

CAT: anti-Cyclic Citrullinated Peptide antistoffen



Apr. Dries Coenen

14 maart 2006

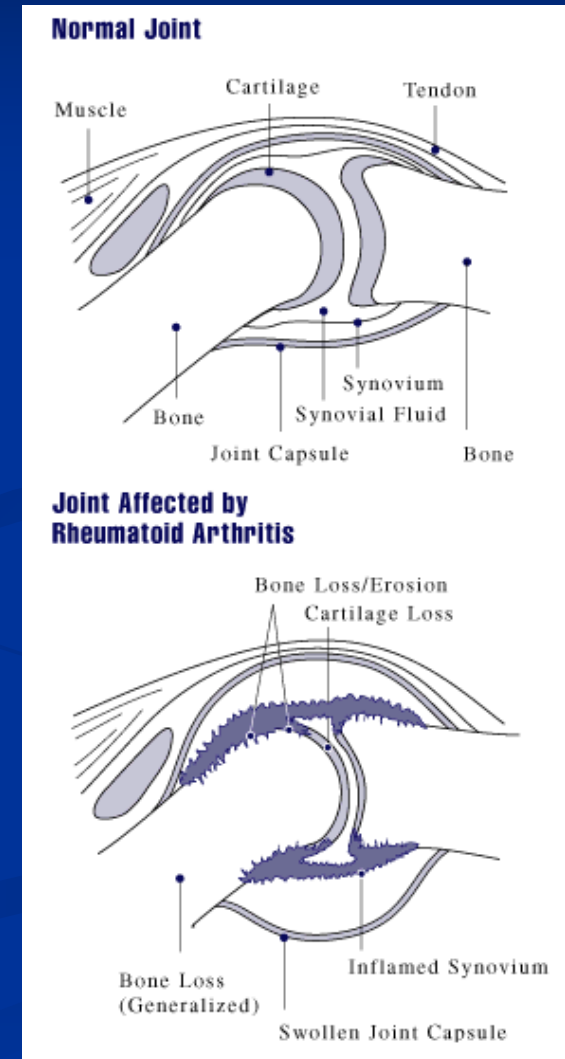
Rheumatoïde arthrititis (RA)

- Chronische systemische autoimmuun aandoening
- Oorzaak voorlopig onbekend
- Symmetrische synovitis leidend tot progressieve gewrichtsbeschadiging
- Prevalentie 1%
- Meer vrouwen (3x) > mannen



Symptomen RA

- Synovitis is het fundamentele kenmerk
 - aantasting kraakbeen en bot
 - leidend tot pijn, stijfheid en functieverlies
- Ook systemische klachten mogelijk
 - Moeheid, gewichtsverlies, koorts, extra-articulaire manifestaties (huid, hart, bloedvaten, longen)



Diagnose

- Anamnese en lichamelijk onderzoek
- Aangevuld met
 - Serologisch onderzoek
 - Radiologisch onderzoek / MRI
- ACR-criteria
 - gouden standaard voor classificatie

American College of Rheumatology (ACR)-criteria

1. Ochtendstijfheid (> 6 weken)
2. Arthritis ≥ 3 gewricht(sgebied)en (> 6 weken)
3. Arthritis van hand- of polsgewrichten (> 6 weken)
4. Symmetrische arthritis (> 6 weken)
5. Onderhuidse verdikkingen (reumanoduli)
6. Reumafactor in serum
7. Gewrichtsbeschadigingen op RX

Patiënten geclassificeerd als RA indien $\geq 4 / 7$

Vroeg stadium RA

- Niet voldaan aan ACR-criteria
 - Chroniciteit (> 6 weken)
 - Radiologische schade nog niet aantoonbaar
- Vroege diagnose problematisch

Therapie

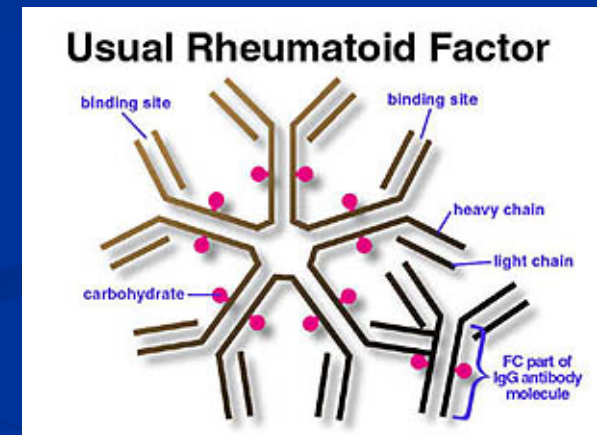
- Meeste gewrichtsschade gedurende eerste 2 jaar na aanvang symptomen
- Daarom vroege en agressieve therapie met DMARDs (disease modifying anti-rheumatatic drugs)
 - vertragen / stoppen van de gewrichtsbeschadiging
 - wel bijwerkingen

Serologische markers voor diagnose van RA

- Reumafactor
- Antistoffen tegen gecitrullineerde epitopen

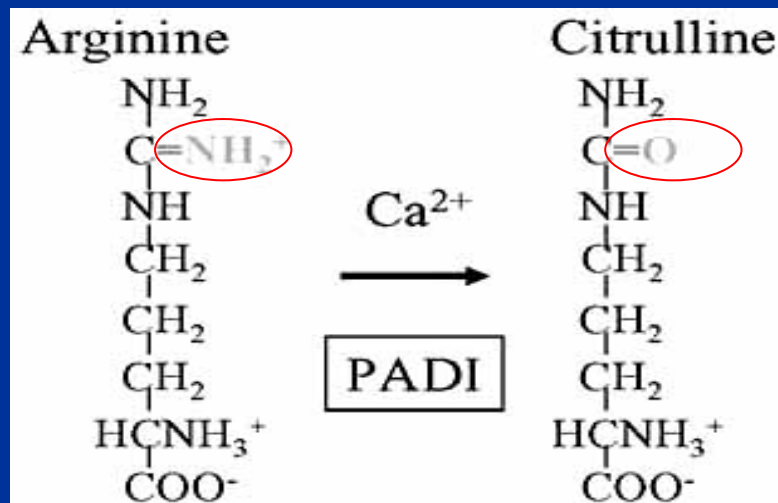
Reumafactor

- Antistoffen tegen Fc deel van IgG
- Meestal IgM
- Sensitiviteit 50-90%
- Specificiteit 70-90%
- Vals positieven bij
 - gezonden
 - autoimmuunaandoeningen
 - infectieuze aandoeningen
- Niet geschikt voor 'rule in' of 'rule out' RA



Antistoffen tegen gecitrullineerde epitopen

- Citrullinatie = post-translationele enzymatische modificatie door PAD (peptidyl arginine deiminase)
- Functie van citrullinatie nog onbekend

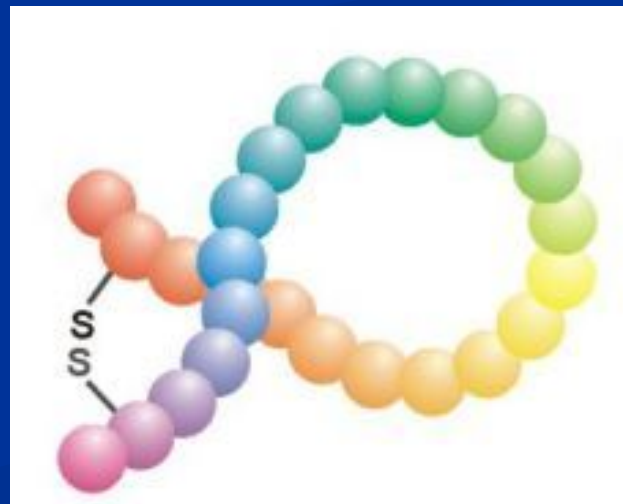


Antistoffen tegen gecitrullineerde peptiden/proteïnen

- Verschillende gecitrullineerde antigenen beschreven
 - anti-perinucleaire factor (1964)
 - humane wangslimvliescellen (IIF)
 - anti- keratine (1979)
 - stratum corneum van ratteslokdarmepitheel (IIF)
 - Beiden herkennen gecitrullineerd filaggrine (eiwit in de epidermis)

Anti-cyclic citrullinated peptide antistoffen

- Synthetisch peptide gebaseerd op sequentie van humaan filaggrine
- Cyclisatie door substitutie van 2 serines door cysteïnes (disulfidebrug)
- ELISA
 - 1^e generatie (2000)
 - 2^e generatie (2002)
 - 3^e generatie (2005)



Aanleiding CAT

- Huidige kit in LAG: Euro-Diagnostica (CCP2 ELISA op microtiterplaat)
- Overschakeling naar nieuwe versie waarbij gewerkt wordt op KT
- Echter twijfels over reproduceerbaarheid van deze test, vooral bij hogere titers
 - *zijn er betere alternatieven?*
- Eerst eens kijken naar waarde van anti-CCP bij
 - *diagnose*
 - *prognose*
 - *follow-up*

Analytische performantie

- zie studie Gasthuisberg

Diagnostische performantie van CCP2

- Systematische review van *Riedemann et al. (2005)*
- Literatuur van jan 2002 tot juni 2005
- 13 studies over diagnostische performantie van CCP2
- 2672 RA patiënten en 2735 controles
- Sensitiviteit: 70.2 %
 - ‘established’ RA: 64.4 – 96 %
 - ‘early’ RA: 14.4 – 83.5 %
- Specificiteit: 93.6 %
 - 88.9-100 %
- Verschillen tussen studies in patiëntenpopulaties, definitie ‘early’ en ‘established’, gebruikte kit en cutoff

Meerwaarde van anti-CCP bij diagnose van RA

- Aanwezigheid voor aanvang RA symptomen
- Aanwezigheid bij RF-negatieve RA-patiënten
- Rol bij differentiële diagnose bij RF-positieve patiënten

Aanwezigheid voor aanvang RA symptomen

- Retrospectieve studies bij bloeddonoren
 - *Rantapää-Dahlqvist et al. (2003)*
 - CCP2 (Euro-Diagnostica)
 - 83 RA patiënten (98 stalen)
 - 28 (34%) anti-CCP positief (mediaan **2.5 j** (interquartile range 1.1-4.7) voor symptomen)
 - *Berglin et al. (2004)*
 - CCP2 (Euro-Diagnostica)
 - 59 RA patiënten
 - 22 (37%) anti-CCP positief (mediaan **2 j** (interquartile range 0.9-3.9) voor symptomen)
 - *Nielen et al. (2004)*
 - 'in house' ELISA
 - 79 RA patiënten
 - 39 (49%) anti-CCP positief (mediaan **4.8 j** (range 0.1-13.8) voor symptomen)

Aanwezigheid voor aanvang RA symptomen

- Prospectieve studie
 - *Van Gaalen et al. (2004)*
 - CCP2 (Euro-Diagnostica)
 - 346 patiënten met ‘undifferentiated arthritis’
 - 318 patiënten over na 3 jaar follow-up
 - 69 anti-CCP + ‘at baseline’
 - 64 RA (93%)
 - 249 anti-CCP – ‘at baseline’
 - 63 RA

Table 3. Anti-CCP antibodies and prediction of RA in patients with UA*

	Patients fulfilling ACR RA criteria, no. (%)		
	After 1 year	After 2 years	After 3 years
Anti-CCP positive (n = 69)	57 (83)	62 (90)	64 (93)†
Anti-CCP negative (n = 249)	46 (18)	60 (24)	63 (25)
Total (n = 318)	103 (32)	122 (38)	127 (40)

Aanwezigheid voor aanvang RA symptomen

Besluit:

- anti-CCP voor optreden symptomen aantoonbaar
- positief resultaat: hoge waarschijnlijkheid tot ontwikkeling RA
- negatief resultaat: RA niet uitgesloten

Aanwezigheid bij RF-negatieve RA-patiënten

- *Vallbracht et al. (2005)*
 - CCP2 (Euro-Diagnostica) en RF-isotypes
 - 295 RA patiënten
 - 99 IgM-RF -
 - 38/99 anti-CCP +

RF combinations	All, <i>n</i> (%)	CCP-positive, <i>n</i> (%)	CCP-negative, <i>n</i> (%)
All RA patients	295 (100)	190 (64.4)	105 (35.6)
All 3 RF isotypes negative	87 (29.5)	30 (34.5)	57 (65.5)
Only IgG-RF negative	166 (56.3)	86 (51.8)	80 (48.2)
Only IgA-RF negative	145 (49.2)	67 (46.2)	78 (53.8)
Only IgM-RF negative	99 (33.6)	38 (38.4)	61 (61.6)

Rol bij differentiële diagnose bij RF-positieve patiënten

- Slechts 25% van RF-positieve patiënten heeft RA
 - RF eveneens positief bij andere autoimmuun of infectieuze aandoeningen
- anti-CCP bruikbaar bij DD omwille van zijn hoge specificiteit

Rol bij differentiële diagnose bij RF-positieve patiënten

Disease	RF positivity	anti-CCP2 positivity
SLE	15-35 %	5.5% ¹
Sjögren syndrome	75-95 %	13.3% ²
Systemic sclerosis	20-30 %	/
polymyositis/dermatomyositis	5-10 %	/
cryoglobulinemie	40-100 %	7 % ³
MCTD	50-60 %	/

- 1 Hoffman IE, Peene I, Cebecauer L, Isenberg D, Huizinga TW, Union A, Meheus I, De Bosschere K, Hulstaert F, Veys EM, De Keyser F. Presence of rheumatoid factor and antibodies to citrullinated peptides in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005 Feb;64(2):330-2.
- 2 Gottenberg JE, Mignot S, Nicaise-Rolland P, et al. Prevalence of anticyclic citrullinated peptide and antikeratin antibodies in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005;64:114-7.
- 3 Wener MH, Hutchinson K, Morishima C, et al. Absence of antibodies to cyclic citrullinated peptide in sera of patients with hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 2004;50:2305-8.

Wat is nog de waarde van RF?

- 1 van de 7 ACR-criteria
- Prognostische waarde
 - RF-positieve RA gepaard met
 - meer radiologische gewrichtsschade
 - meer extra-articulaire manifestaties
- Combinatie RF en anti-CCP zeer specifiek voor RA

Prognostische waarde van anti-CCP

- Voorspelling van radiologische gewrichtsschade
 - Verschillende studies hebben gewrichtsschade geëvalueerd met behulp van radiologische scores bij anti-CCP + en – RA-patiënten
 - anti-CCP + ontwikkelen significant meer radiologische gewrichtsschade dan anti-CCP –

Is follow-up van behandeling met anti-CCP mogelijk?

Study	Treatment	Cohort	Follow-up	Outcome
<i>Bobbio-Pallavicini</i>	Infliximab/MTX	30	78 weeks	No effect on anti-CCP levels (87% responders)
<i>Caramaschi</i>	Infliximab/MTX	27	22 weeks	No effect on anti-CCP levels (74% responders)
<i>De Rycke</i>	Infliximab/MTX	62	30 weeks	No effect on anti-CCP levels (100% responders)
<i>Nissinen</i>	Infliximab/DMARDs	25	6 weeks	No effect on anti-CCP levels (60% responders)
<i>Allesandri</i>	Infliximab/MTX	43	24 weeks	Decrease in anti-CCP in patients with clinical improvement
<i>Spadaro</i>	MTX	20	6 months	No effect on anti-CCP levels
<i>Chen</i>	Etanercept	52	3 months	Decrease in anti-CCP
<i>Rönnelid</i>	DMARDs	279	5 years	Anti-CCP stable; only small drop in 1st year (not correlating with disease)
<i>Mikulic</i>	DMARDs	66	variable	Small anti-CCP reduction in 52% of patients; no association with response

Is follow-up van behandeling met anti-CCP mogelijk?

- Hoe valide zijn de studies?
 - De studies van *Alessandri*, *Chen*, *Rönnelid* en *Mikuls* houden geen rekening met analytische reproduceerbaarheid en lineariteit van de gebruikte assay
- Besluit:
 - Follow-up voorlopig niet aangewezen

Outcome: behandeling sneller gestart door anti-CCP?

- DMARDs kunnen gewrichtsschade reduceren of stoppen
 - Daarom best zo vroeg mogelijk opgestart
 - Positief anti-CCP test kan hulp zijn bij diagnose in een vroeg stadium
- Therapie zou dus sneller opgestart kunnen worden

Impact/Decision making

- Voorlopig geen (inter)nationale guidelines die test aanbevelen voor bepaalde indicatie / populatie
- College voor Zorgverzekeringen
 - RF en anti-CCP zinvol
 - als diagnose op klinische gronden nog niet gesteld kan worden
 - om indruk te krijgen omtrent beloop en prognose

Studie in Gasthuisberg

- Hoe worden anti-CCP antistoffen het beste geanalyseerd?
- Studie met 5 verschillende kits voor anti-gecitrullineerde peptide/proteïne antistoffen

Bepaling van anti-citrullinated peptide/proteïne antibodies

	Antigen	Proposed cutoff	Measuring range
Genesis	Recombinant citrullinated rat filaggrin	6.25 units/mL	0-100 units/mL
Euro-Diagnostica	2nd generation CCP	25 units/mL	25-1600 units/mL
Euroimmun	2nd generation CCP	5 relative units/mL	0-200 relative units/mL
Pharmacia	2nd generation CCP	7 EliA units/mL	0.4-340 units/mL
Inova	3rd generation CCP	20 units	15.62-250 units

■ Traceerbaarheid

- geen internationale standaard beschikbaar
- verschil in meetbereik en cutoff tussen verschillende firma's

Resultaten

- Analytische performantie
 - Reproduceerbaarheid
 - Lineariteit
 - Methode vergelijking
- Diagnostische performantie

Reproduceerbaarheid: Within-run CV%

- 20 aliquots van 2 stalen in 1 run

	Low level		High level	
	mean (U/mL)	CV%	mean (U/mL)	CV%
Genesis	7.9	5.9	23.4	4.8
Euro-Diagnostica	35.4	13.4	401.6	34.3
Euroimmun	4.6	12.6	67.7	11.9
Pharmacia	13.3	7.2	186.6	9.8
Inova	78.1	3.7	187.6	5.1

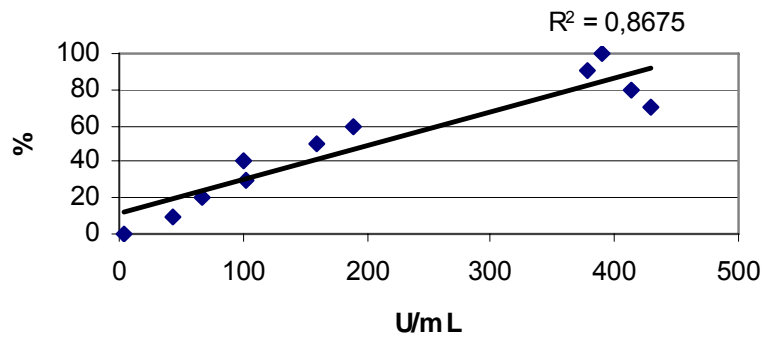
Lineariteit

- Verdunnen van 2 stalen (1 met medium en 1 met high level) met toenemende hoeveelheid van een negatief staal (anti-CCP- en RF -) (0-100% per 10%)
- Bepaald aan de hand van lineaire regressie (R^2 -waarden)

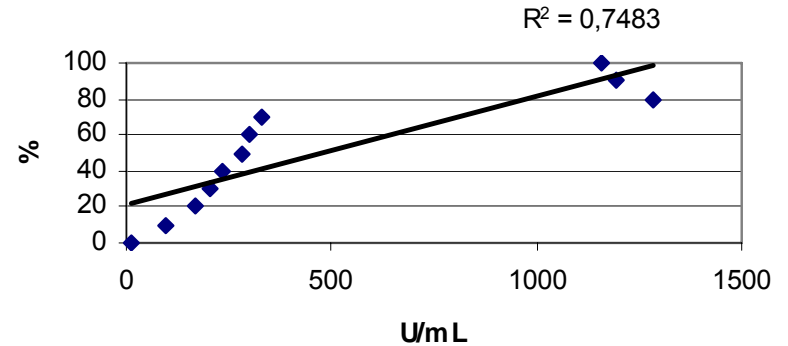
	Lineariteit 1 (R^2)	Lineariteit 2 (R^2)
Genesis	0.96	0.95
Euro-Diagnostica	0.87	0.75
Euroimmun	0.92	0.84
Pharmacia	0.98	0.98
Inova	0.99	/

Lineariteit

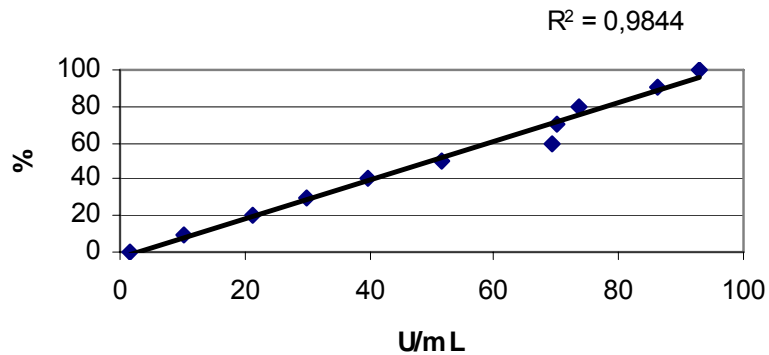
Eurodiagnostica 1



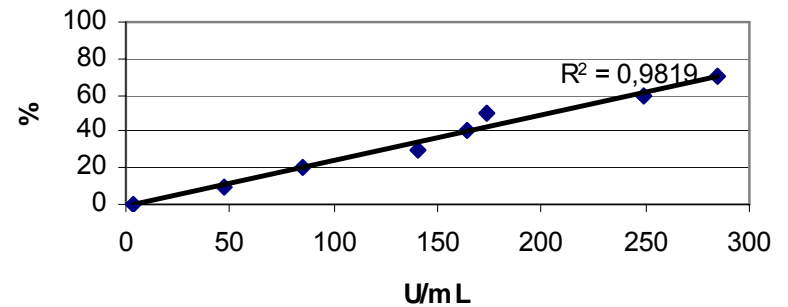
Eurodiagnostica 2



Pharmacia 1



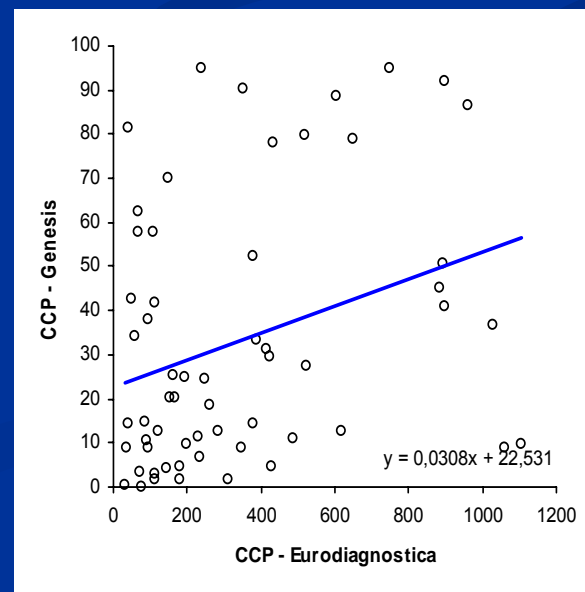
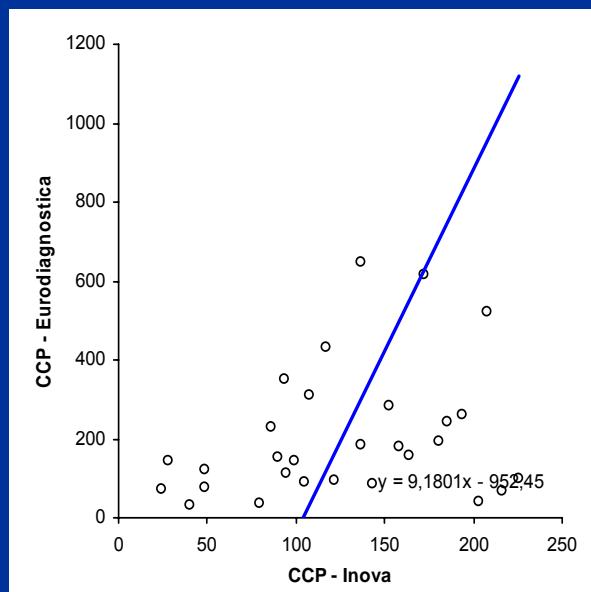
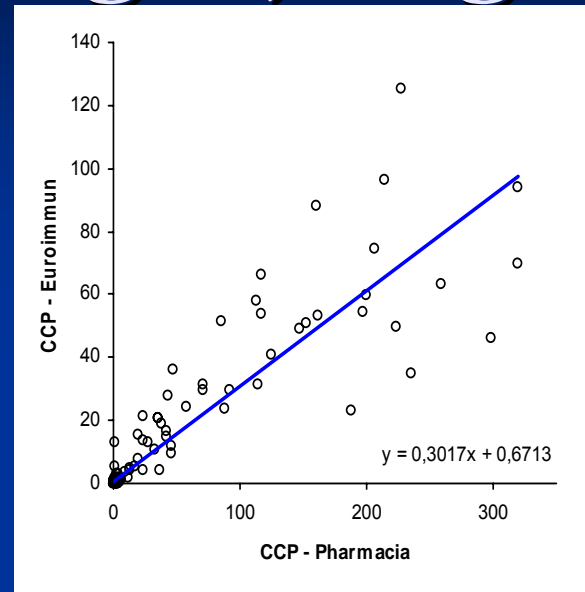
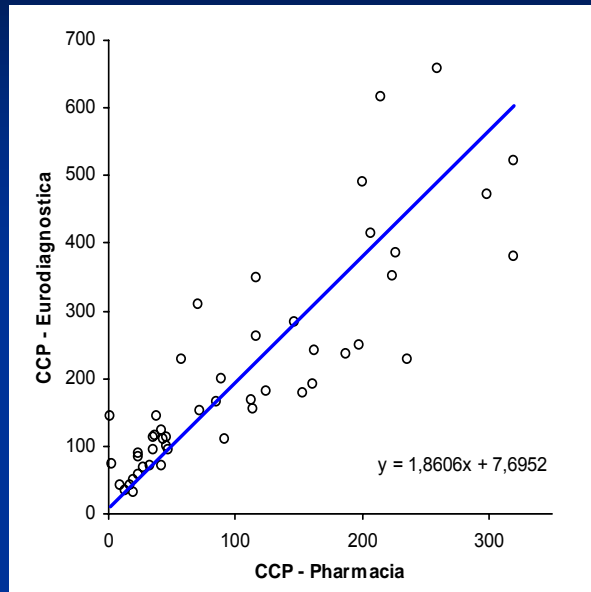
Pharmacia 2



Methode vergelijking

- Pearson correlation (r)
 - tussen 0.28 en 0.91
 - laagste waarden voor vergelijkingen met Genesis (0.31-0.65) en Inova (0.28-0.59)
- Deming regression (intercept and slope)

Methode vergelijking



Diagnostische performantie: patiënten

- 101 RA-patiënten volgens ACR
 - 40 established RA (diagnose > 2j)
 - 45 early RA (symptomen < 1 j)

- 197 Controls
 - 27 psoriatic arthritis
 - 98 connective tissue diseases
 - 41 SLE, 26 Sjögren syndrome, 18 scleroderma, 8 MCTD, 5 polymyositis/dermatomyositis
 - 40 specific autoantibodies
 - 8 anti-thyroid peroxidase, 8 anti-parietal cell, 8 anti-tissue transglutaminase, 8 anti-striated muscle, 8 anti-mitochondrial

- 48 Consecutive patients
 - 16 RA
 - 32 non-RA

Diagnostische performantie: vals positieven?

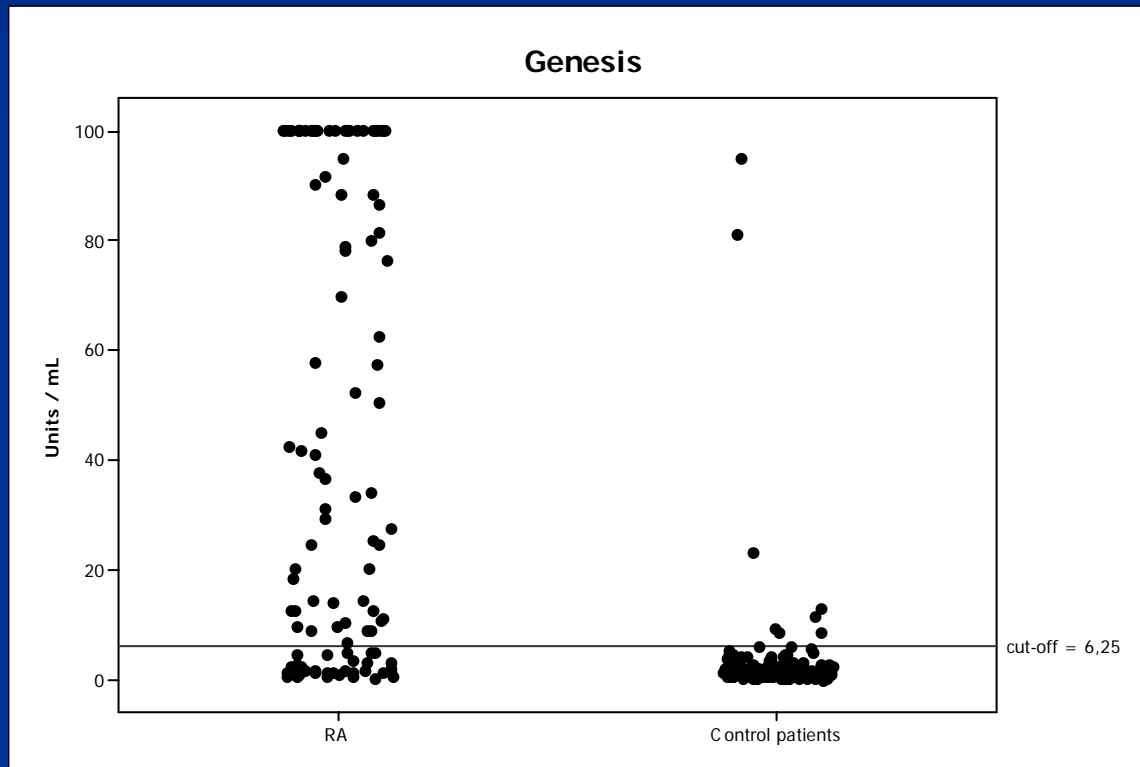
- 30 van 197 controls positief met ≥ 1 assay
- 5 voldoen aan ACR-criteria voor RA
 - 3 Psoriatic arthritis
 - 1 Scleroderma
 - 1 anti-striated muscle
- Dus
 - 5 terecht positief
 - 25 vals positief

Diagnostische performantie

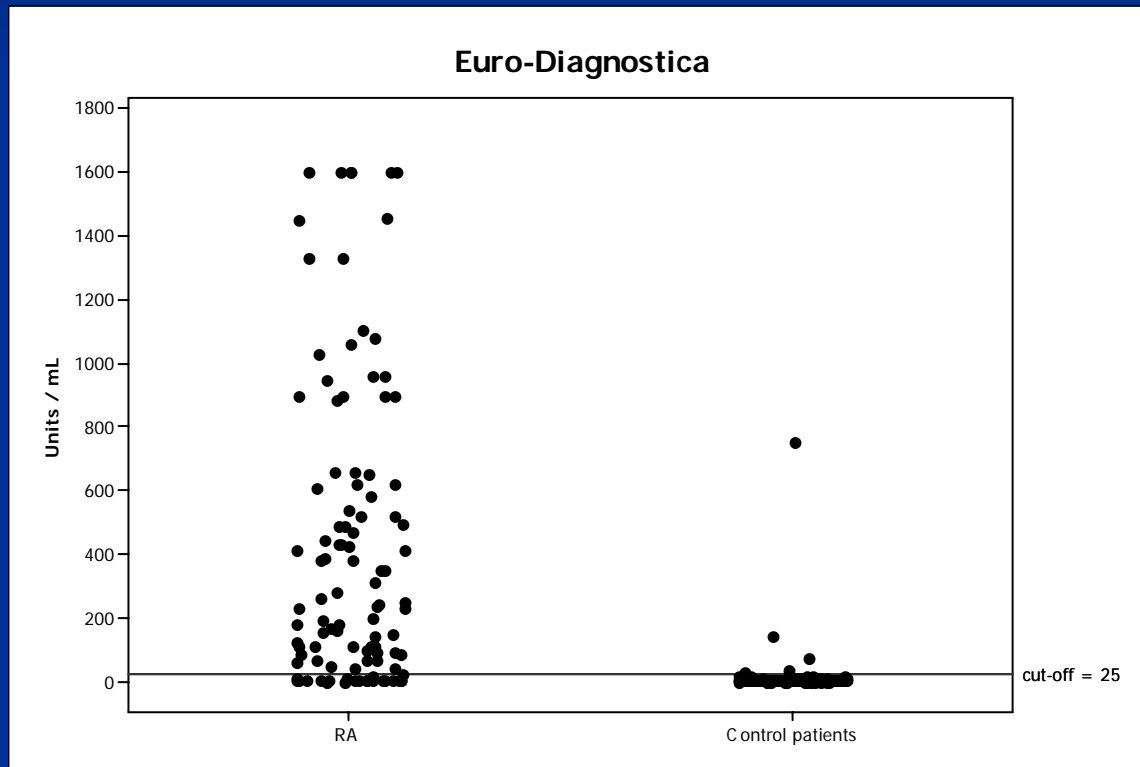
- Sensitiviteit:
 - 101 RA-patiënten + 5 controls (terecht positieven)
- Specificiteit:
 - 192 controls

	Genesis	Euro-Diagnostica	Euroimmun	Pharmacia	Inova
Sensitiviteit (%)	70.8	77.4	74.5	78.3	78.3
Specificiteit (%)	95.8	97.4	97.9	97.9	89.6
LR +	16.9	29.8	35.5	37.3	7.53
LR -	0.305	0.232	0.260	0.222	0.242

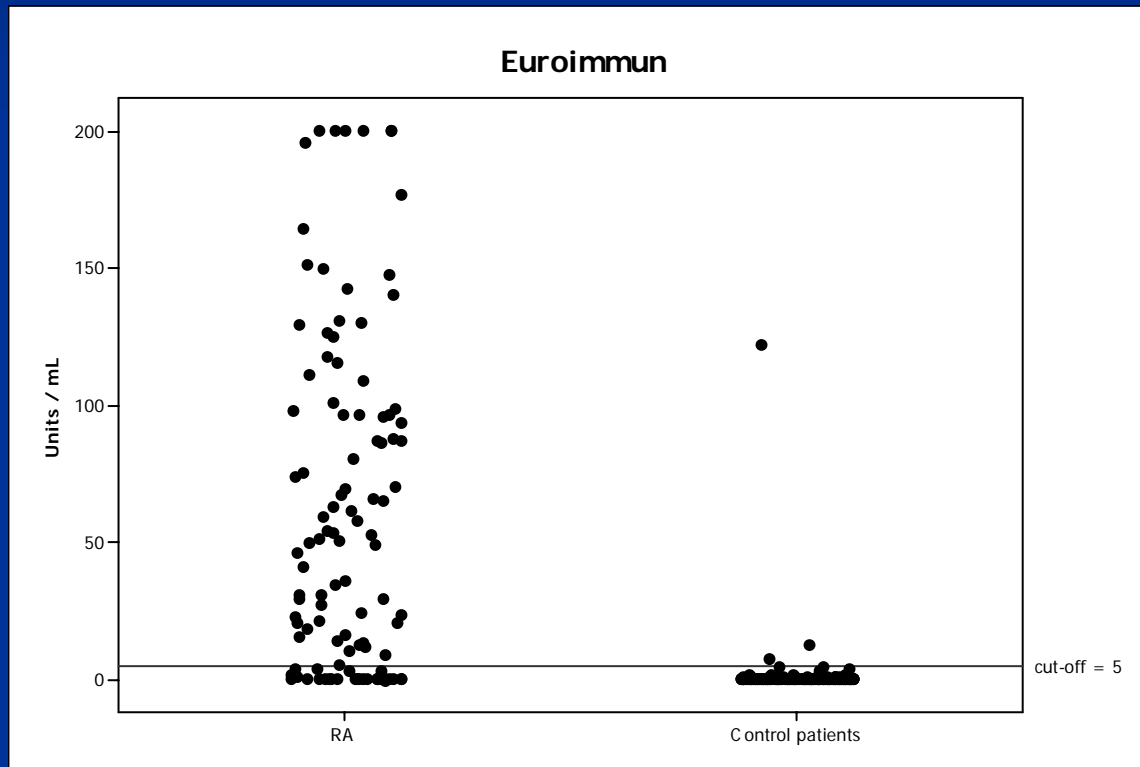
Genesis



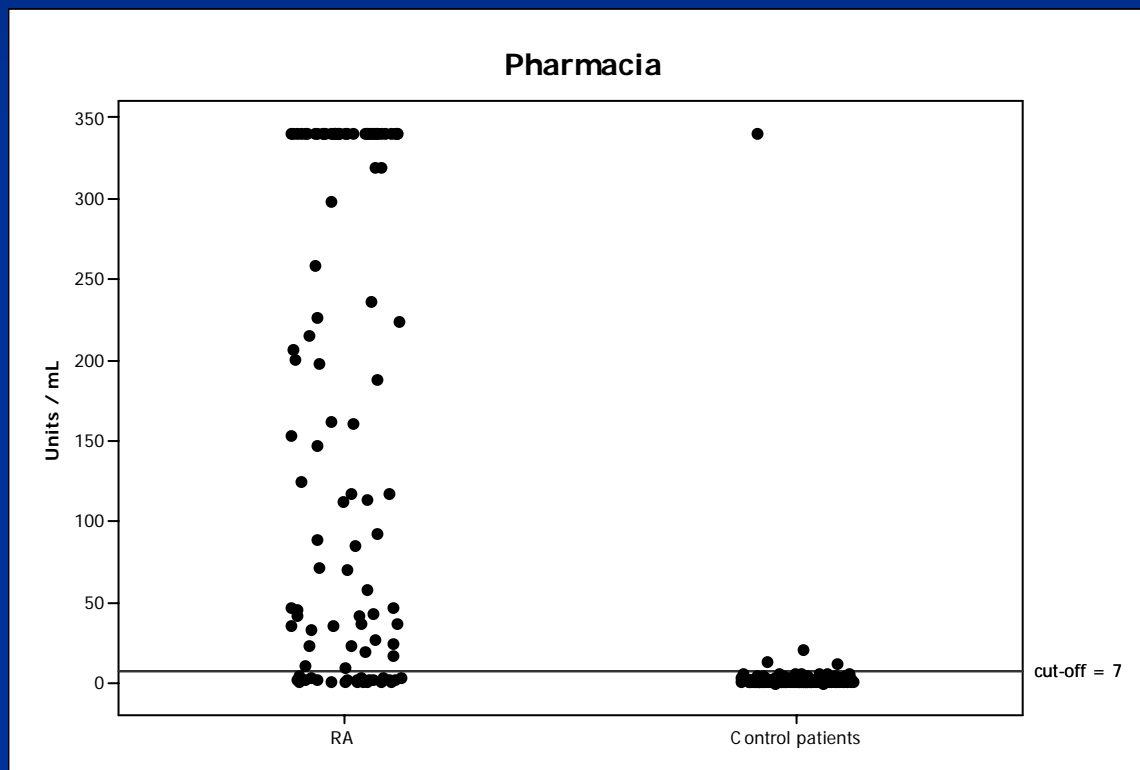
Euro-Diagnostica



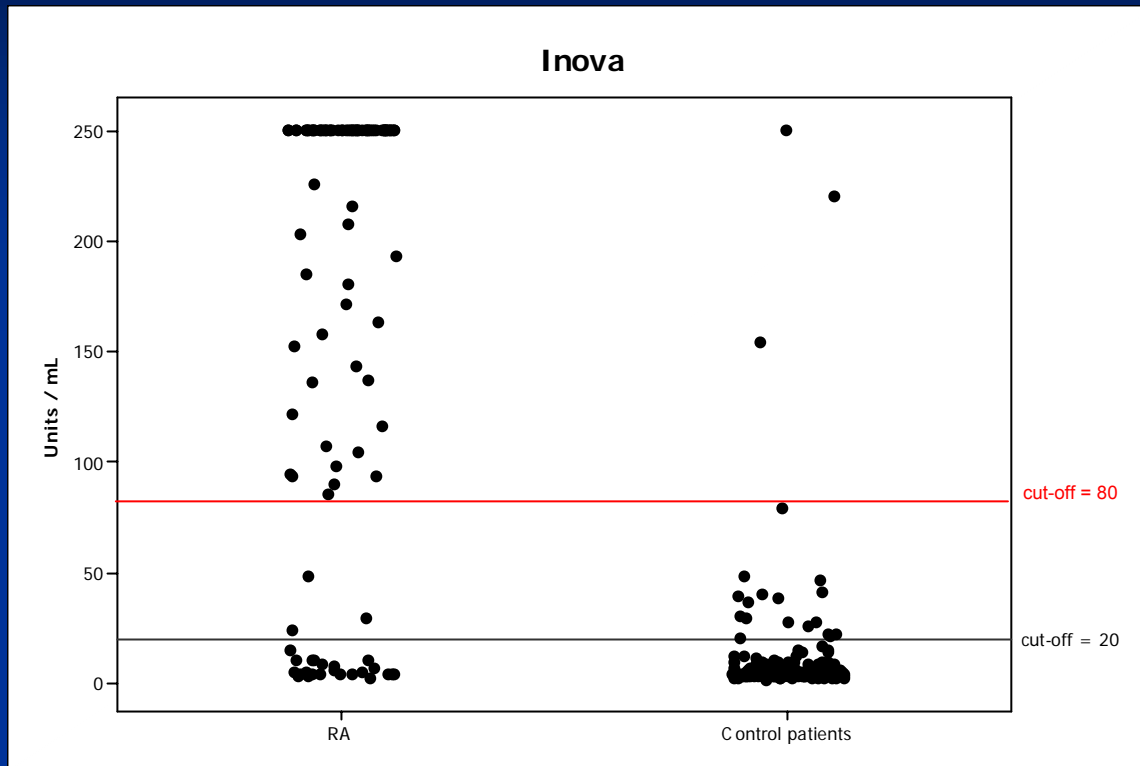
Euroimmun



Pharmacia



Inova

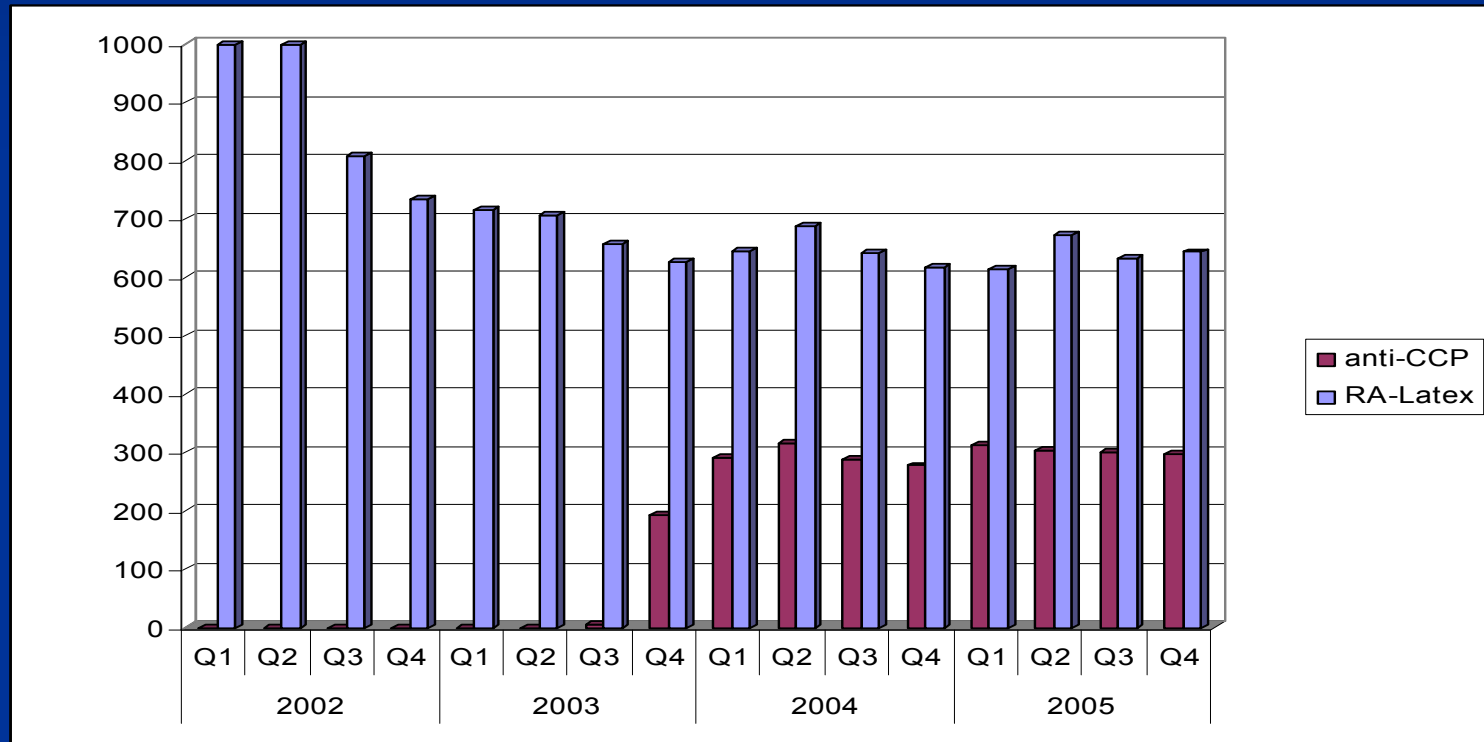


	Cutoff	
	20 units	80 units
Sensitiviteit	78.3	75.5
Specificiteit	89.6	98.4
LR +	7.53	47.2
LR -	0.242	0.249

Diagnostische performantie: sensitiviteit voor 'established' en 'early' RA

	Genesis	Euro- diagnostica	Euroimmun	Pharmacia	Inova	All tests
Established RA	75.0 %	80.0 %	77.5 %	80.0 %	80.0 %	72.5 %
Early RA	64.4 %	71.1 %	68.9 %	71.1 %	73.3 %	62.2 %

Aanvraagpatroon Intramuros



Aanvraagpatroon Intramuros

Medische eenheid	# anti-CCP 2003-2005
IG reumatologie	1585 (62%)
IG alg. inwendige	418 (16%)
IG nefrologie	83 (3%)
dermatologie	70 (3%)
IG hematologie	45 (2%)
IG lever-galb.-pancr.	45 (2%)
IG cardiologie	44 (2%)
IG pneumologie	44 (2%)
overige	228 (9%)
<i>Totaal</i>	<i>2562</i>

Aanvraagpatroon Extramuros

	2003	2004	2005	<i>Totaal</i>
CMA Herentals	5	181	17	203
AZ St-Jan Brugge	1	33	149	183
Centraal labo Hasselt	6	51	31	88
MCH Leuven	1	11	39	51
Imelda ZH Bonheiden	1	3	33	37
Dodoens ZH Mechelen	2	17	16	35
Andere	26	102	34	162
<i>Totaal</i>	42	398	319	759

Aanvraagpatroon Aantal per patiënt

# anti-CCP/ patiënt	# patiënten
10 x	1
6 x	1
5 x	3
4 x	4
3 x	18
2 x	148
1 x	2924

Besparing van 222 analyses mogelijk indien slechts 1 bepaling per patiënt

Financiële impact

- Geen RIZIV-terugbetaling
- 10 € aangerekend
- Prijs per test

	Total cost / test (€)
Genesis	16.69
Euro-Diagnostica	12.35
Euroimmun	13.11
Pharmacia	13.71
Inova	13.62

Organisatorische impact

- Nu: Euro-Diagnostica 1x per 2 weken op automatisch ELISA-toestel BEP III (zodat volledige microtiterplaat gevuld)
- Genesis, Euroimmun en Inova mogelijk op BEP III
- Pharmacia op UniCap 100
 - max. 22 stalen per run
 - 2x per week uitvoeren

Welke kit voor anti-CCP?

	Reproduceerbaarheid	Lineariteit	Keuze cutoff door firma	Prijs / test (€)	Uitvoeringsfrequentie
Genesis	+	+/-	+/-	16.69	1x / 2w
Euro-Diagnostica	-	-	+/-	12.35	1x / 2w
Euroimmun	+/-	-	+/-	13.11	1x / 2w
Pharmacia	+/-	+	+	13.71	2x / w
Inova	+	+	-	13.62	1x / 2w

Besluit

- Pharmacia en Inova (indien cutoff aangepast) scoren het beste
- Validiteit van studies over follow-up?
 - Analytische performantie ontoereikend
- Waarden bekomen met verschillende kits niet vergelijkbaar
 - Nut van kwantitatief resultaat?

To Do

- Invoeren van nieuwe kit voor anti-CCP
- Kwantitatief of kwalitatief?

? Vragen ?