

Il significato diagnostico e prognostico degli anticorpi anti-peptide citrullinato ciclico (Anti-CCP) nell'artrite reumatoide

Diagnostic and prognostic value of antibodies to cyclic citrullinated peptide (Anti-CCP) in rheumatoid arthritis

G.L. Erre, A. Tocco¹, R. Faedda¹, A. Cossu, A. Carcassi

Cattedra e Scuola di Specializzazione di Reumatologia; ¹Istituto di Patologia Medica Università degli Studi di Sassari

SUMMARY

There is strong evidence that the determination of autoantibodies against filaggrine is a very useful tool for the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (Anti-CCP)-ELISA appear to be the most efficient test among those available for the detection of antifilaggrine autoantibodies, as it has the best diagnostic accuracy for the diagnosis of RA. Furthermore, the anti-CCP-ELISA determination in early arthritis is a good predictor of disease persistence and radiographic joint damage. The positivity of Anti-CCP some years before the onset of the RA and the high concentration of autoantibodies in synovial fluid suggest a possible pathogenetic role of citrullination. However, at present, it is unclear whether anti-CCP antibodies have a better diagnostic performance than FR in recent onset synovitis and if they confer any additional value to the prognostic evaluation obtained with validated predictors of outcome (FR, joint count, duration of disease).

Reumatismo, 2004; 56(2):118-123

IL SISTEMA DEGLI ANTICORPI ANTIFILAGGRINA

Nel 1964 Nienhuis e Mandema (1) evidenziarono in Immunofluorescenza Indiretta (IIF), usando come substrato cellule dell'epitelio della mucosa buccale umana, la presenza, nel siero di pazienti malati di artrite reumatoide (AR), di anticorpi che si legavano specificamente contro costituenti dei granuli localizzati in prossimità del nucleo, indicandoli con il termine generico di Anticorpi Anti-fattore perinucleare (APF). Gli APF hanno una sensibilità per l'AR compresa tra il 40-90% quando testati in soggetti con malattia ben definita (2). Oltre un decennio dopo, nel 1979, Young *et al* (3) dimostrarono, sempre con metodica di IIF che il siero dei pazienti con AR incubato con l'epi-

telio dell'esofago di ratto, esprimeva una caratteristica fluorescenza lineare a livello dello strato corneo di quest'ultimo. Vista la selettività del legame per lo strato corneo gli Anticorpi responsabili della fluorescenza vennero indicati con il termine generico di Anticorpi Anti-Cheratina (AKA). Sierologia positiva per gli AKA è riscontrabile in circa il 40-60% dei soggetti con AR ben definita (2) e solo nel 28% dei soggetti con AR a recente insorgenza (4).

Successive evidenze sperimentali identificarono nella pro-filaggrina il bersaglio comune degli Anticorpi presenti nei sieri APF/AKA positivi (5). La filaggrina è una proteina, ricca di residui di istidina, sintetizzata ad opera delle cellule dello strato granuloso dell'epidermide sotto forma di precursore, la profilaggrina, che viene accumulato in specifici organelli citoplasmatici, i cosiddetti granuli cheratoinali. Negli ultimi stadi di differenziazione dello strato corneo dell'epidermide la profilaggrina, costituita da 10-12 molecole omologhe di filaggrina va incontro a un clivaggio con la liberazione delle unità di filaggrina funzionalmente attive (6), e circa il 20 % delle molecole di arginina

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Gian Luca Erre
Cattedra e Scuola di Specializzazione di Reumatologia
Istituto di Patologia Medica
V.le San Pietro 8, IV Piano, 07100 Sassari
E-mail: e.gianluca@libero.it

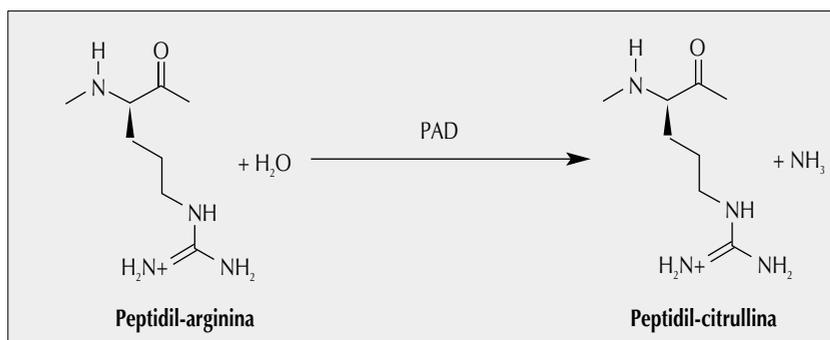


Figura 1 - Conversione dell'arginina in citrullina ad opera della peptidil-arginina deaminasi (PAD).

delle unità di filaggrina così ottenute vengono convertite in citrullina ad opera dell'enzima peptidil-arginina-deaminasi (PAD) (Fig. 1). In realtà non è la filaggrina in quanto tale, ma sono i numerosi residui citrullinati della molecola, ad indurre una specifica risposta anticorpale. I residui citrullinati, della filaggrina e, probabilmente anche di altre proteine, rappresentano infatti il determinante epitopico *target* degli Anticorpi Antifilaggrina (AKA, APF) e più specificamente degli Anti-CCP (7).

SINTESI E SIGNIFICATO PATOGENETICO DEGLI ANTI-CCP

Vossenaar et al. (8) hanno dimostrato, utilizzando come substrato tissutale la membrana sinoviale di ratti con artriti indotte, che il mRNA per la PAD nei granulociti che infiltrano la sinovia, viene trascritto solo in condizioni di flogosi. Nelle aree di necrosi e fibrosi sinoviale la PAD, indotta dalla flogosi, determinerebbe la citrullinizzazione di frammenti fibrinolitici e diverse altre proteine. hanno inoltre evidenziato Sfruttando gli anticorpi monoclonali si è dimostrata la presenza intracellulare di residui di citrullina negli strati del lining e del sub-lining della sinovia reumatoide e non nella sinovia normale (9) e la appartenenza di tali residui a diverse proteine sinoviali e in particolare alla fibrina (10).

Concordemente con queste osservazioni l'elevata concentrazione degli Anticorpi contro i residui citrullinati nel panno sinoviale rispetto al liquido sinoviale e ancor di più rispetto al siero fa pensare ad una loro produzione prevalente, o almeno iniziale, a livello della membrana sinoviale (11).

Numerose proteine citoplasmatiche o nucleari vanno incontro durante l'apoptosi a modificazioni post-trascrizionali, quali la fosforilazione e la formazione di *cross-links*. Le proteine modificate vengono esposte sulla membrana dei corpi apoptotici, *blebs*, risultanti dalla frammentazione cellulare, in

associazione con specifici recettori che ne favoriscono la fagocitosi e l'eliminazione da parte di cellule istiocitiche viciniori.

Alcune di queste modificazioni post-trascrizionali sarebbero responsabili di una risposta policlonale autoreattiva come elegantemente dimostrato da diversi Autori (12, 13) in soggetti affetti da LES e altre malattie autoimmunitarie. Per alcune proteine, come la vimentina (14), è stato dimostrato che la modificazione post-trascrizionale in fase apoptotica consisteva nella citrullinizzazione dei residui arginici. Similmente la citrullinizzazione della filaggrina nei cheratinociti avviene nelle fasi terminali del processo di differenziazione dei cheratinociti che può essere considerato, dal punto di vista funzionale, come un particolare tipo di morte cellulare programmata (MCP).

Un'ipotesi affascinante è che la modificazione post-trascrizionale dei residui di arginina in citrullina nelle cellule apoptotiche della membrana sinoviale possa essere responsabile della induzione di una risposta autoreattiva, in relazione ad una insufficiente clearance delle cellule medesime o ad un ritardo nel completamento del programma di morte cellulare. Frammenti proteici citrullinati verrebbero così presentati al sistema immunitario, stimolando una specifica risposta anticorpale

METODICHE DI DETERMINAZIONE DEGLI ANTI-CCP

Il test per la determinazione degli Anti-CCP è un test in fase solida con metodica Elisa che sfrutta come target una molecola ciclica citrullinata. La metodica in fase solida permette di superare i limiti della variabilità interoperatore, della difficoltà di quantificazione e della scarsa disponibilità di substrato connessi con le metodiche in immunofluorescenza precedentemente impiegate per la ricerca degli Anticorpi Anti-filaggrina (AKA e APF).

La positività è espressa in Unità/ml in relazione al valore di densità ottica ottenuto. Il cut-off variabile da laboratorio a laboratorio, in relazione ai valori dei controllo interni, è intorno alle 50 U/ml. Valori nettamente superiori al cut-off sono altamente specifici per la AR. Esistono attualmente in commercio due generazioni di test per la determinazione degli Anti-CCP e tra questi quello di seconda generazione sembrerebbe dotato di una performance diagnostica superiore (15).

PREVALENZA DEGLI ANTI-CCP NELL'AR E NELLA EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS

Il dosaggio del FR rappresenta al momento l'unico, validato (16), ausilio laboratoristico per la diagnosi dell'AR, pur nei limiti di un basso potere discriminativo legato alla relativa specificità del test. Al contrario del FR, il dosaggio degli Anti-CCP possiede una elevata specificità, superiore al 90%, specie quando presente ad un titolo elevato (17). Nel loro lavoro originale Schellekens et al. (18) riportano, per un valore di specificità del 98%, una sensibilità degli Anti-CCP pari al 68%, quando il test viene applicato ad una popolazione generale di pazienti con AR, e del 41% quando applicato ad una popolazione di early arthritis.

Similmente, lo studio di una numerosa casistica di pazienti con AR evoluta (mediana della durata di malattia pari a sei anni) ha evidenziato un'elevata sensibilità e specificità degli Anti-CCP (87,6% e 88,9%) rispetto al FR (69,98% e 81,7%) (15).

Nelle forme definite e ben documentate di malat-

tia la prevalenza e la specificità degli Anti-CCP sembrerebbero quindi maggiori di quelle riscontrate per il FR. È ancora oggetto di dibattito, invece, se la determinazione degli Anti-CCP offra un reale vantaggio rispetto al FR in termini di predittività dell'AR quando applicato alle artriti di recente insorgenza. In diversi lavori (Tab. I), volti a testare la capacità diagnostica degli Anti-CCP e del FR nelle *early arthritis*, la sensibilità degli Anti-CCP, con l'eccezione di un unico studio (19), è risultata sovrapponibile (20) o significativamente inferiore a quella del FR (21-24). Generalmente superiori, anche se non di molto, sono risultati invece, come ci si aspettava, i valori della specificità degli Anti-CCP rispetto al FR.

Opposte le conclusioni cui giungono Visser et al. (25), indicando, nel più volte citato modello predittivo delle artriti persistenti ed erosive, la determinazione degli Anti-CCP come quella dotata, tra i sette criteri impiegati, del più elevato potere predittivo. La dimostrazione (26), che gli Anti-CCP come il FR, specie IgA, antedatano, anche di alcuni anni (mediana 2,5 anni), l'esordio dell'AR e che gli Anti-CCP sono dotati del maggiore potere predittivo sembra confermare, con un percorso differente, i risultati del modello proposto da Visser. Oltre alle differenze etnico-geografiche delle popolazioni studiate, un altro dato che in parte potrebbe rendere ragione delle differenti valutazioni sulla sensibilità relativa di Anti-CCP e FR è l'impiego di Kit Elisa di differente generazione (15). Se rimane incerta la superiorità diagnostico-predittiva degli Anti-CCP sul FR una solida evidenza è l'elevata capacità discriminativa che si raggiunge asso-

Tabella I - Sensibilità e Specificità degli Anti-CCP e del FR: sommario dei dati in Letteratura.

Autore, anno ^{Ref}	Durata malattia	n		Sensibilità		Specificità	
		AR	Non-AR	Anti-CCP	FR	Anti-CCP	FR
Schellekens, 200018	< 12 mesi	149	337	48%	54%	96%	91%
Kroot, 200021	<12 mesi	273	ND	66%	83%	ND	ND
Golbach-Mansky,200022	<12 mesi	106	132	41%	66%	91%	87%
Jansen 200223	<36 mesi	258	121	42,6%	50,4%	97,5%	93,4%
Saraux 200320	<12 mesi	86	157	47%	45%	93%	ND
Nogueira 200319	<12 mesi	175	177	54%	27%	ND	ND
Nell 200324	<3 mesi	80	100	38%	46%	98,7%	97,4%
ND: non disponibile							

ciando la determinazione di entrambi gli Anticorpi (17, 18, 22, 27). Data per certa la forte associazione tra gli Anti-CCP e il FR (17,18), esiste una, seppure piccola, quota di sieri FR-negativi che risultano positivi per gli Anti-CCP. La determinazione degli Anti-CCP può aggiungere pertanto un dato di supporto diagnostico nelle forme di AR sieronegativa.

IL VALORE PROGNOSTICO DEGLI ANTI-CCP

In relazione alla pressante necessità di definire il grado di aggressività dell'atteggiamento terapeutico, oltre alla diagnosi precoce risulta indispensabile predire l'andamento della malattia permettendo la stratificazione prognostica delle diverse forme di AR. In particolare la sfida attuale della ricerca è quella di identificare quali indicatori bio-umorali siano soddisfacenti predittori di una evoluzione della artrite in senso persistente ed erosivo. Affidabili e validati indici di persistenza e di erosività, sono la durata di malattia, la conta delle articolazioni tumefatte all'esordio e il FR. Tra gli indicatori di *outcome*, accanto al FR, la positività degli Anticorpi Anti-peptide ciclico citrullinato (Anti-CCP) ha, secondo il modello di Visser (25), un valore predittivo positivo elevato per le forme di *early arthritis* persistenti e con andamento erosivo. Valutati a distanza di tempo dall'esordio dell'artrite i pazienti positivi per gli Anti-CCP presentano infatti uno score radiologico sensibilmente più elevato rispetto ai pazienti negativi (21, 27, 28), suggerendo che la presenza di questi Anticorpi sia associata ad una variante di malattia più aggressiva. Dubbia è invece la correlazione della positività degli

Anti-CCP con la severità clinica della malattia valutata in termini di disabilità fisica (HAQ) (21, 27). Il dato non appare contrastante se si considera che lo score radiologico e l'HAQ non risultano strettamente associati, essendo l'HAQ abbastanza variabile nei primi anni di malattia ed influenzato dalla fase di attività e dal tipo, più che dal numero, delle articolazioni interessate.

L'associazione degli Anti-CCP con lo *shared epitope* (HLA-DRB₁) pur presente (29) non aggiunge ulteriori informazioni rimanendo ancora dubbia la capacità del determinante immunogenetico di predire una evoluzione più severa della AR.

Un solo *report* (15) è presente in letteratura sulla associazione dei titoli degli Anti-CCP con i livelli degli indici infiammatori (VES e PCR). Il dato può acquisire un certo interesse se si considera che i livelli degli indici di flogosi, all'esordio, sembrerebbero predire un outcome peggiore, a lungo termine, delle forme di AR erosiva (30). Non esistono, invece, sufficienti evidenze per derivare da questa correlazione la considerazione che il dosaggio degli Anti-CCP possa essere utile come marker di attività di malattia nel follow-up del paziente (31). In realtà, sulla base delle risultanze fin qui ottenute, non sembra che la determinazione degli Anti-CCP, sia dotata di un consistente valore addizionale per la valutazione prognostica rispetto a quanto si ottiene sulla base delle variabili ormai consolidate. (FR, danno articolare basale e durata di malattia). Un significato maggiore, come per la diagnosi, riveste la sua isolata positività nei soggetti FR negativi. Esistono infatti evidenze che i soggetti FR negativi con positività degli Anti-CCP rappresentino il subset con il più elevato score radiologico (23, 32).

RIASSUNTO

Tra gli autoanticorpi antifilaggrina gli Anti-CCP sono quelli dotati del miglior profilo di sensibilità/specificità per la diagnosi dell'AR. Inoltre la valutazione degli Anti-CCP appare utile ai fini della valutazione prognostica delle artriti ad esordio recente essendo la positività degli Anticorpi associata con AR ad evoluzione più aggressiva. La comparsa degli Anti-CCP prima dell'esordio della malattia e il titolo molto elevato nel liquido sinoviale suggeriscono, inoltre, un possibile ruolo patogenetico nel determinismo della malattia. È ancora oggetto di discussione se il dosaggio degli Anti-CCP sia più sensibile di quello del FR nelle *early arthritis* e se la sua determinazione offra elementi addizionali nella valutazione prognostica ottenuta sulla base dei parametri comunemente impiegati (FR, conta articolare, durata di malattia).

Parole chiave - Anticorpi anti-peptide citrullinato ciclico, *early arthritis*, diagnosi, prognosi.

Key words - *Antibodies anti-cyclic citrullinated peptide, early arthritis, diagnosis, prognosis.*

BIBLIOGRAFIA

1. Nienhuis RLF, Mandema EA. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The Antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23: 302-5.
2. Hoet RM, van Venrooij WJ. The antiperinuclear factor (APF) and antikeratin antibodies (AKA) in rheumatoid arthritis. In: Smolen JS, Kalden JR, Maini RN, eds. *Rheumatoid arthritis*. Berlin, Heidelberg: Springer 1992: 299-318.
3. Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, Clark CJM, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979; 2: 97-9.
4. Goldbach-Mansky R, Lee J, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2: 236-43.
5. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière, Girbal E, Durieux JJ, et al. The Antiperinuclear factor and the so called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995; 95: 2672-9.
6. Dale BA, Resing KA, Haydock PV, Fillaggrins. In cellular and molecular biology of intermediate filaments. Goldman RD, Steinert Pm, editors, Plenum Publishing Corporation, New York/London 1992; 393-412.
7. Schellekens GA, De Jong BAW, Van de Hoogen FHJ, Van de Putte LBA, Van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-7.
8. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MMA, Van der Heijden A, Senshu T, Van de Berg WB, et al. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2489-500.
9. Baeten D, Peene I, Union A, Sebbag M, Serre G, Veys EM, et al. Specific presence of intracellular citrullinate proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2218-62.
10. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, et al. The major synovial targets of rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the α - and β -chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166: 4177-84.
11. Masson-Bessière C, Sebbag M, Durieux JJ, Nogueira L, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, et al. In the rheumatoid pannus, antifilaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 544-52.
12. Utz PJ, Hottelet M, Schur PH, Anderson P. Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1997; 185: 843-54.
13. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface blebs on cultured keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1317-30.
14. Asaga H, Yamada M, Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 641-6.
15. 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. *Scand J Rheumatol* 2003; 32: 197-204.
16. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
17. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of Anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 1089-93.
18. Schellekens GA, Visser H, De Jong BA, Van de Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63.
19. Nogueira L, Chapuy-Regaud X, Constantin A. Autoantibodies to deiminated fibrinogen are the most efficient serological criterion for early rheumatoid arthritis diagnosis. *Arthritis Res Ther* 2003; 5 (Suppl 1): S6.
20. Saraux A, Berthelot JM, Devauchelle V, Bendaoud B, Chales G, Le Henaff C, et al. Value of Antibodies to Citrulline-Containing Peptides for diagnosing early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 2535-39.
21. Kroot EJ, De Jong BA, Van Leeuwen MA, Swinkels H, Van den Hoogen FH, Van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinate peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1831-5.
22. Goldbach-Mansky R, Lee J, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2: 236-43.
23. Jansen LMA, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, de Koning MHMT, Dijkmans BAC. The predictive value of Anti-Cyclic citrullinated peptide antibodies in early arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 1961-5.
24. Nell VPK, Machold KP, Eberl G, Hiesberger H, Hoefler E, Smolen JS, et al. The diagnostic and prognostic significance of autoantibodies in patients with very early arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48 (9 Suppl): 107S.
25. Visser H, Le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 357-65.
26. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Halmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2741-9.
27. Jansen LMA, van der Horst-Bruinsma IE, van Schaardenburg D, van de Stadt RJ, de Koning MHMT, Dijkmans BAC. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic

- citrullinated peptide differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 207-6
28. Meyer O, Combe B, Elias A, Benali K, Clot J, Sany J, et al. Autoantibodies predicting the outcome of rheumatoid arthritis: evaluation in two subsets of patients according to severity of radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 682-5.
29. Xia Ofeng Zeng, Maixing AI, Xinping Tian, Xiaodan Gang, Yanping Shi, Qinfang Song et al. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheum* 2003;30:1451-5.
30. Wolfe F, Sharp JT. Radiographic outcome of recent onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1571-82.
31. Erre GL, Tocco A, Fenu P, Dellacà P, Lepori G, Sanna M, et al. Utilità del dosaggio degli Anticorpi anti-cheratina e anti-peptide citrullinato ciclico nel follow-up dei pazienti con artrite reumatoide. *Reumatismo* 2003; 55 (Suppl 5): 23.
32. Van Jaarsveld CHM, der Borg EJ, Jacobs JWG, Schellekens GA, Gmelig-Meyling FHJ, van Booma-Frankfort C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinate antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 689-97.