è di 51 anni (range 20-67). Le sedi interessate dalla malattia erano varie: polmoni, reni, cute, vasi, meningi, mucosa nasale.

Sono stati inoltre arruolati consecutivamente 37 pazienti affetti da MICI afferiti alla Clinica Chirurgica I. Di questi 15 pazienti risultavano affetti da morbo di Crohn, rispettivamente 4 donne e 11 uomini, con età media di 42 anni (range 24-75); 12 pazienti invece erano affetti da rettocolite ulcerosa, 4 donne e 8 uomini con età media di 43 anni (range 31-68). Alcuni di questi pazienti presentavano un follow-up di 20 anni per il morbo di Crohn e di 39 anni per la colite ulcerosa. Le sedi di malattia coinvolte riguardavano: la regione perianale, l'ileo, il digiuno o tutto il colon; nei pazienti con colite ulcerosa la malattia era localizzata al colon, al retto, oppure al sigma-retto. Sono stati valutati i pazienti affetti da GW in più momenti: alla diagnosi e durante le fasi di riasacerbazione della malattia, ovvero in un periodo di follow-up di cinque anni. I pazienti affetti da MICI invece sono stati valutati in due tempi: in fase preoperatoria e a distanza di 3 mesi dall'intervento.

Per ogni fase era prevista la titolazione degli ANCA, la valutazione dell'immunità umorale (indici di infiammazione sistemica: VES, PCR, fibrinogeno; emocromo con formula), la funzionalità renale, il dosaggio dell'albuminemia e la determinazione diretta od anamnestica di quadri infettivi.

Per il dosaggio degli ANCA nei campioni di siero dei pazienti è stata utilizzata la metodica dell'immunofluorescenza indiretta, in accordo con le raccomandazioni del primo Workshop Internazionale sugli ANCA (10). In caso di risultato positivo il dato è stato riconfermato con metodica ELISA (ALIFAX).

Sono state utilizzate le seguenti tecniche:

Preparazione dei neutrofili

Per la preparazione dei vetrini per lo studio degli ANCA si procede inizialmente alla separazione dei granulociti neutrofili da sangue venoso umano periferico eparinato da donatore. Dopo aver eliminato i linfociti su gradiente, gli eritrociti vengono prima separati con Dextrano al 6% e poi lisati con una soluzione di cloruro d'ammonio.

I neutrofili così isolati vengono fatti aderire su vetrino utilizzando una citocentrifuga.

Si procede quindi alla fissazione in alcol etilico 95% precedentemente refrigerato a 4°C (10).

Immunofluorescenza indiretta

Si preparano diverse diluizioni di un campione di siero diluito 200 µL, che viene posto su vetrino e fatto incubare in camera umida e al buio.

Dopo tre lavaggi in PBS, i vetrini vengono cimentati con anticorpi di coniglio anti-immunoglobuline umane fluoresceinati (FITC Rabbit/Kaninchen/Lapin/Anti-human/Humain-DAKO) e dopo altri tre lavaggi si procede alla lettura dei vetrini al microscopio a fluorescenza (LEITZ).

Si preparano sempre due campioni, uno positivo e l'altro negativo, per il controllo.

Per quanto riguarda gli ANCA, nel caso in cui il campione esaminato sia positivo, le caratteristiche morfologiche della colorazione possono apparire di due tipi: citoplasmatico (c-ANCA) e perinucleare (p-ANCA). Il primo aspetto è determinato dalla presenza di anticorpi diretti principalmente verso la proteina citoplasmatica di 29 kD (PR3); il secondo invece da anticorpi diretti prevalentemente contro la MPO di 130 kD.

Analisi statistica

Per l'analisi dei dati sono stati utilizzati i test non parametrici come il test dei campioni appaiati di Wilcoxon e Il test Anova di Kruskal- Wallis.

RISULTATI

Nella **tabella 1** sono elencati tutti i pazienti con GW reclutati, da quando nel nostro laboratorio abbiamo cominciato ad eseguire il dosaggio degli ANCA; 3 sono femmine e 10 sono maschi. L'età, considerata al momento della diagnosi, varia da 20 a 67 anni, con una media di 51 anni.

In tutti i pazienti la diagnosi è stata completata da un reperto bioptico. In alcuni pazienti è stato biopsiato più di un organo; in 11 la biopsia è stata eseguita a livello polmonare.

Il dosaggio degli ANCA, eseguito in tutti i pazienti, è risultato positivo in 11 su 13, con una positività variabile da 1:160 a 1:10240. Tutti presentavano un pattern di *tipo-c* (citoplasmatico) all'immunofluorescenza indiretta e, mediante ELISA, è stata confermata la presenza di autoanticorpi diretti contro la proteinasi3. Soltanto in 2 pazienti il dosaggio, più volte ripetuto, è sempre risultato negativo. Questa negatività ha creato notevoli problemi diagnostici. Infatti, mentre negli altri pazienti il reperto bioptico, supportato dalla presenza degli ANCA, rendeva più agevole la diagnosi, nei 2 pazienti in cui gli ANCA si dimostrarono sempre negativi, è stato assai difficile giungere ad una diagnosi certa. Hanno fatto propendere per l'ipotesi diagnostica di GW i dati clinici. Per di più la buona risposta terapeutica alla terapia classica con immunosoppressori ha infine supportato la validità della diagnosi. In questi 2 pazienti la biopsie eseguite, a livello polmonare per un paziente e della cute e della mucosa nasale per l'altro, non erano state definitive a causa dell'abbondante materiale necrotico presente all'esame istologico. Alla luce di questi dati, gli ANCA si sono dimostrati quindi un valido strumento diagnostico.

Un altro dato emerge dalla nostra casistica: la grande prevalenza di maschi rispetto alle femmine, in contrasto con quanto descritto in letteratura, dove viene segnalata una lieve predominanza maschile di 1:1.6, rispetto alla nostra di 1:3.4. L'età media dei pazienti è simile a quella della letteratura, anche se dobbiamo segnalare il caso di un giovane uomo dell'età di 20 anni che permane in terapia a sette anni dalla diagnosi.

Il paziente P.L.F., il più anziano della nostra casistica, è deceduto per ICTUS dopo trattamento e remissione della malattia.. Il riscontro autoptico, eseguito anche per ricercare un sottostante processo vasculitico alla base dell'ischemia cerebrale, non mise in luce in nessun organo lesioni granulomatose, ma solo aterosclerotiche.

L'altro paziente deceduto, C.M., ebbe una lunga ed impegnativa storia della malattia che lo portò alla dialisi. Morì dopo alcuni mesi a causa di un'infezione polmonare.

Nella **tabella 2** viene riassunto schematicamente il follow-up dei pazienti, nei quali negli ultimi 5 anni era stata evidenziata almeno una riacutizzazione di malattia. In un paziente, sono state riscontrate ben 5 riacutizzazioni, che comparivano sempre dopo un periodo di sospensione della terapia ed erano precedute dalla comparsa di una tonsillite od altri episodi infettivi delle alte vie respiratorie.

In tutti i pazienti gli ANCA si sono negativizzati dopo 4-7 mesi dall'inizio della terapia, indipendentemente dal loro titolo iniziale; infatti anche il paziente con il titolo anticorpale più elevato, F.A.S., si negativizzò in 7 mesi. Le riacutizzazioni, documentate non solo dalla clinica ma anche da reperti radiologici polmonari o da alterazioni renali (proteinuria), non sono state quasi mai associate alla ricomparsa degli ANCA, i quali venivano dosati normalmente ogni 4-6 mesi e rivalutati anche quando il paziente ci segnalava la presenza di qualche sintomo come cefalea, febbre, rinite, ecc., che poteva far sospettare la riacutizzazione della vasculite. Soltanto in 3 pazienti abbiamo avuto la ricomparsa degli ANCA, in concomitanza con segni e sintomi tipici di una riacutizzazione. Il paziente F.A.S. ebbe due riacutizzazioni con rinite crostoso-emorragica e lesioni polmonari, entrambe accompagnate dall'aumento degli ANCA, persistenti a lungo con un titolo elevato. Dalla rivalutazione anamnestica ottenuta nella visite ambulatoriali è emerso che ogni riacutizzazione era preceduta in tutti i pazienti dalla presenza di un qualche processo infettivo (rinite, sinusite, tonsillite, bronchite, lesioni cutanee). Gli esami colturali condotti durante questi episodi hanno evidenziato per lo più la crescita di flora microbica residente. Soltanto in tre pazienti ed in più occasioni si è avuta la crescita di uno *Staphylococcus aureus* a livello del tampone nasale, faringeo o cutaneo. Straordinariamente, chi presentava un'infezione da *S. aureus* aveva di accompagnamento un'elevazione del titolo anticorpale degli ANCA.

Nella **tabella 3** vengono riassunte le caratteristiche dei pazienti afferiti alla Clinica Chirurgica I nei quali era stata posta diagnosi di morbo di Crohn. Di questi 15 pazienti 4 erano femmine ed 11 maschi, con età media di 42 anni (range 24-55). La durata della malattia variava da qualche mese a 20 anni. Tutti questi pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico: 13 di resezione ileo-cecale, 1 di resezione ileo-colica e chiusura della colonstomia ed 1 di gastroentero anastomosi + resezione ileo-cecale. Durante la valutazione preoperatoria abbiamo eseguito la titolazione degli ANCA, il dosaggio dell'immunità umorale (VES, PCR, fibrinogeno, emocromo con formula), della funzionalità renale, delle proteine totali e dell'albuminemia. Questi esami sono stati successivamente ripetuti a 3 mesi dall'intervento chirurgico. In fase preoperatoria, solamente 3 pazienti hanno presentato positività per p-ANCA, uno di questi a titolo elevato. Nello stesso soggetto è stata dimostrata anche la positività per c-ANCA, a basso titolo. Tale rilievo è stato riscontrato solo in un altro soggetto. Non vi era relazione tra la durata della malattia ed il titolo anticorpale. Nei rilievi postoperatori nessun paziente ha presentato positività per c-ANCA, mentre in un caso si è mantenuto il basso titolo e in 2 pazienti, dapprima negativi, si è registrata la comparsa di autoanticorpi p-ANCA a basso titolo.

Nella **tabella 4** sono elencati i 12 soggetti affetti da colite ulcerosa. Di questi pazienti, 4 erano femmine e 8 maschi, con età media di 49 anni (range 31-68). La durata della malattia variava dai 6 anni sino ai 39. Questi pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di proctocolectomia totale. Anche in questo caso, durante la valutazione preoperatoria, è stata eseguita la titolazione degli ANCA, il dosaggio dell'immunità umorale (VES, PCR, fibrinogeno, emocromo con formula), della funzionalità renale, delle proteine totali e dell'albuminemia. Questi esami sono stati successivamente ripetuti a 3 mesi dall'intervento chirurgico. 10 di questi soggetti presentavano la positività per p-ANCA, 4 dei quali a titolo elevato. I c-ANCA risultavano positivi solamente in 3 soggetti, sempre a basso titolo. In un solo caso vi era la contemporanea presenza dei due pattern di presentazione anticorpale, anche se a basso titolo. Nei rilievi postoperatori nessun paziente ha presentato positività per c-ANCA. 2 pazienti hanno presentato la negativizzazione dei p-ANCA; 1 paziente, inizialmente positivo per i soli c-ANCA, ha sviluppato la positività per p-ANCA, seppure a basso titolo. Il resto dei pazienti ha mantenuto la positività per p-ANCA, pur con riduzione del titolo.

DISCUSSIONE

Dai dati ottenuti dalla nostra casistica possiamo confermare, in accordo con la letteratura, il ruolo fondamentale degli ANCA, soprattutto dei c-ANCA, nella diagnosi di GW.

La presenza di questi autoanticorpi, che farebbero classificare la GW come una vasculite autoimmunitaria, si è rivelata elemento molto utile nella diagnosi, tanto che la loro assenza ci ha messo in difficoltà nei due casi ANCA-negativi.

La percentuale di positività degli ANCA nei nostri pazienti è dell'85%, simile a quella descritta più recentemente (65), che varia dall'80 al 90%.

Tutti i nostri pazienti presentano un pattern c-ANCA, a conferma della specificità di questo tipo di autoanticorpi in associazione con la GW. La letteratura riporta valori intorno al 90% (65).

Rimane ancora dubbia l'importanza degli ANCA come fattore patogenetico ipotizzato da molti autori (59, 65, 66). Non vi sono dati a favore o contro, anche se il rilievo di GW ANCA-negative fa sospettare che il ruolo di questi non sia determinante.

Per quanto riguarda la nostra casistica non possiamo dire che un titolo elevato all'esordio fosse predittivo di una maggior gravità della malattia.

Quello che emerge proprio dai nostri dati è la discrepanza tra riacutizzazioni e ricomparsa degli ANCA nel siero dei pazienti, come molti autori riportano (30, 45, 67, 69). Molti dei nostri pazienti hanno presentato anche più di una riacutizzazione senza ANCA, tanto da mettere in difficoltà l'esatta identificazione della patologia. Però i biomorali, come aumento di VES, PCR, marcata proteinuria e la presenza di noduli polmonari, erano molto suggestivi per una riacutizzazione della vasculite. Per di più la terapia immunosoppressiva, che veniva instaurata prontamente, portava di solito ad una rapida remissione.

Nei nostri pazienti, i tre che hanno avuto il riscontro di ANCA durante le riacutizzazioni, manifestavano tutti una contemporanea infezione da *Staphylococcus aureus*. Anche gli altri pazienti hanno accusato episodi infettivi seguiti da riacutizzazione della malattia, ma non sono mai stati evidenziati microrganismi specifici, se non flora microbica residente.

Questi dati ci hanno portato a pensare che episodi infettivi possano essere alla base di una riacutizzazione della malattia, ma unicamente infezioni da *S. aureus* sono in grado di far riapparire questi particolari autoanticorpi.

Nella storia naturale della GW normalmente si riscontra un lungo periodo, precedente l'esordio della vasculite, che è caratterizzato da infezioni nasali, sinusiti o tracheiti ricorrenti. Una rinite crostoso-emorragica può precedere anche di tre anni l'esordio della GW. E' probabile che gli ANCA siano strettamente correlati ad infezioni in cui lo *S. aureus* sia l'agente più importante di queste lesioni, come è segnalato da alcuni autori (44, 51, 67, 69). Anche in altri pazienti, agenti infettivi possono slatentizzare le riaccensioni della malattia, ma poco possono nell'evocare una risposta autoanticorpale diretta verso antigeni dei polimorfonucleati.

Il titolo degli ANCA risulta comunque essere un valido strumento nella valutazione dell'attività della GW ed i nostri dati mostrano una significativa riduzione della prevalenza e del titolo dei c-ANCA. A questo dato si associa la riduzione, statisticamente significativa, degli indici di flogosi (ESR, fibrinogeno) e la creatinina (tabella 5).

Mentre il ruolo degli ANCA nella diagnosi e nella prognosi della GW risulta ben definito, nelle malattie infiammatorie croniche intestinali il loro valore clinico, nonostante i numerosi studi attuati, risulta ancora non ben chiaro. Questo perché, mentre gli ANCA delle vasculiti sono diretti verso un ristretto numero di antigeni, gli ANCA nella CU e MC sono diretti contro una maggiore varietà di antigeni (83). Pertanto attualmente nelle malattie infiammatorie croniche intestinali, gli ANCA risultano soltanto un utile test aggiuntivo nella diagnostica differenziale tra morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa (84).

Nel nostro studio abbiamo testato la prevalenza, la specificità antigenica e la rilevanza clinica degli ANCA in un gruppo di pazienti con MC e CU. Abbiamo quindi messo in relazione la variazione del titolo anticorpale con il trattamento chirurgico a cui tutti i pazienti sono stati sottoposti. Nella nostra casistica, in accordo con la letteratura, emerge una netta prevalenza dei p-ANCA nella colite ulcerosa rispetto a quella rilevata nel morbo di Crohn (85, 86). La percentuale di positività dei p-ANCA, nei pazienti affetti da colite ulcerosa, risulta essere del 83% nella fase pre-trattamento chirurgico, mentre risulta solo del 20% nei pazienti affetti da MC.

La rimozione dell'organo interessato dalla malattia non porta alla scomparsa degli ANCA; nella fase post-chirurgica infatti, la prevalenza degli ANCA nella CU rimane del 75%, mentre nei pazienti affetti da MC risulta invariata. Emerge comunque, dopo l'intervento chirurgico, una riduzione del titolo anticorpale nei pazienti in cui questo

risultava elevato prima del trattamento. Sia per il MC che per la CU, il confronto tra il titolo degli ANCA ed il dosaggio degli indici di flogosi considerati prima e dopo trattamento, non ha raggiunto comunque una significatività statistica (tabella 6). La presenza degli ANCA potrebbe quindi essere solo un epifenomeno della infiammazione cronica e il loro sviluppo potrebbe essere scatenato dalla disregolazione immunitaria che queste malattie accompagna con una accidentale cross-reattività verso antigeni ambientali.

Queste ipotesi dovranno essere però validate in un campione più consistente di pazienti, seguendoli con un follow-up più lungo, visto che queste malattie, come tante altre malattie autoimmunitarie, difficilmente possono essere considerate guarite.

CONCLUSIONI

Anche il nostro studio dimostra l'utilità della ricerca e dosaggio degli ANCA nella diagnosi e follow-up della GW.

I c-ANCA nei nostri pazienti affetti da GW hanno una specificità pari al 100%.

La cross-reattività tra antigeni batterici e dei neutofili potrebbe essere responsabile dell'aumento degli ANCA durante le riacutizzazioni batteriche nei soggetti affetti da GW.

I p-ANCA hanno una netta prevalenza nella Colite Ulcerosa mentre sono di scarso riscontro nelle altre malattie

L'andamento dei titoli dei p e c-ANCA seguono percorsi diversi nelle differenti patologie.

Le riacutizzazioni di malattia nella GW come per le MICI non sono altrettanto ben correlate alla presenza degli ANCA. Questi infatti hanno un comportamento diverso a seconda della fase e del trattamento della malattia.

Pur non rivestendo un ruolo determinante nella diagnosi e predittivo nella prognosi delle malattie infiammatorie croniche intestinali, gli ANCA risultano dal nostro studio un utile test aggiuntivo nella diagnostica differenziale tra morbo di Crohn e rettocolite ulcerosa.

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

GW	Granulomatosi di Wegener
ANCA	Anticorpi anti-citoplasma dei neutrofilo
PM	Poliangioite microscopica
SCS	Sindrome di Churg-Strauss
PR3	serin-proteinasi3
MPO	mieloperossidasi
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
MICI	malattie infiammatorie croniche intestinali
MC	morbo di Crohn
CU	colite ulcerosa
CP	ciclofosfamide

BIBLIOGRAFIA

1. Davies D.J., Moran J.E., Niall J.F., Ryann G.B.: Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *BMJ* 285: 606 (1982).
2. Hall J.B., Wadham B.M., Wood C.J., Ashron V., Adam W.R.: Vasculitis and glomerulonephritis: a subgroup with an antineutrophil cytoplasmic antibody. *Aust NZ J Med* 14: 277-78 (1984).
3. Calabresi P., Edwards E.A., Shilling R.F.: Fluorescent antiglobulin studies in leukopenic and related disorders. *Blood* 13: 2091-100 (1959).
4. Van der Woude F.J., Rasmussen N., Lobarro S.: Autoantibodies against neutrophil and monocytes: rool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1: 425-29 (1985).
5. Gross W.L., Schmitt W.H.: ANCA and associated disease: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin Exp Immunol* 91: 1-12 (1993).
6. Kallenberg C.G.M., Brawer E., Weening J.J., Cohen Tervaert J.W.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 46: 1-15 (1994).
7. Jennette J.C., Falk R.J., Andrassy K., Bacon P.A., Churg J., Gross W.L., Hogan E.C., Hoffman G.S., Hunder G.G., Kallenberg C.G.M., Mc Kluskey R.T., Sinico R.A., Rees A.J., van Es L.A., Waldherr R., Wiik A.: Nomenclature of systemic vasculitides: the proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 37: 187-92 (1994).
8. Jennette J.C., Falk R.J.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: discovery specificity, disease associations and pathogenetic potential. *Adv Pathol Lab Med* 8: 363-78 (1995).
9. Hoffman G.S., Specks U.: Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis Rheum* 41: 1521-37 (1998).
10. Wiik A.: Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 97 (suppl. 6): 12 (1989).

11. Glodshmeding R., Van der Schoor C.E., Bokkel D.: Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate binding-protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 84: 1577-87 (1989).
12. Niles J.L., Mc Kluskey R.T., Ahmad M.F., Amaour M.A.: Wegener's Granulomatosis autoantigens in a novel neutrophil serin-proteinase. *Blood* 74: 1888-93 (1989).
13. Ludemann L., Utecht B., Gross W.L.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener's Granulomatosis recognise an elastinolytic enzyme. *J Exp Med* 171: 357-62 (1990).
14. Jennette J.C., Hojdal J.R., Falk R.J.: Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase3. *Blood* 75: 2263-4 (1990).
15. Falk R.J., Jennette J.C.: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for mieloperoxidase in patient with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *NEJM* 318: 1651-7 (1988).
16. Peen E., Almer S., Bodemar G., Ryder B.O., Sjolin C., Tejle K., Skogh T.: Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosis cholangitis and Crohn's disease. *Gut* 34: 56-62 (1993).
17. Lee S.S., Lawton L.W.M., Chan C. E.: Antilactoferrin antibody in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 31: 669-73 (1992).
18. Cohen Tervaert J.W., Mulder A.H.L., Stegeman C.A., Elema J.D., Huitema M.G., The T.H., Granulomatosis and other inflammatory disease. *An Rheum Dis* 52: 115-20 (1993).
19. Halbwachs-Mecarelli L.H., Nusbaum L.H., Noel L.H., Reumaux D., Erlinger S., Grunfeld J.P., Lasavre P.: ANCA direct against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosis cholangitis. *Clin Exp Immunol* 90: 79-80 (1992).
20. Zhao M.H., Jones S.J., Lockwood C.M.: Bactericidal permeability increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 99: 49-56 (1995).
21. Lasavre P: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies antigen specificity. *Am J Kidney Dis* 18: 159-63 (1991).

22. Mulder A.H.L., Breakraeflofs J., Horst G., Limberg P.C., Nelis G.F., Kallenberg C.G.M.: ANCA in inflammatory bowel disease: characterization and clinical correlates. *Clin Exp Immunol* 95: 490-7 (1994).
23. Mulder A.H.L., Horst G., van Leeuwen M.A., Limburg P.C., Kallenberg C.G.M.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in rheumatoid arthritis: characterization and clinical correlation. *Arthritis Rheum* 36: 1554-60 (1993).
24. Aitola P., Miettinen A., Mattile A.: Effect of proctocolectomy on serum antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 48: 645-7 (1995).
25. Peter H.H., Metzger D., Rump A., Roter E.: ANCA in disease other than systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 91 (suppl. 1): S12-14 (1993).
26. Reumaux D., Duthilleu P., Roos D.: Pathogenesis of disease associated with antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *Human Immunol* 65: 1-12 (2004).
27. Egner W., Chapel H.M.: Titulation of antibody against neutrophil cytoplasmic antigen is useful in monitoring disease activity in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 82: 244-9 (1990).
28. Cohen Tervaert J.W., Huitema M.G., Henè R.J., The T.H., Van der Hem G.K., Kallenberg C.G.M.: Prevention of relapses in Wegener's Granulomatosis by treatment based on ANCA titer. *Lancet* 336: 709-11 (1990).
29. Kerr G.R., Fleisher T.H.A., Hallahan C.W., Leavitt R.Y., Fauci A.S., Hoffman G.S.: Limited prognostic value of changes in ANCA titer in patients with Wegener's Granulomatosis. *Arthritis Rheum* 36: 365-71 (1993).
30. Gasking G., Savage C.O.S., Ryan J.J., Jones S., Lockwood C.M., Rees A.J., Pusey C.D.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody and disease activity during long term follow-up of 70 patients with systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 6: 689-94 (1991).
31. Dolman K.M., Gaus R.O.B., Vervaat T.J., Zevembergen G., Maingay D., Nikkels R.S., Donker A.J.M., Van dem Borne A.E.G.K., Goldschmhuman Eding R.: Vasculitis and antineutrophil cytoplasmic antibody associated with propylthiuracil therapy. *Lancet* 342: 651-2 (1993).
32. Vogt B.A., Kim Y., Jennette J.C., Falk R.J., Burke B.A., Sinaiko A.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-positive crescentic glomerulonephritis

- as a complication of treatment with propylthiouracil in children. *J Pediatr* 124: 986-8 (1994).
33. D'Cruz D., Chesser A.M., Lightowler C., Comer M., Hurst M.J., Baker L.R., Raine A.E.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-positive crescentic glomerulonephritis associated with anti-thyroid drug treatment. *Br J Rheumatol* 34: 1090-1 (1995).
 34. Charles L.A., Caldas M.L.R., Falk R.J., Terrel R.S., Jennette J.C.: Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J Leuk Biol* 50: 539-46 (1991).
 35. Falk R.J., Terrel R.S., Charles L.A., Jennette J.C.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibody induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4115-9 (1990).
 36. Ewert B.H., Jennette J.C., Falk R.J.: Anti-myeloperoxidase antibody stimulate neutrophils to damage endothelial cells. *Kidney Int* 41: 375-83 (1992).
 37. Savage C.D., Pottinger B.E., Gaskin G., Pusey C.: Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am J Pathol* 141: 335-42 (1992).
 38. Vargunam M., Adu D., Taylor C.M., Michael J., Richards N., Neuberger J., Thompson R.A.: Endothelium myeloperoxidase-antimyeloperoxidase interaction in vasculitis. *Nephrol Dial Transpl* 1: 1077-81 (1992).
 39. Mayet W.J., Csernok E., Szymkowiak C., Gross W.L., zum Buschenfelden M.: Human endothelial cells express proteinase3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's Granulomatosis. *Blood* 82: 1221-9 (1993).
 40. Brockmann H., Schwarting A., Kriegsmann J., Gaumann G.G., Muller K.M., Galle P.R.: Proteinase 3 as the major autoantigen of c-ANCA is sovraexpressed in lung tissue of patients with Wegener's Granulomatosis. *Arthritis Res* 4: 220-5 (2002).
 41. Jenette J.C., Falk R.J.: Pathogenesis of vascular and glomerular damage in ANCA-positive vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 13 (suppl.1): 16-20 (1998).

42. Hoffmann G.S.: Classification of the systemic vasculitides: antineutrophil cytoplasmic antibodies, consensus and controversy. *Clin Exp Rheumatol* 16: 111-5 (1998).
43. Jennette J.C.: Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated disease: a pathologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 18: 164-70 (1991).
44. Hellmich B., Csernok E., Gross W.L.: 20 years with ANCA: from seromarker to a major pathogenic player in vasculitis. *J Leuk Biol* 74: 1-2 (2003).
45. Fauci A.S., Haynes B.F., Katz P., Wolff S.M.: Wegener's Granulomatosis: perspective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* 98: 76-85 (1983).
46. Leavitt R.Y., Fauci A.S., Bloch D.A.: The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's Granulomatosis. *Arthritis Rheum* 33: 1101-7 (1990).
47. Duna G.F., Galperin C., Hoffman G.S.: Wegener's Granulomatosis. *Rheum Dic Clin North Am* 21: 949-86 (1995).
48. Van der Geld Y.M., Tool A.T., Videler J., De Haas M., Tervaert J.W., Stegeman C.A., Limburg P.C., Kallenberg C.G., Roos D.: Interference of PR3-ANCA with the enzymatic activity of PR3: difference in patients during active disease or remission of Wegener's Granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 129: 562-70 (2002).
49. Schultz H., Heintz H., Van Zandbergen G., Ullrich S., Reinhold-Keller E., Gross W.L.: ANCA against the bactericidal/permeability increasing protein (PBI-ANCA) compromise the antibiotic function of BPI in a Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Rheumatol* 21: 763-6 (2003).
50. Stegeman C.A., Cohen Tervaert J.W., Sluiter W.J., Manson W., Jong P.E., Kallenberg C.G.M.: Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rate in Wegener's Granulomatosis. *Ann Intern Med* 113: 12-7 (1994).
51. Popa E.R., Stegeman C.A., Kallenberg C.G.M., Cohen Tervaert J.W.: *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res* 4: 77-9 (2002).
52. Voswinkel J., Kramer J., Muller A.: B-lymphocyte infiltrating Wegener's granuloma: the immunoglobulin VH gene repertoire from granulomatous tissues

- displays an antigen-driven maturation and suggest a microbial trigger. *Arthritis Res* 6: 24 (2004).
53. Specks U., Whetley C.L., McDonald T.J.: Anticytoplasmic autoantibody in the diagnosis and follow-up of Wegener's Granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 64: 28-36 (1989).
 54. Weidebach W., Viana V.S.T., Leon E.P., Bueno C., Leme A.S., Arantes-Costa F.M., Martins M.A., Saldiva P.H.N., Bonfa E.: c-ANCA-positive fraction from patients with Wegener's Granulomatosis induces lung vasculitis in rats. *Clin Exp Immunol* 129: 54-60 (2002).
 55. Rao J.K., Weinberger M., Oddone E.Z., Allen N.B., Landsman P., Freussner J.R.: The role of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener's Granulomatosis. *Ann Intern Med* 123: 925-32 (1996).
 56. Nolle B., Specks U., Ludemann J., Korhbach M.S., De Remeé R.A., Gross W.L.: Anticytoplasmic autoantibodies: their immunologic value in Wegener's Granulomatosis. *Ann Intern Med* 111: 28-40 (1989).
 57. Walton E.W.: Giant cell granuloma of the respiratory tract (Wegener's Granulomatosis). *BMJ* 2: 265-70 (1958).
 58. Carrington C.B., Liebow A.A.: Limited forms of angitis and granulomatosis of Wegener's type. *Am J Med* 41: 497-527 (1966).
 59. Savage C.O., Harper L., Holland M.: New findings in pathogenesis of antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 14:15-22 (2002).
 60. Yamashita K., Kobayashi K., Kondo M., Ishikura H., Shibuya Y., Hayasaka S.: Elevated anti-neutrophil cytoplasmic antibody titer in a patient with atypical orbital pseudotumor. *Ophthalmologica* 209: 172-5 (1995).
 61. Thajeb P., Tsai J.J.: Cerebral and ocular manifestations of a limited form of Wegener's Granulomatosis with c-ANCA-associated vasculitis. *J Neuroimaging* 11: 59-62 (2001).
 62. Gross W.L.: Immunopathogenesis of vasculitis. *Rheumatology* 2: 1601-9 (2003).
 63. Santana AN, Antunes T, Barbas CS. Treatment of ANCA-associated vasculitis *JAMA*. 2007 Dec 19;298(23):2739..

64. Yazici Y. Vasculitis update, 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65(3):212-4. Review.
65. Rarok A.A., Stegeman C.A., Limburg P.C., Kallembert C.G.M.: Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 13 : 2232-8 (2002).
66. Van Rossum A.P., Rarok A.A., Huitema M.G., Limburg P.C., Kallenberg C.G.M.: Constitutive membrane expression of proteinase 3 and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies. *Kidney Blood Press Res* 26: 265 (2003).
67. Slot M.C., Cohen Tervaert J.W., Boomsma M.M., Stegeman C.A.: Positive c-ANCA titer at switch to azathioprine therapy is associated with relapse in proteinase 3-related vasculitis. *Arthritis Rheum* 51: 269-73 (2004).
68. Boomsma M.M., Stegeman C.A., Van der Leij M.J., Oost W., Herman J., Kallenberg., Limburg P.C., Cohen Tervaert J.W.: Prediction of relapses in Wegener's Granulomatosis by measurement of anti neutrophil cytoplasmic antibody levels; a prospective study. *Arthritis Rheum* 43: 2025-33 (2000).
69. Mc Kay D.M.: Bacterial superantigens: provocateurs of gut dysfunction and inflammation? *Trends Immunol* 22: 497-501 (2001).
70. Fiocchi C.: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205 (1998).
71. Mayers A.L., Colombo J., Jackson M.A., Harrison C.J., Roberts C.R. : Tuberculous colitis mimicking Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*: 45 (5) : 607-10 (2007).
72. Podolsky D.K.: Inflammatory bowel disease. *NEJM* 347: 417-28 (2002).
73. Kappelman M.D., Rifas-Shiman S.L., Kleinmann K., Ollendorf D., Bousvaros A., Grand R.J., Finkelstein J.A.: The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*: 5 (12): 1424-9 (2007).
74. Carter M.J., Jones S., Mansfield J.C., et al: Further evidence of an association between the allele 2 of the interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) gene (IL-1RM) polymorphism and ulcerative colitis. *Gastroenterology*: 114 A 948 (1998).
75. Papo M., Quer J.C., Gutierrez C. et al. and Richart C.: Genetic heterogeneity within ulcerative colitis determined by interleukin-1 receptor antagonist gene

- polymorphism and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11: 413-420 (1999).
76. Gross W.L., Schmitt W.H., Csernoki E. ; ANCA and associated diseases; immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin Exp Immunol* 91: 1-12 (1993).
 77. Roozendaal C., Van Milligen de Wit M. et al. : Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in primary sclerosing Cholangitis: Defined specificities may be associated with distinct clinical features. *Am J Med.* 105: 393-399 (1998).
 78. Quinton J.F., Sendid B., Reumax D., Duthilleul P., Grandbastien B., Charrier G., Targan S.R., Poulain D. : Anti *Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease:prevalence and diagnostic role. *Gut* 42:788-791 (1998).
 79. Vecchi M., Sinico A., Bianchi M.B., Radice A., Giochetti P., Campieri M. & De Franchis R. : Recognition of bactericidal/permeability-increasing protein by perinuclear Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibody-positive sera from ulcerative colitis patients:prevalence and clinical significance. *Scand J Gastroenterol* 33, 1284-1288 (1998).
 80. Langan r.C., Gotsh P. B., Krafczyk M.A.,Skillinge D.D.: Ulcerative colitis: Diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 1; 76 (9): 1323-30 (2007).
 81. Baert F., Caprilli R. Angelucci E.: Medical Therapy for Crohn's disease: top-down or step-up? *Dig Dis* 25 (3) 260-6 (2007).
 82. Dawwas M.F.: Colectomy and IBD. Does surgery improve survival? *BMJ* 1; 335 (7630): 1109-10 (2007).
 83. Roozendaal C. and Kallenberg C.G.M. : Are anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) clinically useful in inflammatory bowel diseases (IBD)? *Clin Axp Immunol* 116: 206-213 (1999).
 84. Sandborn W.J: Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art. *Rev Gastroenterol Disord.* 4 (4): 167-74 (2004).
 85. Abad E., Tural C., Mirapeix E. and Cuxart A.: Relationship between ANCA and Clinical activity in inflammatory Bowel Disease: Variation in prevalence of ANCA and Evidence of heterogeneity. *Journal of Autoimmunity* (1997) 10, 175-180.

86. Roozendaal C. , Pogany K., Horst G., et al. and Kallenberg C.G.M. : Does analysis of the antigenic specificities of Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibodies contribute to their clinical significance in the inflammatory bowel diseases? *Scand J Gastroenterol* 34, 1123-1131 (1999).