

ANCA (anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo) POR INMUNOFLORESCENCIA EN LA COLITIS ULCEROSA

Lics. Federico Moscardi, Jose Luis Ianiro

ABSTRACT

ANCA, an antibody against the neutrophil cytoplasm, is associated with inflammatory bowel diseases (IBD) as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), besides the well known relation with Wegener's disease and other vasculitis. They are immunological markers with potential clinical utility, however their relation with the diagnosis, activity, extension and chronicity of the IBD is still controversial.

UC as a disease is probably heterogenous, and it is influenced by genetic and ambiental factors. ANCA is affected by the methodology used in their detection. The finding in our patients with UC of C-ANCA instead of P-ANCA, as it is described in the literature, was the motive for the study of the prevalence of this antibody in this disease.

32 patients were studied, 16 female, with the only requisite of a biopsy diagnostic of UC, and a 88 regular follow up in the clinics. ANCA was detected by immunofluorescence, in at least one sample per patient, registering the P, C and A (atypical) ANCA frequency and titles. Other antibodies were also investigated on murine tissues and HEp 2 cells, which can be associated to ANCA in IBD. ANCA positive sera were evaluated according the distribution of the patterns, age of the patients, activity and chronicity of the disease. As a result 28% (9/32) of the patients were ANCA positive; 4 C-ANCA, 3 A-ANCA and 2 P-ANCA in titles 1/20 to 1/40. The probable causes of these results are discussed. No evidence, as age affecting the expression of ANCA or the relation between ANCA and the chronicity of the disease, was found.

We considered two definitions of activity for UC: a) «In strict sense» when the clinical manifestations were simultaneous with the determination of ANCA; b) «wide sense» when clinical or pathological diagnosis was done 60 days before or after the ANCA determination.

A positive ANCA showed association with UC in the wide sense ($p = 0.0003$) and showing 67% of sensitivity, 95% specificity, 89% predictive value of a positive test and 83% of a negative test. This was unrelated to the immunofluorescence pattern. Other antibodies studied were not associated to UC in a significative form.

RESUMEN

Ante el hallazgo en algunos pacientes de colitis ulcerosa (CU) de C-ANCA en lugar del P-ANCA generalmente descripto en la literatura, este trabajo se propuso precisar las formas de

presentación del autoanticuerpo por inmunofluorescencia, en patrón y título, en relación al diagnóstico y la actividad de esa enfermedad en los pacientes de nuestro hospital.

Se estudiaron 32 pacientes, 16 mujeres, con el solo requisito de tener biopsia positiva para CU y seguimiento clínico continuo asentado en historia clínica (HC), y se determinó ANCA por inmunofluorescencia en, por lo menos, una muestra por paciente, registrando la frecuencia y títulos de P, A y C-ANCA.

También se investigaron otros autoanticuerpos detectables sobre tejidos murinos y células HEp 2, que pueden asociarse a ANCA en las enfermedades inflamatorias intestinales.

Los resultados de ANCA se evaluaron en relación a la distribución de patrones y títulos, a la edad de los pacientes y a la antigüedad y actividad de la enfermedad. Se obtuvo 28% de ANCA positivos (9 de 32 pacientes), 4 C-ANCA, 3 A-ANCA y 2 P-ANCA, con títulos de 1/20 a 1/40, discutiéndose las causas probables de estos resultados. No hubo evidencia de que la edad afectase la expresión de ANCA, ni relación del autoanticuerpo con la duración de la enfermedad.

Se consideraron dos definiciones de actividad de la CU: en sentido estricto cuando hubo manifestaciones clínicas simultáneas con el estudio de ANCA, y en sentido amplio cuando la actividad clínica o histológica se registró dentro de los 60 días anteriores o posteriores a la determinación del autoanticuerpo. ANCA, independientemente del patrón que tuviera, mostró asociación con la actividad de la CU, considerada en sentido amplio ($p = 0.0003$), resultando la sensibilidad 67%, la especificidad 95%, los valores predictivos del resultado positivo 89% y del resultado negativo 83%.

Los otros autoanticuerpos investigados resultaron no asociados significativamente a la CU, activa o no.

INTRODUCCIÓN

El autoanticuerpo contra el citoplasma del neutrófilo (ANCA), que se asocia a las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC)^{1,2}, es un marcador inmunológico con utilidad clínica, aunque en su relación con el diagnóstico, la actividad, la extensión y la antigüedad de la enfermedad existen controversias^{1,3-6}.

Como las enfermedades con componentes autoinmunes como la CU sufren influencia étnica, genética y ambiental, habiendo detectado en nuestros pacientes mayor frecuencia de la esperada de C-ANCA (patrón citoplasmático), en lugar del generalmente asociado P-ANCA^{1,7} (patrón perinuclear) y dada la influencia que las variaciones metodológicas de la inmunofluorescencia (IF) tienen sobre la interpretación

de los resultados, investigamos la relación entre ANCA y CU en nuestro hospital.

Se estudió un grupo de pacientes con biopsia positiva para CU y con seguimiento continuo en historia clínica (HC), estableciendo la frecuencia de los distintos patrones de ANCA y relacionando retrospectivamente el resultado del análisis con la edad del paciente y la actividad y antigüedad de la enfermedad según dichos registros clínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos del estudio: pacientes que tuvieran biopsia positiva de CU. Todos nuestros pacientes tienen historia clínica única. No hubo otro requisito para participar del estudio.

Muestras: 50 sueros, por lo menos una muestra por paciente, mantenido a -20° C hasta el momento de la investigación de ANCA.

ANCA: se determinó por IF, con técnica convencional⁹. Brevemente: el suero del paciente se diluyó 1/20 con *buffer* PBS y se incubó 30' a temperatura ambiente en cámara húmeda sobre improntas de neutrófilos humanos fijados con etanol. Posteriormente se hicieron 2 lavados de 5' y la impronta volvió a incubarse otros 30' con antiglobulina humana marcada con fluoresceína (marca Kallestadt, dilución 1/100). Se hicieron otros dos lavados de 5' y finalmente se montaron los preparados y observaron por epiluminación con 400X en microscopio de fluorescencia Leitz Jena. Las muestras que mostraron fluorescencia según un patrón en relación a los sueros negativos ensayados en paralelo se definieron convencionalmente como:

P-ANCA: fluorescencia perinuclear, eventualmente con engrosamientos, que no se proyecta al citoplasma.

A-ANCA: ANCA atípico. Fluorescencia perinuclear más irregular que la de P-ANCA, con imprecisa definición de los lóbulos. Ocasionalmente el mismo suero en distintos preparados semeja P-ANCA o C-ANCA.

C-ANCA: Fluorescencia citoplasmática punteada, más densa en el centro.

Todas las muestras que dieron patrones compatibles con ANCA fueron confirmadas sobre neutrófilos fijados con formol, según técnica convencional.

Las improntas empleadas fueron comerciales (INOVA o *The Binding Site*) o propias, de sensibilidad comparable con aquellas según pruebas previas, preparadas con el método de Falk y Jeannette⁹.

Habiéndose descrito otros autoanticuerpos en esta enfermedad (anticélulas caliciformes, anticitoesqueleto, antinucleares)^{8,10} que pueden superponerse con ANCA, todos los sueros obtenidos fueron también ensayados para su detección por IF en dilución 1/20 sobre cortes de hígado, riñón y estómago de rata y en dilución 1/40 sobre células *HEp2* con técnica convencional.

Criterios de actividad de la enfermedad

Para este estudio retrospectivo se hicieron dos defi-

niciones de actividad :

1) En **sentido estricto**, cuando hay en la HC registro de actividad clínica de la CU simultánea con la determinación de ANCA.

2) En **sentido amplio**, cuando la actividad clínica o histológica se registró hasta 60 días antes o después de la investigación del autoanticuerpo.

Métodos estadísticos

La relación entre ANCA positivo, la actividad y la antigüedad de la enfermedad, se estudió mediante tablas de doble entrada, determinándose el valor *p* de los *chi* cuadrados con el método exacto de Fisher adecuado cuando se incluyen *n* menores de 5.

RESULTADOS

Fueron 16 hombres y 16 mujeres, con edades de 24 a 89 años (promedio 59,3 años, mediana 58,5). La antigüedad del diagnóstico fue desde un mes a 40 años (promedio 7,7 años). Tres de los pacientes tomaron corticoides por períodos variables dentro de los dos meses anteriores y posteriores a la determinación de ANCA.

De 32 pacientes, 9 (6 mujeres y 3 hombres) resultaron ANCA positivos ($9 / 32 = 28\%$) (tabla 1).

Patrones y títulos

Se obtuvieron los siguientes patrones: 4 C-ANCA, 3 A-ANCA y 2 P-ANCA.

Cuatro sueros de distintos patrones tuvieron título 1/40 y los otros cinco sólo alcanzaron el título mínimo para ser considerados positivos: 1/20

ANCA y actividad de la enfermedad

De los 9 pacientes ANCA+, 5 ($5 / 9 = 55,5\%$) mostraron actividad clínica de la enfermedad en un período que comprende el día en que ese anticuerpo era positivo (actividad en sentido estricto). Si, en cambio, se considera la actividad en sentido amplio cuando hay registro de ella, no simultáneo pero si dentro de los 60 días anteriores o posteriores a la positividad de ANCA, quedan incluidos 8/9 pacientes (88,8%).

De los tres pacientes con actividad en sentido amplio que se suman, el número 1 la mostró clínicamente dentro de los 60 días siguientes al ANCA+ y los números 3 (biopsia) y 18 (clínica), en los 60 días anteriores al anticuerpo positivo.

Cuatro personas resultaron con la enfermedad activa siendo ANCA negativos; dos con «manifestaciones leves» clínicas en sentido estricto y dos con actividad en sentido amplio, una clínica y otra histológica.

Los otros 19 pacientes del grupo ANCA negativo no mostraron actividad de la enfermedad con ningún criterio según sus HC.

Ningún paciente tuvo diagnóstico agregado de alguna otra enfermedad que sea conocida como asociada a ANCA.

Según la definición amplia de actividad de la enfer-

Tabla 1. Pacientes, ANCA y actividad de la enfermedad.

Paciente	Sexo	Edad	ANCA	Actividad en estricto	Actividad en sentido amplio
No. 1	Femenino	49	A-ANCA 1/20	(-)	(+) clínica
No. 2	Femenino	75	(-)	(-)	(-)
No. 3	Masculino	46	C-ANCA 1/20	(-)	(+) biopsia
No. 4	Masculino	25	(-)	(-)	(-)
No. 5	Femenino	57	C-ANCA 1/20	(+)	(-)
No. 6	Femenino	42	(-)	(-)	(-)
No. 7	Femenino	88	P-ANCA 1/80	(+)	(-)
No. 8	Femenino	55	(-)	(-)	(-)
No. 9	Femenino	84	(-)	(-)	(-)
No. 10	Masculino	72	(-)	(-)	(-)
No. 11	Masculino	81	(-)	(-)	(-)
No. 12	Masculino	55	(-)	(-)	(-)
No. 13	Masculino	55	(-)	(-)	(-)
No. 14	Femenino	72	(-)	(-)	(-)
No. 15	Masculino	40	(-)	(-)	(-)
No. 16	Masculino	45	(-)	(-)	(-)
No. 17	Femenino	25	(-)	(-)	(-)
No. 18	Femenino	48	A-ANCA 1/20	(-)	(+) clínica
No. 19	Masculino	39	(-)	(-)	(-)
No. 20	Masculino	40	C-ANCA 1/40	(+)	(-)
No. 21	Femenino	55	(-)	(-)	(-)
No. 22	Masculino	82	(-)	(+)	(-)
No. 23	Femenino	31	C-ANCA 1/20	(+)	(-)
No. 24	Masculino	55	(-)	(-)	(+) biopsia
No. 25	Masculino	54	A-ANCA 1/20	(+)	(-)
No. 26	Femenino	52	(-)	(-)	(-)
No. 27	Femenino	38	(-)	(-)	(-)
No. 28	Femenino	70	(-)	(-)	(+) biopsia
No. 29	Femenino	39	P-ANCA 1/20	(-)	(-)
No. 30	Masculino	48	(-)	(-)	(-)
No. 31	Masculino	79	(-)	(-)	(-)
No. 32	Masculino	69	(-)	(+)	(-)

medad, un ANCA positivo, independientemente del patrón, se asocia significativamente ($p=0,0003$) con la actividad de la CU (tabla 2).

La sensibilidad resulta 67% y la especificidad 95%. El valor predictivo de un resultado positivo es 89% y de un resultado negativo 83%.

La asociación entre ANCA positivo y actividad de la enfermedad en sentido estricto resulta no significativa.

ANCA, edad y antigüedad de la enfermedad

La edad promedio del grupo ANCA positivo es 56 años y la del negativo es 60 años.

Los pacientes ANCA positivo distribuyen sus edades en todo el rango etario, 4 por encima y 5 por debajo del promedio.

Representando gráficamente agrupados en dos ejes verticales los casos ANCA+ y ANCA- en relación al tiempo transcurrido en años desde la fecha de diagnóstico, se observa una acumulación relativa de casos ANCA negativos en el primer año, pero la misma resulta no significativa (tabla 3).

Colitis ulcerosa y otros autoanticuerpos

Ocho (25%) de los pacientes estudiados fueron positivos para otros autoanticuerpos. De ellos, seis lo fueron para anticélula parietal (ACP), con uno de ellos también positivo para antimúsculo liso (AML). Los otros dos resultaron positivos para anticuerpos antinucleares. De los nueve pacientes ANCA+, dos tam-

Tabla 2. ANCA y actividad en sentido amplio de la colitis ulcerativa.

	Colitis ulcerosa		total
	activa	no activa	
ANCA+	8	1	9
ANCA-	4	19	23
TOTAL	12	20	32

ANCA+ se asocia significativamente ($p=0,0003$) con la actividad en sentido amplio de la CU.

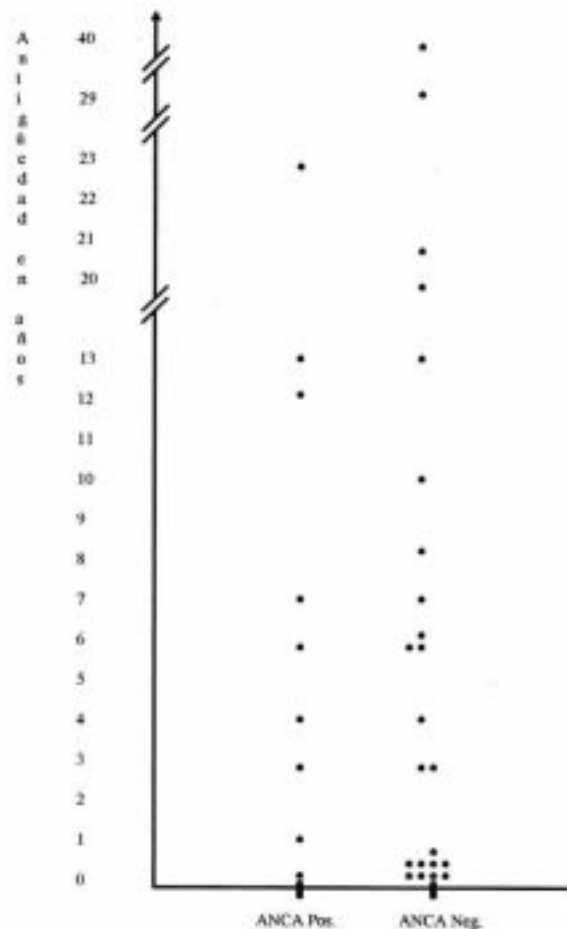
bién lo fueron para ACP, uno de ellos además para AML, con el título mas alto en este estudio, 1/100. Este paciente ya tuvo antecedentes de C-ANCA+ con actividad simultánea de la enfermedad y fue el único positivo para proteínas del citoesqueleto, que se detecta en células HEp 2 y ha sido asociado a CU¹⁰.

En conjunto estos autoanticuerpos resultaron no asociados a la enfermedad ni a su actividad (sólo lo fueron 3 de 9).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las enfermedades inflamatorias intestinales comprometen un área crítica en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Con los alimentos llega al in-

Tabla 3. Determinación de ANCA en relación a la antigüedad del diagnóstico de CU.



testino una enorme cantidad de potenciales antígenos que sin embargo normalmente no originan respuestas inmunes debido a la existencia de sistemas efectores y reguladores, que con la colaboración de la flora normal, las secreciones y los movimientos intestinales las impiden. La ruptura de la homeostasis en la enfermedad ha sido asociada a la aparición de complejos inmunes, citotoxicidad contra antígenos colónicos, autoanticuerpos, modificaciones de las poblaciones linfoides y otras alteraciones⁸. Lo relativamente errático de estas manifestaciones limita su interés clínico.

Los ANCAs pueden ser los primeros marcadores inmunológicos con utilidad clínica en esta enfermedad.

La identificación de estas moléculas puede hacerse con la metodología ELISA, aunque con limitaciones para los antígenos que, como puede ocurrir en la CU, no sean proteinasa 3 (Pro 3) ni mieloperoxidasa (MPO). El presente trabajo se propuso determinar la manifestación de la CU como ANCA sólo mediante IF.

Este autoanticuerpo se detecta sobre neutrófilos humanos fijados. Según que el patrón de fluorescencia que se observa sea citoplasmático o perinuclear, será C-ANCA o P-ANCA. Un patrón parecido al P, pero más difuso, ha sido llamado A-ANCA (ANCA atípico). Los antígenos detectados por estos anticuerpos están en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos. De ellos, la Pro 3 da el patrón C-ANCA y la MPO, lactoferrina, elastasa, cathepsina G y lisozima generalmente determinan el patrón P-ANCA¹¹. Un antígeno de descripción más reciente, el *Bactericidal permeability increasing protein* (BPI), constituyente de los gránulos primarios de los neutrófilos y potente antibiótico natural, puede también originar el patrón C-ANCA^{12,13}.

Los C-ANCA (Pro 3) sobre todo y algunos P-ANCA, en particular MPO, se asocian a vasculitis sistémica. Las enfermedades más relacionadas a C-ANCA son la granulomatosis de Wegener⁹, la poliarteritis microscópica y el síndrome de Churg Strauss, pero hay referencias vinculando ese patrón a otras enfermedades, incluido el 97% de los abscesos hepáticos por *Entamoeba histolytica*, que también causa vasculitis del colon¹¹.

Patrones, títulos y frecuencia

En el presente estudio encontramos los tres patrones de ANCA, con mayor proporción de C-ANCA, que resulta significativa a pesar del número no grande de muestras. Los títulos fueron bajos, en consonancia con lo informado por otros, pero siempre iguales o mayores a 1/20 para descartar falsos positivos. En las enfermedades vasculíticas los títulos son generalmente 10 y 20 veces mayores.

La literatura relaciona las EII con los patrones P-ANCA y A-ANCA^{1,7,14} con pocas citas de C-ANCA^{15,16}. La discrepancia aumenta cuando se trata de otros aspectos de la CU, enfermedad que se reconoce como heterogénea, con posibles subtipos, distintas causas^{3,17} y asociación con HLA¹⁸. Es posible que esos desacuerdos

se relacionen con la influencia étnica y ambiental que es común en las enfermedades con componentes autoinmunes. La gran mayoría de los estudios sobre las EII provienen del norte de América y del norte y centro de Europa. Algunas citas de C-ANCA en EII proviene de otras zonas geográficas^{19,26}.

En un trabajo sobre CU se ha informado que los sueros BPI positivos, por lo tanto posibles C-ANCA (el estudio no investiga los patrones), se asocian a la enfermedad cuando está activa⁵.

Una variable importante en la determinación de ANCA por IF es la dilución del suero que se estudia. Cuando se ensayan muestras poco diluidas, menores de 1/20, los patrones se hacen de difícil definición y se pueden generar artificios que parecen resultados positivos. El *EEC/BCR Group for ANCA Assay Standardization*, en un estudio internacional para estandarizar la detección de ANCA sólo encontró reproducibles los resultados de los sueros con títulos altos²⁰. La obra de referencia para métodos de laboratorio de inmunología clínica establece una dilución de partida de los sueros de 1/20²¹. Títulos como 1/10 o menores deberían considerarse «falsos positivos». Esa es nuestra experiencia personal. Atribuimos, por ejemplo, la frecuencia inusualmente alta de este anticuerpo que un estudio informó en pacientes en diálisis, a considerar positivos títulos muy bajos, como fuera comunicado por uno de nosotros²².

El presente estudio en contró una frecuencia de ANCA en CU de 28%, lo que está en el límite inferior del rango descripto en la literatura, que llega hasta el 85%²⁴. También en este caso atribuimos una parte de esas frecuencias altas a considerar positivos sueros en diluciones muy bajas. Eso también puede explicar los informes que asocian la actividad de la CU a ANCA+, sólo en títulos «altos», como uno que incluye casi un 50% de muestras con título 1/10²³ ANCA y actividad de la CU.

Como ya se expuso, en el contexto de nuestra definición de actividad de la enfermedad según que haya registro o no de la misma en la HC dentro de los 60 días de la determinación de ANCA (con la limitación de la posible exclusión de activaciones histológicas no investigadas por ser subclínicas) la presencia del autoanticuerpo, independientemente del patrón, se asocia significativamente a la actividad de la CU.

Los valores predictivos de los resultados positivo y negativo (89 y 83% respectivamente) significan el primero la probabilidad de que un ANCA+ corresponda a una activación habida o a haber dentro de los 60 días, y el segundo la no actividad en el mismo plazo.

ANCA y edad

La edad promedio de los pacientes de este estudio, 59,3 años, es mayor que la de otros trabajos similares, debido a que nuestra población hospitalaria incluye un alto porcentaje de ancianos.

Las edades de los pacientes ANCA+ se distribuyen en todo el rango etario del grupo, 5 por debajo y 4 por

encima de la edad promedio, lo que sugiere que la misma no afecta significativamente la presentación del anticuerpo. Por otra parte, en un trabajo hecho en ancianos, no encontramos que la desregulación inmunológica que se asocia al envejecer, determinara la presencia de ANCA en ausencia de patología²⁴.

Otras variables

No encontramos relación entre la positividad de ANCA y la antigüedad del diagnóstico de CU.

Con respecto a la variable medicamentosa sólo tres de los pacientes, los número 19, 20 y 31 (un ANCA+ con actividad de la enfermedad y dos ANCA- , inactivos) tomaron corticoides por períodos variables dentro de los dos meses anteriores o posteriores a la determinación de ANCA.

Otros autoanticuerpos

La investigación de los otros autoanticuerpos analizados no mostró asociación significativa con la enfermedad ni con su actividad, cosa que es compatible con la característica de epifenómeno que los mismos tienen con frecuencia, a diferencia de ANCA que sugiere participación en la patogenia.

En conclusión, ANCA positivo por inmunofluorescencia, con título igual o mayor de 1/20, independientemente del patrón observado, se asocia significativamente a la actividad de la colitis ulcerosa dentro de los 60 días anteriores o posteriores a su determinación.

BIBLIOGRAFIA

1. Bradwell A, Stokes R, Johnson G. Atlas of autoantibody patterns on tissue. *The Binding Site*. Birmingham 1997;94-100
2. Saxon A, Shanahan F, Landers C, et al. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:202-10
3. Rutgeers P, Vermeine S. Serological diagnosis of inflammatory bowel diseases. *Lancet* 2000;356:2117
4. Abad E, Tural C, Mirapeix E, et al. Relationship between antineutrophil cytoplasmic antibodies and clinical activity in inflammatory bowel diseases: variations in prevalence of ANCA and evidence of heterogeneity. *J Autoimmun* 1997;10(2):175-80
5. Roozendaal C, Pogany K, Horst G, et al. Does analysis of the antigenic specificities of antineutrophil cytoplasmic antibodies contribute to their clinical significance in the inflammatory bowel diseases? *Scand J Gastroenterol* 1999;34(11):1123-31
6. Kull K, Salupere R, Vibo R, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in estonian patients with inflammatory bowel diseases. *Prevalence and diagnostic role*. *Hepatogastroenterology* 1998;45(24):2132-7
7. Freeman H, Roeck B, Devine D, et al. Prospective evaluation of neutrophil autoantibodies in 500 consecutive patients with inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol* 1997;11(3):203-7
8. James S, Strober W, Greespan J. Gastrointestinal, hepatobiliary, oral & dental diseases. In: *Basic and clinical immunology*. Stites and Terr. Appleton and Lange 1991, Norwalk
9. van de Woude F, Rasmussen N, Lobatto S. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;1:425-9
10. Biancone L, Monteleone G, Marasco R, et al. Autoimmunity to tropomyosin isoforms in ulcerative colitis (UC) patients and unaffected relatives. *Clin Exp Immunol* 1998;113(2):198-205
11. Schultz D, Tozman E. Antineutrophil cytoplasmic anti bodies: major antigens, pathophysiology and diseases associations. *Sem Arthritis Rheum* 1995;25(3):143-59
12. Schnabel A, Csernak E, Schultz H, et al. BPI protein (BPI ANCA) marked chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary diseases. *Med Klin* 1997;92(7):389-93
13. Sediva A, Kolarova I, Bartunkova J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in children. *Eur Pediatr* 1998;157(12):987-91
14. Arturi A, Marcos J, Babini J. Laboratorio en Reumatología. Universidad Nacional de La Plata 2001:46-47
15. García Herola A, Nos P, Hoyos M, et al. Significado de la determinación de anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo en colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol* 1998;4:169-73
16. Segelmark M, Baslund B, Wieslander J. Some patients with anti MPO autoantibodies have a c-ANCA pattern. *Clin Exp Immunol* 1994;96:458-65
17. Satsangi J, Landers C, Welsh K, Koss K et al. The presence of antineutrophil cytoplasmic antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within Inflammatory Bowel Diseases. *Inflam Bowel Dis* 1998;4(1):18-26
18. Yang H, Rotter J, Toyoda H, et al. Ulcerative colitis a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical ANCA markers. *J Clin Invest* 1993;92:1080-4
19. Sung J, Chan K, Hsu R, et al. Ulcerative colitis and ANCA in Hong Kong Chinese. *Am J Gastroenterol* 1993;88:864-9
20. EEC/BCR Group for ANCA Assay Standardization. The value of indirect immunofluorescent and solid phase techniques for ANCA detection. *J Immunol Methods* 1993;159:1-16
21. Wiik A. Anticytoplasmic neutrophil antibodies. In: Rose N, Macario E, Folds J, Clifford H, Nakamura R. (eds) *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 5th edition Washington. American Society for Microbiology 1997;954-9
22. Moscardi F. Metodología para la determinación de ANCA (carta al Editor) *Transplantes* 1997;3(1)
23. Seibold F, Weber P, Klein R, et al. Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel diseases and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1992;33:657
24. Moscardi F, Ianiro J, Maxit M. Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) en ancianos. *Medicina* 1997;51:36-40
26. Li P, Leung J, Lai F. Use of antineutrophil cytoplasmic antibodies in diagnostic in a chinese population. *Am J Nephrol* 1994;14(2):99-105