

Gli esami in autoimmunologia nella diagnosi e nel monitoraggio dell'artite reumatoide: la risposta del laboratorio

M. Tampona

Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Policlinico di Bari

Riassunto

Il trattamento precoce dell'Artrite Reumatoide (AR) previene il danno articolare, ma un'accurata diagnosi nella fase iniziale della malattia può essere difficile. Per anni la determinazione del fattore reumatoide (FR) è stato l'unico test di laboratorio utilizzato per la diagnosi e la prognosi di pazienti affetti da malattia articolare infiammatoria. Recentemente molti autoanticorpi hanno mostrato performance diagnostiche migliori e sono stati proposti come marcatori di diagnosi e prognosi di AR. Più promettenti tra tutti gli autoanticorpi anti-proteine cicliche citrullinate (APCA): sono altamente specifici di AR, si riscontrano precocemente nel decorso clinico della malattia, sono associati a più severo danno articolare ed a maggiore attività di malattia. Importanti progressi sono stati compiuti nella identificazione e determinazione di APCA e molti kit ELISA sono oggi disponibili. L'automazione dei metodi garantisce l'accuratezza analitica e ne permette un utilizzo routinario nei laboratori clinici.

Summary

Autoantibody testing in the diagnosis and monitoring of Rheumatoid Arthritis: the role of Laboratory Early treatment prevents progression of joint damage in Rheumatoid Arthritis (RA) but diagnosis in early disease is impeded by lack of appropriate diagnostic criteria. For decades, the determination of rheumatoid factor (RF) has been the central autoimmune laboratory test, playing a critical role for both diagnosis and prognostication in recent-onset synovitis/early arthritis patients. Recently, several additional autoantibodies have demonstrated better performances than RF and have been proposed as diagnostic and prognostic markers for RA. Most prominently, anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPA) are highly specific for RA, can be found early in the disease course and are associated with more severe joint destruction and disease activity. Important progress has been made in the detection and identification of ACPA and many ELISA kits are commercially available. In addition, full automation of the assay, featuring ease of use, rapid response and high productivity, have increase their use for diagnostic and prognostic purposes in RA patients.

Introduzione

Durante gli ultimi anni i protocolli terapeutici per l'artrite reumatoide (AR) hanno subito considerevoli modifiche. L'evidenza della comparsa di erosioni articolari entro i primi mesi del decorso clinico di AR ha condotto a riconoscere l'importanza dell'istituzione precoce di farmaci in grado di ritardare la progressione di malattia. Tale vantaggio è stato dimostrato nel corso di molti studi clinici che hanno incluso pazienti con durata media di insorgenza dei sintomi inferiore a 1 anno. È stato evidenziato che un trattamento iniziato entro 3 mesi dall'insorgenza dei sintomi assicura al paziente un migliore esito ed una migliore qualità di vita nel lungo termine¹.

Il trattamento precoce di AR richiede, però, una accurata

diagnosi differenziale, che nella fase iniziale di malattia infiammatoria articolare può essere difficoltosa. La presentazione clinica di AR e di altre artriti precoci non è sempre caratteristica; gli stessi criteri classificativi dell'American College of Rheumatology (ACR), nati con lo scopo dichiarato di permettere una precisa classificazione dei pazienti con malattia stabilita, presentano dei limiti se applicati a pazienti con forme cliniche all'esordio².

Autoanticorpi specifici di AR

La disponibilità di test di laboratorio capaci di distinguere tra AR ed altre forme di artrite si dimostra quindi clinicamente utile. Fra i criteri classificativi ACR per AR, il fattore reumatoide (FR) è l'unico marker sierologico con-

templato. E' stato dimostrato che la sua presenza è associata ad una diagnosi più sfavorevole per distruzione cartilaginea e disabilità articolare, specialmente se ad alto titolo. Il FR, tuttavia, è spesso negativo o presente a basso titolo nelle fasi iniziali di malattia e può risultare positivo in corso di altre patologie autoimmuni, infezioni virali e batteriche, e anche in soggetti sani.

Anticorpi anti-proteine cicliche citrullinate (APCA), descritti negli ultimi anni in pazienti con AR, si sono dimostrati sensibilmente più specifici. Gli APCA sono anticorpi diretti contro varie proteine nelle quali i residui di arginina sono stati convertiti in citrullina tramite modifiche post-traduzionali, catalizzate dagli enzimi peptidil-argininadeaminasi. A seconda del substrato utilizzato, sono stati sviluppati diversi test per il dosaggio degli APCA. Le cellule della mucosa buccale umana e l'esofago di ratto hanno fornito il substrato antigenico per gli anticorpi anti-fattore perinucleari (APF) e anti-cheratina (AKA). APF sono presenti nel 40-90% dei pazienti con AR con una specificità variabile dal 73% al 99%, gli AKA presentano una sensibilità compresa tra il 36% e il 59% ed una specificità tra l'88% e il 99%. Nonostante la loro elevata specificità diagnostica, la difficoltà nella standardizzazione dei substrati naturali e l'interpretazione soggettiva del pattern di immunofluorescenza indiretta hanno ostacolato la diffusione di questi test. Quando è stato dimostrato che sia gli anticorpi anti-fattore perinucleare che gli anti-cheratina, reagiscono con proteine citrullinate come la filaggrina, la ricerca di APCA è stata eseguita utilizzando metodiche di immunoblot e di immunoenzimatica.

Inizialmente è stato commercializzato un test immunoenzimatico che utilizzava un peptide ciclico citrullinato derivato dalla filaggrina (anti-CCP1)³. In numerosi studi sono stati riportati valori di sensibilità compresi tra il 41% (corrispondente ad una specificità del 97.8%) e il 68% (corrispondente ad una specificità del 98%) in AR stabilita. Con lo sviluppo di test di II generazione (anti-CCP2), che utilizzano un peptide ciclico sintetico, la sensibilità è aumentata fino al 80%, mantenendo livelli di specificità elevati.

Oltre all'alto valore diagnostico, gli anticorpi anti-CCP possono essere presenti precocemente nel corso di malattia, persino anni prima della comparsa dei segni e sintomi clinici; la sensibilità diagnostica aumenta progressivamente nel tempo fino a raggiungere i valori del 70% al momento della presentazione dei primi sintomi. Anche il FR può essere presente prima della comparsa dei segni e sintomi di malattia, ma la sua positività è più recente e la percentuale di pazienti che si positivizza alla diagnosi è più bassa che non quella per anti-CCP. L'associazione FR e anticorpi anti-CCP permette di individuare pazienti con Early Arthritis (EA) che svilupperanno malattia conclamata⁴.

Gli anticorpi anti-CCP hanno mostrato anche un elevato valore predittivo per lo sviluppo di lesioni articolari erosive. In un noto studio prospettico, condotto su pazienti affetti da artrite, sono stati valutati numerosi parametri clinici e sierologici ed è stato sviluppato un modello predittivo capace di discriminare artriti autolimitantesi, artriti persistenti ed artriti persistenti erosive⁵. La presenza di anticorpi anti-CCP e la durata dei sintomi superiore a 6 mesi sono stati i due parametri in grado di predire lo sviluppo di artrite persistente, e gli anticorpi anti-CCP, da soli,

correlano con lo sviluppo di artrite persistente erosiva. Studi successivi, condotti con i test di II generazione, hanno confermato la presenza di anti-CCP come ottimo indicatore prognostico di lesioni erosive radiologicamente documentate durante follow-up di 2 anni.

Non è chiaro se il dosaggio degli autoanticorpi anti-CCP possa essere utilizzato come parametro bioumorale nel monitorare la malattia e l'effetto del trattamento farmacologico. I primi studi condotti in pazienti affetti da AR in trattamento con farmaci biologici hanno dimostrato che nei pazienti ACR-responder i livelli di FR si riducono; i livelli di anti-CCP, dopo un iniziale decremento, ritornano ai valori precedenti l'inizio del trattamento⁶ o persistono invariati anche dopo 3 anni dalla diagnosi. Altri autori, invece, hanno segnalato una riduzione significativa dei livelli di anti-CCP dopo 34 settimane dall'inizio del trattamento e una riduzione variabile dal 25% al 50% solo nel primo anno di malattia. Il dosaggio degli anticorpi anti-CCP pertanto non sembrerebbe utile nel monitorare il trattamento dell'AR. Il diverso comportamento del FR avvalorerebbe l'ipotesi che differenti meccanismi fisiopatologici di modulazione intervengono nel modificare i livelli circolanti dei due autoanticorpi.

Anticorpi anti-CCP sono stati dosati nel liquido sinoviale (LS), ma il significato clinico della loro determinazione non è ancora definito. In pazienti affetti da AR gli anti-CCP sono presenti nel LS a livelli più elevati rispetto a quelli presenti in pazienti affetti da osteoartrite ed artrite psoriasica. Inoltre il rapporto tra la concentrazione di anti-CCP-IgG e quella delle IgG-totali (anti-CCP IgG/IgG) nel LS risulta elevato confermando l'ipotesi della loro produzione intra-articolare. I livelli anticorpali nel LS, tuttavia, non differiscono significativamente da quelli riscontrati nel siero degli stessi pazienti e non sembrano correlare con altri parametri clinici e di laboratorio: questi dati inducono a ritenere il loro dosaggio nel LS poco utile a fini diagnostici e di monitoraggio di malattia, limitandone l'uso allo studio di casi selezionati con sintesi intra-articolare preferenziale⁷.

Accuratezza diagnostica dei metodi

Per la ricerca degli anticorpi anti-CCP sono oggi disponibili test di seconda e terza generazione (CCP2 e CCP3) che utilizzano peptidi ciclici sintetici, che hanno portato ad un incremento significativo della sensibilità analitica (circa l'80%), mantenendo un'elevata specificità (98-99%). La valutazione dell'accuratezza diagnostica dei test anti-CCP presenti in commercio ha dimostrato che la specificità dei kit è omogeneamente alta, mentre la sensibilità è significativamente diversa. Diversi possono essere i motivi di tale dato: differenti valori di cut off utilizzato nei vari studi, differente selezione clinica dei pazienti valutati, differente formulazione dell'antigene utilizzato. Bizzaro e coll. hanno confrontato undici kit commerciali di seconda e terza generazione, testando 100 campioni di pazienti con AR e 202 campioni di soggetti sani e pazienti con altre patologie autoimmuni, virali o neoplasie. I kit utilizzavano differenti substrati antigenici citrullinati: peptide ciclico sintetico originale, peptidi citrullinati provenienti da sequenze virali, vimentina umana mutata, filaggrina ricombinante di ratto, peptide citrullinato sintetico, peptidi citrullinati ciclici sinte-

Tabella I. Antigeni selezionati contenuti nel “synovial proteome” microarray.

Antigeni AR correlati	peptidi di citrullina ciclica e peptidi lineari di filaggrina (12), peptidi di collagene tipo II (~400), peptidi di HCgp39 (~70), peptidi hnRNP A2 (14), Ro 60/52, La, HSP 60,70,90, human recombinant BiP, cheratina, vimentina, fibrinogeno nativo e ricombinante, peptide A e B del fibrinogeno. Collagene tipo I-V, acetil-calpastatina, annexina V, hnRNP ricombinante B1 e D, GPI
Altri antigeni	dsDNA, RNA, rRNA,PDH, aldolasi, topoisomerasi I, Jo-1, proteine snRNP, complesso Sm, Scl-70, Scl-100, PARP, cardioplipina
Controlli	antigeni di Candida, vaccino anti-epatite A e B, vaccino pneumococcico, vaccino influenzale.IgG/IgM umane

HCgp39:human cartilage glycoprotein 39; HSP:heat shock protein; BiP:endoplasmic molecular chaperone; hnRNP: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; PDH:pyruvate dehydrogenase; GPI: glucose-6-phosphate isomerase; rRNA:ribosomal-RNA; snRNP:small nuclear RNP; Sm complex:Smith complex; PARP:poly(ADP-ribose) polymerase.

tici multipli. I valori di sensibilità e specificità ottenuti mediante l'analisi delle curve ROC sono stati compresi tra il 60% e 75%, e tra 89.1% e 98.5% rispettivamente. Ad una specificità del 98.5% i diversi kit mostravano una differente sensibilità compresa tra il 41% e 74%. E' emersa una buona concordanza in tutti i kit che utilizzavano l'antigene ciclico sintetico originale, minore concordanza tra questi kit e quelli che utilizzavano altri peptidi o proteine citrullinate. Le variazioni metodologiche nella preparazione del test non sono sembrate rilevanti per l'accuratezza diagnostica; la variabile più importante è stata la sorgente antigenica: la quantità e la posizione del residuo di arginina citrullinata sono determinanti per la sensibilità di un test, la presenza di proteine o di sequenze peptidiche contaminanti sono più importanti per la sua specificità diagnostica. Pertanto la scelta del kit commerciale per il dosaggio di anticorpi anti CCP è molto importante per ottenere buoni risultati⁸.

Automazione

I metodi ELISA per la ricerca degli APCA sono oggi disponibili su sistemi automatizzati e questo ha rappresentato un ulteriore vantaggio per la diffusione di questo test nei laboratori. L'accuratezza analitica dei test ELISA per la ricerca di anticorpi anti-CCP persiste anche quando il dosaggio viene eseguito in completa automazione. L'imprecisione analitica espressa come CV% within-run e total CV% è risultata inferiore a quanto dichiarato in letteratura per i test ELISA su micropiastra in generale, ed è pienamente accettabile se comparato a quella dichiarata per il dosaggio di altri anticorpi. Il valore della sensibilità funzionale del dosaggio di questi anticorpi è risultato ben al di sotto del valore di cut-off utilizzato per la sensibilità clinica del test e il test di diluizione ha mostrato un profilo di precisione con un alto grado di accuratezza analitica⁹. Ciascun laboratorio è in grado di valutare la precisione analitica e l'accuratezza diagnostica del test APCA sulla strumentazione in uso attraverso l'utilizzo di protocolli di validazione standardizzati e facili da eseguire.

Microarray

Recenti sviluppi nella tecnologia proteomica hanno aperto la possibilità di discriminare centinaia di diversi analiti, proteine o anticorpi, contemporaneamente, con ridotti tempi di reazione e piccola quantità di materiale. In commercio ci sono già alcuni test che usano la tecnologia ALBA/

ALBIA (addressable laser bead arrays /addressable laser bead array-immunoassay) automatizzata, per la definizione dei profili autoanticorpali di patologie autoimmuni sistemiche ed organo specifiche. E' in via di definizione un sistema microarray, “synovial proteome” in grado di misurare reattività contro un elevato numero di peptidi citrullina-modificati contemporaneamente (Tab. I, modificata)¹⁰. L'arthritis chips include per la maggior parte antigeni che ricercano anticorpi altamente specifici di AR (peptidi ciclici di citrullina, peptidi lineari di filaggrina, cheratina, vimentina, fibrinogeno citrullinato, peptidi del collagene tipo II) che, rispetto alla ricerca di singoli anticorpi, comporta indubbi vantaggi in termini di performance analitiche (aumento della sensibilità e della specificità, ridotti tempi di risposta, miniaturizzazione spinta). Nel pannello antigenico, tuttavia, sono pure presenti proteine verso le quali sono diretti anticorpi di cui è dimostrata l'associazione con altre patologie autoimmuni sistemiche (Lupus Eritematoso Sistemico, S. di Sjögren, Sclerosi Sistemica, Dermatopolimiosite), o altre proteine che riconoscono anticorpi di cui non è ancora noto il significato clinico; eventuali reattività verso questi antigeni devono essere opportunamente valutate ed interpretate.

Se l'obiettivo di un multiplex testing è di aumentare la sensibilità e specificità per la diagnosi di AR, tuttavia è necessaria un'appropriata formulazione dei profili analitici basata sull'evidenza e sull'analisi economica da un lato, e sulla valutazione degli outcome clinici dall'altro.

Modelli statistici capaci di valutare “overlap of reactivities” permetterebbero ai clinici di ottenere informazioni sierologiche utili sia nella fase diagnostica per la classificazione delle artriti sia nel reclutamento e selezione di pazienti da sottoporre a trial clinici.

In conclusione, nuovi autoanticorpi sono stati descritti in pazienti con AR e nuovi test sono stati sviluppati per il loro dosaggio. Tra questi gli anticorpi anti-CCP sono entrati di diritto nella pratica di routine. I dati emersi dimostrano che essi presentano elevata specificità diagnostica ed elevato valore predittivo positivo di sviluppo di AR in pazienti con EA e di lesioni erosive, performance utili a differenziare l'AR da altre forme di artrite e a selezionare pazienti da sottoporre a trattamenti più aggressivi.

Bibliografia

1. Nell VP, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early

- rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 906-14.
2. Symmons DP, Hazes JM, Silman AJ. Cases of early inflammatory polyarthritis should not be classified as having rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30:902-4.
 3. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43:155-63.
 4. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans 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.
 5. 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.
 6. Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avalle S, Bugatti S, Montecucco C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:R264-72.
 7. Spadaro A, Riccieri V, Alessandri C, Scivo R, Valesini G. Utilità della determinazione degli anticorpi anti-peptidi ciclici citrullinati nell'analisi del liquido sinoviale di pazienti con artite reumatiche. *Reumatismo* 2006; 58:116-20.
 8. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta V. Analytical and diagnostic characteristics of 11 2nd and 3rd-generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clin Chem* 2007; 53:1527-33.
 9. Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Lapadula G, Pansini N. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies measured by an automated enzyme immunoassay: analytical performance and clinical correlations. *Chim Clin Acta* 2005; 355:137-44.
 10. Hueber W, Utz PJ, Robinson W.H. Autoantibodies in early arthritis: advances in diagnosis and prognostication. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21:S59-64.