

LAVORO ORIGINALE

Anticorpi anti proteinasi 3 nella sclerosi sistemica (ScS) diffusa con impegno renale normotensivo: possono essere suggestivi di una sovrapposizione tra ScS e vasculite idiopatica?*

Anti-proteinase 3 antibodies in diffuse systemic sclerosis (SSc) with normotensive renal impairment: is it suggestive for an overlapping between SSc and idiopathic vasculitis?

F. Bellisai, G. Morozzi, M.R. Bacarelli, A. Radice¹, R.A. Sinico¹, J. Wieslander², G.D. Sebastiani³, V. Campanella, R. Marcolongo, M. Galeazzi

Istituto di Reumatologia, Università di Siena, Italy; ¹Dipartimento di Nefrourologia e Dipartimento di Allergologia e Immunologia Clinica, Azienda Ospedaliera Ospedale San Carlo Borromeo, Milano, Italy; ²Wieslab, Lund, Sweden; ³Divisione di Reumatologia, Ospedale San Camillo de Lellis, Roma, Italy

SUMMARY

Objective. To test the prevalence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in systemic sclerosis (SSc) and to verify a possible association of ANCA with normotensive renal involvement in SSc.

Patients and methods: 51 patients affected by SSc, 35 with diffuse scleroderma (dSSc) and 16 with limited scleroderma (lSSc), were tested for ANCA by indirect immunofluorescence (IIF) on human ethanol and formalin-acetone-fixed granulocytes (before and after DNase treatment), by conventional enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) and by capture-ELISA.

Results. Six out of 51 selected SSc patients had ANCA by IIF (11.7%) and five presented a perinuclear/nuclear atypical ANCA pattern. In all cases we only found anti-proteinase3 (aPR3) antibodies. All ANCA positive patients had diffuse form of SSc (17.1%), all were anti-Scl70 positive (aScl70), five patients had proteinuria, three had microscopic haematuria. All ANCA positive patients were normotensive with normal renin plasma levels, the mean erythrocyte sedimentation rate (ESR) was higher in this group compared to the other SSc patients.

Conclusions. Our study shows that aPR3 is not rare in dSSc. According to the clinical and serological findings and to the recent literature, we can hypothesise that when ANCA are found in SSc, an overlapping of scleroderma with systemic necrotizing vasculitis should be suspected.

Reumatismo, 2001; 53(1):33-39

INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (ScS) è una malattia del connettivo ad eziologia sconosciuta. L'etiopatogenesi della ScS è sconosciuta, si ritiene tuttavia che il danno iniziale nella malattia risieda in una

vasculopatia (1,2). La forte associazione della ScS con il fenomeno di Raynaud conferma che il danno vascolare rappresenta una tappa fondamentale nella patogenesi della sclerosi sistemica.

D'altra parte sappiamo che gli anticorpi rivolti contro il citoplasma dei neutrofili (ANCA) sono considerati come markers di alcune vasculiti sistemiche necrotizzanti (3). È infatti noto che gli anti-proteinasi3 (aPR3) sono diagnostici per la granulomatosi di Wegener (GW) (4,5) mentre gli anti-mieloperossidasi (aMPO) sono fortemente associati con la poliangiite microscopica e la glomerulonefrite idiopatica necrotizzante (6,7). Inoltre gli ANCA, specie di tipo perinucleare (pANCA), so-

* Lavoro premiato al XXXVI Congresso SIR di S. Margherita di Pula, 1999

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr.ssa Francesca Bellisai, Istituto di Reumatologia, Università di Siena, Policlinico Le Scotte - 53100 Siena, Italy, Tel. 39 577 233378; Fax 39 577 40450

no stati ritrovati nel siero di pazienti affetti da altre patologie quali epatiti autoimmuni, colite ulcerosa (8), artrite reumatoide (9,10), lupus eritematoso sistemico (11-13), sindrome di Felty (14), malattia di Kawasaki (15) e più recentemente, alcune infezioni acute e croniche compresa quella da HIV (16,17). Il significato clinico e patogenetico di questi anticorpi in tali patologie non è stato ancora chiarito. Per quanto riguarda la sclerosi sistemica esistono pochi dati in letteratura. In particolare, diversi Autori hanno ipotizzato un possibile ruolo patogenetico degli anti-MPO nel coinvolgimento renale della sclerodermia (18-20), ma questa ipotesi non è stata confermata da altri autori (21). In questo lavoro descriviamo le caratteristiche cliniche e sierologiche di 6 pazienti affetti da sclerodermia diffusa con anticorpi anti-PR3 e le confrontiamo con le caratteristiche dei pazienti ANCA negativi.

PAZIENTI E METODI

I sieri di 51 pazienti affetti da sclerodermia (44 donne, 7 uomini) trattati presso il nostro centro da giugno 1994 a novembre 1998 sono stati retrospettivamente testati per gli ANCA. La diagnosi di ScS è stata fatta in accordo con i criteri ARA (22). Sulla base dell'estensione del danno cutaneo, 35 pazienti sono stati classificati come sclerodermia diffusa (dScS) e 16 come sclerodermia limitata (lScS) (23). Dei 35 pazienti con forma diffusa, 30 erano positivi per anticorpi anti-topoisomerasi I (anti-Sc170). L'età dei pazienti era compresa tra 33 e 74 anni (età media 53 anni) e la durata di malattia variava dai 6 ai 444 mesi (in media 104 mesi). I sieri sono stati conservati in aliquote da 0.5 ml a -70°C fino al dosaggio. Sono stati testati i sieri di 120 donatori sani come gruppo di controllo.

Tutti i sieri sono stati testati per la presenza di ANCA in IFI usando neutrofili fissati in etanolo in accordo con la metodica approvata al 1° Workshop Internazionale sugli ANCA (25). Questi tests sono stati eseguiti in due laboratori diversi (lab 1 e lab 2, rispettivamente Istituto di Reumatologia di Siena, Italia, e Dipartimento di Nefrourologia e Dipartimento di Allergologia e Immunologia clinica, Milano, Italia). Inoltre, sono state eseguite due tecniche per evitare l'interferenza dovuta alla presenza di anticorpi anti-nucleo. In primo luogo, tutti i campioni sono stati testati su substrati fissati in formalina-acetone (0.25% formalina, 45% acetone, 2.2mM tampone fosfato) e successivamente, tutti i

sieri ANCA positivi, sono stati ricontrollati in IFI usando vetrini con neutrofili pretrattati con Dnasi. In breve, la Dnasi liofilizzata (Sigma) è stata sciolta in 1 ml 150 mM NaCl e diluita in 40 mM Tris-HCl pH7.9, 10mM NaCl, 6mM Mg Cl₂, 10 mM CaCl₂ a 3µg/ml come concentrazione finale. I vetrini sono stati incubati con enzima diluito o tampone per 30' a 37°C in camera umida (26). Dopo 3 lavaggi con PBS per 5' ciascuno, l'IFI è stata eseguita come già descritto. Per la ricerca degli anticorpi anti-PR3 sono stati utilizzati un kit del commercio (Shield diagnostics, Sw) (lab 1) e una metodica ELISA elaborata in casa (lab 2) (27). Inoltre tre campioni di siero positivi in ELISA per gli aPR3 sono stati testati con la capture ELISA (lab 3, Wieslab, Lund, Sweden) (28). Per la ricerca degli anticorpi anti-lattoferrina (aLF) e aMPO sono state utilizzate metodiche ELISA fatte in casa, come precedentemente descritto (13). È stata eseguita anche la ricerca degli ANA in IFI (HEp-2000, Immuno-Concepts, Sacramento, USA) utilizzando FITC coniugato anti-IgG umane. Gli anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili (ENA) sono stati ricercati in immunodiffusione doppia (Immuno-Concepts, Sacramento, USA).

Analisi statistica

I valori medi di alcuni parametri di laboratorio sono stati confrontati con l'U-test di Mann-Whitney. Le frequenze sono state confrontate con il test di Fischer. Un $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

Tra i 51 sieri di pazienti affetti da sclerodermia testati per gli ANCA, 6 sono risultati positivi (11.7%). Tutti tranne uno (cANCA) presentavano un pattern atipico di fluorescenza sul substrato fissato in etanolo, caratterizzato da una combinazione di tipo perinucleare/nucleare con qualche punteggiatura nel citoplasma (Fig. 1a). In formalina acetone tutti questi pattern diventavano citoplasmatici. La fig 1b mostra il pattern nucleare di un siero positivo per anticorpi anti-Sc170, negativo per gli ANCA. Inaspettatamente, quando testati in ELISA, la specificità antigenica di questi sieri era anti-PR3 in tutti i casi. Infatti in nessun caso è stata riscontrata una positività per anti-LF e anti-MPO. Questo riscontro è stato confermato anche con la capture ELISA su tre di questi sieri. Il pre-trattamento con la Dnasi (26) inoltre, aboliva completa-

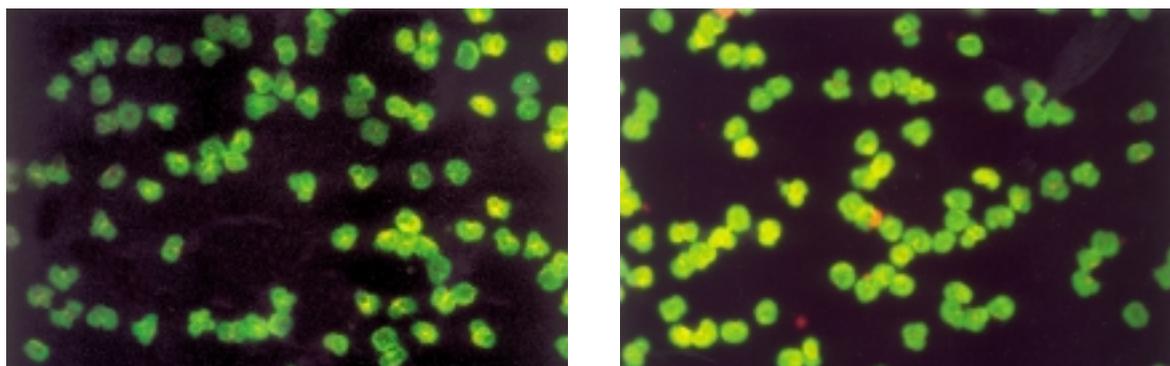


Figura 1a, b - Quadro fluoroscopico (IFI) (400x) dei neutrofilii fissati in etanolo utilizzando sieri di pazienti affetti da dScS. (a) pattern perinucleare atipico in siero con positività per aPR3 e aScl70; (b) pattern nucleare in siero con aScl70 e negatività per gli ANCA.

mente la fluorescenza perinucleare/nucleare, lasciando solo un debole pattern citoplasmatico in due dei sieri testati.

I dati demografici, clinici e sierologici di questi sei pazienti sono illustrati nella Tab. I.

Tutti i pazienti erano affetti da sclerodermia diffusa con anticorpi anti-Scl70, cinque su sei presentavano proteinuria, VES elevata e valori normali di

creatinina plasmatica e di renina. La pressione arteriosa era normale. In tre pazienti è stato possibile dimostrare retrospettivamente la presenza di ematuria microscopica. Inoltre, al momento del prelievo, tutti i pazienti erano trattati con steroidi (dosaggio medio 15 mg di prednisone al giorno) e quattro di loro (paz 1,2,4,5 della tabella I) avevano ricevuto boli di ciclofosfamide (1 grammo al

Tabella I - Caratteristiche demografiche, cliniche e sierologiche di 6 pazienti affetti da dScS aPR3 positivi.

Pazienti:	1	2	3	4	5	6
Età/sexo	55/F	44/M	39/F	71/F	45/F	52/M
Durata di malattia (mesi)	96	48	72	12	24	72
Sclerodermia diffusa.	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Fenomeno di Raynaud	Si	Si	Si	Si	Si	Si
fibrosi polmonare(*)	Si	Si	No	Si	Si	Si
Coinvolgimento esofageo(^)	Si	Si	No	Si	Si	Si
proteinuria (>0.15 g/24 h)	1.8	1.3	1.2	1.4	No	1.5
microematuria	Si	Si	No	No	Si	No
Press. Art.(v.n.<140/90mmHg)	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.
VES(v.n. <20 mm/h)	100	68	28	35	32	60
GR($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4050	4800	4449	5005	4093	5011
GB(mm^3)	11000	10200	7600	15000	8200	11900
Piastri($\times 10^3/\text{mm}^3$)	526	399	378	159	350	459
Renina. (1.5-5.7ng/ml/h(**))	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.	Norm.
Creatinina (v.n.: 0.6-1.2 mg/dl)	1.1	0.9	0.8	1.3	0.5	0.8
Fattore Reumatoide	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
ANA(***)	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
aScl-70	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
Anticorpi anti-centromero	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
ANCA IIF	pANCA ^o	cANCA				
aPR3	pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

Legenda Tab. I

(*) La fibrosi polmonare è stata diagnosticata e valutata in accordo con i criteri precedentemente pubblicati (24)

(**) La renina è stata misurata in ortostatismo

(***) I pattern degli ANA erano omogeneo e nucleolare (titolo medio = 1:640 e 1:1280, rispettivamente). Questo pattern IFI è caratteristico dei sieri positivi per gli aScl70.

(^o) Il pattern fluoroscopico è perinucleare atipico

(^) Il coinvolgimento esofageo è stato valutato con mezzi radiologici convenzionali (esofago baritato) e con esofagogomanometria.

Tabella II - Caratteristiche demografiche, cliniche e sierologiche di 51 pazienti affetti da sclerodermia divisi in funzione della variante clinica e della presenza degli ANCA.

<i>Variante clinica</i>	<i>dScS ANCA +</i>	<i>dScS ANCA -</i>	<i>lScS</i>
N° di pazienti	6	29	16
Età media (anni)	51	53.5	55
Durata media malattia (mesi ± SD)	54 ± 36	97 ± 96	156 ± 156
fenomeno di Raynaud (%)	100	100	100
Coinvolg. Gastroint. (%)	66.6	61	50
Fibrosi Polmonare (%)	83.3	88.8	12.5
Ematuria (%)	50	19.2	12.5
Renina (v.n. 1.5 – 5.7)	4.2	n.t. (^)	n.t.(^)
Proteinuria (v.n. <0.150 g/L) (media g/L ± SD)	0.67 ± 0.7	0.45 ± 0.44	0.25 ± 0.28
Pressione arteriosa sistemica elevata (%)	0	14.3	18.7
V.E.S (media ± SD) ^o	40.2 ± 20.62*	24.37 ± 21.25	14.7 ± 8.05
Creatinina (media mg/dl)	0.92	0.96	0.84

Legenda Tab.II
 (^) Non testato
^o Velocità di sedimentazione degli eritrociti
 *p < 0.05 vs ANCA- dScS and lScS

mese per sei mesi consecutivi) per trattare una fibrosi polmonare rapidamente ingrossante. Nessuno di questi pazienti assumeva ACE-inibitori, D-penicillamina o altri farmaci potenzialmente nefrotossici che avrebbero potuto giustificare la presenza di proteinuria isolata. In cinque pazienti era presente una fibrosi polmonare. L'unico paziente senza segni di fibrosi riscontrabili radiologicamente presentava un moderato deficit ventilatorio restrittivo rilevato con le prove di funzionalità respiratorie. Un paziente (numero 4) aveva anticorpi anti-cardiolipina (aCl) e riferiva due episodi di trombosi venosa profonda a carico degli arti inferiori, precedenti alla comparsa della sclerosi sistemica. Due pazienti riferivano una anamnesi familiare positiva per malattie reumatiche; la madre della paziente 1 è deceduta per complicanze legate a una sclerosi sistemica, mentre la madre del paziente 2 era affetta da artrite reumatoide.

I 51 pazienti sclerodermici sono stati suddivisi in tre gruppi in funzione della presenza degli ANCA e dell'estensione del danno cutaneo. Le caratteristiche cliniche e sierologiche di questi gruppi sono descritte nella tabella II. Abbiamo riscontrato una durata di malattia inferiore nella forma diffusa ANCA positiva, confrontata con la forma ANCA negativa e con la forma limitata, ma questo riscontro non è statisticamente significativo. La proteinuria era più frequente ed elevata nel gruppo ANCA positivo (dato non significativo) e infine la VES era significativamente più elevata nella forma diffusa ANCA positiva rispetto a quella ANCA ne-

gativa (p < 0,05). Per quanto riguarda le caratteristiche immunologiche dei nostri pazienti, i sei pazienti affetti da dSSc presentavano una positività degli ANA con pattern omogeneo e nucleolare ad un titolo medio di 1:1280 e 1:640; i sieri dei 6 pazienti risultavano positivi per anti-Sc170.

Nella forma limitata gli ANA sono stati riscontrati nell'87% dei casi (14/16). Il pattern era centromerico ad un titolo medio di 1:5120. Anticorpi anti-Ro sono stati riscontrati in 10% delle forme diffuse ANCA negative. Nessuno dei 35 pazienti affetti da forma diffusa aveva anticorpi anti-centromero. Inoltre non sono stati riscontrati altri anti-ENA o anticorpi anti-DNA nella nostra casistica. Per quanto riguarda i controlli sani, sono stati riscontrati anticorpi anti-nucleari in 2 casi (1:80) e nessuna fluorescenza per ANCA. Non sono stati riscontrati anticorpi anti-PR3, mentre 2 sieri hanno presentato bassi titoli di anticorpi anti-MPO e anti-LF.

DISCUSSIONE

Il primo aspetto del nostro lavoro che merita di essere commentato riguarda la presenza, in 5 dei 6 sieri ANCA positivi, di anticorpi anti-PR3 con un pattern fluoroscopico di tipo perinucleare/nucleare, anziché citoplasmatico come solitamente dovrebbe essere. Possiamo ipotizzare almeno due spiegazioni: la PR3 potrebbe essere ridistribuita intorno al nucleo e riconoscere in questi pazienti epitopi diversi da quelli comunemente riscontrati nel-

la GW e meno frequentemente in altre vasculiti necrotizzanti. La seconda ipotesi è che il pattern p-ANCA in etanolo sia dovuto alla coesistenza degli ANA. I risultati dell'esperimento usando un pretrattamento con Dnasi sembrano supportare questa seconda ipotesi. Il significato clinico e patologico di questo riscontro deve comunque essere ulteriormente valutato, così come la correlazione funzionale e biologica tra anti-Sc170 e a PR3 nella ScS. Il secondo aspetto originale è la presenza degli anticorpi anti-PR3 in un certo numero di pazienti affetti da sclerosi sistemica diffusa (6/35; 17.1%). La positività per questi anticorpi è stata confermata in 3 laboratori diversi utilizzando metodi e tecniche differenti (compresa la capture ELISA). Ovviamente non si può escludere la coesistenza di altre specificità antigeniche di tipo ANCA, da noi non testate, che sono comunque molto meno caratteristiche e il cui significato clinico risulta sconosciuto. In precedenti studi Endo et al (18) hanno riscontrato aMPO in 6 pazienti sclerodermici su 100 (6%). Questi pazienti sono andati tutti rapidamente incontro ad insufficienza renale ingravescente. Cinque di questi pazienti erano normotesi e la biopsia renale, disponibile in 3 casi, ha dimostrato lesioni necrotizzanti con minimi depositi di immunocomplessi. Questi riscontri hanno portato gli Autori a concludere che un sottogruppo di pazienti sclerodermici può presentare un impegno renale normotensivo ed emorragie polmonari. Questi pazienti erano caratterizzati da un punto di vista sierologico dalla presenza di anticorpi anti-MPO. Locke et al (21) hanno riscontrato aMPO nel siero di pazienti affetti da sclerodermia (2.5%) su 81 pazienti. Uno di questi due pazienti ha presentato un coinvolgimento renale istologicamente caratteristico della vasculite farmaco-indotta, probabilmente imputabile al trattamento con D-penicillamina. Contrariamente ad Endo, Locke suggeriva che gli ANCA si ritrovano raramente nella sclerodermia e che non possono essere considerati come una variante della malattia. Secondo Locke, gli aMPO associati al coinvolgimento renale, nella sclerodermia, hanno cause diverse rispetto alla malattia di base e il loro riscontro in un paziente affetto da SSc deve indurre a cercare una patologia indipendente.

Un terzo lavoro su questo argomento è stato pubblicato da Akimoto et al (20). Gli Autori hanno ritrovato aMPO in 7 pazienti affetti da sclerodermia su 77 (11.7%), esattamente la stessa prevalenza che abbiamo riscontrato nel nostro gruppo di pazienti (6 su 51). Uno di questi 7 pazienti è deceduto per una vasculite sistemica necrotizzante e gli altri 6 non

hanno presentato sintomi riferibili a vasculite sistemica o a coinvolgimento renale. Akimoto ha suggerito che gli aMPO possano essere considerati come marcatori sierologici di alcuni sintomi nella sclerodermia. Più recentemente, 2 casi clinici sono stati pubblicati (29,30) descrivendo la coesistenza di sclerodermia diffusa e glomerulonefrite pauciimmune in due pazienti positivi per aMPO e aSc170. Appare importante sottolineare che in questi studi non sono mai stati ricercati gli anticorpi anti-PR3 probabilmente per il riscontro di p-ANCA in IFI. Contrariamente ai risultati presentati in 2 precedenti studi (18,21) e in accordo con il terzo (20), abbiamo dimostrato che la presenza degli ANCA nella sclerodermia non è rara, specialmente nella forma diffusa di malattia (17.1%) con impegno renale normotensivo e valori plasmatici di renina normali. Sfortunatamente nei nostri pazienti la biopsia renale non è stata eseguita per il miglioramento della funzione renale e la riduzione della proteinuria dopo il trattamento steroideo e/o immunosoppressivo. Questo può rappresentare il limite del nostro studio. Infatti, essendo uno studio retrospettivo, l'unica dimostrazione della possibile coesistenza di dScS e vasculite sistemica nella nostra casistica è il riscontro anamnestico di ematuria in 3 casi (pazienti 1,2,5). Inoltre, la presenza di proteinuria isolata in alcuni dei nostri pazienti può essere imputabile ad una sindrome nefrosica dovuta ad una glomerulonefrite in remissione dopo la terapia immunosoppressiva.

È difficile spiegare perché non abbiamo riscontrato aMPO nella nostra casistica. Possiamo ipotizzare delle differenze a) nel pattern della sclerodermia, tra le diverse popolazioni, dovute probabilmente a influenze genetiche e/o ambientali, b) nel numero di pazienti studiati.

In conclusione, anche se, per i motivi sopra elencati, non possiamo dare una chiara dimostrazione della presenza di una vasculite sistemica necrotizzante nei nostri pazienti affetti da sclerodermia diffusa, i nostri risultati, supportati da quelli precedentemente pubblicati, suggeriscono che gli ANCA nella sclerodermia, se di tipo aMPO ed ora anche aPR3, devono indurre a sospettare una sovrapposizione con una vasculite sistemica necrotizzante. In questi casi, devono essere eseguiti gli accertamenti clinici necessari, compresa la biopsia renale. Questo permetterebbe di fare una corretta diagnosi differenziale tra rene sclerodermico, vasculite renale ed eventualmente nefropatia farmaco-indotta, e di impostare una strategia terapeutica più appropriata in questi pazienti.

RIASSUNTO

Scopo del lavoro: testare la prevalenza degli ANCA nella sclerodermia e verificare una possibile associazione con l'impegno renale normotensivo.

Pazienti e metodi: gli ANCA sono stati cercati in 51 pazienti affetti da ScS con diverse metodiche (IFI, ELISA e capture ELISA).

Risultati: gli ANCA sono stati trovati in 6 pazienti (anti-PR3), tutti affetti da forma diffusa con positività degli aScl70, con impegno renale normotensivo e valori normali di reninemia.

Conclusioni: gli aPR3 non sono rari nella ScS e la loro presenza potrebbe indicare una sovrapposizione tra sclerodermia e vasculite necrotizzante.

BIBLIOGRAFIA

1. Furst D.E, Clements P.J: Hypothesis for the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997; 24:53-7.
2. Smith EA, LeRoy EC: Systemic sclerosis: etiology and pathogenesis. In: Klippel JH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology*. London: Mosby-Year Book Europe, 1994: 7.10.1-10.
3. Jennette JC: Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: A pathologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:164-70.
4. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, et al: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; i: 425-9.
5. Jennings JG, Chang L, Savage JA: Anti-proteinase 3 antibodies, their characterization and disease association. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 251-6.
6. Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651-7.
7. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD et al: Association of autoantibodies to myeloperoxidase with different form of vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1264-72.
8. Saxon A, Shanahan F, Landers C et al: A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 202-10.
9. Savage JA, Gallicchio MC, Stockman A, et al: Antineutrophil cytoplasm antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 92-8.
10. Afeltra A, Sebastiani GD, Galeazzi M, et al: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in synovial fluid and in serum of patients with rheumatoid arthritis and other types of synovitis. *J Rheumatol* 1996; 23:10-5.
11. Nassberger L, Sjöholm AG, Jonsson H, et al: Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 380-3.
12. Sinico RA, Pozzi C, Radice A, Tincani A: ANCA with specificity for lactoferrin in systemic lupus erythematosus. In Gross WL, ed. *Advances in experimental Medicine and Biology*. Abstract Book of the fourth International Workshop on ANCA. London, UK, Plenum 1992: 32.
13. Galeazzi M, Morozzi G, Sebastiani GD, et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in 566 european patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies. *Clin Exp Rheum* 1998; 19: 541-6.
14. Juby A, Johnston C, Davis P, Russelli AS. Antinuclear and antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in the sera of patients with Felty's syndrome. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 185-8.
15. Rider LG, Wener MH, French J, Sherry DD, Mendelman PM: Autoantibody production in Kawasaki syndrome. *Clin Exp Rheum* 1993; 11: 445-9.
16. Klaassen RJ, Goldschmeding R, Dolman KM, et al: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 24-30.
17. Magen EC, Ballieux BFPB, Vanes LA, Daha MR, van der Woude: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: a review of the antigens, the assays and the clinical and possible pathogenetic consequences. *Blood* 1993; 81: 1996-2002.
18. Endo H, Hosono T, Kondo H: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in 6 patients with renal failure and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994; 21: 864-70.
19. Kiraz S, Simsek H, Ertenli I, Benekli M, Kadayifci A, Calguneri M: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic sclerosis. *Clin Rheum* 1996; 15: 519-23
20. Akimoto S, Ishikawa O, Tamura T, Miyachi Y: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 1996; 134: 407-10.
21. Locke IC, Worrall JG, Leaker B, Black CM, Cambridge G: Autoantibodies to myeloperoxidase in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997; 24: 86-9.
22. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-3.
23. Medsger TA jr and Steen VD, "Classification, prognosis", Clement PJ and Furst DE, eds. *Systemic Sclerosis*. Maryland: Williams and Wilkins; 1996; 57-64
24. Renzoni E, Rottoli P, Coviello G, Perari MG, Galeazzi M, Vagliasindi M: Clinical, laboratory and radiological findings in pulmonary fibrosis with and without connective tissue disease. *Clin Rheumatol* 1997; 16: 570-7.
25. Wiik A: Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1988; 97:(6), 12-3.

26. Vidrich A, Lee J, James E et al: Segregation of P-ANCA antigenic recognition by DNase treatment of neutrophils: ulcerative colitis, type I auto-immune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *J Clin Immunol* 1995; 15:293-8.
27. Sinico RA, Tadros M, Radice A et al: Lack of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Henoch-Schonlein purpura and IgA nephropathy. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;73: 19-26.
28. Westam KWA, Selga D, Bygren P et al: Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int* 1998; 53: 1230-6.
29. Villaverde V, Balsa A, Cabezas JA, Fernandez-Prada M, Torre A, Mola EM: Normotensive renal failure in a patient with systemic sclerosis and p-anti neutrophil cytoplasmic autoantibodies which developed into Paget's disease of bone after immunosuppressive therapy. *Rheumatology (Oxford)* 1999 Feb; 38(2):190-1.
30. Anders HJ, Wiebecke B, Haedecke C, Sanden S, Combe C, Schlondorff D: MPO-ANCA-positive crescentic glomerulonephritis: a distinct entity of scleroderma renal disease? *Am J Kidney Dis* 1999; 33(4): e3.