

# Αντισώματα έναντι του κυκλικού κίτρουλλινιωμένου πεπτιδίου σε Ελληνες ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Ι. ΑΛΕΞΙΟΥ<sup>1</sup>  
Κ. ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ<sup>2</sup>  
Α. ΖΙΩΓΑΣ<sup>1</sup>  
Α. ΚΟΥΤΡΟΥΜΠΑΣ<sup>1</sup>  
Α. ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ<sup>1</sup>  
Α. ΓΕΡΜΕΝΗΣ<sup>2</sup>  
Λ. Ι. ΣΑΚΚΑΣ<sup>1</sup>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Να μελετηθεί η διαγνωστική αξία των αντι-CCP αντισωμάτων σε Ελληνες ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ).

**Μέθοδοι:** Χρησιμοποιώντας ανοσο-ενζυματική μέθοδο (CCP2 kit) μετρήσαμε αντι-CCP αντισώματα σε 220 ασθενείς με ΡΑ (95 με εξω-αρθρικές εκδηλώσεις), 178 ασθενείς με άλλα ρευματικά νοσήματα, και 100 υγιείς αιμοδότες. Μετρήσαμε το ρευματοειδή παράγοντα (RF) και το συγκρίναμε με τα αντι-CCP αντισώματα για την περιοχή κάτωθεν της καμπύλης (area under the curve, AUC), ευαισθησία, και ειδικότητα. Αναλύσαμε τη σχέση των αντι-CCP αντισωμάτων με τις εξω-αρθρικές εκδηλώσεις.

**Αποτελέσματα:** Η ευαισθησία των αντι-CCP αντισωμάτων και του RF για τη ΡΑ ήταν 63.2% και 59.1%, και η ειδικότητα ήταν 95.0% και 91.2%, αντίστοιχα. Η AUC για τα αντι-CCP αντισώματα ήταν 0.90 (95% CI, 0.87-0.93) και για τον RF ήταν 0.71 (95% CI, 0.64-0.77). Τα αντι-CCP αντισώματα είχαν στατιστική συσχέτιση με την ακτινογραφική βλάβη των αρθρώσεων. Οι CCP(+) ΡΑ ασθενείς είχαν αυξημένο αριθμό διογκωμένων αρθρώσεων και αυξημένη CRP σε σχέση με του CCP(-) ΡΑ ασθενείς (Mann-Whitney U test,  $p=0.01$ , και  $p<0.001$ , αντίστοιχα). Δεν υπήρχε στατιστική συσχέτιση των αντι-CCP αντισωμάτων με το σκορ DAS28 ( $r = 0.13$ ,  $p = 0.12$ ). ΡΑ ασθενείς με υψηλό τίτλο αντι-CCP αντισωμάτων συσχετιζόνταν με ορογονίτιδα και πνευμονική ίνωση.



<sup>1</sup> Ρευματολογική Κλινική και

<sup>2</sup> Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, Λάρισα

**Συμπέρασμα:** Σε Ελληνες ασθενείς με ΡΑ, τα αντι-CCP αντισώματα έχουν καλύτερη διαγνωστική αξία από τον RF και συσχετίζονται με δείκτες ενεργότητας, την αρθρική βλάβη και εξωαρθρικές εκδηλώσεις.

Ελληνική Ρευματολογία 2007, 18(3):275-283

**Όροι ευρετηρίου:** αυτοαντισώματα, αντι-CCP αντισώματα, ειδικότητα, ευαισθησία, ρευματοειδής αρθρίτιδα, ρευματοειδής παράγοντας

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (ΡΑ) στηρίζεται κυρίως σε κλινικά κριτήρια που μπορεί να κάνουν χρόνια για να εκπληρωθούν. Ο ρευματοειδής παράγοντας (rheumatoid factor, RF) που περιλαμβάνεται στα διαγνωστικά κριτήρια της ΡΑ έχει χαμηλή ειδικότητα για τη νόσο. Νέα αντισώματα, έναντι μορίων κιτρουλλίνης, έδειξαν καλή ειδικότητα για τη ΡΑ σε βορειοευρωπαϊούς λαούς. Η κιτρουλλίνη σχηματίζεται από μετα-μεταφραστική τροποποίηση των καταλοίπων αργινίνης με τα ένζυμα απο-ιμινάσες πεπτιδυλ-αργινίνης. Τέτοια κιτρουλλινωμένα μόρια περιλαμβάνουν τη φιλαγγρίνη, τη κερατίνη, τη φιμπρίνη και την βιμεντίνη<sup>1</sup>. Σήμερα τα αντισώματα έναντι κιτρουλλινωμένων μορίων ανιχνεύονται με ανοσο-ενζυματική μέθοδο (ELISA) όπου χρησιμοποιείται ως αντιγόνο κυκλικό κιτρουλλινωμένο πεπτίδιο. Τα αντι-CCP1<sup>2,3</sup> και αντι-CCP2<sup>4-9</sup> αντισώματα βρέθηκε ότι έχουν μεγάλη ειδικότητα για τη ΡΑ και συσχέτιση με τη βλάβη των αρθρώσεων<sup>10-13</sup>.

Στους βορειοευρωπαϊούς λαούς, η ΡΑ συσχετίζεται με τον κοινό επίτοπο του HLA-DRB1. Επίσης, η παραγωγή των αντι-CCP αντισωμάτων συσχετίζεται με τον κοινό επίτοπο του HLA-DRB1<sup>12</sup>. Στους Ελληνες με ΡΑ ο κοινός επίτοπος του HLA-DRB1 μπορεί να υπάρχει στη μειοψηφία των ασθενών<sup>14</sup> και γιαυτό μελετήσαμε τη σημασία των αντι-CCP αντισωμάτων σε Ελληνες ασθενείς με ΡΑ.

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Ασθενείς

Η μελέτη είχε δύο σκέλη. Στο πρώτο εξετάστηκε

σε προοπτική μελέτη η διαγνωστική αξία των αντι-CCP αντισωμάτων σε 155 συνεχόμενους ασθενείς με ΡΑ (γυναίκες 118, άνδρες 37, ηλικία  $60.3 \pm 12.8$  έτη [μέσος όρος  $\pm$  σταθερή απόκλιση(SD)]) Όλοι οι ασθενείς είχαν ΡΑ σύμφωνα με τα κριτήρια της Αμερικανικής Ρευματολογικής Εταιρείας του 1987<sup>15</sup>. Στους ασθενείς αυτούς καταγράφηκαν δημογραφικά στοιχεία, βασικές αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις και η φαρμακευτική αγωγή. Εκατόν εβδομήντα οκτώ ασθενείς με άλλες ρευματοπάθειες (γυναίκες 131, άνδρες 48, ηλικία  $54.9 \pm 16.5$  έτη), σύμφωνα με τα κριτήρια της αντίστοιχης νόσου, και 100 υγιείς αιμοδότες του τοπικού Κέντρου Αιμοδοσίας (γυναίκες 15, άνδρες 85, ηλικία  $39.2 \pm 10.4$  έτη), χρησίμευσαν ως μάρτυρες νόσου και υγιείς μάρτυρες, αντίστοιχα.

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης εξετάθηκαν συσχετίσεις των αντι-CCP αντισωμάτων με εξω-αρθρικές εκδηλώσεις σε 220 συνεχόμενους ασθενείς με ΡΑ. Από αυτούς, οι 95 είχαν εξω-αρθρικές εκδηλώσεις (exRA), και οι 125 δεν είχαν ποτέ εξω-αρθρικές εκδηλώσεις (cRA). Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν στο Ρευματολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

### Μέθοδοι

Η δραστηριότητα της ΡΑ εκτιμήθηκε με το σκορ DAS28<sup>16</sup>, τον αριθμό των διογκωμένων αρθρώσεων, τη διάρκεια της πρωινής δυσκαμψίας, και τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP, mg/dL). Η ακτινογραφική βλάβη των αρθρώσεων εκτιμήθηκε σε απλή ακτινογραφία των άκρων χειρών σύμφωνα με το τροποποιημένο Larsen score<sup>17,18</sup> σε κλίμακα 0 (καμμία βλάβη)-V (μέγιστη βλάβη). Δυο ρευματολόγοι (I.A, A.Z), βαθμολόγησαν την βλάβη με τυφλό τρόπο, χωρίς να γνωρίζουν τα αποτελέσματα αντισωμάτων και όταν υπήρχε απόκλιση των δυο βαθμολογητών επιλέχθηκε η χαμηλότερη βαθμολογία.

Οι οροί των ασθενών και των μαρτύρων μετά τη συλλογή τους διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη μέτρηση των αντισωμάτων. Τα αντι-CCP αντισώματα μετρήθηκαν με QUANTA lite CCP2 IgG ELISA

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ**

χαρακτηριστικό	Τιμή (μέσος όρος ± SD)
ΤΚΕ (n=152)	30.9 (± 22.8) mm/1n ώρα
CRP (n=143)	1.8 (±3.3) mg/dL
Larsen σκορ (n=131)	2.1 (±1.1)
Αντι-CCP αντισώματα (n=155)	81.9 (±115.4) IU/mL
RF (n=155)	246.3 (± 508.1) IU/mL

kit (INOVA diagnostics), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (φυσιολογικό όριο = 20 IU/mL). Ο IgM RF μετρήθηκε με ανοσο-νεφελομετρία (Dade Behring) (φυσιολογικό όριο=15 IU/mL) Οι μετρήσεις και των δυο αντισωμάτων έγιναν τυφλά, χωρίς να είναι γνωστή η διάγνωση της νόσου και το αποτέλεσμα του άλλου αντισώματος.

Έγιναν καμπύλες Receiver Operating Characteristics (ROC) και υπολογίσθηκε η περιοχική κάτωθεν της καμπύλης (area under the curve, AUC) μαζί με τα αντίστοιχες ζώνες αξιοπιστίας (confidence intervals, CIs). Υπολογίσθηκαν η ευαισθησία, και ειδικότητα. Η στατιστική συσχέτιση (correlation) μεταξύ των επιπέδων των αντι-CCP αντισωμάτων και του Larsen score προσδιορίσθηκε με το Spearman's rank correlation test. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογιστικό πρόγραμμα SPSS.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Διαγνωστική αξία των αντι-CCP αντισωμάτων στη ΡΑ

Τα εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΡΑ φαίνονται στον Πίνακα 1. Οι ασθενείς είχαν διάρκεια της νόσου 11,3 (±0.8) έτη (μέσος όρος ± σταθερή απόκλιση), με πρωινή δυσκαμψία 32,9 (±52,6) λεπτά, ευαίσθητες αρθρώσεις 8 (±7), διογκωμένες αρθρώσεις 3 (±5), και σκορ DAS28 4,5 (±1,6). Η συχνότητα των αντι-CCP αντισωμάτων και του RF σε ασθενείς και υγιείς φαίνονται στον Πίνακα 2. Η συχνότητα των αντι-CCP αντισωμάτων

στους ασθενείς με ΡΑ ήταν 63,2% και του RF ήταν 59,1%. Εβδομήντα εξ ΡΑ ασθενείς (49%) ήταν αντι-CCP(+) και RF(+), 22 ΡΑ ασθενείς (14,2%) ήταν αντι-CCP(+) και RF(-), και 16 ΡΑ ασθενείς (10,3%) ήταν αντι-CCP(-) και RF(+). Θετικότητα για αντι-CCP με ή χωρίς RF είχαν 75,5% των ΡΑ ασθενών. Μεταξύ των 63 RF(-) ΡΑ ασθενών, 22 ασθενείς (34,9%) ήταν αντι-CCP(+). Ενώ μεταξύ των 57 αντι-CCP(-) ΡΑ ασθενών, 28,1% ήταν RF(+).

Εννέα από του 14 ασθενείς με άλλα ρευματικά νοσήματα είχαν πολύ χαμηλά επίπεδα αντι-CCP αντισωμάτων (23,2-27,7 IU/mL). Ένας ασθενής, με συστηματικό ερυθρεμάτωδη λύκο και υψηλά επίπεδα αντι-CCP αντισώματα, είχε μητέρα με ΡΑ.

Όταν η ευαισθησία και ειδικότητα των αντι-CCP αντισωμάτων και του RF εξετάσθηκαν μαζί, η AUC για τα αντι-CCP αντισώματα ήταν 0.90 με 95% CI από 0.87 έως 0.93, ενώ η AUC για τον RF ήταν 0.71 με 95% CI από 0.64 έως 0.77. Η τιμή AUC για τα αντι-CCP αντισώματα ήταν υψηλότερη από αυτή του RF χωρίς επικάλυψη των ζωνών αξιοπιστίας. Αυτό δείχνει ότι τα αντι-CCP αντισώματα είχαν καλύτερη διαγνωστική αξία από τον RF στη ΡΑ. Όταν η ευαισθησία και η ειδικότητα εξετάσθηκαν χωριστά, η ευαισθησία των αντι-CCP αντισωμάτων για τη ΡΑ ήταν 0,63 και η ειδικότητα ήταν 0,95. Οι αντίστοιχες τιμές του RF ήταν 0,59 και 0,91. Η παρουσία είτε του ένα είτε του άλλου αντισώματος αύξανε την ευαισθησία στο 0,75, ενώ η παρουσία και των δυο αντισωμάτων αύξανε την ειδικότητα στο 0,98.

### Αντι-CCP2 αντισώματα και βαρύτητα της ΡΑ

Η ενεργότητα της ΡΑ, σύμφωνα με το δείκτη DAS28, ήταν χαμηλή (DAS28 <3,2) σε 30 ΡΑ ασθενείς (19,7%), μέτρια (DAS28 3,2-5,1) σε 68 ΡΑ ασθενείς (44,7%), και υψηλή (DAS28 >5,1) σε 54 ΡΑ ασθενείς (35,5%). Περισσότεροι ΡΑ ασθενείς με υψηλό δείκτη DAS28 είχαν αντι-CCP αντισώματα (75,9%) σε σχέση με ΡΑ ασθενείς με χαμηλό δείκτη DAS28 (31,8%) (p<0,001). Ωστόσο, δεν βρέθηκε στατιστική συσχέτιση (correlation) μεταξύ των αντι-CCP αντισωμάτων και

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΑΝΤΙ-CCP ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ RF ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΡΕΥΜΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ.**

Νόσος (n)	anti-CCP (%)	RF (%)
Σπονδυλαρθρίτιδες (53)	2 (3.8)	5 (9.4)
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος(32)	2 (6.2)	6 (18.7)
Σύνδρομο Sjogren (17)	3 (17.6)	3 (17.6)
οστεοαρθρίτιδα (19)	0 (0.0)	0 (0.0)
αγγειίτιδα (15)	3 (20)	4 (26.7)
Ρευματική πολυμυαλγία (11)	0 (0.0)	0 (0.0)
Κρυσταλλική αρθρίτιδα(7)	0 (0.0)	1 (14.3)
Νόσος Still των ενήλικων (5)	0 (0.0)	0 (0.0)
Συστηματική σκλήρυνση (5)	1 (20)	1 (20)
Νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα (4)	1 (25)	1 (25)
Άλλες (n=10)	2 (20.0)	1 (10.0)
Υγιείς μάρτυρες (100)	0 (0.0)	3 (3.0)

της ενεργότητας της νόσου, όπως αυτή ορίζεται με τον δείκτη DAS28 ( $r = 0,13$ ,  $p = 0,12$ ). Αντι-CCP(+) PA ασθενείς είχαν αύξηση του αριθμού των διογκωμένων αρθρώσεων και των επιπέδων της CRP σε σχέση με τους αντι-CCP(-) PA ασθενείς (Mann-Whitney U test,  $p=0,01$ , και  $p<0,001$ , αντίστοιχα).

Τριάντα εννέα PA ασθενείς (72,2%) με υψηλή ενεργότητα νόσου ήταν RF(+), σε σχέση με 15 PA ασθενείς (50,0%) με χαμηλή ενεργότητα νόσου (μη σημαντικό, NS). Υπήρχε μέτρια στατιστική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του IgM RF και του δείκτη DAS28 ( $r = 0,29$ ,  $p = 0,001$ ). Επίσης, οι RF(+) PA ασθενείς είχαν αύξηση του αριθμού των διογκωμένων αρθρώσεων και των επιπέδων της CRP σε σχέση με τους RF(-) PA ασθενείς (Mann-Whitney U test,  $p=0,02$ , και  $p=0,002$ , αντίστοιχα).

Δώδεκα PA ασθενείς είχαν Larsen σκορ 0-I, 83 ασθενείς είχαν σκορ II-III, και 36 ασθενείς είχαν σκορ IV-V. Μεταξύ των PA ασθενών με μεγάλη αρθρική βλάβη (σκορ Larsen IV-V), 28 ασθενείς (77,7%) ήταν αντι-CCP(+) και 22 ασθενείς (61%) ήταν αντι-CCP(-) και RF(+). Μεταξύ των PA ασθενών με μικρή αρθρική βλάβη (σκορ Larsen 0-1), οι αντίστοιχοι αριθμοί ήταν 6 (50%) και 3 (25%). CCP(+) PA ασθενείς παρουσίαζαν μια τάση για μεγαλύτερο ακτινογραφικό αρθρικό σκορ συγκρι-

νόμμοι με CCP(-) PA ασθενείς, που δεν έφθανε στατιστική σημαντικότητα. Υπήρχε όμως μια σχετικά μικρή στατιστική συσχέτιση (correlation) μεταξύ του ακτινογραφικού αρθρικού σκορ και των αντι-CCP αντισωμάτων (Spearman correlation coefficient,  $r = 0,27$ ,  $p = 0,001$ ). Καλύτερη στατιστική συσχέτιση μεταξύ του ακτινογραφικού αρθρικού σκορ και των αντι-CCP αντισωμάτων βρέθηκε σε ασθενείς με μικρή διάρκεια νόσου (0-5 έτη) (Spearman  $r = 0,40$ ,  $p = 0,029$ ). Για την τελευταία ανάλυση, οι PA ασθενείς χωρίστηκαν ανάλογα με τη διάρκεια νόσου σε κατηγορίες μικρής (0-5 έτη), μέτριας (5-10 έτη), και μεγάλης διάρκειας (> 10 έτη) νόσου.

Βρέθηκε σχετικά μικρή στατιστική συσχέτιση μεταξύ του RF και του ακτινογραφικού αρθρικού σκορ (Spearman  $r = 0,33$ ,  $p = 0,001$ ).

#### **Αντι-CCP αντισώματα και εξω-αρθρικές εκδηλώσεις**

Αντι-CCP αντισώματα βρέθηκαν σε 62 exRA ασθενείς (65,3%) και σε 73 cRA ασθενείς (58,4%) (NS). Δεν υπήρχε στατιστική σημαντική διαφορά στη θετικότητα για αντι-CCP αντισώματα σε σχέση με τη θεραπεία με αντι-TNFα παράγοντα ή πρεδνιζολόνη. Αντι-CCP αντισώματα βρέθηκαν σε 90,9% των ασθενών με πνευμονική ίνωση ( $p=0,03$ ) (Πίνακας 4). Μεταξύ των ασθενών με

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΩΝ ANTI-CCP ANΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ RF ΣΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ**

<b>Anti-CCP</b>	PA vs μη PA.	PA vs ρευματική νόσος	PA vs υγιείς
AUC	0,90 (95% CI: 0,87 - 0,93)	0,87 (95% CI: 0,83 - 0,91)	0,95 (95% CI: 0,92 - 0,97)
Ευαισθησία	63,6% (95% CI: 55,8% - 70,8%)	63,6% (95% CI: 55,8% - 70,8%)	63,6% (95% CI: 55,8% - 70,8%)
Ειδικότητα	95,0% (95% CI: 91,7% - 97,0%)	92,1% (95% CI: 87,2% - 95,3%)	100% (95% CI: 96,4% - 100%)
<b>RF</b>	PA vs μη PA	PA vs ρευματική νόσος	PA vs υγιείς
AUC	0,71 (95% CI: 0,64 - 0,77)	0,72 (95% CI: 0,66 - 0,78)	0,682 (95% CI: 0,61 - 0,76)
Ευαισθησία	59,1% (95% CI: 51,2% - 66,5%)	59,1% (95% CI: 51,2% - 66,5%)	59,1% (95% CI: 51,2% - 66,5%)
Ειδικότητα	91,2% (95% CI: 87,3% - 94,0%)	87,93% (95% CI: 82,3% - 92,0%)	97,00% (95% CI: 91,6% - 99,0%)

AUC= area under the curve

exRA, 37,9% είχαν υψηλά επίπεδα αντι-CCP αντισωμάτων (>100 IU/mL) σε σχέση με το 21,6% των ασθενών με cRA (p=0,008). Τα επίπεδα των αντι-CCP αντισωμάτων ήταν υψηλά σε 52,9% των ασθενών με ορογονίτιδα και σε 63,6% των ασθενών με πνευμονική ίνωση (p=0,02 και p=0,008,

αντίστοιχα) (Πίνακας 5).

Ο RF ανιχνεύθηκε στο 69,5% των ασθενών με exRA σε σχέση με το 60,0% των ασθενών με cRA (NS). CCP(+) και RF(+) ήταν 55,8% των exRA ασθενών και 42,4% των cRA ασθενών (NS). CCP(+) με ή χωρίς RF(+) είχαν 78,9% exRA ασθενείς και

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΑΝΤΙ-CCP ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΡΑ ΚΑΙ ΕΞΩ-ΑΡΘΡΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ (EXRA) ΚΑΙ ΣΕ ΡΑ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΠΟΤΕ ΕΞΩ-ΑΡΘΡΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ (CRA).**

Νόσος	CCP2(+)(%)
<b>exRA</b> (n = 95)	62(65,3)
-ρευματοειδή οζίδια (n=10)	6(60,0)
-πνευμονική ίνωση (n=11)	10(90,9)*
-ορογονίτιδα (n=17)	14(82,4)
-αγγειίτιδα δέρματος (n=2)	1(50,0)
-νευροπάθεια (n=5)	3(60,0)
-σύνδρομο ξηρότητας (n=53)	35(66,0)
-σύνδρομο Felty (n=4)	4(100)
-φαινόμενο Raynaud (n=14)	6(42,9)
<b>cRA</b> (n=125)	73(58,4)

\* p=0.03

76,0% cRA ασθενείς (NS). Τα επίπεδα του RF ήταν  $265,0 \pm 52,0$  IU/mL (μέσος όρος  $\pm$  σταθερό λάθος του μέσου όρου, SEM) σε exRA και  $205,1 \pm 40,6$  IU/mL σε cRA (NS). Υψηλά επίπεδα RF ( $> 268$  IU/mL) ήταν συχνότερα σε ασθενείς με σύνδρομο ξηρότητας των οφθαλμών. Το όριο των 268 IU/mL επιλέχθηκε επειδή έχει 98,5% ειδικότητα για τη ΡΑ και προήλθε από την καμπύλη ROC.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αντι-CCP αντισώματα σε διάφορες μελέτες βρέθηκε να έχουν ευαισθησία 0,64-0,74 και ειδικότητα 0,90-0,99 για τη ΡΑ<sup>4-10</sup>. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία να διαγνώσουν πρώιμη ΡΑ από παροδική αρθρίτιδα<sup>3</sup>, ή αδιαφοροποίητη αρθρίτιδα<sup>19</sup>. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η δική μας βρήκε ευαισθησία 0,63 και ειδικότητα 0,95 για τα αντι-CCP αντισώματα στη ΡΑ. Η διαφορετική συχνότητα των αντι-CCP αντισωμάτων σε διάφορους πληθυσμούς ΡΑ έχει διάφορες εξηγήσεις: (α) τα αντι-CCP αντισώματα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στα κιτρουλλινιωμένα μόρια και διαφορετικοί ασθενείς έχουν διαφορετικές υπο-ομάδες αντι-CCP αντισωμάτων<sup>20,21</sup>. (β) τα επίπεδα των αντι-CCP αντισωμάτων στη ΡΑ επηρεάζονται από τα αλληλία HLA, και είναι υψηλότερα σε ασθενείς με τον κοινό

επίτοπο του HLA-DRB1 (SE)<sup>12</sup>. Σε Ελληνες ασθενείς με ΡΑ, μία μελέτη βρήκε τον κοινό αυτό επίτοπο στη μειοψηφία των ασθενών<sup>14</sup> αλλά μια μετέπειτα μελέτη στο 65% των ασθενών<sup>22</sup> (γ) Η θεραπεία μπορεί να επιδρά στα επίπεδα των αντισωμάτων. Μείωση των επιπέδων των αντι-CCP αντισωμάτων με τη θεραπεία έχει βρεθεί από μερικούς ερευνητές<sup>23</sup> αλλά όχι από άλλους<sup>24</sup>.

Τα δυο αντισώματα, αντι-CCP, και RF φαίνεται ότι αλληλοσυμπληρώνονται όσον αφορά τη χρησιμότητά τους. Η υψηλή ειδικότητα των αντι-CCP αντισωμάτων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε RF(-) ασθενείς, όπου η συχνότητα των αντι-CCP αντισωμάτων φθάνει το 40%<sup>7</sup>. Από το άλλο μέρος, 28,1% των αντι-CCP(-) ΡΑ ασθενών ήταν RF(+). Η χαμηλή συχνότητα του RF στους ασθενείς μας μπορεί να εξηγηθεί από το απλό γεγονός ότι το νοσοκομειακό μας Ρευματολογικό Ιατρείο λειτουργεί ως πρωτοβάθμιο, δευτεροβάθμιο και τριτοβάθμιο κέντρο και ως εκ τούτου οι ΡΑ ασθενείς έχουν όλο το φάσμα της βαρύτητας της νόσου, από πολύ ελαφριά μέχρι πολύ βαριά. Η πρακτική αυτή είναι σε αντίθεση με άλλες χώρες, όπου τα νοσοκομεία δέχονται μόνο παραπομπές από άλλους Ιατρούς και οι ΡΑ ασθενείς περιλαμβάνουν μόνο τις βαρύτερες μορφές της νόσου.

Στη μελέτη μας βρέθηκε συσχέτιση των αντι-

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΟΥ ΑΝΤΙ-CCP ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΡΑ ΚΑΙ ΕΞΩ-ΑΡΘΡΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ (EXRA) ΚΑΙ ΣΕ ΡΑ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΠΟΤΕ ΕΞΩ-ΑΡΘΡΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ (CRA).**

Νόσος	αντι-CCP abs (IU/mL; mean±SEM)
<b>exRA</b> (n = 95)	99,1±16,1
-ρευματοειδή οζίδια (n=10)	80,0±24,9
-πνευμονική ίνωση (n=11)	152,6±31,5*
-ορογονίτιδα (n=17)	107,2±22,0**
-αγγειίτιδα δέρματος (n=2)	55,3±30,1
-νευροπάθεια (n=5)	53,0±24,8
-σύνδρομο ξηρότητας (n=53)	78,2±10,9
-σύνδρομο Felty (n=4)	108,5±43,1
-φαινόμενο Raynaud (n=14)	64.9±20.2
<b>cRA</b> (n=125)	73.1±10.2

\* p=0.008, \*\*p=0.02

CCP αντισωμάτων με δείκτες ενεργότητας της νόσου, όπως αριθμό διογκωμένων αρθρώσεων και επίπεδα CRP, όπως και σε άλλη μελέτη<sup>7</sup>. Η μελέτη μας δεν διάρκεσε πολλά έτη για να παρακολουθήσει την ακτινογραφική εξέλιξη των αρθρώσεων σε σχέση με τα αντι-CCP αντισώματα. Εν τούτοις, βρέθηκε στατιστική συσχέτιση των αντι-CCP αντισωμάτων με το ακτινογραφικό αρθρικό σκορ. Ήμελετες μακρόχρονης παρακολούθησης βρέθηκε συσχέτιση των αντι-CCP αντισωμάτων μόνων<sup>13</sup> ή σε συνδυασμό με τον κοινό επίτοπο του HLA-DRB1<sup>12</sup> με ταχύτερη ακτινογραφική αρθρική βλάβη. Σε ανάλυση πολλαπλής εξάρτησης (multiple regression analysis), τα αντι-CCP αντισώματα<sup>11</sup> βρέθηκε ότι είναι προγνωστικός δείκτης της βλάβης των αρθρώσεων.

Η υψηλή ειδικότητα των αντι-CCP αντισωμάτων στη ΡΑ συνδυασμένο με την πρώιμη εμφάνιση τους πριν την κλινική έκφραση της νόσου<sup>25,26</sup>, κάνει εμφανή την ανάγκη να χρησιμοποιηθούν τα αντι-CCP αντισώματα ως διαγνωστικά κριτήρια της ΡΑ. Η συσχέτιση των αντι-CCP αντισωμάτων με την βλάβη των αρθρώσεων<sup>11,12,13,27,28</sup> και με τις εξω-αρθρικές εκδηλώσεις της ΡΑ δίνει επιπρόσθετη βοήθεια στους ρευματολόγους να αποφασίσουν πολύ ενωρίς επιθετική θεραπεία

σε άτομο με ΡΑ που έχει αυξημένες πιθανότητες για βαριά πορεία της νόσου.

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς ευχαριστούν τον κ. Ηλία Ζιντζαρά, Επικουρο Καθηγητή Βιομαθηματικών, Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επίσης ευχαριστούν την κα. Ευαγγελία Σακκά για τη δακτυλογράφηση του κειμένου.

#### ABSTRACT

#### **Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Greek patients with rheumatoid arthritis.**

I. Alexiou<sup>1</sup>, K. Theodoridou<sup>2</sup>, A. Ziogas<sup>1</sup>, A. Koutroumpas<sup>1</sup>, A. Kontogianni<sup>1</sup>, A. Germenis<sup>2</sup>, L. I. Sakkas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Rheumatology, and <sup>2</sup>Immunology and Histocompatibility, Thessaly University School of Medicine and Hospital, Larisa 41110, Greece

Objective: To assess the diagnostic value of anti-CCP antibodies in Greek patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods: Using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (CCP2) kit, we tested anti-CCP antibodies in serum samples from 220 Greek patients with RA (95 with extra-articular manifestations, exRA), 178 patients with other rheumatic diseases, and 100 healthy blood donors. We also determined rheumatoid factor (RF) and compared it to anti-CCP antibodies for area under the curve (AUC), sensitivity, specificity and likelihood ratios.

Results: Sensitivity of anti-CCP antibodies and RF for RA was 63.2% and 59.1%, and specificity was 95.0% and 91.2%, respectively. When sensitivity and specificity were considered simultaneously, the AUC for anti-CCP antibodies was 0.90(95%CI, 0.87-0.93) and the AUC for RF was 0.71(95%CI, 0.64-0.77). The presence of both antibodies increased specificity to 98.2%. Anti-CCP antibodies were positive in 34.9% of RF-negative RA patients. Anti-CCP antibodies showed a correlation with the radiographic joint damage. Anti-CCP-positive RA patients had increased the swollen joint count and serum CRP concentration compared to anti-CCP-negative RA patients (Mann-Whitney U test,  $p=0.01$ , and  $p<0.001$ , respectively). However, no correlation was found between anti-CCP antibodies and DAS28 score ( $r = 0.13$ ,  $p = 0.12$ ). High anti-CCP levels were found in patients with serositis and lung fibrosis.

Conclusions: In Greek patients with RA, anti-CCP antibodies exhibit a better diagnostic value than RF and a correlation with radiological joint damage and extra-articular manifestations.

Hellenic Rheumatology 2007; 18(3):275-283

**Key words:** *autoantibodies, anti-CCP antibodies, rheumatoid arthritis, rheumatoid factor, sensitivity, specificity.*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- van Boekel MA, van Venrooij WJ. Modifications of arginine and their role in autoimmunity. *Immunol Rev* 2003;2: 57-62.
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43:155-63.
- Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JMW. How to diagnose rheumatoid arthritis early. A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 357-65.
- Lee DM, Schur PH. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 870-4.
- Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, et al. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scan J Reumatol* 2003; 32: 197-204.
- Dubucquoi S, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerie L, Sibilia J, Goetz J, et al. Evaluation of the anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 415-9.
- Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004, 63: 1085-9.
- Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M, Förger F, Siebert U, Helmke K. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1079-84
- Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45:20-5
- De Rycke L, Peene I, Hoffman IEA, Kruihof E, Union A, et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1587-93
- Forslind K, Ahlmén M, Eberhardt K, Hafström I, Svensson B for the BARFOT study group: Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1090-5.
- van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TWJ, Schreuder GMTh, Breedveld FC, Zanelli E, et al Association between HLA class II genes and autoantibodies to



- cyclic citrullinated peptides (CCPs) influence the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2113-21.
13. Ronnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L, et al. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1744-9
  14. Boki KA, Panayi GS, Vaughan RW, Drosos AA, Moutsopoulos HM, Lanchbury JS. HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks. The HLA-DR beta shared-epitope hypothesis accounts for the disease in only a minority of Greek patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35:749-55
  15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
  16. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL: Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 44-8.
  17. Larsen A: How to apply Larsen score in evaluating radiographs of rheumatoid arthritis in long-term studies? *J Rheumatol* 1995; 22:1974-5.
  18. Larsen A, Dale K, Eek M: Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diag* 1977; 18: 481-91.
  19. Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:709-15.
  20. Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-81.
  21. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2001; 47: 1089-93.
  22. Stavropoulos C, Spyropoulou M, Koumantaki Y, Kappou I, Kaklamanis PV, Linos A et al. HLA-DRB1\* genotypes in Greek rheumatoid arthritis patients: association with disease characteristics, sex and age at onset. *Br J Rheumatol* 1997;36: 141-2
  23. Alessandri C, Bombardieri M, Papa N, Cinquini M, Magrini L, Tincani A, et al. Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNF $\alpha$  therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1218-21.
  24. Caramaschi P, Biasi D, Tonolli E, Pieropan S, Martinelli N, Carvetto A, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptides in patients with rheumatoid arthritis before and after infliximab treatment. *Rheumatol Int* 2005;26: 58-62
  25. Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, van Venrooij WJ, et al. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6: R303-R308.
  26. Vittecoq O, Incaugarat B, Jouen-Beades F, Legoedec J, Letourneur O, Rolland D, et al. Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2004;135:173-80
  27. Kroot E-JJA, de Jong BAW, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FHJ, van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1831-5.
  28. Alexiou I, Germetis A, Ziogas A, Theodoridou K, Sakkas LI. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Greek patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskel Dis* 2007;8:37-43