

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS ANTICORPOS ANTI-CITRULINA E DO FACTOR REUMATÓIDE IgM NA ARTRITE REUMATÓIDE

Ana Lemos,* Maria Piedade Ramos,* Maria José Furtado,* Carla Carvalho,*
Maria José Santos,** J Canas da Silva**, Humberto Ventura*

Resumo

A presença de factor reumatóide da classe IgM (FR-M) no soro é um dos critérios para classificação da artrite reumatóide (AR).

Objectivos: Comparar a sensibilidade e especificidade de dois marcadores de diagnóstico serológico em doentes portugueses com AR: os anticorpos anti-citrulina de 2ª geração (anti-CCP₂) e o FR-M.

Material e Métodos: Foram avaliados 56 doentes com AR estabelecida (44 mulheres e 12 homens; duração média da doença 9,5±8,5 anos) e comparados com um grupo controlo composto por 93 indivíduos com características demográficas idênticas (43 doentes com espondilartropatias e 50 doadores de sangue). A determinação dos anticorpos anti-CCP₂ foi efectuada por fluoroimunoensaio enzimático e a determinação do FR-M foi efectuada por microElisa.

Resultados: Os anticorpos anti-CCP₂ foram positivos em 40 doentes com AR (71,4%) num título médio de 350,5 UA/ml (11-1670 UA/ml) e negativos em todos os indivíduos do grupo controlo. O FR-M foi positivo em 34 doentes com AR (60,7%), em 4 doentes com espondilartropatias (9,3%) e num dador de sangue (2%). A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram de 71,4%, 100%, 100% e 72,9% para os anticorpos anti-CCP₂ e de 60,7%, 90,7%, 89,5% e 63,9% para os FR-M, respectivamente.

Conclusões: A determinação dos anticorpos anti-CCP₂ mostrou ter uma excelente especificidade e uma *performance* global superior ao FR-M neste grupo de doentes com AR estabelecida.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide; Anticorpos Anti-CCP; Factor Reumatóide; Testes Diagnósticos.

Abstract

The presence of IgM class rheumatoid factor (RF-M) in the serum is one of the ACR criteria for the classification of rheumatoid arthritis (RA).

Objectives: To compare the sensitivity and specificity of two diagnostic markers for RA in Portuguese patients: the 2nd generation anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP₂) and the RF-M.

Methods: Serum samples from 56 patients with established RA (44 women and 12 men, mean disease duration 9,5±8,5 years) were evaluated for the presence of anti-CCP₂ and RF-M. Results were compared with 93 samples from a control group with identical demographic characteristics (43 from patients with spondylarthropathies and 50 from healthy blood donors). The determination of anti-CCP₂ antibodies was performed by enzymatic fluoroimmunoassay and RF-M was measured by microElisa.

Results: Anti-CCP₂ antibodies were positive in 40 patients with RA (71,4%) at a mean antibody concentration of 350,5 UA/ml (range: 11-1670 UA/ml) and negative in all controls. The RF-M was positive in 34 patients with RA (60,7%), in 4 patients with spondylarthropathies (9,3%) and in one blood donor (2%). The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for RF-M was 60,7%, 90,7%, 89,5% and 63,9% and for anti-CCP₂ was 71,4%, 100%, 100% and 72,9% respectively.

Conclusions: The anti-CCP₂ assay showed an excellent specificity and a global performance superior to that of the RF-M test in this population with established RA.

Keywords: Rheumatoid Arthritis; Anti-CCP Antibodies; Rheumatoid Factor; Diagnostic Tests.

Introdução

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflama-

*Laboratório de Imunologia, Serviço de Patologia Clínica

**Serviço de Reumatologia, Hospital Garcia de Orta, Almada

tória crónica, potencialmente incapacitante, cujo diagnóstico assenta essencialmente em critérios clínicos. O factor reumatóide (FR) está presente no soro de 70-90% dos doentes, mas apesar de ser um critério para classificação da AR,¹ é um marcador pouco específico, podendo ser positivo noutras doenças reumáticas, em doenças não reumáticas ou em indivíduos saudáveis.² Os FR detectados com maior frequência nos laboratórios clínicos são autoanticorpos da classe IgM dirigidos contra a fracção Fc das imunoglobulinas de classe IgG, mas existem FR de outros isotipos (G, A, E, D).

Os anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico (CCP) fazem parte de uma família de marcadores serológicos da AR utilizados nos últimos quarenta anos e que hoje sabemos serem todos eles dirigidos contra os resíduos citrulinados da filagrina.³ Os primeiros anticorpos desta família a serem estudados foram os anticorpos anti-factor perinuclear (APF) descobertos por Nienhuis *et al* em 1964, utilizando como substrato as células da mucosa oral.⁴ Na sua detecção utilizou-se uma técnica de imunofluorescência indirecta (IFI), mas devido à dificuldade na obtenção do substrato nunca foi implementada na rotina dos laboratórios de diagnóstico. Em 1979, Young *et al* descreveram os anticorpos anti-queratina (AKA).⁵ Estes anticorpos são pesquisados no estrato córneo de esófago de rato por IFI. Esta técnica está implementada na rotina do laboratório de imunologia do Hospital Garcia de Orta desde 1995 e apresenta uma sensibilidade de 43,3% e uma especificidade de 95% na AR.⁶ Tanto os APF como os AKA revelaram-se marcadores com boa especificidade, mas pouco sensíveis. Em 1998 Schellekens *et al* demonstraram que os anticorpos presentes na maioria dos doentes com AR tinham como antígeno alvo os resíduos citrulinados da filagrina.⁷ Na sequência desta descoberta é implementada uma técnica ELISA em que se utiliza como substrato peptídeos citrulinados. No ano 2000 os peptídeos citrulinados são substituídos nos testes ELISA por peptídeos citrulinados cíclicos dando origem aos testes de 1ª geração anti-CCP₁ que revelaram uma sensibilidade superior às técnicas de IFI.³ No início de 2002 várias casas comerciais desenvolveram testes ELISA de segunda geração, os anti-CCP₂, utilizando como antígeno alvo peptídeos ci-

trulinados cíclicos sintéticos que mimetizam a verdadeira disposição conformacional dos epitopos. Com esta alteração no antígeno alvo obteve-se uma melhoria da sensibilidade e da especificidade do teste.⁸

A utilização deste marcador está cada vez mais generalizada na prática clínica. Foi demonstrado que a presença de anti-CCP₂ se associa a uma doença mais grave e com maior destruição articular avaliada radiologicamente.⁹ Nas artrites iniciais os anti-CCP₂ associados à presença de factores reumatóides mostraram ter um valor preditivo positivo (VPP) de 100% para o desenvolvimento de AR.^{10,11}

Antes de implementar este novo teste na rotina do laboratório de imunologia do Hospital Garcia de Orta decidimos fazer a avaliação comparativa do desempenho diagnóstico dos anticorpos anti-CCP₂ com o FR-M na AR estabelecida.

Doentes e métodos

Doentes

Foram estudados 56 doentes caucásicos (44 mulheres e 12 homens), seguidos regularmente na consulta externa de reumatologia com diagnóstico de artrite reumatóide de acordo com os critérios de 1987 do *American College of Rheumatology*¹ cujas características são apresentadas no Quadro I.

Como grupo controlo deste estudo foram avaliados 93 indivíduos: 43 com o diagnóstico de Espondilartropatia (21 com Espondilite Anquilosante, 17 com Artrite Psoriática e 5 com Espondilartropatia Indiferenciada) e 50 dadores de sangue. Entre os soros dos dadores de sangue foi escolhida uma amostra de conveniência com características

Quadro I. Características dos doentes com Artrite Reumatóide (AR), com Espondilartropatias e Dadores

	AR N=56	Espondilartropatias N=43	Dadores N=50
Idade	54 ± 13,3	47,9 ± 11,8	53 ± 20
Sexo feminino	44 (78,5%)	31 (70%)	40 (80%)
Duração doença	9,5 ± 8,5	8,9 ± 9	–
Erosões	35 (62,5%)	–	–
Terapêutica:			
Corticóides	39 (70%)	5 (11%)	
Metotrexato	52 (93%)	18 (41%)	
Anti-TNFα	29 (52%)	27 (62%)	

demográficas idênticas às dos doentes com AR.

Todos os doentes assinaram o consentimento informado para a participação neste estudo, o qual foi efectuado com aprovação da comissão de ética do Hospital Garcia de Orta.

Determinação de anticorpos anti-CCP₂ e FR-M

A determinação de anticorpos anti-CCP₂ foi efectuada por fluoroimunoensaio enzimático (EliA™ CCP Phadia). Os poços de reacção foram revestidos com péptidos citrulinados sintéticos de 2ª geração. Os anticorpos presentes nas amostras, após ligação ao antigénio, foram detectados por um conjugado (anti-IgG humana marcada com β-galactosidase) e revelados por uma solução de desenvolvimento (4-metilumbeliferil-β-D-galactosido). A intensidade da fluorescência é directamente proporcional à concentração de anticorpos no soro. Foram considerados positivos os valores iguais ou superiores a 10 UA/ml.

A determinação do FR-M foi efectuada por imunoensaio enzimático (DIA MeDIX, IVAX Diagnostics, Inc.). Utilizou-se placa de microELISA revestida com o fragmento Fc da imunoglobulina G altamente purificada. Os anticorpos presentes na amostra, após ligação ao antigénio que reveste os pocetos de reacção, foram detectados pelo conjugado (anti-IgM humana marcada com peroxidase de rábano) e revelados pelo cromogénio trimetil benzidina. A intensidade da cor é directamente proporcional à concentração do FR-M presente na amostra. A absorvância foi lida a 450 nm. Foram consideradas positivas as amostras com valores iguais ou superiores a 20 UI/ml.

Análise estatística

Os resultados descritivos são apresentados sob a forma de frequências (%), de médias e desvio padrão (DP). Na comparação entre grupos usou-se o teste *t* de Student. Valores de *p*<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência foram calculados usando o *software* estatístico Analyse IT™ (Leeds, UK).

Resultados

Quarenta doentes (71,4%) com AR

apresentavam anticorpos anti-CCP₂ em título igual ou superior a 10 UA/ml e 34 (60,7%) tinham FR-M em título superior ou igual a 20 UI/ml. O título médio dos anti-CCP₂ foi 350,5±423,5 UA/ml (11-1670) e do FR-M 121,8±115,4 UI/ml (21-500). Ainda que 51,8% dos doentes com AR fosse positiva para ambos os anticorpos, 11 (19,6%) foram positivos exclusivamente para anticorpos anti-CCP₂ e 5 (8,9%) só para o FR-M. O título médio dos anti-CCP₂ e dos FR-M foi superior nos doentes com doença erosiva (98±108,7 UA/ml e 290,5±381,5 UI/ml) quando comparados com os doentes sem erosões radiológicas (62,1±112,3 UA/ml e 184,7±404,6 UI/ml), mas só a diferença entre os títulos de FR-M tem significado estatístico (*p*=0,03). Não encontramos diferenças significativas no título de anti-CCP₂ ou FR-M nos doentes sob terapêutica corticoide ou anti-TNFα.

Nenhum indivíduo do grupo controlo foi positivo para anticorpos anti-CCP₂; no entanto, 4 doentes com espondilartropatias (1 com Artrite Psoriática e 3 com Espondilite Anquilosante) (4,4%) e um dador de sangue (2,2%) foram positivos para o FR-M (Quadro II).

Os anticorpos anti-CCP₂ revelaram uma sensibilidade de 71,4%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo 100%, valor preditivo negativo de 72,9% e eficiência de 83,8%. Por sua vez o FR-M apresentou uma sensibilidade de 60,7%, especificidade de 90,7%, VPP 89,5%, VPN de 63,9% e eficiência de 73,7% (Quadro III). A avaliação do desempenho diagnóstico dos anti-CCP₂ e FR-M está representada na Figura 1. A relação entre especificidade e sensibilidade dos dois testes está representada na Figura 2 através da curva ROC (*receiver operating characteristics curve*).

Discussão

O diagnóstico precoce da AR é desejável, tendo em

Quadro II. Número e percentagem de soros positivos para FR-M e anti-CCP₂

	AR N=56	Espondilartropatias N=43	Dadores N=50
FR-M+ / anti-CCP ₂ +	29 (51,8%)	0	0
FR-M+ / anti-CCP ₂ -	5 (8,9%)	4 (9,3%)	1 (2%)
FR-M - / anti-CCP ₂ +	11 (19,6%)	0	0
FR-M - / anti-CCP ₂ -	11 (19,6%)	39 (90,3%)	49 (98%)

Quadro III. Comparação do desempenho do FR-M e dos anticorpos anti-CCP₂

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Eficiência	AUC
Anti-CCP ₂ Cut-off >20UA/ml	71,4%	100%	100%	72,9%	83,8%	0,866
RF-M Cut-off >20UI/ml	60,7%	90,7%	89,5%	63,9%	73,7%	0,787

VPP – Valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; AUC – área sob a curva ROC.

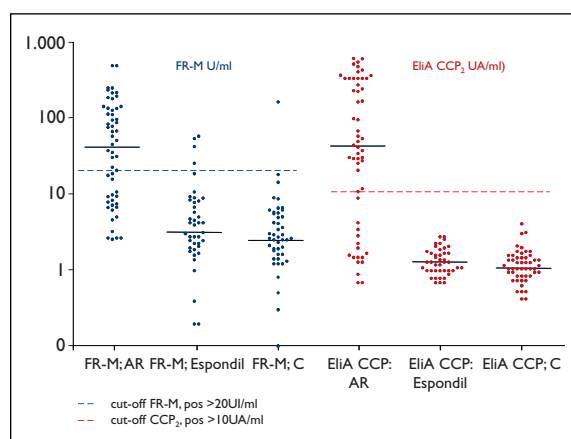


Figura 1. Títulos do FR-M (azul) e dos anticorpos anti-CCP₂ (vermelho) nos doentes com artrite reumatóide (RA), espondilartropatias (Espondil) e controlos saudáveis (C).

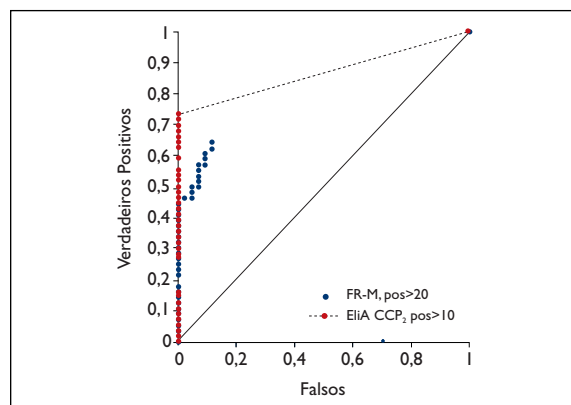


Figura 2. Desempenho dos anticorpos anti-CCP₂ e do FR-M.

conta que uma terapêutica instituída atempadamente pode prevenir lesões articulares irreversíveis e os marcadores serológicos são um auxiliar importante no diagnóstico desta doença.

Neste estudo, tanto os FR-M determinados por

microELISA como os anti-CCP₂ mostraram um bom desempenho no diagnóstico da AR. Para o FR-M encontramos uma sensibilidade (60,7%) e especificidade (90,7%), valores sobreponíveis aos descritos na literatura.¹² Os anti-CCP₂ tiveram no entanto um melhor desempenho apresentando sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e eficiência em cerca de 10% superiores ao FR-M. A elevada sensibilidade (71,4%) e especificidade (100%) dos anti-CCP₂ na nossa população está de acordo com os trabalhos de outros autores.¹³ A alta especificidade do anti-CCP₂ é o aspecto mais relevante deste teste, sendo de realçar a capacidade que demonstrou para discriminar a AR das espondilartropatias seronegativas (análise da curva ROC com uma AUC de 0,866). Observou-se ainda uma marcada diferença na concentração de anti-CCP₂ entre doentes positivos com AR (416 UA/ml) e as amostras do grupo controlo (1,8 UA/ml).

Apesar de mais de metade dos doentes com AR ser positiva para ambos os testes, não há uma sobreposição total entre os resultados do FR-M e anti-CCP₂. Os anti-CCP₂ revelaram-se positivos em 11 doentes com AR (19,6%) nos quais os FR-M foram negativos, conferindo ao teste CCP₂ uma maior sensibilidade face ao FR-M. Esta maior sensibilidade estará relacionada com o facto deste estudo ter envolvido doentes com AR bem caracterizada, assim como ter sido utilizado para a determinação de anticorpos anti-citrulina um teste de 2ª geração. Recentemente, alguns autores ao compararem o teste de 2ª geração com o FR-M no diagnóstico de AR obtiveram resultados semelhantes aos descritos neste trabalho.¹⁴⁻¹⁶ Também estudos comparativos entre testes de 2ª geração (anti-CCP₂) e 3ª geração (anti-CCP₃) demonstraram uma igual ou maior sensibilidade dos anti-CCP₂,^{17,18} confirmando-se a sua maior valia no diagnóstico desta doença.¹⁹⁻²¹

A presença de FR-M em título elevado e de anti-CCP tem sido descrita como um marcador prog-

nóstico na AR.^{9,22} Neste estudo os doentes com AR erosiva apresentavam títulos mais elevados de FR-M e anti-CCP₂, mas a pequena dimensão da amostra e o desenho do estudo não permite avaliar essa característica do teste.

Os nossos resultados confirmam a excelente *performance* diagnóstica dos anti-CCP₂ na AR e que o recurso aos dois testes, anti-CCP₂ e FR-M, pode aumentar o potencial de diagnóstico de AR numa primeira abordagem clínico laboratorial.

Correspondência para

Ana Lemos
Laboratório de Imunologia
Serviço de Patologia Clínica
Hospital Garcia de Orta
Av. Prof. Torrado da Silva
2800 Almada
E-mail: amarialemos@hotmail.com

Referências

- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-24.
- Pincus T. Laboratory tests in rheumatic disorders. In Klippel J, Dieppe P ed. *Rheumatology* 2nd ed. London: Mosby, 1997;2:10.4-5.
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-163.
- Nienhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: the antiperinuclear factor *Ann Rheum Dis* 1964; 23:302-305.
- Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med J* 1979; 2:97-99.
- Pimentel dos Santos FM, Ramos P, Tavares V, et al. Anticorpos anti-queratina: interesse diagnóstico e prognóstico na artrite reumatóide (resumo). *Acta Reum Port* 1999, 24: 53.
- Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101:273-281.
- Riedemann JP, Munoz S, Kavanaugh A. The use of second generation anti-CCP antibody (anti-CCP2) testing in rheumatoid arthritis - a systematic review. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:S69-76.
- Van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Bredveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:949-958.
- Raza K, Breese N, Nightingale P, et al. Predictive Value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32:231-238.
- Nielen MM, Schaardenburg D, Reesink HW et al. Specific autoantibodies precede symptoms of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380-386.
- Galleen FA, Linn-Rasker SP, Venrooij WJ, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 709-715.
- Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:845-851.
- Sauerland U, Becker H, Seidel M, et al. Clinical Utility of the Anti-CCP Assay Experiences with 700 Patients. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*2005;1050:314-318.
- Santos E, Cerveira C, Neves E, Figueiras O, Carneiro P. Diagnostic Performance of Rheumatoid Factor Antibodies Anti-cyclic Citrullinated Peptide and Anti-Keratin in Rheumatoid Arthritis in Shoenfeld Y, Gershwin M E. *Autoimmunity Reviews-Abstracts of 5th International Congress on Autoimmunity*. Amsterdam. Elsevier, 2006: 343-344.
- Correia M L, Carvalho S G, Pereira M H. Rheumatoid Arthritis and Control Patients in Shoenfeld Y, Greshwin M E. *Autoimmunity Reviews-Abstracts of 5th International Congress on Autoimmunity*. Amsterdam. Elsevier, 2006:331
- Bizarro N, Villalta D, Tozzoli R, Tonutti E. A Comparative evaluation of 11 Second and Third Generation Elisa Methods for the Detection of Antibodies to Citrullinated Proteins in Shoenfeld Y, Gershwin M E. *Autoimmunity Reviews-Abstracts of 5th International Congress on Autoimmunity*. Amsterdam. Elsevier, 2006: 22-23
- Abreu I, Cardoso C, Martins T, Chaves J. Evaluation of Anti-CCP antibodies by Two Different Methods in Shoenfeld Y, Greshwin M E. *Autoimmunity Reviews-Abstracts of 5th International Congress on Autoimmunity*. Amsterdam. Elsevier, 2006:325
- Garcia Berrocal B, González C, Pérez M, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies in IgM rheumatoid factor-positive patients. *Clinica Chimica Acta* 2005;354; 123-130.
- Vallbrach I, Rieber J, Oppermann M, Forger 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; 1079-1084.
- Abreu I, Laroche P, Bastos A et al. Multiplexed Immunoassay for detection of Rheumatoid factors by FIDIS technology. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050:357-363.
- Zendman AJ, Venrooij WJ, Pruijn GJ. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Reumatology* 2006;45:20-25.