

## ДИАГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА АНТИНЕУТРОФИЛНИТЕ ЦИТОПЛАЗМЕНИ АНТИТЕЛА

М. Христова и М. Балева

Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, Медицински университет – София

## DIAGNOSTIC VALUE OF ANTI-NEUTROPHIL CYTOPLASMIC ANTIBODIES

M. Hristova and M. Baleva

Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, Medical University – Sofia

<p><b>Резюме:</b></p> <p><b>Ключови думи:</b></p> <p><b>Адрес за кореспонденция:</b></p>	<p>Интерпретацията на антинеутрофилните цитоплазмени антитела (ANCA) рядко е трудна и изисква задълбочено познаване на разликите в методите за тяхното определяне и свързаните с тях възможни фалшивоположителни и фалшивоотрицателни резултати. В последните години се правят много опити за стандартизиране на тяхното определяне, с което те не само да се ползват като полезен серологичен тест, а да заемат мястото си на диагностичен критерий в класификацията на първичните ANCA-асоциирани васкулити (AAV). Клиничната интерпретация на резултатите се усложнява и поради факта, че тези антитела са хетерогенна група и част от тях се срещат при хроничновъзпалителни, автоимунни заболявания, при употребата на определени медикаменти, при инфекциозни и малигнени процеси. Поради това тази обзорна статия има за цел да посочи актуалните имунологични характеристики на съответните състояния и да представи новите виждания за диагностичните възможности, които ANCA предоставят на клиничната практика.</p> <p>cANCA, pANCA, анти-PR3 ANCA, анти-MPO ANCA, минорни специфичности, антитела срещу лизозомно свързания мембранен протеин-2, неутрофилни екстрацелуларни „капани“, ANCA-свързани васкулити</p> <p><i>Д-р Мария Христова Христова, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ, ул. „Св. Г. Софийски“ № 1, 1431 София, e-mail: maria_hr@dir.bg</i></p>
<p><b>Summary:</b></p> <p><b>Key words:</b></p> <p><b>Address for correspondence:</b></p>	<p>The interpretation of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies is often not an easy task and it requires profound knowledge about the discrepancy of the detection methods with consequent false positive and false negative results. In the last years, there are many attempts for a standardization of those methods in order to allow them to play a role not only as an useful serological assay but also as diagnostic criteria in the classification of ANCA associated vasculitis (AAV). The clinical interpretation of the results is complicated also because of the fact that ANCA are a heterogenous group and some of the types can be found in different chronic-inflammatory and autoimmune diseases, after the use of some drugs, and in infectious and malignant processes. That is why in this review we discuss the current immunological characteristics of the above-mentioned states and present the new understanding and trends about the diagnostic significance which ANCAs contribute to clinical practice.</p> <p>cANCA, pANCA, anti-PR3 ANCA, anti-MPO ANCA, minor specificities, antibodies against the lysosomal-associated membrane protein 2, neutrophil extracellular traps, ANCA-associated vasculitis</p> <p><i>Maria Hristova Hristova, Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, MU, 1, Sv. G. Sofiiski Str., Bg – 1431 Sofia, e-mail: maria_hr@dir.bg</i></p>

Антинеутрофилните цитоплазмени антитела (ANCA) представляват антитела с различни специфичности, насочени срещу антигени, откривани главно в азурофилните и специалните

цитоплазмени гранули на неутрофилите и в тези на моноцитите. За първи път тези антитела са описани от D. J. Davies и сътр. през 1982 г. [1], които забелязват антитела от клас IgG при из-

следване на серум от пациенти с некротизиращ гломерулонефрит чрез индиректна имуофлуоресценция. Това откритие се последва от публикация на F. J. van der Woude и сътр. [2], които през 1985 г. описват класическия тип светене на тези антитела при 25 от 27 пациенти с Вегенерова грануломатоза. През 1988 г. R. J. Falk и сътр. [3] наблюдават ANCA с перинуклеарно светене при пациенти с различни системни васкулити, с което се оформят и основните имуофлуоресцентни образи.

## МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ANCA

### Индиректна имуофлуоресценция

Днес индиректната флуоресценция се използва като скрининг, който дава представа за основните видове ANCA. Описани са четири типа светене върху етанол-фиксираны неутрофили: 1. Класически цитоплазмен тип – cANCA, характеризиращ се с цитоплазмено зърнисто светене и отговарящ главно на антипротеиназа 3 (PR3) ANCA. 2. Перинуклеарен тип – pANCA с линеарно перинуклеарно светене, отговарящо най-вече на антимиелопероксидаза (MPO) и порядко на минорните специфичности. 3. Атипичен – неспецифичен, тип светене, или xANCA, обикновено отрицателен при ELISA. 4. Атипичен тип cANCA (acANCA) с дифузна, равномерна цитоплазмена флуоресценция, без изявена зърнистост, обикновено кореспондиращ на някоя от по-редките (минорни) специфичности [4]. На табл. 1 са показани основните типове светене и заболявания, при които те най-често се срещат. Много от изследваните серуми при наличие на други антитела, напр. антинуклеарни (ANA), анти-ДНК (dsDNA), антихистонови антитела, могат да дадат фалшивоположителен резултат от pANCA или acANCA тип. За да бъдат разграничени от реално положителните pANCA, е възможен контрол чрез втори тип фиксация на неутрофилите върху формалин, като резултатите от двата типа фиксация се интерпретират в комбинация. Перинуклеарното светене при етанол-фиксираните неутрофили е резултат от електростатично взаимодействие между положително заредените цитоплазмени белтъци и негативно заредената ДНК, в чиято посока те се придвижват. При формалинова фиксация процесът на придвижване е преустановен и тези протеини остават в цитоплазмата. В резултат на това наличните pANCA, както и cANCA изглеждат по сходен начин като cANCA тип, а фалшивоположителни pANCA не се наблюдават (те са отрицателни или показват незначително светене). Въпреки това много автори не препоръчват

контрол с формалин-фиксираны неутрофили, тъй като серуми с доказана MPO специфичност не показват светене, т.е. наблюдават се фалшивоотрицателни резултати. Съществуват убедителни данни, че тестването върху формалин-фиксираны неутрофили е с по-слаба специфичност от повечето ELISA методи [4]. По тази причина установеният международен консенсус включва комбинация на индиректната имуофлуоресценция с ензимно свързаните сорбентни тестове (ELISA) [5], чиято цел е да се намалят фалшивоположителните резултати с около 27% според данните на E. Csernok и сътр. [6].

Таблица 1. Основни имуофлуоресцентни образи и състояния, с които по-често се асоциират

cANCA	Грануломатоза на Вегенер
pANCA	Микроскопски полиангиит, синдром на Churg-Strauss, автоимунни заболявания – системен лупус, ревматоиден артрит, хронични стомашно-чревни заболявания, медикаментозно обусловени
acANCA	медикаментозно обусловени, хроничновъзпалителни заболявания
xANCA	Автоимунни хепатити, първична билиарна цироза, склерозиращ холангит, медикаментозно- и малигненообусловени

### ELISA методи

За разлика от индиректната имуофлуоресценция, ELISA методите позволяват определяне на антигенната специфичност на антителата.

ELISA техниките за определяне на ANCA са с относително добра чувствителност – средно около 81% (62-100%), и с много висока специфичност – 98% (96-99%) [7]. Въпреки това се препоръчва комбинацията им с индиректната имуофлуоресценция, тъй като едновременното отчитане дава възможност за контрол както върху фалшивоположителните, така и върху фалшивоотрицателните стойности с добра позитивна и особено висока негативна предикативна стойност. Чрез ELISA се установява, че класическите cANCA са насочени към протеиназа 3 (PR3) – серин-протеаза с молекулно тегло 29 kD, намираща се в азурофилните гранули на неутрофилите. Специфичностите, характерни за pANCA, са насочени спрямо по-голям брой антигени – на първо място, към класическата за този тип светене миелопероксидаза (MPO), както и спрямо лактоферин (LF), еластаза (LE), кателсин G (CG), пермеабилзиращ бактериален протеин (BPI) bactericidal/permeability-increasing protein, определяни още като минорни антигени. На тях в последно време се приписва относително по-ниската чувствителност на ELISA метода по отношение на IIF и наличието на

IIF+/PR3-/MPO-серотип. Ето защо при такъв серотип за пълнота на изследването биха могли да се търсят минорни специфичности, въпреки че до момента тяхната клинична роля не е определена. Макар и в по-малък процент минорни антигени се наблюдават и при серотипове IIF+/PR3+/MPO-, IIF+/PR3-/MPO+ и IIF-/PR3-/MPO-, т.е. възможно е паралелно наличие на антитела с различни специфичности, чието процентно съотношение е показано на табл. 2. Съвсем наскоро открит подтип антитела, отговарящи предимно на рANCA имунофлуоресценция, са антителата срещу лизозомния мембранен протеин-2 (LAMP-2), познат още като CD 107b. За определянето им R. Kain и сътр. [8] използват ELISA, а валидацията е направена посредством Western blot.

**Таблица 2. Честота на по-редките (минорни) специфичности, тествани чрез ELISA при предварително определените по международния консенсус серотипове**

	IIF+/PR3-/MPO-	IIF+/PR3-/MPO+	IIF+/PR3+/MPO-	IIF-/PR3-/MPO-
CG	61%	80%	36%	25%
BPI	40%	20%	20%	14%
LF	31%	27%	16%	6%
Elastase	12%	0%	4%	0%

Съществуват две основни разновидности на ELISA методите – директни ELISA методи, използвани главно с търговска цел, и т. нар. „захващащи“ (от англ. capture) ELISA методи, при които се използват моноклонални антитела срещу PR3 или съответно MPO с цел повишаване на чувствителността на метода. При обработката на антигена в процеса на натоварване при директните ELISA методи е възможно да се появят конформационни промени в епитопите му, с което се възпрепятства разпознаването му от серумните антитела и се стига до фалшивоотрицателен резултат. За да се избегнат споменатите проблеми при натоварването на антигена и да се повиши чувствителността на метода, се въвеждат т. нар. ELISA техники със захващане на антигена от предварително натоварени моноклонални антитела. Проучванията по отношение на ANCA показват категоричното превъзходство на втората техника в сравнение с първата [9-10], но и при нея съществуват различни ограничения.

#### **Флуоцитометрично определяне на ANCA**

С навлизането на многоцветната флуоцитометрия и анализа чрез микросфери се правят пилотни проучвания и по отношение на опреде-

лянето на ANCA [11]. Резултатите показват, че методът е сравним по показатели с предходните два метода (табл. 3) и няма големи предимства. Това налага като «златен» стандарт при определянето на ANCA да бъде използван международно приетият консенсус от 1999 г. [12].

**Таблица 3. Специфичност и чувствителност на методите за определяне на ANCA при активност на заболяването**

	IIF	ELISA	IIF+ ELISA	Флуоцитометрия
Специфичност	75% (67-85%)	98% (96-99%)	99%	88%
Чувствителност	84% (34-92%)	81% (62-100%)	92% (82-97%)	82%

#### **ДИАГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ**

Интерпретацията на положителните за ANCA резултати се прави на базата на комплексна оценка от клинични, хистологични и лабораторни показатели. ANCA са типична находка при т.нар. ANCA-асоциирани васкулити. Те обаче биха могли да се срещнат и при хронични възпалителни заболявания, инфекциозни заболявания, медикаментозно обусловени състояния, малигнени процеси. При това за правилна оценка на лабораторните данни в съображение влизат и показателите специфичност, чувствителност, предиктивна стойност на положителните и отрицателните резултати, нозологична чувствителност и нозологична специфичност на теста [13]. Определянето на ANCA съгласно международния консенсус е полезен серологичен тест за клинична оценка. Тестът би могъл да се използва в няколко насоки: 1. В подкрепа на диагнозата, без да е включен като диагностичен критерий в номенклатурната класификация от Chapel Hill [14]. 2. За оценка на активността на болестния процес и 3. Като прогностичен критерий за предвиждане на евентуални релапси. Все пак трябва да се отбележи, че различните автори приемат с резерви някои от тези насоки заради разнопосочните данни, получени при отделните проучвания [15-18].

#### **ПЪРВИЧНИ СИСТЕМНИ ВАСКУЛИТИ – ANCA-АСОЦИИРАНИ ВАСКУЛИТИ**

Първичните системни васкулити на средните и малките по размер съдове са интердисциплинарни заболявания, понеже биха могли да се проявят със засягането на различни органи и системи. Препоръката да се прави биопсия на засегнатите органи невинаги е възможно да бъде спазена. Въпреки че теоретично хистологичното изследване има добра диференциалноди-

агностична стойност и е включено като част от критериите на ACR, Chapel Hill, на практика най-често срещаната картина е левкоцитоклазичен васкулит (със или без еозинофили), която може да се наблюдава при редица други заболявания [19]. По-характерните грануломатозни изменения се откриват по-рядко. В този смисъл имунологичните показатели при тяхната добра интерпретация биха могли да подпомогнат значително клиницистите, без да се възприемат като дефинитивен диагностичен критерий. Според серологията първичните системни васкулити могат да се разделят на ANCA-негативни и ANCA-позитивни. Последните се определят още и като ANCA-асоциирани васкулити (AAV) и включват следните заболявания: Вегенерова грануломатоза (WG), микроскопски полиангиит (MPA) и синдром на Churg-Strauss (CCS). Към тях някои автори причисляват и локализираните форми на васкулит-гломерулонефрит, които могат да са проява както на WG, така и на MPA [17, 20]. Основната имунологична характеристика на AAV е представена в табл. 4. Тези заболявания се определят като редки, с бързо прогресиране, нередко с лоша прогноза и относително висока смъртност [19]. Затова поставянето на точната диагноза и включването на съответното лечение е от решаващо значение за крайния изход. Диагностичната роля на ANCA е от значение и при релапсите на заболяванията, защото в повечето случаи повишаването на титъра на антителата предхожда клиничната изява, поради което е препоръчително периодичното контролно изследване на ANCA при пациенти с AAV.

**Грануломатозата на Wegener (WG)** се определя като васкулит с грануломатозно възпаление, засягащ предимно горните и долните дихателни пътища и/или бъбреците. В 36 до 50% [21] от случаите в процеса на болестта може да се появи и кожна симптоматика. Имунологичната характеристика на Вегенеровата грануломатоза са антитела от cANCA тип, отговарящи в 90% от случаите на анти-PR3 ANCA специфичност. При

това заболяване те са високоспецифичен маркер, тъй като се позитивират при около 80% от болните със системно засягане и при около 50% при локализирана форма. За WG съществуват най-голям брой проучвания в сравнение с другите AAV, които показват, че титърът на антителата корелира с активността на болестта, а повишаването му се последва от релапс на заболяването [22-24]. Трябва да се отбележи, че при грануломатозата на Вегенер макар и значително по-рядко се откриват и антитела с MPO специфичност – между 10 и 30% [18].

**Микроскопският полиангиит** се определя като негрануломатозен васкулит на малките и средните по размер съдове, който в сравнение с другите AAV по-рядко засяга долните дихателни пътища и по-често има бъбречна симптоматика. Антителната констелация при MPA може да се приеме донякъде като реципрочна на грануломатозата на Вегенер, тъй като се наблюдават основно рANCA и се срещат предимно анти-MPO ANCA при до 60% от случаите [4]. Могат да се наблюдават и/или антитела срещу минорни антигени, по-често еластаза, лактоферин и катепсин G [25], но обикновено титърът на анти-MPO е най-висок. В още по-редки случаи е възможно да бъдат открити cANCA тип и анти-PR3 ANCA.

Подобна имунологична картина се наблюдава и при ограничената форма на гломерулонефрит-васкулит. При бъбречното засягане нередко се установяват и cANCA с класически или атипичен тип светене, който да отговаря на анти-MPO ANCA специфичност [26]. Нов специфичен маркер за огнищния некротизиращ гломерулонефрит са антителата срещу LAMP-2 (H4B4), които R. Kain и сътр. [8] идентифицират при 93% от пациентите с посоченото заболяване. Тези антитела отговарят главно на рANCA тип. При повечето от изследваните пациенти при терапевтична ремисия на заболяването тези антитела се негативират, което показва, че те също биха могли да се използват и за оценка на активността на заболяването.

Таблица 4. Имунологична характеристика на ANCA-свързаните васкулити (модифицирана по McLaren)

ANCA	Грануломатоза на Вегенер	Микроскопски полиангиит	Синдром на Churg-Strauss	Гломерулонефрит-васкулит
cANCA IIF	64%	23%	33%	36%
pANCA IIF	21%	58%	33%	45%
PR3-ANCA ELISA	75% (65-80%)	40%	10%	45-55%
MPO-ANCA ELISA	20% (10-30%)	50% (58%)	60%	64%
Негативни	5%	10%	30-50%	–

При **синдрома на Churg-Strauss (CSS)** картината е сложна и от клинична, и от имунологична гледна точка. Той е относително рядко заболяване със заболяемост от 1,3-6,8/1 млн., протичащо като алергичен грануломатозен ангиит, засягащ дихателните пътища с астмоподобни прояви, еозинофилия и периферна неврологична симптоматика. В сравнение с другите AAV бъбречното засягане е по-рядко. Разграничават се три фази в протичането на заболяването – „продромална”, васкулитна и постваскулитна. Поставянето на диагнозата в първата фаза е много трудно, защото симптомите са неспецифични и се свързват главно с алергичен ринит, носна полипоза и бронхиална астма на фона на тъканна и периферна еозинофилия ( $> 1500$  клетки/ $\text{mm}^3 = >1,5 \times 10^9/\text{l}$  абс. бр. или  $> 10\%$ ). Тъй като се смята, че имунната патология предшества клиничните прояви на болестта, е уместно при такива пациенти да се търсят ANCA, особено при влошаване на симптомите [27]. Тук трябва да се отбележи обаче, че такива антитела се наблюдават само при около 50% от пациентите с доказано заболяване (от 10 до 70%) и съответно при 50% липсват. Според наличието или липсата на ANCA се оформят две групи пациенти с CSS. При ANCA-позитивната група се наблюдават по-често пурпура, бъбречно засягане, неврологична симптоматика (от страна на ЦНС и под формата на mononeuritis multiplex), гастроинтестинално кървене [28]. Има данни, че честотата на бъбречното засягане при това заболяване е около 26.7% от случаите, като при 75% от тях се откриват ANCA [29]. ANCA-негативните пациенти се отличават с по-често засягане на белодробния паренхим и сърцето. При биопсично изследване се наблюдава еднаква честота на грануломите и при двете групи, докато проявите на васкулит са по-чести при ANCA-позитивните пациенти – 79%, спрямо 39% за негативните [28]. Няма данни за влиянието на ANCA върху изхода на заболяването, но се знае, че сърдечното и гастроинтестиналното засягане, както и наличието на васкулит се свързват с по-лоша прогноза. Като цяло тя се приема като добра при навременно започнало лечение. Съществуват данни, че релапсите при това заболяване се предхождат от покачване на еозинофилните нива и няма данни относно титъра на ANCA. От имунологична гледна точка характерни за CSS са рANCA тип на светене, като не е задължително те да отговарят на анти-MPO ANCA специфичност [30]. Процентното разпределение на ANCA спрямо основните антигени при това заболяване е 80-90% за анти-MPO и 10-20% анти-PR3 ANCA. Според други

проучвания анти-MPO ANCA и анти-PR3 ANCA се срещат поравно в 30% от случаите [13].

#### **ХРОНИЧНОВЪЗПАЛИТЕЛНИ И АВТОИМУННИ ЗАБОЛЯВАНИЯ, ПРИ КОИТО МОГАТ ДА БЪДАТ ОТКРИТИ ANCA И ТЯХНОТО КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ**

Диагностичната роля на ANCA не бива да се надценява, тъй като те могат да се наблюдават и при различни хроничновъзпалителни, инфекциозни, малигнени състояния, а според някои автори те биха могли да бъдат открити и в до 2% от нормалната популация без наличие на клинични изяви. Антитела предимно от рANCA тип, отговарящи на анти-MPO ANCA специфичност или насочени към някои от другите минорни антигени, могат да се наблюдават при много от системните автоимунни заболявания, като лупус еритематозус, ревматоиден артрит, склеродермия, улцерозен колит, болест на Behcet или пък да бъдат лекарствено индуцирани. Българският принос в това отношение е на И. Манолова и [31], които съобщават, че при пациенти с ревматоиден артрит, положителни за рANCA с MPO и/или минорна специфичност, се наблюдава повишена активност на заболяването. При хроничновъзпалителните заболявания на чревния тракт често се наблюдават ANCA, които могат да бъдат от рANCA тип или атипични. Откриването на ANCA при улцерозен колит варира между 35 и 71%, предимно срещу MPO, но напоследък са докладвани случаи, рефрактерни на лечение, при които специфичността е към PR3 [32]. Не липсват данни и относно минорните антигени, сред които най-често се откриват VPI и лактоферин, а наличието на антитела срещу катепсин G отново се свързва с по-изразена рефрактерност на заболяването [33]. Следователно някои субтипове ANCA могат да се свържат с тежестта на протичане на заболяването и прогноза по отношение на отговора към лечение. При болестта на Crohn ANCA се откриват в значително по-слаба степен – между 10 и 30% [34]. Въпреки че само по себе си изследването на ANCA при тези две заболявания няма диференциалнодиагностична стойност, то определянето на ANCA и последващо тестване на антитела срещу *Saccharomyces cerevisiae* чрез ELISA може да се използва в подкрепа на диагнозата [12]. Според консенсусното становище от 1999 г. по-характерните серологични типове на двете заболявания могат да бъдат определени като: рANCA+ ASCA – при улцерозен колит и рANCA-ASCA+ при болест на Crohn. Наличие на ANCA се наблюдава и при други автоимунни заболявания в областта на гастроентерологията – при пациенти с първичен склерозиращ холангит и такива с първи тип авто-

имунен хепатит. При тези две заболявания е доказано, че освен ANCA от клас IgG значение могат да имат и ANCA от клас IgA [35]. Този феномен на изотипно превключване трябва да се познава, понеже като повечето търговски китове ELISA за ANCA определят само антителата от IgG тип.

### ЛЕКАРСТВЕНО ИНДУЦИРАНИ ANCA

Съществуват много данни, които показват, че отключващ фактор на дадено аутоимунно заболяване може да бъде приемът на определен медикамент. Познати са състояния като lupus-like синдром, remphigus medicamentosus и др., които се свързват с употребата на  $\beta$ -блокери, антибиотици и т.н. Така например при lupus-like синдрома освен антинуклеарни антитела, характерна находка са антихистоновите антитела. Съществуват значителен брой публикации, които показват, че ANCA се индуцират при употребата на антииреоидни препарати – пропилтиоурацил, метимазол, карбимазол [36-38], както и при употребата на миноциклин [39]. Тези лекарства се приемат и като външни отключващи фактори на васкулитната болест. Според различните проучвания наличие на ANCA се наблюдава в 20-64% от случаите при лечение с пропилтиоурацил, като само малка част от пациентите имат клинична симптоматика [37]. Обикновено при прекратяване приема на медикамента изчезват и симптомите, а серологията се негативира. Понякога обаче е възможно отключване или активиране на съществуващо заболяване. За разлика от идиопатичните васкулити, които протичат със значително по-тежко бъбречно, белодробно и неврологично засягане, състоянията на лекарствено индуцираните ANCA често се проявяват с кожно засягане. Особено характерен е уртикария-васкулитът. При по-тежка симптоматика освен смяна или прекратяване на препарата се налага включването на имunosупресивна терапия и такива пациенти са показани за оперативно лечение на основното заболяване. Друга характерна особеност на лекарствено предизвиканите васкулити за разлика от идиопатичните е отсъствието на зависимост между титъра на ANCA и тежестта на клиничната симптоматика. Спад в титъра на антителата се наблюдава към третия месец след постигане на ремисия, но има случаи, при които антителата персистират до 2 години. Имунологичната характеристика на лекарствено индуцираните ANCA се свързва с главно с атипичните xANCA или с pANCA, отговарящи на една или повече минорни специфичности или на MPO специфичност. Според някои автори наличието на ANCA

спрямо повече от една специфичност е по-характерно за лекарствено индуцираните състояния, отколкото за AAV [40], но има множество примери, които не поддържат подобно твърдение. Съществуват единични съобщения за лекарствено индуцирани ANCA, свързани с циметидин [41], пантопризол [42], хидралазин [43], цефотаксим [44], сулфасалазин и др.

### ANCA И ИНФЕКЦИОЗНИ СЪСТОЯНИЯ

Установено е, че роля за развитието на ANCA могат да играят както бактериални, така и вирусни инфекции. Този факт поставя още едно предизвикателство за разкриването на механизмите по отношение на етиологията и патогенезата на ANCA-свързаните състояния. Едно вероятно обяснение за образуването на ANCA въобще са наскоро установените неутрофилни екстрацелуларни „капани“ (NETs), свързващи се с различни патогени. Известно е, че васкулитите могат да се дължат на различни подлежащи инфекциозни състояния, като исторически погледнато, тази връзка е позната още от луесния аортит. За разлика от идиопатичните AAV инфекциозните васкулити се определят все още като вторични, но натрупаните напоследък данни за ролята на микроорганизмите в патогенезата на първичните васкулити правят трудно тяхното отграничаване при наличие на ANCA, тъй като и клиничното им протичане често е сходно. Най-често наличието на ANCA се свързва с носителство на *Staphylococcus aureus*, HbsAg, HCV, HIV, TBC.

За първи път съмнение за връзката между грануломатозата на Вегенер и носителството на *Staphylococcus aureus* е изказано от самия Вегенер. Хронично носителство на *S. aureus* се среща при около 63% от пациентите с болест на Вегенер, за разлика от здрави контроли, при които то е 25% [45]. Нещо повече, данните на С. А. Stegeman и сътр. [46] показват силната асоциация между хроничното носителство на микроорганизма и релапсите на заболяването, като според други проучвания продължителното приложение на котримоксазол при такива пациенти е от полза за постигането на ремисия на основното заболяване [47]. Механизмът, по който *S. aureus* осъществява своята патологична роля по отношение на ANCA-васкулитите, е неясен и съществуват различни теории, вкл. познатото му действие като суперантиген, който се свързва с V $\beta$  на Т-клетъчния рецептор (TCR) с поликлонално активиране на Т-или пък поликлонално активиране на В-клетки чрез различни компоненти в стената си.

Както беше отбелязано, в патогенезата на AAV нерядко роля играят и вирусни инфекции.

Така напр. за нодозния полиартериит (PAN) е известно, че може да се наблюдава в асоциация с HBV инфекция, която според различни данни средно е около 30% [48]. При около 10% от пациентите с PAN се открива подлежаща HCV инфекция [45]. Според L. Guillevin и сътр. [49], които проучват характеристиките на HBV-PAN повече от 30 години, наличието на ANCA при това заболяване е рядкост, но според други автори те се срещат често както при автоимунни, така и при вирусни чернодробни заболявания [50].

Значението на вирусните инфекции за ANCA анти тялообразуването се подкрепя и от съобщения за наличие на тези антитела при пациенти с HIV. Първите описани клинични случаи за подобна асоциация датират от 1991 г. [51] и 1992 г. [52]. Въпреки че все още не е доказано, се предполага, че на атителата се дължи т. нар. HIV-PAN [53]. От друга страна, O. A. Cornely и сътр. [54] намират наличие на ANCA до 4% при HIV позитивни пациенти, но посочват, че не откриват белези на васкулит. Досега не са публикувани проучвания, определящи имунологичните характеристики на ANCA при пациенти със СПИН, но съществуват значителен брой статии за тяхното наличие и клинично значение при трансплантации.

В практиката често се налага да се прави диференциална диагноза между грануломатозата на Вегенер при белодробна локализация и белодробна туберкулоза. В подобни ситуации има примери за редица диагностични грешки. Въпреки че ANCA са специфичен маркер за AAV, трябва да се подчертае, че е възможно те да бъдат открити и при инфекция с *M. tuberculosis*, което да доведе до погрешно поставяне на диагноза Вегенерова грануломатоза. Присъствието на ANCA при туберкулоза според различните проучвания варира за всички серотипове общо между 10 и 40% и между 1 и 33% за cANCA/anti-PR3 серотип. L. Teixeira и сътр. [55] в своето проучване посочват, че 10% от пациентите са позитивни за cANCA при IIF и около 1% са позитивни за PR-3 ANCA, което те тълкуват като ниска серопозитивност и слаба специфичност на ANCA при туберкулозата. Според тях наличието на cANCA/anti-PR3 серотип почти изключва диагнозата туберкулоза.

### ANCA и малигнени състояния

При много автоимунни заболявания рискът от последващо развитие на малигнено заболяване е повишен, като това е доказано и за AAV [56]. От друга страна, при много малигнени състояния се откриват различни автоантитела. ANCA не правят изключение. Още през 1992 г. K. M. O'Neil и сътр. [57] публикуват случай, при

който наличието на ANCA-позитивен васкулит маскира картината на карцином на панкреаса. Две години по-късно излиза съобщение за наличие на ANCA при случай на асимптомно протичащ рак на стомаха, както и за ANCA позитивен паранеопластичен васкулит при недиференциран аденокарцином в областта на медиастинума [58]. При изследване на пациенти с Вегенерова грануломатоза (положителни за anti-PR3) E. Tatsis и сътр. [59] откриват солидни тумори в при 5% от случаите, като най-често срещаният сред тях е карциномът на бъбрека. Описани са случаи с наличие на ANCA при аденокарцином на белите дробове, рак на панкреаса, хепатоцелуларен карцином, колоректален карцином [60-63]. Често дискутирана асоциация е тази между MPA и различни хематологични заболявания, като повечето от тях се проявяват като левкоцитокластичен васкулит или PAN. Имунологичната характеристика на ANCA при малигнени състояния не е добре проучена. На IIF могат да се наблюдават pANCA, но могат да се открият и cANCA, както и атипични cANCA [5].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

През изминалите 4 десетилетия от публикуването на първото съобщение за ANCA до момента са натрупани значителен брой експериментални и клинични данни за тяхната роля в патогенезата на автоимунната болест. Охарактеризирани са различните подтипове ANCA, тяхната имунна специфичност и клинично значение. Непрекъснатото усъвършенстване на методите за тяхното определяне по отношение на показателите специфичност и чувствителност разширява границите на диагностичните възможности и те се превръщат в надежден критерий за поставяне на диагнозата и проследяване на болестта. Неслучайно те залягат в консенсусния алгоритъм на R. Watts и сътр. [64], а след очакваната ревизия на международния консенсус вероятно ще намерят място като диагностичен критерий и в препоръките на Европейското дружество за васкулити (EUVAS) и Американската колегия по ревматология (ACR). Ето защо темата за диагностичната стойност на ANCA продължава да бъде актуална.

### Библиография

1. Davies, D. J. et al. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? – *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, 285, 1982, № 6342, 606.
2. van der Woude, F. J. et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. – *Lancet*, 1, 1985, № 8426, 425-429.

3. Falk, R. J. et J. C. Jennette. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. – *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1988, № 25, 1651-1657.
4. Pollock, W., M. Trevisin et J. Savige. Australasian ANCA Study Group Testing on formalin-fixed neutrophils is less sensitive and specific for small vessel vasculitis, and less sensitive for MPO-ANCA, than most ELISAs. – *J. Immunol. Methods*, **339**, 2008, № 2, 141-145.
5. Savige, J. et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. – *Am. J. Clin. Pathol.*, **120**, 2003, № 3, 312-318.
6. Csernok, E., P. Lamprecht et W. L. Gross. Diagnostic significance of ANCA in vasculitis. – *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, **2**, 2006, № 4, 174-175.
7. Mandl, L. A. et al. Using antineutrophil cytoplasmic antibody testing to diagnose vasculitis can test-ordering guidelines improve diagnostic accuracy? – *Arch. Intern. Med.*, **162**, 2002, 1509-1514.
8. Kain, R. et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. – *Nat. Med.*, **14**, 2008, № 10, 1088-1096.
9. Csernok, E. et al. Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. – *Rheumatology (Oxford)*, **43**, 2004, № 2, 174-180.
10. Feng, Z. et al. Clinical relevance of anti-PR3 capture ELISA in diagnosing Wegener's granulomatosis. – *J. Clin. Lab. Anal.*, **22**, 2008, № 1, 73-76.
11. Trevisin, M. et al. Evaluation of a multiplex flow cytometric immunoassay to detect PR3- and MPO-ANCA in active and treated vasculitis, and in inflammatory bowel disease (IBD). – *J. Immunol. Methods*, **336**, 2008, № 2, 104-112.
12. Savige, J. et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) – *Am. J. Clin. Pathol.*, **111**, 1999, № 4, 507-513.
13. McLaren, J. S. et al. The diagnostic value of anti-neutrophil cytoplasmic antibody testing in a routine clinical setting. – *QJM*, **94**, 2001, № 11, 615-621.
14. Jennette, J. C. et al. Nomenclature of systemic vasculitides: Proposal of an international consensus conference. – *Arthritis Rheum.*, **37**, 1994, 187-192.
15. Finkelstein, J. D. et al. Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. – *Ann. Int. Med.*, **147**, 2007, № 9, 611-619.
16. Girard, T. et al. Are antineutrophil cytoplasmic antibodies a marker predictive of relapse in Wegener's granulomatosis? A prospective study. – *Rheumatology (Oxford)*, **40**, 2001, № 2, 147-51.
17. Stegeman, C. A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) levels directed against proteinase-3 and myeloperoxidase are helpful in predicting disease relapse in ANCA-associated small-vessel vasculitis. – *Nephrol. Dial. Transplant.*, **17**, 2002, № 12, 2077-2080.
18. Wiik, A. Rational use of ANCA in the diagnosis of vasculitis. – *Rheumatology (Oxford)*, **41**, 2002, № 5, 481-483.
19. Semple, D. et al. Clinical review: Vasculitis on the intensive care unit – part 1: diagnosis. – *Crit. Care*, **9**, 2005, № 1, 92-97.
20. Kallenberg, C. G. Pathogenesis of PR3-ANCA associated vasculitis. – *J. Autoimmun.*, **30**, 2008, № 1-2, 29-36.
21. Chen, K. R. et A. J. Carlson. Clinical approach to cutaneous vasculitis. – *Am. J. Clin. Dermatol.*, **9**, 2008, № 2, 71-92.
22. Boomsma, M. M. et al. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. – *Arthritis Rheum.*, **43**, 2000, № 9, 2025-2033.
23. Segelmark, M. et al. Monitoring proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies for detection of relapses in small vessel vasculitis. – *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 2003, № 5, 769-774.
24. Sanders, J. S. et al. Prediction of relapses in PR3-ANCA-associated vasculitis by assessing responses of ANCA titres to treatment. – *Rheumatology (Oxford)*, **45**, 2006, № 6, 724-729.
25. Gross, W. L., S Hauschild et N. Mistry. The clinical relevance of ANCA in vasculitis. – *Clin. Exp. Immunol.*, **93**, 1993, Suppl. 1, 7-11.
26. Pollock, W. et al. Immunofluorescent patterns produced by antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) vary depending on neutrophil substrate and conjugate. – *J. Clin. Pathol.*, **55**, 2002, № 9, 680-683.
27. Zwerina, J. et al. The emergence of antineutrophil cytoplasmic antibodies may precede the clinical onset of Churg-Strauss syndrome. – *Arthritis Rheum.*, **60**, 2009, № 2, 626-627.
28. Grau, R. G. Churg-Strauss syndrome: 2005-2008 update. – *Curr. Rheumatol. Rep.*, **10**, 2008, № 6, 453-458.
29. Sinico, R. A. et al. Renal involvement in Churg-Strauss syndrome. – *Am. J. Kidney Dis.*, **47**, 2006, № 5, 770-779.
30. Holle, J. U. et P. Lamprecht. ANCA-associated vasculitides. Classifying the disease and its activity according to EULAR/EUVAS recommendations. – *Z. Rheumatol.*, **68**, 2009, № 1, 75-80.
31. Manolova, I. et M. Dantcheva. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Bulgarian patients with rheumatoid arthritis: characterization and clinical associations. – *Rheumatol. Int.*, **26**, 2005, № 2, 107-114.
32. Xu, J. et al. A subset of ulcerative colitis with positive proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. – *World J. Gastroenterol.*, **14**, 2008, № 45, 7012-7015.
33. Sobajima, J. et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in ulcerative colitis: anti-cathepsin G and a novel antibody correlate with a refractory type. – *Clin. Exp. Immunol.*, **105**, 1996, № 1, 120-124.
34. Vasilias, E. A. et al. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. – *Gut*, **47**, 2000, № 4, 487-496.
35. Schwarze, C. et al. IgA class antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis. – *Clin. Exp. Immunol.*, **133**, 2003, № 2, 283-289.
36. Chen, Y. X. et al. Propylthiouracil-associated antineutrophil cytoplasmic autoantibody-positive vasculitis: retrospective study of 19 cases. – *J. Rheumatol.*, **34**, 2007, № 12, 2451-2456.
37. Bonaci-Nikolic, B. et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated autoimmune diseases induced by antithyroid drugs: comparison with idiopathic ANCA vasculitides. – *Arthritis Res. Ther.*, **7**, 2005, № 5, R1072-1081.
38. Harper, L. et al. Propylthiouracil and carbimazole associated-antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in patients with Graves' disease. – *Clin. Endocrinol. (Oxford)*, **60**, 2004, № 6, 671-675.
39. Marzo-Ortega, H. et al. Is minocycline therapy in acne associated with antineutrophil cytoplasmic antibody positivity? A cross-sectional study. – *Br. J. Dermatol.*, **156**, 2007, № 5, 1005-1009.
40. Csernok, E., P. Lamprecht et W. L. Gross. Clinical and immunological features of drug-induced and infection-induced proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibodies and myelo-

- peroxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies and vasculitis. – *Curr. Opin. Rheumatol.*, 22, 2010, № 1, 43-48.
41. Ueda, H. et al. Cimetidine-induced tubulointerstitial nephritis with both MPO-ANCA and PR3-ANCA. – *Clin. Exp. Nephrol.*, 9, 2005, 4, 332-334.
  42. Jacobs-Kosmin, D., C. T. Derk et N. Sandorfi. Panto-prazole and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. – *J. Rheumatol.*, 33, 2006, № 3, 629-632.
  43. Dobre, M., J. Wish et L. Negrea. Hydralazine-induced ANCA-positive pauci-immune glomerulonephritis: a case report and literature review. – *Ren. Fail.*, 31, 2009, № 8, 745-748.
  44. Feriozzi, S. et al. Cephalexin-associated allergic interstitial nephritis and MPO-ANCA positive vasculitis. – *Ren. Fail.*, 22, 2000, № 2, 245-251.
  45. Kallenberg, C. G. et H. Tadema. Vasculitis and infections: contribution to the issue of autoimmunity reviews devoted to "autoimmunity and infection". – *Autoimmun. Rev.*, 8, 2008, № 1, 29-32.
  46. Stegeman, C. A. et al. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener's granulomatosis. – *Ann. Intern. Med.*, 120, 1994, № 1, 12-17.
  47. Popa, E. R. et J. W. Tervaert. The relation between *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions. – *Int. Med.*, 42, 2003, № 9, 771-780.
  48. Trepo, C. et L. Guillevin. Polyarteritis nodosa and extra-hepatic manifestations of HBV infection: the case against autoimmune intervention in pathogenesis. – *J. Autoimmun.*, 16, 2001, № 3, 269-274.
  49. Guillevin, L. et al. Hepatitis B virus-associated polyarteritis nodosa: clinical characteristics, outcome, and impact of treatment in 115 patients. – *Medicine (Baltimore)*, 84, 2005, № 5, 313-322.
  50. De Riva, V. et al. What is behind the presence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in chronic liver disease? – *Liver Int.*, 29, 2009, № 6, 865-870.
  51. Davenport, A. et P. J. Grant. False positive autoantibodies in HIV infection. – *Nephron*, 59, 1991, № 3, 515-516.
  52. Klaassen, R. J., R. Goldschmeding et K. M. Dolman. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection. – *Clin. Exp. Immunol.*, 87, 1992, № 1, 24-30.
  53. Calabrese, L. H. Infection with the human immunodeficiency virus type 1 and vascular inflammatory disease. – *Clin. Exp. Rheumatol.*, 22, 2004, № 6, Suppl. 36, S87-93.
  54. Cornely, O. A., S. Hauschild et C. Weise. Seroprevalence and disease association of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and antigens in HIV infection. – *Infection*, 27, 1999, № 2, 92-96.
  55. Teixeira, L. et al. Low seroprevalence and poor specificity of antineutrophil cytoplasmic antibodies in tuberculosis. – *Rheumatology (Oxford)*, 44, 2005, № 2, 247-250.
  56. Pankhurst, T. et al. Malignancy is increased in ANCA-associated vasculitis. – *Rheumatology (Oxford)*, 43, 2004, № 12, 1532-1535.
  57. O'Neil, K. M., D. M. Jones et J. M. Lawson. Wegener's granulomatosis masquerading as pancreatic carcinoma. – *Dig. Dis. Sci.*, 37, 1992, № 5, 702-704.
  58. Navarro, J. F. et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated paraneoplastic vasculitis. – *Postgrad. Med. J.*, 70, 1994, № 823, 373-375.
  59. Tatsis, E. et al. Wegener's granulomatosis associated with renal cell carcinoma. – *Arthritis Rheum.*, 42, 1999, № 4, 751-756.
  60. Watz, H. et al. Bronchioloalveolar carcinoma of the lung associated with a highly positive pANCA-titer and clinical signs of microscopic polyangiitis. – *Pneumologie*, 58, 2004, № 7, 493-498.
  61. Christl, S. U. et al. Pancreatic tail tumor as an unusual first manifestation of Wegener's disease. – *Z. Gastroenterol.*, 42, 2004, № 6, 513-516.
  62. Walcher, J., T. Witter et H. D. Rupprecht. Hepatocellular carcinoma presenting with paraneoplastic demyelinating polyneuropathy and PR3-antineutrophil cytoplasmic antibody. – *J. Clin. Gastroenterol.*, 35, 2002, № 4, 364-365.
  63. Diez-Portes, L. et al. ANCA-associated vasculitis as paraneoplastic syndrome with colon cancer: a case report. – *Lupus*, 14, 2005, № 8, 632-634.
  64. Watts, R. et al. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. – *Ann. Rheum. Dis.*, 66, 2007, № 2, 222-227.

Постъпил за печат на 1 юни 2011 г.