

SEROPREVENȚA ANTICORPILOR p-ANCA LA PACIENȚII CU RECTOCOLITĂ ULCEROHEMORAGICĂ ȘI LA RUDELE LOR DE GRADUL I

Elena Toader¹, Cecilia Durnea²

Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr.T. Popa” Iași
Facultatea de Medicină

1. Institutul de Gastroenterologie și Hepatologie Iași
2. Institutul de Sănătate Publică Iași

p-ANCA PREVALENCE IN ULCERATIVE COLITIS PATIENTS AND FIRST-DEGREE RELATIVES (Abstract): Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) are more common in patients with ulcerative colitis (UC) than in patients with Crohn's disease (CD), but its prevalence depends on the population being studied and the method employed for its detection. **Aim:** To determinate the prevalence of p-ANCA in ulcerative colitis (UC) patients and their first degree in NE Romania area. **Material and method:** In this study, we investigated the prevalence of p-ANCA as detected by ELISA, in the serum of 44 patients with UC and 22 first degree relatives. We also correlated the presence of this antibody with disease activity and extent, extraintestinal complications and therapy. 26 healthy individuals comprised the control group. **Results:** p-ANCA was detected in 11% of the patients with UC. Of the 5 p-ANCA positive UC patients, 1 case were found to have proctosigmoiditis, 1 cases had left-sided colitis and 3 cases had pancolitis. There was no correlation between the presence of this antibody and any of the studied clinical variables (extend disease, complication, family disease, surgery). No person of the first degree and control group presented positive test. **Conclusions:** The prevalence of p-ANCA in NE Romania patients with UC (11%) is lower than that in the Western population. The negativity of p-ANCA in all first degree relatives of NE Romania UC patients should be further elucidated. **Key words:** pANCA, ULCERATIVE COLITIS, ELISA

Diagnosticul serologic din rectocolită ulcerohemoragică (RCUH) cuprinde o serie de anticorpi cu importanță diferită în precizarea diagnosticului. Printre aceștia se numără și anticorpii anticitoplasmă neutrofilică ANCA care au fost descoperiți de mulți ani ca markeri ai dezechilibrului imunologic în boala inflamatorie intestinală (BII), patternul pANCA - perinuclear ANCA fiind mai specifici pentru RCUH (1). Anticorpii ANCA reprezintă o familie de autoanticorpi din clasa imunoglobulinelor G și M îndreptați împotriva unor antigene țintă reprezentate de granulațiile azurofile ale polimorfonu-

clearelor (proteinaza 3 și mieloperoxidaza). Determinarea acestor anticorpi se face prin imunofluorescență, sau, cu acuratețe sporită prin ELISA.

Utilitatea determinării ac pANCA este motivată din mai multe considerente:

- ca test adjuvant în precizarea fenotipului de BII (RCUH sau Boală Crohn),
- markeri pentru evoluția bolii și precizarea tratamentului.

Scopul acestui studiu a fost de a evalua semnificația seroprevenței anticorpilor pANCA la pacienții cu RCUH din N-E României și rudele lor de gradul I.

MATERIAL ȘI METODĂ

În studiu au fost incluși pacienți diagnosticați cu RCUH în Institutul de Gastroenterologie și Hepatologie Iași și rudele lor de gradul I. S-a constituit în același timp și un lot martor din 26 subiecți sănătoși, comparabil ca distribuție pe grupe de vârstă și sex cu loturile studiate.

Pacienții evaluați au fost grupați în 3 categorii :

- *grupul cu RCUH* include 44 pacienți diagnosticați cu RCUH ;
- *grupul rudelor de grad I* al pacienților cu RCUH, 22 persoane ;
- *grupul de control* include 26 subiecți sănătoși cu distribuție pe grupe de vârstă și sex similară cu a pacienților din lotul de studiu.

Includerea pacienților în studiu s-a bazat pe următoarele criterii :

- *criterii diagnostice* definite pe baza datelor clinice, endoscopice, histologice, radiologice ;
- *criterii evolutive* - boală cu o durată de cel puțin 2 ani.

Severitatea bolii a fost apreciată în raport cu criteriile Truelove și Witts cu definirea formelor ușoare, moderate și severe de boală.

Evaluarea extinderii leziunilor inflamatorii s-a făcut prin examinare endoscopică cu încadrare în proctită (afectare rectală), colită stângă (afectare până la unghiul splenic al colonului), pancolită (afectare colonică întinsă ce depășește unghiul splenic al colonului).

Criterii de excludere au fost pentru pacienții care au primit terapie imunosupresivă considerată ca medicația susceptibilă de a modifica titrul ac pANCA, aspect care este însă controversat (2).

Din probele de sânge recoltate s-au efectuat testări serologice pentru evidențierea pANCA, utilizându-se pentru determinare metoda ELISA.

Metoda de determinare

Pentru determinarea pANCA a fost utilizată metoda cantitativa ELISA, cu evidențierea mieloperoxidazei (MPO) și proteinaza 3 (PR3) ca antigenelor responsabile pentru pANCA. Metoda are la bază o reacție indirectă cu fază solidă de tip sandwich, cu realizarea în ser a unui complex antigen-anticorp între enzimele IgG conjugate cu MPO PR3. Testările serologice s-au efectuat în cadrul Laboratorului de Microbiologie, Institutul de Sănătate Publică Iași (laborator autorizat în efectuarea testelor ELISA), cu analizor automat pentru ELISA, ETI-STAR, (DiaSorin Italia). Fiecare probă biologică reprezentată de serul provenit de la subiecții incluși în studiu a fost prelucrată în acord cu instrucțiunile specificate pentru metoda de determinare. Procedura de lucru presupune mai multe etape :

1. Se prepară tamponul de spălare și diluentul pentru probe.
2. Se diluează probele. Probele de ser sau plasmă se diluează 1 : 100 cu diluant pentru probe (10 μ L ser sau plasma + 990 μ L diluant)
3. Se marchează pe foaia de lucru poziția probelor în godeuri incluzând 6 godeuri pentru calibratori, 2 pentru Controalele Pozitive (PC) și două pentru Controalele Negative (NC). Se poate opta și pentru testarea probelor în duplicate.
4. Se așează în holder numărul necesar de godeuri.
5. Se pipetează în godeuri câte 100 μ L de Calibratori, controale și probe diluate.
6. Se incubează 30 minute la temperatura camerei.
7. Se spală de 3 ori cu câte 300 μ L de tampon de spălare.
8. Se pipetează câte 100 μ L de Conjugat în fiecare godeu.
9. Se incubează 15 minute la temperatura camerei.
10. Se spală de trei ori ca în pasul 7.
11. Se pipetează în fiecare godeu câte 100

Seroprevalența anticorpilor p-ANCA la pacienții cu ectocolită ulcerohemoragică

TABELUL I
Valori pANCA prin testare ELISA

| Interpretare | Ac anti-PR3 (U/mL) | Ac anti-MPO (U/mL) |
|--------------|--------------------|--------------------|
| Normal | <5 | <5 |
| Crescut | >5 | >5 |

μL de Substrat pastrând aceeași ordine în care s-a pipetat Conjugatul.

12. Se incubează 15 minute la temperatura camerei.
13. Se adaugă câte 100 μL de reactiv de stopare în aceeași ordine ca și Substratul. Se așteaptă 5 minute.
14. Se citește absorbanta fiecărui godeu la 450 nm dacă se folosește un singur filtru, sau la 450/ 600-690 nm dacă se folosește un cititor cu două filtre. Reacția este stabilă pentru cel puțin 30 minute. Citirea densității optice trebuie făcută în acest interval de timp.

Valori probabile (așteptate) sunt redată în tabelul I, cu recomandarea ca fiecare laborator să stabilească propriile limite pentru valorile normale sau patologice.

Evaluarea rezultatelor se face cu ajutorul curbei obținute. Se recomandă curba cu 4 parametri pentru interpretarea rezultatelor.

Rezultatul pozitiv trebuie raportat la statusul clinic al pacientului. De asemenea, fiecare decizie pentru terapie se stabilește individual.

Tehnica prezintă o serie de limite legate de calitatea preparării antigenelor, izolarea sau purificarea proteinelor citoplasmice din neutrofilele umane și modificările de

conformație a epitopilor pentru antigen ocupați după aderarea la suprafață cu antigen.

REZULTATE

Din distribuția cazurilor referitoare la extensia leziunilor inflamatorii la grupul pacienților cu RCUH s-a constatat afectare tip colită stângă în 50% cazuri, pancolită în 32% cazuri și proctită în 18% cazuri. La același grup de studiu evaluarea severității bolii în raport cu criteriile Truelove și Witts relevă forme ușoare la 41% pacienți, forme mederate la 38% pacienți și forme severe la 21% pacienți.

În grupul pacienților cu RCUH testul pANCA a fost identificat pozitiv în raport cu valoarea cutoff (> 5U/mL) la 5 pacienți (11%). Majoritatea titrurilor au fost sub valoare cutoff de 5U/mL. Cel mai mare titru a fost de 17U/mL.

La grupul rudelor cu RCUH și martori nu s-a înregistrat nici un test pozitiv pentru pANCA (fig. 1).

Prezentarea pacienților cu RCUH și pANCA pozitiv în raport cu datele demografice, vechimea bolii, extinderea leziunilor, stadiul de activitate este redat în tabelul II.

DISCUȚII

pANCA este raportată în literatură cu o prevalență variabilă la pacienții cu BII. Pacienții cu RCUH prezintă mai frecvent pANCA (între 33%-84%) comparativ cu boala Crohn (BC) unde pANCA apare la 15% din pacienți și caracterizează subgrupul de BC colonică (3,4). În studiul nostru prevalența pANCA

TABELUL II
Pacienții cu RCUH și pANCA pozitiv

| Pacient | Sex | Vârsta | Vechimea bolii | Extensie | Severitate | Complicații, ME, chirurgie |
|---------|-----|--------|----------------|------------------|------------|---|
| 1 | M | 46 | 3 | Pancolită | S | Spondilită anchilozantă, colectomie, pouchită |
| 2 | F | 25 | 5 | Pancolită | S | Tromboflebită, anemie, megacolon toxic |
| 3 | F | 34 | 2 | Pancolită | M | CS |
| 4 | M | 70 | 10 | Colită stângă | M | Pseudopolipi |
| 5 | M | 51 | 8 | Proctosigmoidită | M | XXX |

Legendă S=sever, M=mediu, CS=colangită sclerozantă, ME=manifestări extraintestinale

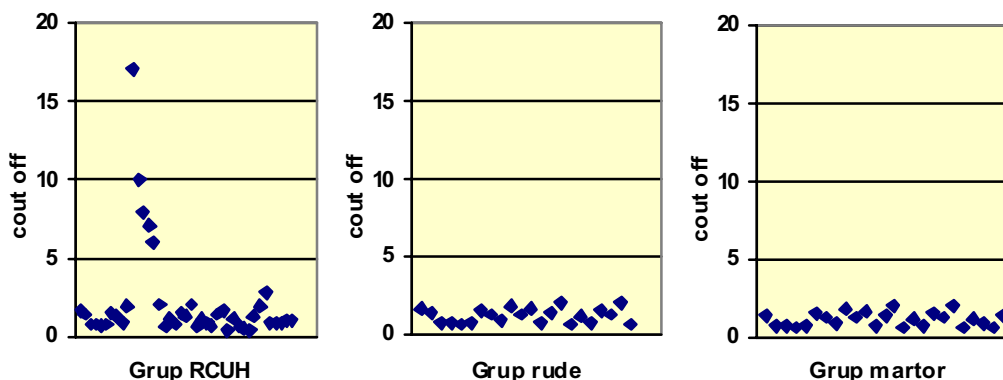


Fig. 1. Rezultate la testul pANCA în loturile de studiu

la pacienții cu RCUH este mai mică comparativ cu rezultatele raportate de alți autori. Din totalul pacienților testați doar 5/44 seruri (11%) au fost pozitive pentru pANCA aparținând pacienților cu RCUH; pacienții incluși în grupul rudelor și martori sănătoși nu au prezentat teste pozitive. Determinările s-au făcut la pacienții cu evoluția bolii de peste 2 ani și fără tratament imunomodulator care să modifice configurația bolii.

Diferențe de prevalență a pANCA au fost constatate la mai multe serii de studii derulate în arii geografice diferite; ele pot fi atribuite atât particularităților etnice cât și tehnicilor de lucru utilizate. La pacienții cu RCUH din Estonia (populație cu incidență mică a BII comparativ cu seriile europene), pANCA a fost detectată în 29/59 (49%) din cazuri cu RCUH, în 4 din 17 cazuri cu BC și în 4% din 111 cazuri subiecți sănătoși în timp ce la populația din UK prevalența a fost de 42,4% (5). Pentru ambele boli nu se constată corelație între prezența de pANCA și durata sau extensia bolii

Prezența pANCA cât și titrul nu se corelează cu extensia bolii, severitatea puseului de activitate și forma clinică evolutivă (6). Controverse ale relației pANCA- stadiul de activitate al bolii rezultate din datele diferitelor studii, care raportează atât titruri înalte de pANCA la pacienții cu RCUH activă, cât și lipsa de corelație între statusul pANCA + și boală activă, par a fi clarificate

de datele unui singur studiu de urmărire pe termen lung a prezenței și variației titrului pANCA, care precizează absența corelației între pANCA și stadiul de activitate al bolii (1,7). Mai mult, posibilitatea de conversie din pANCA negativ în pANCA pozitiv și viceversa nu se corelează cu activitatea bolii. În studiul nostru 4/5 pacienții cu seruri pozitive pentru pANCA prezentau boala în stadiul de activitate și leziuni extinse la nivelul colonului descendent sau pancolită. Având în vedere numărul redus de teste pozitive, rezultatele constatate nu pot fi considerate definitive pentru corelația între pANCA și boala activă. Cel mai mare titru de anticorpi a fost înregistrat la un pacient cu pancolită care a necesitat colectomie. În acest caz, titrul ridicat de pANCA a probat nu numai relația cu boala activă cu leziuni extinse, dar s-a dovedit și predictiv pentru pouchita apărută la un an după intervenția chirurgicală, care a necesitat reintervenție chirurgicală.

Variațiile de prevalență pot fi explicate prin implicarea factorilor tehnici utilizați în diferite metode de determinare (ELISA, imunofluorescență) (7). Metoda comună de determinare a anticorpilor pANCA este imunofluorescența indirectă (IFI), tehnica ELISA fiind mai recent introdusă. Variabilitatea rezultatelor între diferite laboratoare a impus standardizarea metodelor de determinare, în special pentru studiile comparabile. Dife-

Seroprevalența anticorpilor p-ANCA la pacienții cu ectocolită ulcerohemoragică

rențele de rezultate între studii ar trebui atribuite nu numai metodelor variate de lucru, dar și opțiunii laboratorului pentru valoarea de cutoff (valoarea prag de detecție a antigenelor cu semnificație patologică), cu recomandarea ca fiecare laborator să stabilească limitele normale și patologice (8). Încadrarea valorilor pANCA într-un model cantitativ este folosită în evaluarea clinică și biochimică a pacienților cu RCUH, în stabilirea corelațiilor cu factorii de risc și stabilirea asociațiilor epidemiologice.

În studiul nostru serurile pANCA pozitive au fost evaluate prin metoda ELISA, tehnica sandwich, cu valoarea cutoff de 5 U/mL. Pozitivitatea pANCA la populația de rectocolitici din NE României trebuie interpretată în raport cu structura genetică a pacientului, natura antigenului împotriva căruia se dezvoltă anticorpii, natura florei intestinale a populației din regiune.

Susceptibilitatea pentru BII poate fi influențată de genele complexului major de histocompatibilitate HLA, implicate în mod regulat în răspunsul imunologic. În mod distinct a fost raportată asocierea antigenelor CMH clasa I și II cu RCUH, statusul pANCA pozitiv fiind mai frecvent asociat cu HLA DR2 în timp ce pANCA – este asociat cu HLA DR4 (9). Mediarea imunologică a fost un obiectiv urmărit în criteriile de includere a pacienților, încât cei care au urmat tratament imunomodulator nu au fost selectați.

Determinările HLA pentru compatibilitatea transplantului de organ relevă un mozaic genetic, astfel încât, în lipsa unor studii imunogenetice despre structura genetică a pacienților cu RCUH, nu pot fi făcute aprecieri care să demonstreze asocierea dintre pANCA și HLA pentru populația de rectocolitici din această regiune a țării.

Mai mult, din datele din literatura reiese că această asociere pANCA-markerii genetici nu este confirmată la toate populațiile, ceea ce denotă o dependență mare a pozitivității testului de structura etnică a populației.

Existența unor variații regionale importante de tipul extremelor de prevalență menționate în unele studii din Germania, pun sub semnul întrebării relația pANCA-HLA. De asemenea, este acceptată și existența unor diferențe între date complete despre structura genetică a populației, care nu permit aprecieri ale relației pANCA și haplotipul pacientului (10).

Creșterea prevalenței pANCA la rudele pacienților cu RCUH, în special probanții pANCA pozitiv, validată pe mai multe serii de studiu, susține ipoteza de marker genetic al susceptibilității pentru RCUH (11,12).

În studiul nostru din 22 subiecți testați, rude de grad I ale pacienților cu RCUH (copii, părinți), nici un ser nu este pozitiv pentru pANCA (nici pentru rudele pacienții pANCA pozitiv și nici pentru rudele pacienții pANCA negativ), titrurile de anticorpi fiind sub valoarea cutoff de 5U/l. Absența markerilor genetici la rudele pacienților cu RCUH, sugerează o structură genetică diferită a populației din regiunea de NE a României. Acest aspect poate reprezenta o particularitate regională, a cărei confirmare necesită analiză în cadrul unor studii suplimentare.

Specificitatea pANCA este dată de prezența a doua antigene majore proteinaza 3 (PR3) și mieloperoxidaza (MPO) și de un set de antigenelor minore reprezentate de: catepsina, elastaza, lactoferina, lizozimul, proteine bacteriene implicate în creșterea a permeabilității. În RCUH antigenele majore sunt rar detectate și la titruri joase, în timp ce antigenele minore sunt mai frecvent descrise (13). În studiul nostru frecvența redusă și titrurile joase ale ac pANCA rezultate prin determinarea ELISA, pot fi datorate specificității kiturilor pentru antigenele majore MPO și PR3. Din grupul antigenelor minore, lactoferina reprezintă antigenul majoritar. Este cunoscut faptul ca lactoferina umană prezintă o secvența comună, de 68%, cu lactoferina din laptele de vacă, cu posi-

bilitatea unei reacții încrucișate între anticorpii umani și lactoferină (3). Alimentația copilului din primul an de viață (naturală sau artificială) pe un sistemul imun imatur, poate fi implicată în apariția de anticorpi împotriva lactoferinii. Istoricul pozitiv de alimentație naturală prelungită până la 1 an, constatat la majoritatea pacienților cu RCUH, ar putea argumenta prevalența pANCA redusă. De asemenea, este cunoscută și acceptată coexistența diferiților antigeni în același ser, dar numai testele cantitative antigen specific pot defini specificitatea antigenică a pacientului cu RCUH, creând și premisele unei mai bune corelații între titru de anticorpi și activitatea bolii. Faptul că titrul pANCA s-ar putea corela în principal cu antigenele majore, testarea, prin specificitatea kiturilor, nu permite analiza relației între activitatea bolii și titrul antigenelor specifici populației cu RCUH din NE României al cărui spectru antigenic nu este cunoscut.

Rolul bacteriilor în patogeniza BII este susținut de rezultatele studiilor experimentale pe modelul animal, dar nici până în prezent nu a fost identificat un germene specific. Alterarea florei intestinale a fost bine demonstrată la pacienții cu RCUH. Această ipoteză este susținută de faptul că modificări ale concentrației florei intestinale se asociază cu scăderea potențialului protector al lactobacilului și bifidobacteriei (14). Modificarea în timp a frecvenței RCUH poate fi și consecința modificărilor florei intestinale. Faptul că pANCA reacționează cu antigenele bacteriene vine în sprijinul ipotezei mimetismului antigenic investigat pentru autoanticorpii direct îndreptați asupra lactoferinii, care posedă o secvență comună cu proteina de șoc microbială (15). Nu sunt excluse variații de microfloră gastrointestinală umană pentru populația din NE României, dacă se are în vedere frecvența mare a enterocolitei la populația pediatrică. În Estonia a fost comparată microflora bacteriană prin coproculturi prelevate de la copii cu vârstă

până la 1 an cu cei din Suedia. Cauza diferenței de microfloră bacteriană cercetată la cele 2 populații rămâne necunoscută. Microflora curentă în populația din Estonia este similară cu cea din Suedia unde RCUH este mult mai frecventă, diferențele fiind atribuite implicării altor cauze (16).

Studiul nostru suportă rezultatele și pentru un caz de RCUH asociat cu colangită sclerozantă, dar titrul nu se corelează cu activitatea sau extensia bolii. Similar cazului cu pouchită, asocierea pANCA-RCUH-CS vine ca o confirmare a implicării factorului imunogenetic în patogeniza bolii.

CONCLUZII

Frecvența mică a anticorpii pANCA la pacienții cu RCUH din NE României le atribuie un rol limitat în diagnosticul serologic al bolii. Din cauza sensibilității reduse, determinarea uzuală a ac pANCA nu este utilizată. Testele pozitive influențează probabilitatea distincției între RCUH și BC. Titrul acestor anticorpi nu se corelează cu activitatea bolii și pare stabil în timp.

Probabilitatea susceptibilității genetice a RCUH, demonstrată prin frecvența mare a bolii la rudele de grad I, reprezintă un punct de interes pentru majoritatea cercetătorilor. Predispoziția genetică a bolii la rudele de gradul I, verificată prin testări serologice imune, nu se confirmă pentru pacienții din această regiune a țării, iar rezultatele testărilor pANCA efectuate la pacienții cu RCUH din N-E României prezintă valori mult mai mici față de datele din literatură. Interpretarea conjugată a frecvenței reduse a BII familiale și seroprevalența ac pANCA relevă aspecte care argumentează constatările noastre. Nici unul dintre pacienții cu istoric pozitiv pentru BII nu a prezentat pANCA +.

Considerăm aceste aspecte o particularitate regională, care necesită o documentare susținută și extinsă la un număr cât mai mare de pacienți în cadrul unor studii suplimentare.

Seroprevalența anticorpilor p-ANCA la pacienții cu ectocolită ulcerohemoragică

BIBLIOGRAFIE

1. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel diseases. *Clin Chem* 2006 ; 52 : 171-181.
2. Joossens S, Reinisch W, Veimeire S et al. The values of serologic markers in indeterminate colitis- a prospective follow-up study. *Gastroenterol* 2002 ; 122 : 1242-1247.
3. Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Colombel JF et al. Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001 ; 7 : 192-201.
4. Joossens S, Daperno M, Shums Z et al. Interassay and interobserver variability in the detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with ulcerative colitis. *Clin Chem* 2004 ; 50 : 1422-1425.
5. Kull K, Salupere R, Uibo R, Ots M, Salupere V. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Estonian patients with inflammatory bowel diseases : prevalence and diagnosis role. *Hepato-Gastroenterol* 1998 ; 45 : 2132- 2137.
6. Ferrante M, Henckaerts L, Jonssens M et al. New serologic markers inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 2007 ; 56 : 1394-1403.
7. Dubinski MC. Can serologic markers help determinate prognosis and guide therapy. Falk Symposium 172, 2010, 30.
8. Vernier G, Sendid B, Poulain D, Colombel JF. Relevance of serologic studies in inflammatory bowel disease *Curr Gastroenterol Rep* 2004 ; 6 (6) : 482-487.
9. Duerr RH, Neigut DA. Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup. *J Autoimmun* 2000 ; 14 (1) : 83-97.
10. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 ; 411 : 599-603.
11. Osangthamnont C, Manatsathit S, Pongprasopchai S et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm with ulcerative colitis and their first-degree relatives in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol* 2001 ; 16 (8) : 866-871.
12. Shanahan F, Duerr RH, Roterr JI et al. Neutrophil antibodies in ulcerative colitis : familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterol* 1992 ; 103 : 456-461.
13. Dotan I. New serologic markers for IBD diagnostic, The key to IBD : Treatment , diagnostic and pathophysiology. Falk Symposium 172, 2010, 29.
14. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science* 2005 ; 307 : 1920-1925
15. Guarner F. The intestinal flora in inflammatory bowel disease : normal or abnormal? *Curr Opin Gastroenterol* 2005 ; 21 : 414-418.
16. Seep E, Julge K, Vasar M et al. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infant. *Acta Paediatr* 1997 ; 86 : 956-961.