

Proprietà diagnostiche del dosaggio degli Anticorpi Antifilaggrina (Anticorpi anticheratina e Anti-peptide citrullinato ciclico) nell'Artrite Reumatoide

Diagnostic value of Antiflaggrine Antibodies (Antibodies to cyclic citrullinated peptide and anti-keratin Antibodies) for Rheumatoid Arthritis

Summary

Objective: The aim of the study is to verify the diagnostic value of antibodies to cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and anti-keratin antibodies (AKA), alone and in combination, in patients with rheumatoid arthritis (RA) and early rheumatoid arthritis (ERA). **Methods:** A retrospective study was performed in 100 patients with established RA and 100 controls to validate sensitivity, specificity and positive predictive value (PPV) for RA of the Anti-CCP and AKA assays in our Unit. **Results:** Anti-CCP demonstrated high sensitivity (70%) and specificity (97%) for the diagnosis of RA and similar accuracy for the diagnosis of ERA. The sensitivity and the specificity of AKA were respectively 52% and 99%. **Conclusion:** We concluded that anti-CCP is a very valuable tool for the diagnosis of RA and ERA.

Erre GL, Tocco A, Longu MG, et al. Diagnostic value of Antiflaggrine Antibodies (Antibodies to cyclic citrullinated peptide and anti-keratin Antibodies) for Rheumatoid Arthritis. *Trends Med* 2006; 6(2):105-110.

© 2006 Pharma Project Group srl

Gian Luca Erre, *Andreina Tocco, Maria Giovanna Longu, Patrizia Fenu, *Marcella Sanna, *Rossana Faedda, Aldo Carcassi.

Cattedra e Scuola di Specializzazione di Reumatologia,
*Istituto di Patologia Speciale Medica e Metodologia Clinica -
Università degli Studi di Sassari

Key words:
rheumatoid arthritis
antibodies to cyclic citrullinated peptide
anti-keratin antibodies



Gian Luca Erre

Cattedra e Scuola di Specializzazione di Reumatologia
V.le San Pietro n° 8, IV piano
07100 Sassari
Tel. 079/228446, 079/228447 - Fax 079/216282
e-mail: e.gianluca@libero.it

Introduzione

Ancora oggi l'AR viene diagnosticata principalmente sulla base delle manifestazioni cliniche e l'impiego dei test sierologici è ampiamente limitato alla ricerca del FR. Quest'ultimo, pur avendo un'elevata sensibilità (75%-80%), possiede una bassa specificità, risultando positivo in numerose altre condizioni patologiche oltre che, in una certa percentuale, anche nella popolazione anziana sana.

È noto da molto tempo che i sieri dei pazienti con AR reagiscono in maniera specifica contro la filaggrina contenuta nelle cellule dell'epitelio buccale (APF) umano¹ e dell'epitelio dell'esofago di ratto (AKA)². Questi autoanticorpi, identificabili mediante tecniche di immunofluorescenza indiretta (IIF), non sono mai diventati parte della diagnostica laboratoristica routinaria a causa della difficoltà nel reperire e conservare il substrato antigenico e della importante variabilità nell'interpretazione dei pattern fluoroscopici.

La recente sintesi di peptidi contenenti residui di citrullina ha permesso di sviluppare un test in fase solida³ che offre maggiore maneggevolezza e standardizzazione.

Obiettivi

Lo studio, di tipo retrospettivo, intende valutare sensibilità e specificità relative per la diagnosi di AR, del dosaggio di Anti-CCP, AKA e FR.

Materiali e Metodi

I sieri di 100 pazienti con diagnosi di AR, in accordo con i criteri dell'ACR⁴ (American College of Rheumatology) del 1987, afferenti all'Istituto di Patologia Medica negli anni compresi tra il 1990 e il 2002 sono stati raccolti, aliquotati in campioni di 1 ml e conservati a -20°C. Ventisei pazienti (26%) sono stati classificati come affetti da AR di recente insorgenza (ERA), in quanto il periodo di tempo compreso tra l'esordio della sintomatologia e il momento della raccolta del campione non superava i 12 mesi. In questo gruppo è stata fatta un'ulteriore suddivisione sulla base della modalità di presentazione della malattia. A seconda del numero delle articolazioni interessate all'esordio, i pazienti affetti da ERA sono stati suddivisi in soggetti con Mono, Oligo e Poliartrite. Per fornire i dati sulla sensibilità e specificità dei test, è stata selezionata una popolazione di controllo, costituita da 50 pazienti affetti da altre patologie reumatiche (20 Entesoartriti, 8 LES, 6 Sclerodermie, 5 Artrosi, 4 Vasculiti, 4 M. di Still dell'adulto, 2 Paget osseo) e 50 soggetti sani. Le caratteristiche demografiche dei pazienti con AR e della popolazione di controllo sono sintetizzate nella tabella 1.

La prevalenza stimata delle AR nella nostra popolazione di riferimento (ovvero la probabilità pre-test della AR nei pazienti con Artrite di recente insorgenza che afferiscono al Nostro Centro) è stata valutata nella misura del 25%.

Gli AKA sono stati determinati, secondo quanto descritto da Young *et al.*, con metodica in IIF utilizzando come substrato l'esofago di ratto. I campioni di siero sono stati diluiti con un rapporto di

1:10. Per la metodica è stato impiegato un Kit commerciale (Anti-Keratin Antibody System, Scimedex Corporation, Denville, New Jersey), seguendo le istruzioni in dettaglio. I vetrini sono stati letti in cieco rispetto alla diagnosi e i risultati dubbi sono stati rivalutati. Sono stati considerati positivi solo i vetrini con una fluorescenza laminare dello strato corneo, mentre quelli che esibivano una colorazione a tutto spessore dell'epitelio sono stati considerati negativi.

I sieri sono stati testati per gli Anticorpi Anti-CCP utilizzando un Kit commerciale di seconda generazione (Immunoscan RA II generazione, Eurodiagnostica Harneim, Netherland), secondo le istruzioni in dettaglio. I campioni di siero sono stati diluiti con un rapporto di 1:50.

Il FR è stato dosato con metodica laser-nefelometrica ed è stato considerato positivo un valore superiore alle 40 UI.

Gli ANA sono stati testati in IIF su cellule di fegato e rene di ratto. I campioni sono stati classificati utilizzando un sistema di valutazione semi-quantitativo. Ad ogni livello di diluizione (tra 1:40 e 1:640) veniva attribuito un punteggio in relazione all'intensità della fluorescenza, compreso tra 1+ e 4+. Sono stati considerati positivi i campioni con un titolo superiore a 1:40 o pari a 1:40 con almeno un 2+ di intensità della fluorescenza.

Analisi statistica

Per l'elaborazione statistica dei dati è stato impiegato il Software SPSS versione 11.0 per Windows Statistical Package. Il test χ^2 è stato impiegato per il confronto delle positività anticorpali nei differenti gruppi di pazienti. Per il confronto degli indici degli Anti-CCP, in funzione della durata di malattia e della terapia adottata, è stato impiegato il T-test. Per il calcolo del valore ottimale di *cut-off* per gli Anti-CCP è stata tracciata la curva ROC. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$ per test a due code

Tabella 1. Caratteristiche demografiche.

	Totali	Femmine		Età	
		N	%	Mediana	Range
AR	100	80	80	48	17-72
Altre malattie reumatiche	50	40	80	46	16-75
Controlli sani	50	35	70	45	17-80

Figura 1. ROC curve Anti-CCP

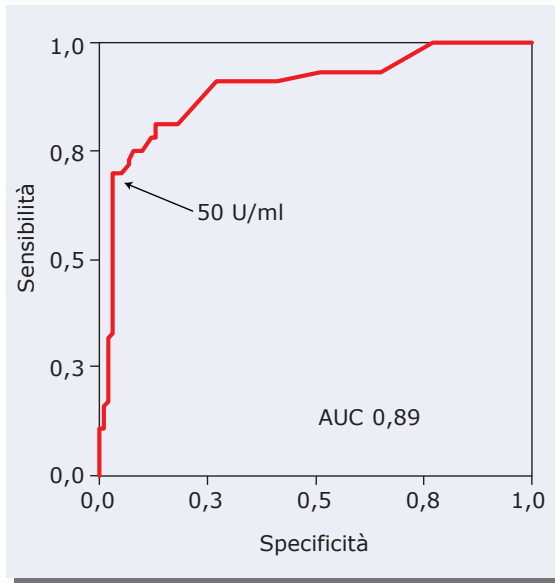
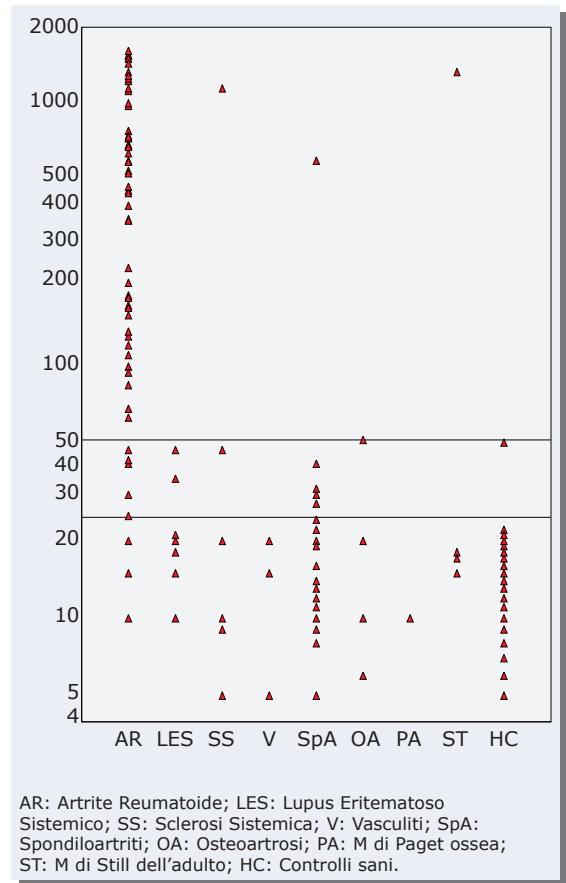


Figura 2. Distribuzione dei titoli degli Anti-CCP nella popolazione testata.



Risultati

Sensibilità e specificità di Anti-CCP e AKA

Dall'analisi della curva ROC (figura 1), tracciata sui risultati del test per la ricerca degli anticorpi Anti-CCP, abbiamo determinato come cut-off, al di sopra del quale considerare positivo il risultato del test, il valore di 50 U/ml.

A questo valore di riferimento, gli anticorpi Anti-CCP sono risultati positivi in 72 pazienti su 100 (72%) affetti da AR, mentre solo 3 su 100 dei pazienti del gruppo di controllo (3%) hanno mostrato una reazione positiva (figura 2). Nello specifico, i soggetti controllo risultati positivi agli Anti-CCP sono affetti da Sclerosi Sistemica (SS), Spondiloartrite Sieronegativa e Morbo di Still dell'adulto (MSA), con dei titoli inaspettatamente elevati (nell'ordine 1150, 600 e 1325 U/ml). I sospetti falsi positivi riferivano una sintomatologia

artritica/artralgica, ma l'esame delle radiografie delle mani e dei piedi non mostrava alterazioni scheletriche compatibili con una diagnosi di AR. Nessuno, nel gruppo dei controlli sani, ha mostrato un test positivo per gli Anti-CCP.

Al cut-off di 50 U/ml il dosaggio degli Anti-CCP ha pertanto una sensibilità del 70% e una specificità del 97%. L'analisi della curva ROC fornisce una AUC (accuratezza del test) pari a 0,89.

Tabella 2. Proprietà diagnostiche di Anti-CCP e AKA.

Test	Sensibilità	Specificità	VPP		VPN	
			p-pret 25%	p-pret 5%	p-pret 25%	p-pret 5%
Anti-CCP	70%	97%	88%	54%	90%	98%
AKA	52%	99%	94%	73%	86%	97%
AKA+Anti-CCP	51%	99%	94%	72%	90%	97%
AKA o Anti-CCP	79%	98%	92%	67%	93%	98%

Assumendo come pari a 25% la probabilità pre-test della nostra popolazione di riferimento (pazienti afferenti al Nostro Centro che svilupperanno AR) il test ha un valore predittivo positivo (VPP) dell'88% e un valore predittivo negativo del 90% (tabella 2). Gli AKA determinati con metodica qualitativa (IIF) sono risultati positivi in 52 pazienti con AR e in solo un paziente nel gruppo di controllo, con una sensibilità del 52% e una specificità del 99%. Il VPP del test, con una probabilità pre-test del 25%, è pari a 98% e il VPN pari a 67%.

La combinazione degli AKA e degli Anti-CCP ha un VPP del 92% nei pazienti che risultano positivi per uno solo dei due tests e sale al 94% quando entrambi i tests sono positivi.

Impiegato come test di screening nella popolazione generale afferente al servizio di Medicina di Base per artralgia/artrite (probabilità pre-test del 5%), il dosaggio degli Anti-CCP ha un VPP del 54% e VPN del 98%. Ovvero l'interpretazione del risultato positivo per il test porta a una stima di falsi positivi pari al 50% circa dei soggetti testati, se applicato indistintamente ad una popolazione non selezionata.

Nel totale delle AR, la positività degli Anti-CCP e degli AKA non presenta significative differenze in relazione al sesso (χ^2 1,86 $p=0,1$ e χ^2 1,6 $p=0,19$ rispettivamente) e all'età del paziente (χ^2 42 $p=0,3$ e χ^2 46 $p=0,2$ rispettivamente).

AKA e Anti-CCP nelle Early AR

La percentuale di positività degli Anti-CCP nelle Early AR è del 73%, sovrapponibile alla sensibilità mostrata dal test quando applicato alla popolazione generale dei pazienti con AR. Pertanto, nell'approccio diagnostico differenziale alle artriti ad insorgenza recente, il dosaggio degli Anti-CCP assicura comunque una discreta sensibilità nei confronti dell'AR. Inoltre, non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative ($p=0,5$) tra i valori medi dei titoli degli Anti-CCP delle forme ad esordio precoce rispetto a quelli delle forme avanzate.

Anche per quanto riguarda gli AKA, non ci sono differenze statisticamente significative nella percentuale di positività nelle forme precoci di AR rispetto a quelle evolute ($p=0,49$). Gli AKA mantengono comunque una sensibilità relativamente bassa (57%) anche nelle forme ad esordio recente, cosa che ne pregiudica l'impiego diagnostico come esame di primo livello.

Nei soggetti con AR recente è stato inoltre valutato se esistessero delle differenze nelle percen-

tuali di positività degli Anti-CCP e degli AKA in funzione della modalità di esordio. La conta delle articolazioni tumefatte e/o dolenti all'esordio rappresenta un indice del grado di aggressività della malattia ed è un fattore predittivo confermato di progressione del danno articolare. Abbiamo pertanto suddiviso il campione in AR a esordio mono (una sola articolazione tumefatta e/o dolente), oligo (fino a 3 articolazioni tumefatte e/o dolenti) e poliarticolare (oltre le tre articolazioni tumefatte e/o dolenti). Le uniche due forme ad esordio monoarticolare tra le Early AR (7%) risultavano negative sia per gli Anti-CCP che per gli AKA. Dei restanti soggetti con Early AR, 19 (73%) avevano una forma poliarticolare e i restanti 5 (20%) una forma oligoarticolare. La percentuale di positività per gli Anti-CCP non era dissimile nei due gruppi (68% nella forma poli e 80% nella forma oligoarticolare, $p=0,1$), analogamente a quanto riscontrato per gli AKA (60% circa di positività nelle forme poli come nelle forme oligo, $p=0,2$). Non erano presenti inoltre differenze significative tra le medie dei titoli degli Anti-CCP nelle forme poliarticolari rispetto a quelle oligoarticolari ($p=0,8$).

Discussione

Nei 100 pazienti con AR studiati la sensibilità dei test per gli Anti-CCP e per gli AKA è stata rispettivamente del 70 e del 52%. Per spiegare la bassa sensibilità del test in Immunofluorescenza Indiretta, bisogna sottolineare che gli Anticorpi contro la filaggrina sono diretti contro una classe abbastanza eterogenea di antigeni. Anche il test ELISA, peraltro, che comunque assicura una sensibilità accettabile del 70%, impiega come fonte antigenica un peptide che copre solo parzialmente i determinanti epitopici target degli Anticorpi. Molto elevato è invece risultato il grado di specificità sia per gli AKA (99%) che per gli Anti-CCP (97%), sottolineando come il sistema anticorpale contro la filaggrina/citrullina sia esclusivo della malattia e probabilmente svolga un ruolo determinate a livello patogenetico.

I test sono inoltre risultati assolutamente inadeguati per un impiego di *screening* nella popolazione generale con una sintomatologia non suggestiva per l'AR.

La *window of opportunity* nella gestione della AR è rappresentata dalla diagnostica precoce della malattia e da un altrettanto tempestivo approccio terapeutico. Abbiamo pertanto valutato quale sia l'accuratezza diagnostica degli Anti-CCP e degli AKA

Tabella 3. Sensibilità e specificità degli Anti-CCP e del FR nella ERA: sommario dei dati in letteratura.

Autore, anno	Durata malattia	n		Sensibilità		Specificità	
		AR	Non-AR	Anti-CCP	FR	Anti-CCP	FR
Schellekens, 2000 ³	<12 mesi	149	337	48%	54%	96%	91%
Kroot, 2000 ⁷	<12 mesi	273	ND	66%	83%	ND	ND
Golbach-Mansky, 2000 ⁸	<12 mesi	106	132	41%	66%	91%	87%
Jansen, 2002	<36 mesi	258	121	42,6%	50,4%	97,5%	93,4%
Saroux, 2003	<12 mesi	86	157	47%	45%	93%	ND
Nogueira, 2003	<12 mesi	175	177	54%	27%	ND	ND
Nell, 2003	<3 mesi	80	100	38%	46%	98,7%	97,4%
Nostrì dati	<12 mesi	26	100	73%	54%	97%	90%

ND: non disponibile

nei pazienti con AR insorta da meno di un anno. Sia gli Anti-CCP che gli AKA hanno mostrato dei valori di sensibilità (73% e 57% rispettivamente) sovrapponibili a quelli ottenuti nel totale delle AR, dimostrando, in accordo con quanto descritto da altri Autori, che gli Anticorpi del sistema filaggrina/citrullina si positivizzano fin dalle fasi iniziali della malattia e si mantengono tali anche nelle forme avanzate.

Nel modello predittivo proposto da Visser e collaboratori⁵, dei sette criteri proposti per l'identificazione, tra le early arthritis, delle forme con tendenza persistente ed erosiva, la positività degli Anti-CCP è quello con la *odds ratio* più elevato. In realtà, riguardo alla superiorità diagnostica degli Anti-CCP sul FR, precedenti studi hanno portato a risultati discordanti. Schellekens³ e altri Autori suggeriscono che il dosaggio degli Anti-CCP sia più specifico ma meno sensibile del FR. Peraltro, le curve ROC costruite da Schellekens³ per il FR-IgM e per gli Anti-CCP appaiono simili e non mostrano le AUC calcolate.

Suzuki et al⁶ invece dimostrano chiaramente che il dosaggio degli Anti-CCP assicura una maggiore capacità diagnostica rispetto al dosaggio del solo FR-IgM. Nel suddetto studio, che ha testato oltre 500 pazienti con AR e 200 soggetti controllo, vengono infatti riportati dei valori di sensibilità e specificità degli Anti-CCP (87,6% e 88,9%) più elevati di quelli del FR (69,8% e 81,7%). L'elevata sensibilità degli Anti-CCP rilevata, rispetto ai precedenti studi, è attribuita dagli Autori al fatto di avere impiegato una metodica ELISA di seconda

generazione dotata di una maggiore sensibilità. Nel nostro lavoro, eseguito impiegando una metodica di seconda generazione, la sensibilità del test è pari al 70%, mentre quella del FR è del 75% in accordo con la maggior parte dei dati presenti in letteratura (tabella 3).

Se consideriamo le sensibilità relative degli Anti-CCP (70%), degli AKA (57%) e del FR (54%) nel gruppo delle Early AR, risulta che nel primo anno di malattia, quindi, generalmente, proprio nella fase di accertamento diagnostico, il test per gli Anti-CCP è quello con la migliore performance diagnostica.

Nel totale delle AR, gli Anti-CCP hanno mostrato una forte associazione con il FR, mentre una piccola quota di sieri è risultata positiva solo per uno dei test suddetti. I due sistemi anticorpali pertanto, benché entrambi espressione abbastanza specifica della malattia, sono il risultato di due meccanismi patogenetici differenti e non interdipendenti.

In conclusione, il dosaggio degli Anti-CCP e degli AKA si è dimostrato altamente specifico per l'AR e capace di diagnosticare la malattia anche nelle fasi iniziali. La possibilità di sfruttare le metodiche anche nelle fasi precoci dell'AR rappresenta un dato di assoluta importanza in funzione della pressante necessità di iniziare il più precocemente possibile la terapia. Il confronto dei due test, evidenziando, a parità di specificità, la maggiore sensibilità degli Anti-CCP rispetto agli AKA, indica chiaramente la superiorità diagnostica della metodica in fase solida. **T.M.**

Bibliografia

1. **Nienhuis RLF, Mandema EA.** A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The Antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23:302-305.
2. **Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, et al.** Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979; 2:97-99.
3. **Schellekens GA, Visser H, De Jong BA, et al.** The diagnostic properties of rheumatoid arthritis recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43:155-163.
4. **Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al.** The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Reum* 1988; 31:315-324.
5. **Visser H, Le Cessie S, Vos K, et al.** How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:357-365.
6. **Suzuki K, Sawada T, Murakami A, et al.** High diagnostic performance of Elisa detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003; 32:197-204.
7. **Kroot EJ, De Jong BA, Van Leeuwen MA, et al.** The prognostic value of anti-cyclic citrullinate peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1831-1835.
8. **Goldbach-Mansky R, Lee J, Hoxworth J, et al.** Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2:236-243.