

# CAT

## Critically Appraised Topic

### **Anti-Cyclic Ctrullinated Peptide (CCP) antibodies:**

### **Belang bij diagnose / prognose / follow-up van reumatoïde arthritis**

Author: Apr. D. Coenen

Supervisor: Prof. Dr. X. Bossuyt

Search/methodology verified by: Dr. J. Frans

Date: 14/3/2006

Expiry date: 14/3/2008

#### **CLINICAL BOTTOM LINE**

---

Anti-CCP antistoffen kunnen in een vroeg stadium aantoonbaar zijn zelfs wanneer klinische kenmerken van reumatoïde arthritis (RA) nog niet duidelijk zijn. Een echt betrouwbare vroegdiagnostiek is echter niet mogelijk met deze test, aangezien een negatief resultaat de diagnose niet kan uitsluiten. Het uitvoeren van zowel anti-CCP antistoffen en reumafactor bij een patiënt verdacht voor RA is interessant aangezien 35-40 % van de RA patiënten die reumafactor negatief zijn anti-CCP positief zijn. Anderzijds kan anti-CCP helpen bij de differentieel diagnose bij reumafactor positieve patiënten. Positiviteit voor zowel reumafactor als anti-CCP is zeer specifiek voor RA.

De aanwezigheid van anti-CCP antistoffen definieert een subpopulatie van RA patiënten die meer radiologische gewrichtsschade ontwikkelen. Of anti-CCP positieve RA patiënten daarom nu aggressiever behandeld moeten worden is een punt van discussie.

Follow-up van behandeling door middel van het opvolgen van anti-CCP titers blijkt niet aangewezen.

## CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

---

Rheumatoïde arthritis (RA) is een autoimmuunziekte waarvan de oorzaak nog steeds niet bekend is en wordt gekenmerkt door een symmetrische erosieve synovitis. Dit leidt tot progressieve gewrichtsbeschadiging resulterend in pijn, stijfheid en functieverlies. RA is de meest voorkomende inflammatoire gewrichtsaandoening met een prevalentie van 1 % [1].

De diagnose wordt gesteld aan de hand van de 7 American College of Rheumatology (ACR) criteria. Naast de klinische criteria ochtendstijfheid, arthritis van de hand, symmetrische arthritis, arthritis van drie of meer gewrichten, reumatische knobbels en erosies of ontkalkingen in hand- of polsgewricht, is de zogenoemde reumafactor de enige serologische marker. Een patiënt heeft RA wanneer hij voldoet aan vier van de zeven genoemde criteria [3]. In het vroege stadium van de ziekte zijn de klinische criteria vaak niet goed aantoonbaar en worden pas duidelijk wanneer er al gewrichtsbeschadiging is opgetreden. Hoewel de term reumafactor dit doet vermoeden is deze echter niet specifiek voor RA. Aangezien snelle interventie met de huidige beschikbare geneesmiddelen gewrichtsbeschadiging kan verminderen of stoppen en omwille van mogelijke bijwerkingen van de therapieën, is een serologische test wenselijk die sensitief en specifiek is in de vroege fase van RA [5-16].

Serologische markers die voor RA specifiek zijn, berusten op antistoffen tegen gecitrullineerde antigenen. Citrullinatie is een post-translationele modificatie door peptidylarginine deiminases (PAD) waarbij arginine gedeïmineerd wordt tot citrulline. RA autoantistoffen gericht tegen gecitrullineerde antigenen zijn al langer bekend onder de vorm van de anti-keratine en anti-perinucleaire factor antistoffen. Het antigeen dat herkend wordt door deze testen is gecitrullineerd filaggrine. De reactiviteit van deze antistoffen is volledig afhankelijk van de aanwezigheid van citrulline residues. Sindsdien zijn er verschillende nieuwe antigenen ontwikkeld voor het detecteren van autoantistoffen tegen gecitrullineerde epitopen. Een grote doorbraak kwam er door de ontwikkeling van een ELISA die gebruikmaakt van een op filaggrine gebaseerd cyclisch gecitrullineerd peptide (anti-CCP ELISA van de eerste generatie). Superieure epitopen werden geselecteerd door screening met RA sera van specifieke citrulline bevattende cyclische peptiden. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van de anti-CCP test van de tweede generatie met een hogere sensitiviteit en dezelfde specificiteit dan de eerste generatie anti-CCP test [5-16].

Momenteel zijn er verschillende fabrikanten die een kit voor gecitrullineerde peptiden op de markt hebben. In LAG gebeurt het doseren van deze antistoffen momenteel met de Immunoscan RA kit (Euro-Diagnostica), een anti-CCP test van de tweede generatie. Bij de

implementatie van deze test in het laboratorium in 2003 was het destijds de enige commerciële kit op de Europese markt beschikbaar. Aan de hand van de gegevens van het iQC-materiaal zijn er echter twijfels over de reproduceerbaarheid van deze test, vooral bij hoge titers. Van deze kit is er nu een nieuwe versie op de markt gekomen, waarbij gewerkt wordt op kamertemperatuur in plaats van op 37°C.

## QUESTION(S)

---

<b>Patient</b>	Patiënten met chronische polyarthritis en verdacht voor reumatoïde arthritis
<b>Intervention</b>	Anti-CCP antistoffen
<b>Comparison</b>	Klinisch onderzoek / medische beeldvorming / reumafactor
<b>Outcome</b>	Zijn Anti-CCP antistoffen een goede test voor diagnose / prognose / follow-up?

- 1) *Wat is de meerwaarde van anti-CCP antistoffen bij de diagnose van RA?*
- 2) *Levert het resultaat prognostische informatie?*
- 3) *Wat is de plaats van deze bepaling in de follow-up van behandeling van patiënten met RA?*
- 4) *Hoe worden anti-CCP antistoffen het beste geanalyseerd?*

## SEARCH TERMS

---

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: “Arthritis, Rheumatoid/diagnosis”, “cyclic citrullinated peptide”*
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific); Search term: “Rheumatoid arthritis AND citrullinated”*
- 3) *Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>)*
- 4) *ACR ([www.rheumatology.org](http://www.rheumatology.org))*
- 5) *UpToDate Online version 13.3 (2006)*
- 6) *Diagnostisch Kompas (College voor zorgverzekeringen) ([www.dk.cvz.nl](http://www.dk.cvz.nl))*

- 7) *Samenwerkende Artsenlaboratoria & diagnostische centra in Nederland (SAN)* ([www.de-san.nl](http://www.de-san.nl))

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

### 1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*

1. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis 2002 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46(6):328-346.
2. Guidelines for the initial evaluation of the adult patient with acute musculoskeletal symptoms. American College of Rheumatology ad hoc committee on clinical guidelines. *Arthritis & Rheumatism* 1996; 39(1):1-8.
3. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. *Arthritis & Rheumatism* 1988;31-315-324.

### 2) *Systematic Reviews and Meta-analyses*

4. 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 Sep-Oct;23(5 Suppl 39):S69-76.

### 3) *Reviews*

5. Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Jan;45(1):20-5.
6. Emery P. Treatment of rheumatoid arthritis. *BMJ*. 2006 Jan 21;332(7534):152-5.
7. Mimori T. Clinical significance of anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis. *Intern Med*. 2005 Nov;44(11):1122-6.
8. Vander Cruyssen B, Peene I, Cantaert T, Hoffman IE, De Rycke L, Veys EM, De Keyser F. Anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPA) in rheumatoid arthritis: specificity and relation with rheumatoid factor. *Autoimmun Rev*. 2005 Sep;4(7):468-74.

9. Vallbracht I, Helmke K. Additional diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2005 Jul;4(6):389-94.
10. Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Zucano A, Pansini N. Proteomic: new advances in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 2005 Jul 24;357(2):219-25.
11. Shmerling RH. Diagnostic tests for rheumatic disease: clinical utility revisited. *South Med J.* 2005 Jul;98(7):704-11; quiz 712-3, 728.
12. Rantapaa-Dahlqvist S. Diagnostic and prognostic significance of autoantibodies in early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2005 Mar-Apr;34(2):83-96.
13. Renaudineau Y, Jamin C, Saraux A, Youinou P. Rheumatoid factor on a daily basis. *Autoimmunity.* 2005 Feb;38(1):11-6.
14. Vincent C, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity.* 2005 Feb;38(1):17-24.
15. Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, Petit-Teixeira E, Clavel C, Nogueira L, Vincent C, Cornelis F, Roudier J, Serre G. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2004 Nov;71(6):493-502.
16. Zendman AJ, Vossenaar ER, van Venrooij WJ. Autoantibodies to citrullinated (poly)peptides: a key diagnostic and prognostic marker for rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 2004 Jun;37(4):295-9.

#### 8) *Original Articles*

17. Chen HA, Lin KC, Chen CH, Liao HT, Wang HP, Chang HN, Tsai CY, Chou CT. The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006 Jan;65(1):35-9.
18. Ronnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L, van Vollenhoven RF. 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 Dec;64(12):1744-9. Epub 2005 Apr 20.
19. Caramaschi P, Biasi D, Tonolli E, Pieropan S, Martinelli N, Carletto A, Volpe A, Bambara LM. Antibodies against cyclic citrullinated peptides in patients affected

- by rheumatoid arthritis before and after infliximab treatment. *Rheumatol Int.* 2005 Nov;26(1):58-62.
20. Greiner A, Plischke H, Kellner H, Gruber R. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-citrullin antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1050:295-303.
21. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(5):R949-58.
22. De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, Van den Bosch F, Hoffman IE, Veys EM, De Keyser F. Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Feb;64(2):299-302.
23. Spadaro A, Riccieri V. Methotrexate effect on anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Aug;64(8):1241-2. (Letter)
24. Mikuls TR, O'Dell JR, Stoner JA, Parrish LA, Arend WP, Norris JM, Holers VM. Association of rheumatoid arthritis treatment response and disease duration with declines in serum levels of IgM rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. *Arthritis Rheum.* 2004 Dec;50(12):3776-82.
25. Alessandri C, Bombardieri M, Papa N, Cinquini M, Magrini L, Tincani A, Valesini G. Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann Rheum Dis.* 2004 Oct;63(10):1218-21.
26. Nissinen R, Leirisalo-Repo M, Peltomaa R, Palosuo T, Vaarala O. Cytokine and chemokine receptor profile of peripheral blood mononuclear cells during treatment with infliximab in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004 Jun;63(6):681-7.
27. Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, Van Venrooij WJ, Klareskog L, Dahlqvist SR. 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(4):R303-8.

28. 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(3):R264-72.
29. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes RE, Huizinga TW. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004 Mar;50(3):709-15.
30. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb;50(2):380-6.
31. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Oct;48(10):2741-9.
32. 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 Feb;46(2):357-65.

9) *Reference Works, Handbooks and Databases*

33. UpToDate Online version 13.3 (2006)

10) *Posters, "grey literature", presentations*

34. Meier E. A Short Guide to Rheumatoid arthritis, 2<sup>nd</sup> ed. by Pharmacia Diagnostics AB, 2005
35. Burlingame R. et al. Development of CCP3, a more sensitive cyclic citrullinated peptide ELISA. (poster)
36. Egerer K et al. A new powerful marker for the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis – Anti-MCV (Autoantibodies against Mutated-Citrullinated Vimentin). (poster)
37. Spiritus T. CAT: Reumafactor. 2003.

## APPRAISAL

---

### 1 Analytische performantie

#### 1.1 Pre-analytische factoren

Anti-CCP antistoffen kunnen zowel opgespoord worden in serum als in plasma. Lipemische, gehemolyseerde of microbiëel gecontamineerde stalen worden best vermeden. Stalen kunnen gedurende enkele dagen tot weken bewaard worden bij 2-8°C. Langdurige bewaring is mogelijk bij -20°C. Toevoeging van bewaarmiddelen aan het staal kan het testresultaat beïnvloeden.

#### 1.2 Analytische factoren

##### Analytisch meetbereik

Na het beëindigen van de ELISA wordt de absorptie of fluorescentie afgelezen bij een welbepaalde golflengte. Hieruit wordt dan de hoeveelheid antistoffen berekend aan de hand van een calibratiecurve. De hoeveelheid antistoffen wordt uitgedrukt in units/ml. Vanaf een welbepaalde cut-off waarde wordt het staal als positief of negatief gecatalogeerd.

Verschillende firma's hebben momenteel een kit met CE-label voor anti-CCP op de markt:

- Diastat anti-CCP (Axis-Shield)
- Immunoscan RA (Euro-Diagnostica)
- Anti-CCP (Euroimmun)
- Quanta Lite CCP2 en CCP3 (Inova)
- EliA CCP (Pharmacia)

##### Traceerbaarheid

Er is geen internationale standaard beschikbaar voor anti-CCP antistoffen. Daarom heeft elke firma zelf calibratiemateriaal ontwikkeld op basis van serum materiaal afkomstig van anti-CCP positieve RA patiënten. Dit verklaart het verschil in meetbereik en cutoff waarden voor de verschillende firma's [Attachment 3].



### Within/Between run variatie

De bijsluiters van de verschillende firma's geven een within en een between run variatie aan van 1% tot 12.8% en van 2% tot 12% respectievelijk.

### *1.3 Turn-around-time*

De analyse van anti-CCP antistoffen wordt momenteel in LAG éénmaal per twee weken uitgevoerd met de kit van Euro-Diagnostica zodat een volledige microtiterplaat (96 posities) gebruikt kan worden. De analyseduur bedraagt ongeveer 2 uur.

### *1.4 Kwaliteitsfactoren*

Als interne kwaliteitscontrole wordt steeds een home-made patiëntenpool meegenomen, naast een positieve en negatieve controle meegeleverd door de firma. Aangezien er geen gegevens beschikbaar zijn over  $CV_I$  en  $CV_G$  van anti-CCP antistoffen ([www.westgard.com](http://www.westgard.com)), wordt de KAL-limiet vastgelegd op 3.5 SD.

Het WIV organiseert een externe kwaliteitsevaluatie voor deze parameter. Ons laboratorium neemt hieraan deel.

## **2 Diagnostische performantie**

In verschillende studies werd reeds de diagnostische performantie van de anti-gecitrullineerde peptide assays geëvalueerd.

*Riedemann et al.* [4] voerden een systematische review uit van de gepubliceerde literatuur tussen januari 2002 en juni 2005 over het klinisch gebruik van anti-CCP antistoffen van de 2<sup>e</sup> generatie (anti-CCP2). In deze periode werden hierover 38 studies gepubliceerd. Hiervan werden 27 studies die gebruikmaakten van de anti-CCP2 assay geïncludeerd. De diagnostische performantie werd in 13 van deze 27 studies geëvalueerd. De sensitiviteit varieerde tussen 64.4% en 96 % voor 'established' RA en tussen 14.4% en 83.5 % voor 'early' RA. De specificiteit lag tussen 88.9% en 100 %. Verschillen in patiëntenpopulaties en in de keuze van de cutoff waarde werden waargenomen tussen de verschillende studies [Attachment 2].

De firma Inova heeft recent een nieuwe kit voor anti-CCP antistoffen op de markt gebracht (CCP van de derde generatie) met volgens hun een verbeterde sensitiviteit gecombineerd met dezelfde specificiteit [35]. Recent is ook een nieuwe marker beschreven gebaseerd op gemuteerd gecitrullineerd vimentin (anti-MCV). Volgens een recente poster zou deze test eveneens een betere sensitiviteit hebben dan de anti-CCP2 test, terwijl de specificiteit even hoog blijft [36]. Verdere studies dienen dit te bevestigen.

Onze studie uitgevoerd in Gasthuisberg (zie verder) toont sensitiviteiten tussen 70.8% en 78.3% en specificiteiten tussen 89.6% en 97.9% voor de verschillende uitgeteste kits. Voor 'early' RA patiënten werd een sensitiviteit tussen 64.4% en 73.3% en voor 'established' RA patiënten tussen 75.0% en 80.0% gevonden.

### 3 Klinische impact

#### 3.1 Diagnostisch

##### Wat is de meerwaarde van anti-CCP antistoffen bij de diagnose van RA?

- Anti-CCP antistoffen zijn reeds lang aanwezig vooraleer symptomen van RA optreden

*Rantapää-Dahlqvist et al.* [31], *Berglin et al.* [27] en *Nielen et al.* [30] bestudeerden de aanwezigheid van anti-CCP antistoffen in bloedstalen van bloeddonoren die later RA ontwikkelden. De sensitiviteit van anti-CCP2 voor het identificeren van toekomstige RA lag tussen 33.7% en 37%, met een specificiteit rond 98%. De mediaan tijd tussen de staalname en de aanvang van symptomen was 2.5 jaar en 2 jaar voor de studie van *Rantapää-Dahlqvist et al.* en *Berglin et al.* respectievelijk. In de studie van *Nielen et al.* werden van 79 patiënten meerdere stalen onderzocht met een mediaan van 7.5 jaar (range 0.1-14.5 jaar) voor het vroegste staal voor aanvang van RA symptomen. Van de 79 patiënten waren er 40.5% anti-CCP positief reeds 4.8 jaar (range 0.1-13.8 jaar) voor aanvang van symptomen. De specificiteit in deze studie was 99.4%. In deze studie werd een 'in-house' ELISA voor anti-CCP gebruikt.

Een andere studie van *Van Gaalen et al.* [29] bestudeerden een cohort van 936 consecutieve patiënten met recente artritis. Van deze 936 patiënten konden 346 na 2 weken evaluatie niet geclassificeerd worden met een specifieke diagnose. Deze 346

patiënten werden gedurende 3 jaar opgevolgd. Na 3 jaar bleven er 318 patiënten over voor analyse. Van deze patiënten waren er 69 ‘at baseline’ anti-CCP2 positief, waarvan er 64 (93%) RA ontwikkelden. Van de 318 patiënten had 40% na 3 jaar RA ontwikkeld.

In het vroeg stadium van de ziekte waar de klinische symptomen nog niet duidelijk aantoonbaar zijn, zou de test het meeste kunnen bijbrengen voor de clinicus. Maar aangezien anti-CCP antistoffen in een vroeg stadium van de ziekte gedetecteerd worden met een lage sensitiviteit, sluit een negatief resultaat de diagnose niet uit. Hierdoor is een echt betrouwbare vroegdiagnostiek met deze test niet mogelijk.

- Anti-CCP antistoffen aanwezig bij reumafactor negatieve RA patiënten

*Valbracht et al.* [9] stelde vast dat 35-40% van reumafactor-negatieve RA patiënten positief scoren voor anti-CCP antistoffen. Indien bij reumafactor-negatieve patiënten met polyarthritis anti-CCP antistoffen aangetoond kunnen worden, kan de diagnose van RA met meer zekerheid gesteld worden.

- Rol bij differentiële diagnose bij reumafactor positieve patiënten

De hoge specificiteit van anti-CCP antistoffen kan waardevol zijn bij het onderscheiden van RA van andere aandoeningen die ook vaak gepaard gaan met reumafactor positiviteit [5,11]. Reumafactor wordt immers in belangrijke mate teruggevonden bij andere reumatische aandoeningen (zie onderstaande tabel [11]) en arthralgiën veroorzaakt door virale infecties. Indien eveneens anti-CCP antistoffen gedetecteerd worden, is de diagnose van RA meer waarschijnlijk.

Disease	RF-positivity
Rheumatoid arthritis	50-90%
Systemic lupus erythematosus	15-35%
Sjögren syndrome	75-95%
Systemic sclerosis	20-30%
Polymyositis/dermatomyositis	5-10%
Cryoglobulinemia	40-100%
Mixed connective tissue disease	50-60%

### Wat is de waarde nog van reumafactor?

Reumafactor behoort tot één van de ACR-criteria voor de diagnose van RA, alhoewel ze niet erg specifiek is voor RA. Momenteel is er nog geen sprake van toevoeging van anti-CCP antistoffen aan de ACR-criteria. Positiviteit voor zowel reumafactor als anti-CCP is wel zeer specifiek voor RA [9].

RA-patiënten positief voor reumafactor en/of anti-CCP antistoffen hebben een hoger risico om erosieve gewrichtsbeschadiging te ontwikkelen. Deze twee parameters worden daarom gebruikt in modellen ter voorspelling van erosiviteit [8].

#### **Besluit:**

*Anti-CCP antistoffen kunnen in een vroeg stadium aantoonbaar zijn zelfs wanneer klinische kenmerken van RA nog niet duidelijk zijn, maar een echt betrouwbare vroegdiagnostiek is niet mogelijk met deze test, aangezien een negatief resultaat de diagnose niet uitsluit. Het uitvoeren van zowel anti-CCP antistoffen en reumafactor is interessant aangezien 35-40 % van de RA patiënten die reumafactor negatief zijn anti-CCP positief zijn. Anderzijds kan anti-CCP helpen bij de differentieel diagnose bij reumafactor positieve patiënten. Positiviteit voor zowel reumafactor als anti-CCP is zeer specifiek voor RA.*

### Levert het resultaat prognostische informatie?

- Voorspelling van radiologische gewrichtsschade

De systematische review van *Riedemann et al.* [4] includeerden 4 studies (*De Rycke et al.*, *Forslind et al.*, *Nielen et al.* en *van Gaalen et al.*) die de prognostische waarde van anti-CCP2 voor het identificeren van radiologische gewrichtsschade bestudeerden. In deze studies werd gewrichtsschade geëvalueerd met behulp van radiologische scores (Larsen en Sharp/van der Heijde). Deze studies zijn het eens dat de aanwezigheid van anti-CCP2 geassocieerd is met meer radiologische gewrichtsschade. De review van *Vallbracht et al.* [9] haalt studies aan van *Jaarsveld et al.*, *Kroot et al.* en *Meyer et al.* die de hypothese ondersteunen dat RA patiënten die positief zijn voor anti-CCP significant meer radiologische gewrichtsschade ontwikkelen dan anti-CCP negatieve patiënten. Studies van *Rönnelid et al.* [18] en van *van der Helm-van Mil et al.* [21]

toonden eveneens aan dat er bij de anti-CCP positieve RA patiënten meer radiologische gewrichtsschade vastgesteld kon worden dan bij anti-CCP negatieve patiënten.

In 2002 heeft *Visser et al.* [32] een ‘prediction model of arthritis outcome’ voorgesteld voor ‘early’ RA patiënten. Hij toonde aan dat anti-CCP een hoog discriminerend vermogen had in het onderscheiden van persisterende en zelf-limiterende arthritis en van erosieve en niet-erosieve arthritis.

### **Besluit:**

***De aanwezigheid van anti-CCP antistoffen definieert een subpopulatie van RA patiënten die meer radiologische gewrichtsschade ontwikkelen. Medische beeldvorming blijft echter noodzakelijk aangezien deze antistoffen de outcome voor een bepaalde patiënt niet kunnen voorspellen. Of anti-CCP positieve RA patiënten nu aggressiever behandeld moeten worden is nog een punt van discussie.***

### *3.2 Therapeutisch*

#### Wat is de plaats van deze bepaling in de follow-up van behandeling van patiënten met RA?

Recent zijn er een aantal studies gepubliceerd die de invloed van behandeling van RA op anti-CCP titers hebben onderzocht.

Een studie van *Bobbio-Pallavicini et al.* [28] onderzocht het effect van infliximab behandeling op verschillende autoantistoffen. Serumstalen van 30 patiënten werden onderzocht ‘at baseline’ en na 30, 54 en 78 weken. Anti-CCP antistoffen werden gevonden bij 83% van de patiënten voor therapie. Anti-CCP antistoffen verminderden significant na 30 weken, maar keerden daarna terug naar de titer ‘at baseline’.

*Caramaschi et al.* [19] bestudeerden het effect van infliximab behandeling op de anti-CCP titer bij 27 patiënten. De serum titers veranderden niet na infliximab behandeling.

*De Rycke et al.* [22] toonde aan bij 62 RA patiënten dat RF titers significant verminderden na 30 weken behandeling met infliximab in combinatie met methotrexaat, terwijl anti-CCP titers onveranderd bleven.

*Nissinen et al.* [26] bestudeerden een cohort van 25 RA patiënten die behandeld werden met infliximab. Na 6 weken werd er geen significant verschil in anti-CCP levels teruggevonden.

*Alessandri et al.* [25] rapporteerden het effect van behandeling met infliximab gecombineerd met methothrexaat van 43 patiënten met RA niet antwoordend op DMARDs. 'At baseline' waren er 38 van de 43 patiënten (88%) positief voor anti-CCP. De serum titers van anti-CCP en RF verminderden significant na 6 maanden behandeling. Wanneer de patiënten onderverdeeld werden op basis van hun klinische respons op infliximab, werd er alleen een significante daling vastgesteld voor patiënten met klinische verbetering.

*Spadaro et al.* [23] onderzochten de invloed van behandeling met methotrexaat op anti-CCP titers bij 20 RA patiënten. Na 6 maanden behandeling bleek er geen significant verschil in anti-CCP titers, terwijl RF titers wel significant daalden.

*Chen et al.* [17] bestudeerden de verandering in titer van anti-CCP en RF na behandeling met etanercept. In de studie werden 90 patiënten geïncludeerd waarbij DMARDs gefaald hadden. Alle patiënten werden verder behandeld met DMARDs, maar bij 52 van hen werd eveneens etanercept opgestart. De anti-CCP titers daalden significant na 3 maanden behandeling met gemiddeld 31.3%.

*Rönnelid et al.* [18] toonde aan dat behandeling met sulfasalazine, maar niet met andere DMARDs resulteerde in een daling van anti-CCP levels. Deze daling werd vastgesteld tijdens het eerste jaar van follow-up.

*Mikuls et al.* [24] bestudeerde 'at baseline' en 'follow-up' stalen van 66 RA patiënten. De tijd tussen de 2 stalen was gemiddeld 13.7 maanden met een SD van 8.6 maanden. Van 64 patiënten die positief waren 'at baseline', hadden er 33 (52%) een reductie van  $\geq 25\%$  van de anti-CCP titer gedurende de behandeling. De beperkingen van deze studie zijn de heterogeniteit van behandeling, de relatief kleine patiëntengroepen per behandeling en het verschil in tijdstip van staalname voor follow-up. Uit hun studie besloten ze dat er geen verband was tussen therapieresponse en verandering in anti-CCP titer.

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 1 <sup>st</sup> year (not correlating with disease)
<i>Mukils</i>	DMARDs	66	Variable	Small anti-CCP reduction in 52% of patients; no association with response

**Besluit:**

*Follow-up van behandeling door middel van het opvolgen van anti-CCP titers blijkt niet aangewezen.*

### 3.3 Outcome

Kan de behandeling sneller gestart worden door de test waardoor complicaties, morbiditeit, mortaliteit vermeden kunnen worden?

De Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis van de ACR adviseert om bij elke patiënt met de diagnose van RA behandeling met DMARDs binnen de 3 maanden na het stellen van de diagnose op te starten [1]. DMARDs kunnen immers gewrichtsschade reduceren of voorkomen waardoor functieverlies vermeden kan worden, hetgeen een aanzienlijke besparing voor de ziekteverzekering betekent.

Anti-CCP antistoffen zijn reeds aanwezig in een vroege fase van de ziekte (vaak zelfs lang voor het optreden van de eerste verschijnselen), maar gaan dan gepaard met een lagere sensitiviteit. Een positieve test kan een hulp zijn bij het stellen van de diagnose van RA in een vroeg stadium van de ziekte en therapie zou in deze gevallen sneller opgestart kunnen worden.

## 4 Organistorische impact

Zie studie Gasthuisberg

## 5 Financiële impact

Zie studie Gasthuisberg

## 6 Impact / Decision making

Zijn er bestaande guidelines die de test voor een bepaalde indicatie/populatie aanbevelen?

Echte guidelines hieromtrent bestaan voorlopig niet.

Het *College voor Zorgverzekeringen* ([www.dk.cvz.nl](http://www.dk.cvz.nl)) zegt hierover het volgende:

Aanvullende diagnostiek (reumafactor en anti-CCP) ter classificering is zinvol als de diagnose op klinische gronden nog niet gesteld kan worden (classificatiecriteria dienen dan als diagnostische criteria) en om een indruk te krijgen omtrent beloop en prognose.



Doelgroep: een patiënt met chronische polyarthritis en verdenking van RA die (nog) niet aan de klinische criteria voldoet.

*Vander Cruyssen et al.* [8] stellen in hun artikel volgende guideline voor over het uitvoeren van reumafactor en anti-CCP antistoffen:

Eerst dient reumafactor uitgevoerd te worden. Indien er een hoge pretest probabiliteit voor RA is (gebaseerd op klinische symptomen) of wanneer hoge reumafactor titers gevonden worden, kan alleen reumafactor volstaan. Ingeval van lage pretest probabiliteit of wanneer reumafactor negatief of intermediaire titers geeft, dient bijkomend anti-CCP uitgevoerd te worden.

Werden er reeds voor de eigen ziekenhuissituatie flowcharts/guidelines opgesteld?

In ons ziekenhuis bestaat er geen uitgewerkt zorgpad voor patiënten met arthralgiën.

## **STUDIE IN GASTHUISBERG**

---

In LAG gebeurt het doseren van deze antistoffen momenteel met de Immunoscan RA kit (Euro-Diagnostica), een anti-CCP test van de tweede generatie. Bij de implementatie van deze test in het laboratorium in 2003 was het destijds de enige commerciële kit op de Europese markt beschikbaar. Aan de hand van de gegevens van het iQC-materiaal zijn er echter twijfels over de reproduceerbaarheid van deze test, vooral bij hoge titers. Van deze kit is er nu een nieuwe versie op de markt gekomen, waarbij gewerkt wordt op kamertemperatuur in plaats van op 37°C.

We vonden 5 firma's bereid om hun kit voor anti-gecitrullineerde peptide/proteïne antistoffen door ons te laten evalueren. Drie kits maken gebruik van CCP van de tweede generatie, één kit van CCP van de derde generatie en één kit van recombinant gecitrullineerd filaggrine.

## **1 Materials and methods**

### *1.1 Patients and samples*

A total of 298 serum samples were included in this study. Eighty-five patients attended the rheumatology outpatient clinic of our hospital. The diagnosis was established based on the American College of Rheumatologists criteria. Forty patients had established RA (9 males: age range, 49-74 years; median, 60 years and 31 females: age range, 26-77 years; median, 54

years) and 45 patients had early RA (13 males: age range, 37-81 years; median, 64 years and 32 females: age range, 27-84 years; median, 51.5 years). The classification 'established' and 'early' RA was based on the time of serum sampling. The time of serum sampling was more than 2 years after diagnosis of RA for the established RA patient group and less than 1 year after onset of symptoms for the early RA patients group (median, 4 months; range, 0-11 months).

To provide data on assay specificity, 165 diseased controls were studied. This included: (i) 27 patients with psoriatic arthritis, (ii) 99 patients with connective tissue diseases (41 systemic lupus erythematosus, 26 Sjögren syndrome, 18 scleroderma, 8 mixed connective tissue disease and 5 polymyositis/dermatomyositis), (iii) 40 patients with a positive laboratory tests for specific autoantibodies (8 anti-thyroid peroxidase antibodies, 8 antiparietal cell antibodies, 8 anti-tissue transglutaminase antibodies, 8 anti-striated muscle antibodies and 8 anti-mitochondrial antibodies), and (iv) 48 consecutive patients for whom a rheumatologist in our institute ordered anti-CCP antibodies for investigation of joint diseases during the period August and September 2005. Clinical data of consecutively recruited patients were collected retrospectively by review of electronic medical records. Each of those patients was evaluated by documentation of the American College of Rheumatologists criteria, which are considered the gold standard for RA diagnosis. Sixteen patients of this group were identified as having RA.

All serum samples were stored at -20°C until assayed.

The study was approved by the local hospital Ethics Committee.

### *1.2 Determination of anti-citrullinated peptide antibodies*

Five commercially available anti-citrullinated peptide ELISA assays were evaluated. Four assays, Immunoscan RA (Euro-Diagnostica AB, Malmö, Sweden), Anti-CCP ELISA (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Germany), EliA™ CCP (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) and Quanta Lite™ CCP3 IgG ELISA (Inova Diagnostics, Inc., San Diego, CA) detect anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, whereas one kit, Citrullinated Protein Antibodies (Genesis Diagnostics, Cambridgeshire, UK), detects citrullinated recombinant rat fillagrin. The assays of Euro-Diagnostica, Euroimmun and Pharmacia use the same antigen (second generation synthetic cyclic citrullinated peptide), whereas the assay of Inova is a third generation anti-CCP assay. The technical details of the different assays are summarized in Attachment 3. The Genesis, Euro-Diagnostica, Euroimmun and Inova assays were carried out on an automated ELISA instrument, the BEP III (Dade Behring). Serum dilutions were made on the PhD (BioRad). The Pharmacia assay was carried out on the UniCap 100 instrument (Pharmacia) and is a fluoroenzyme immunoassay. The procedures were conducted according to the manufacturers' recommendations. The manufacturers' recommended cutoff values and the cutoff values as determined by the highest sum of sensitivity and specificity were used to calculate the diagnostic performance of each test.

### *1.3 Statistical analysis*

ROC plot analysis, Pearson correlations, and Altman-Bland analysis were performed with Analyze-It, Ver. 1.62 (Smart Software). The areas under the ROC curves were compared by use of the methodology of DeLong et al. This method takes into account possible correlations between the areas under the ROC curves, created by the fact that the same persons underwent all tests.

## 2 Results

### 2.1 Technical performance

*Linearity.* We determined assay linearity by diluting two samples (one containing a medium and one containing a high concentration of anti-citrullinated peptide antibodies) with increasing amounts (from 0% to 100%, in increments of 10%) of a sample that did not contain anti-citrullinated peptide antibodies. The results are shown in Attachment 4. The  $R^2$ -value varied between 0.748 and 0.998. The linearity was problematic at high values for the Euro-Diagnostica and the Euroimmun ELISAs (>200 units/mL and >50 relative units/mL, respectively).

*Imprecision.* We assessed the imprecision by testing 20 aliquots of two serum samples (one sample with a high anti-citrullinated peptide antibodies value and one with a low value), as proposed by NCCLS guideline EP5-A. Within-run CVs varied between 3.7 % and 34.3 % (Attachment 3). The best results were obtained with the Genesis and Inova tests and the worst results with the Euro-Diagnostica test. The between-run imprecision could not be assessed as we performed only a limited number of runs.

*Method comparison.* The range of anti-citrullinated peptide antibodies titers and median anti-citrullinated peptide titer in established RA samples varied substantially among the measurement methods (Attachment 3).

Using Pearson correlation, we evaluated linear correlation among the different assays. The correlation coefficients ( $r$ ) for all possible comparisons are given in Attachment 5 and 6. Low correlation coefficients were observed when the different methods were compared with Inova and Genesis. The correlation coefficient ranged between 0.28 and 0.59 for comparison with Inova and between 0.31 and 0.65 for comparison with Genesis. For the other comparisons the correlation coefficients ranged between 0.76 and 0.91.

For evaluating the degree of agreement, we performed Deming regression analysis and Altman-Bland analysis. The results are shown in Attachment 5 and 6. These analyses showed low agreement among assays. Additionally, Altman-Bland analysis, which was done by plotting the difference between observations against the mean, revealed that the difference between assays increased for increasing means (heteroscedasticity).

### 2.2 Diagnostic performance

Attachment 7 and 8 shows the results obtained for anti-citrullinated peptide antibodies in RA patients and control groups. Sixty-nine of 121 sera from RA patients (40 sera of established RA patients, 45 sera of early RA patients and 16 sera of RA patients in the consecutive group) tested positive with all the assays used. Positive reactions with all the assays were found in 72.5% and 62.2% of the sera in the 'established' RA group and 'early' RA group, respectively.

Thirty of 197 control sera (32 sera of non-RA patients in the consecutive group, 27 sera of psoriatic arthritis patients, 98 sera of patients with connective tissue diseases and 40 sera with specific autoantibodies) showed a positive reaction with one or more assays. Five sera showed a positive reaction with all the assays. The thirty patients with presumptive false positive results were all evaluated by documentation of the American College of Rheumatologists criteria. Patients not fulfilling the ACR criteria were considered as false positive. Three psoriatic arthritis patients, one scleroderma patient and one patient with anti-

striated muscle antibodies fulfilled those criteria and were considered as a true positive value for calculating sensitivity.

Twelve control sera showed a positive reaction only with the Inova assay with antibody concentrations between 21.5 and 220.3 units (median, 37.7 units; average, 58.2 units). Sensitivity and specificity were calculated for each method (Attachment 9). The areas under the curves were 0.869, 0.880, 0.872, 0.896 and 0.904 for Genesis, Euro-Diagnostica, Euroimmun, Pharmacia and Inova methods, respectively. We compared the areas under the ROC of the tests using a methodology of DeLong et al. that takes into account possible correlation between the areas under the ROC for the tests induced by the fact that same persons underwent all tests. No significance difference among the tests was found. Optimum cutoff values based on the highest sum of sensitivity and specificity were estimated and are shown in Attachment 6. In our study the cutoff for the Inova assay was superior to that indicated by the manufacturer (79.28 units versus 20 units). Diagnostic sensitivities and specificities were calculated for each assay at these optimum cutoff values. Sensitivities and specificities were between 74.5 and 80.2 % and between 93.2 and 98.4 %, respectively. We also calculated positive and negative predictive values and positive and negative likelihood ratios (Attachment 9).

## COMMENTS

---

Hoe worden volgens de studie in UZ Gasthuisberg anti-CCP antistoffen nu het beste geanalyseerd?

### *Analytische performantie*

*Reproduceerbaarheid:* De kits van Genesis en Inova hebben de beste reproduceerbaarheid, de kit van Euro-Diagnostica de slechtste (CV% van 13.3%-34.3%).

*Lineariteit:* De lineariteit voor de Euro-Diagnostica en de Euroimmun ELISAs is problematisch bij hoge waarden (>200 units/mL en >50 relative units/mL, respectievelijk).

*Methode vergelijking:* Er is een slechte correlatie en agreement tussen de verschillende kits. De reactiviteit van eenzelfde staal met de verschillende kits is sterk variërend [attachment 5 en 6]. De vraag die we hierbij kunnen stellen is of het wel nut heeft om het resultaat kwantitatief uit te drukken.

### *Diagnostische performantie*

Er bestaat geen significant verschil tussen de AUCs van de ROC-curves voor de verschillende kits. De diagnostische parameters van de verschillende kits zijn vergelijkbaar [attachment 9].

De sensitiviteit van de kit van Genesis die gebruikmaakt van recombinant rat filaggrine ligt iets lager dan bij de kits die gebruikmaken van CCP van de 2<sup>e</sup> generatie. De specificiteit van de kit van Inova die gebruikmaakt van CCP van de 3<sup>e</sup> generatie heeft een iets lagere specificiteit dan de kits die gebaseerd zijn op CCP van de 2<sup>e</sup> generatie. Indien de cutoff waarde gebruikt zou worden waarbij de som van sensitiviteit en specificiteit maximaal is, zijn de diagnostische parameters van de verschillende kits even goed of even slecht.

#### *Financiële en organisatorische impact*

*Huidig aanvraagpatroon:* In 2004 en 2005 werden anti-CCP antistoffen ongeveer 1500 keer per jaar aangevraagd. Een overzicht van de intramuros en extramuros aanvragen wordt gegeven in attachment 1.

*RIZIV nomenclatuur:* Tot op heden werd de bepaling van anti-CCP antistoffen nog niet opgenomen in de nomenclatuurregels; er wordt bijgevolg geen terugbetaling door het RIZIV voorzien. Momenteel wordt aan de patiënt 10.00 euro aangerekend voor anti-CCP antistoffen.

*Schatting kostprijs per test voor de verschillende kits:* De anti-CCP test van Eurodiagnostica, Inova, Euroimmun en Genesis worden uitgevoerd op een microtiterplaat op het automatisch ELISA toestel BepIII. De anti-CCP test van Pharmacia wordt uitgevoerd op het toetsel UniCap 100. Per run kunnen hier 22 patiëntenstalen uitgevoerd worden in tegenstelling tot maximaal 88 (afhankelijk van het aantal calibratoren en controles) voor de andere kits.

	Consumable cost / test (€)	Task unit + logistics cost / test (€)	Total supporting cost / test (€)	Total cost / test (€)
Genesis	11.36	2.53	2.80	16.69
Euro-Diagnostica	7.02	2.53	2.80	12.35
Euroimmun	7.78	2.53	2.80	13.11
Pharmacia	7.60	3.31	2.80	12.84
Inova	8.29	2.53	2.80	13.62

*Berekend op basis van 400 testen / kwartaal en met de huidige personeelsbezetting*

*Uitvoeringsfrequentie:* Momenteel wordt de test éénmaal per 2 weken uitgevoerd zodat een volledige microtiterplaat gevuld is. Indien overgeschakeld zou worden naar Pharmacia zou de test tweemaal per week uitgevoerd moeten worden. Hierdoor zou de TAT dalen van maximaal 14 dagen naar 3-4 dagen.

*Samenvatting:*

	Reproduceerbaarheid	Lineariteit	Keuze cutoff door firma	Prijs/test (€)	Uivoeringsfrequentie
Genesis	+	+/-	+/-	16.69	1x / 2w
Euro-Diagnostica	-	-	+/-	12.35	1x / 2w
Euroimmun	+/-	-	+/-	13.11	1x / 2w
Pharmacia	+/-	+	+	12.84	2x / w
Inova	+	+	-	13.62	1x / 2w

*+: goed; +/-: matig; -: slecht*

De kits die het beste scoren zijn die van Pharmacia en die van Inova indien de cutoff waarde aangepast wordt.

**TO DO/ACTIONS**

---

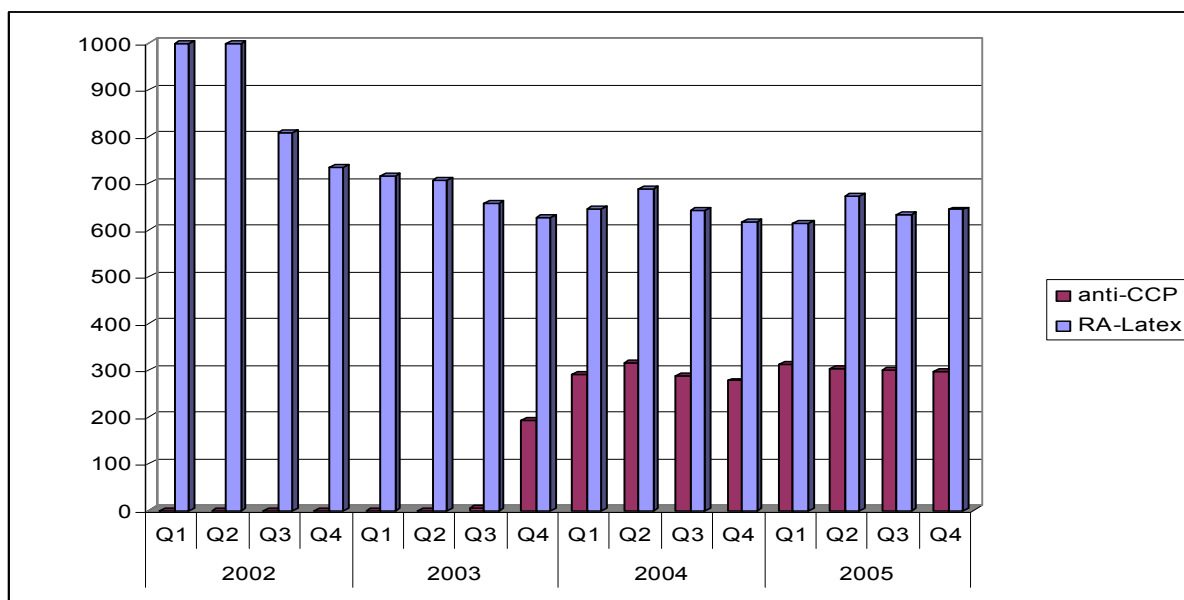
- Vervanging van de huidige kit voor anti-CCP antistoffen. Moet het resultaat kwantitatief of kwalitatief gerapporteerd worden?

## ATTACHMENTS

---

### Attachment 1: Aanvraagpatroon anti-CCP en Reumafactor

#### *Anti-CCP en reumafactor (RA-latex) aanvragen intramuros 2002-2005*



#### *Anti-CCP per aanvragende medische eenheid 2003-2005*

	Aantal uitvoeringen anti-CCP
IG Reumatologie	1585
IG Algemene inwendige	418
IG Nefrologie	83
Dermatologie	70
IG Hematologie	45
IG Lever-Galblaas-Pancreas	45
IG Cardiologie	44
IG Pneumologie	44
Overige	228
<i>Totaal</i>	<i>2562</i>

*Anti-CCP aanvragen extramuros 2003-2005*

	2003	2004	2005	<i>Totaal</i>
Centrum Medische Analyse Herentals	5	181	17	<i>203</i>
AZ Sint-Jan Brugge	1	33	149	<i>183</i>
Centraal Labo Hasselt	6	51	31	<i>88</i>
MCH Leuven	1	11	39	<i>51</i>
Imelda Ziekenhuis Bonheiden	1	3	33	<i>37</i>
Doedoensziekenhuis Mechelen	2	17	16	<i>35</i>
Andere laboratoria	26	102	34	<i>162</i>
<i>Totaal</i>	<i>42</i>	<i>398</i>	<i>319</i>	<i>759</i>

Attachment 2: The diagnostic properties of the anti-CCP2 test [4].



**Table II.** The diagnostic properties of the anti-CCP2 test evaluated in each report.

Author	Manufacturer	Cut-off for a positive test	Patients	Sensitivity (95% CI)	Controls	Specificity (95% CI)
Bombardieri 2004	2	> 5 U	30 RA patients DD1 <sup>†</sup> = 10 years	76.66%	39 HCV patients (8 with articular involvement)	100%
Choi 2005	2	> 3.8 IU	324 RA patients	72.8%	142 OA, 24 FM, 20 SLE, 16 Behçet's, 15 JRA, 34 other RDS, 286 healthy controls	92%
Cornea 2004	3	> 30 U	79 RA patients (total) 69 established RA DD2 = 6.5 years. (SD ± 6.2 years) 10 early RA	94% 96% 80%	56 EAA, 25 SLE, 50 Sjögren's, 10 healthy	92%
De Rycke 2004	1	> 25 U	118 RA patients DD1 = 5 years (range 0.12-44 yrs.)	74.4% (67.7-83.2)	OA 25, PMR 25, SLE 17, PSA 9, other 70	97.3% (93.8-99.1)
Dubucquoi 2004	2	No data	140 RA patients (total) DD = 75 pts. > 2 years 65 pts. < 2 years 21 pts. < 6 months	64.3% 77.3% 49.2% 47.6%	33 healthy, 47 Sjögren's, 51 SLE	96.9%
Grotenboer 2004	1	> 25 U	93 established RA 172 early RA	68.8% 59.9%	21 PsA, 26 primary SS, 44 PMRs	91.2%
Lee 2003	2	> 5 U	103 RA patients - no data on DD Mean age 55.4 years	66%	21 JRA, 21 PsA, 11 spondylitis, 26 inflammatory arthritis, 39 SLE, 23 non-inflammatory, 5 other inflammatory conditions	90.4%
Lopez-Hoyos 2004	1	> 50 U	57 EORA 41 classical RA	64.7% 92.7%	49 PMRs, 24 healthy	100%
Nielen 2005	1	> 25 U	258 early RA DD: 0.4 years (0.3 to 0.7) <sup>§§</sup>	57.8%	121 Undifferentiated arthritis DD: 0.4 years (0.3 to 0.6) <sup>§§</sup>	94.2%
Pinheiro 2003	No data	No data	150 RA patients DD: "long duration"	80%	50 controls No description	98%
Suzuki 2003	2	> 4.5 U	549 RA DD1 = 9.4 years (range 6 weeks to 56 years) 91 early RA 166 RF (-) RA patients	87.6% 83.5% 69.3%	56 SLE, 35 SSS, 30 Sjögren's, 24 PM/DM, 16 MCTD, 15 vasculitis, 15 OA, 15 other rheumatic diseases, 320 normal individuals	88.9%
Vallbracht 2004	1	> 25 U	295 RA patients DD2 = 8.3 years. (SD ± 10.1) 97 early RA (DD < 1 year) 87 all RF (-) RA patients 99 IgM RF (-) RA patients	64.4% 14.4% 34.5% 38.4%	163 Deg/inflam joint diseases 103 CTDs/Vasculitis 154 healthy controls	97.1%
Van Gaalen 2005	1	> 25 U	476 early arthritis cohort 153 RA	53.6%	107 Undifferentiated arthritis (UA), 38 crystal, 29 SPA 28 PsA, 25 MCTD, 25 OA, 16 ReAr, 46 others	93.6% (considering only UA)  95.9% (considering all controls)

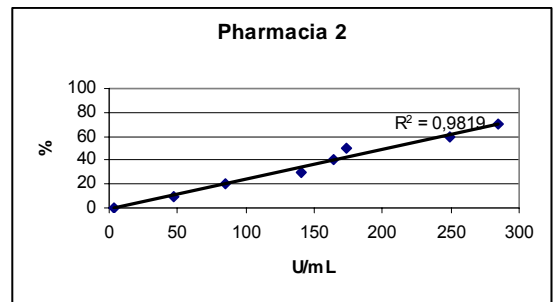
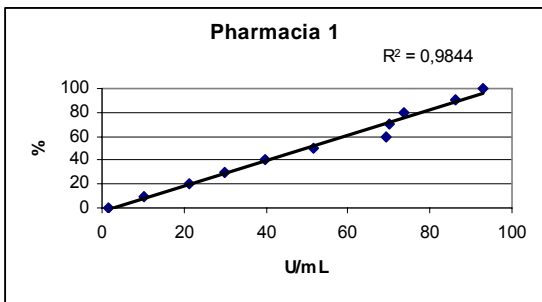
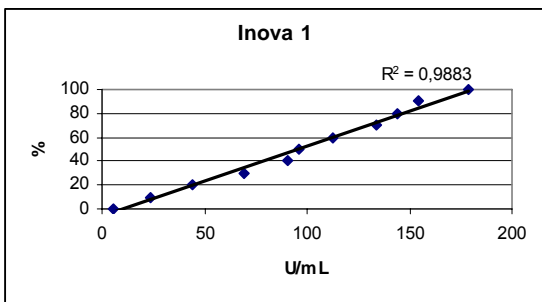
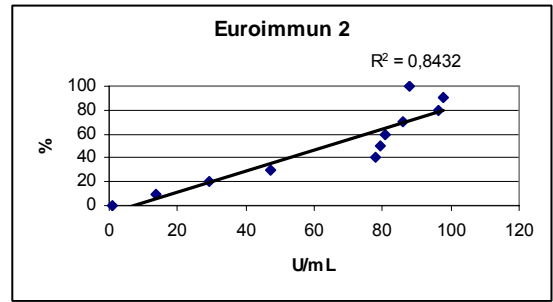
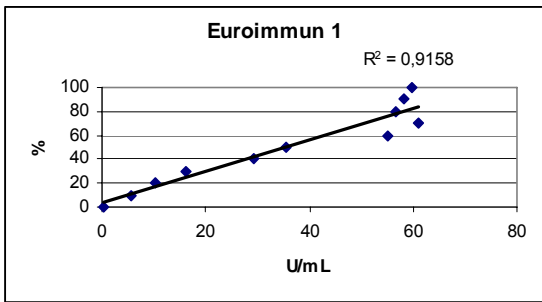
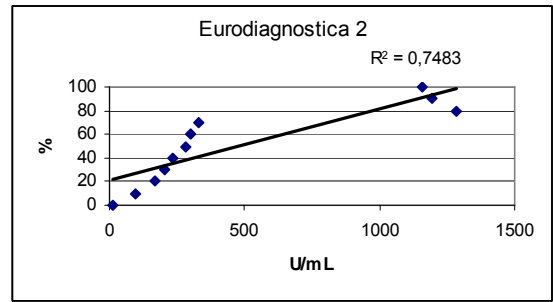
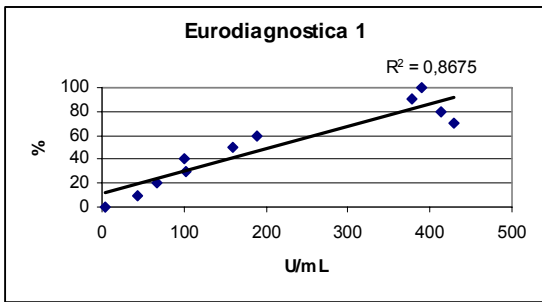
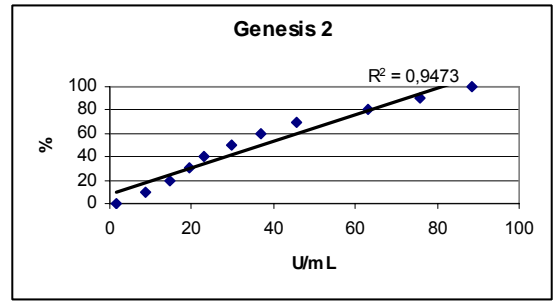
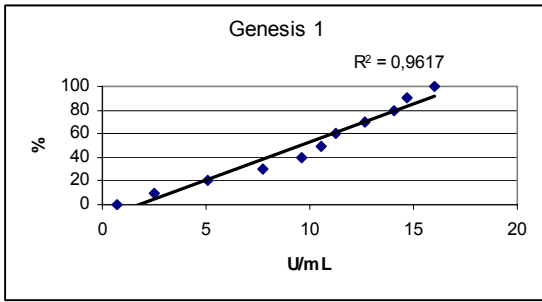
† Test manufacturer: 1 = Euro-Diagnostica, The Netherlands; 2 = Axis-Shield, UK; 3 = Inova Diagnostic, USA.  
 ‡ DD) = disease duration: 1: median; 2: mean §§ median (interquartile range).

## Attachment 3: Assay characteristics.

Manufacturer	Antigen/preparation	Serum dilution	Incubation times (serum, conjugate and substrate)	No. of calibrators	Conjugate	Substrate	Proposed cutoff	Measuring range	Range (median) of 40 'established' RA samples	Linearity ( $R^2$ )	Within-run CV
Genesis	Recombinant citrullinated rat filagrin	1:100	30 min; 30 min; 10 min	6	Rabbit anti-human IgG / HRP	TMB	6,25 units/mL	0-100 units/mL	0,5->100 (29,4) units/mL	0,962-0,947	5,9%; 4,8%
Euro-Diagnostica	Second generation synthetic cyclic citrullinated peptides	1:50	60 min; 30 min; 30 min	5	Anti-human IgG / HRP	TMB	25 units/mL	25-1600 units/mL	<25->1600 (195,3) units/mL	0,868-0,748	13,4%; 34,3%
Euroimmun	Second generation synthetic cyclic citrullinated peptides	1:100	60 min; 30 min; 30 min	6	Monoclonal mouse anti-human IgG / AP	pNPP	5 relative units/mL	0-200 relative units/mL	0->200 (51,1) relative units/mL	0,916-0,916	12,6%; 11,9%
Pharmacia	Second generation synthetic cyclic citrullinated peptides	1:100	30 min; 28 min; 39 min	6	Monoclonal mouse anti-human IgG / $\beta$ -galactosidase	4-Mehylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside	7 EliA units/mL	0,4-340 EliA units/mL	0,4->340 (157,0) EliA units/mL	0,984-0,982	7,2%; 9,8%
Inova	Third generation synthetic cyclic citrullinated peptides	1:101	30 min; 30 min; 30 min	5	Goat anti-human IgG / HRP	TMB	20 units	15,62-250 units	<15,62->250 (>250) units	0,988	3,7%; 5,1%

Within-run CV was assessed by measurement of 20 aliquots of two samples in one run. One sample contained 4,6 relative units/mL and the other 67,7 relative units/mL (Euroimmun). AP, alkaline phosphatase; pNPP, p-nitrophenyl phosphate; HRP, horseradish peroxidase; TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

Attachment 4: Linearity

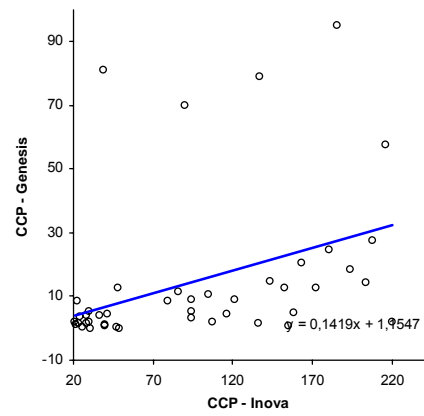
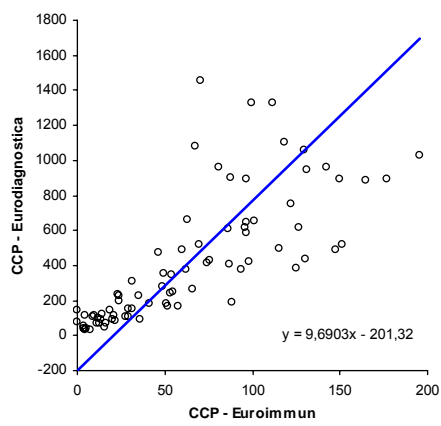
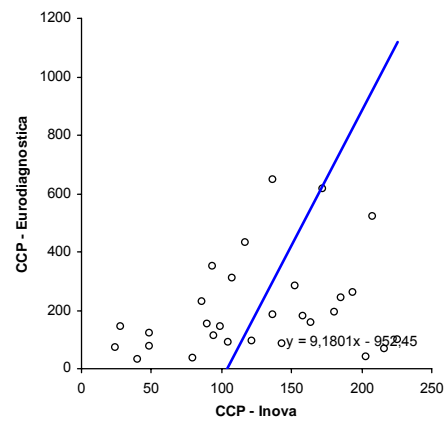
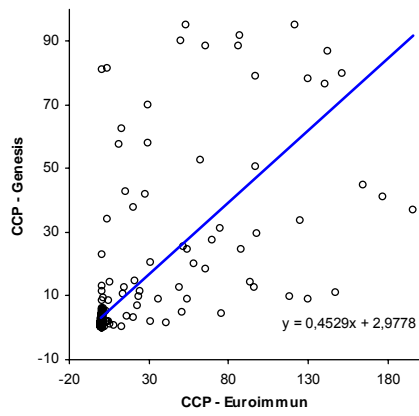
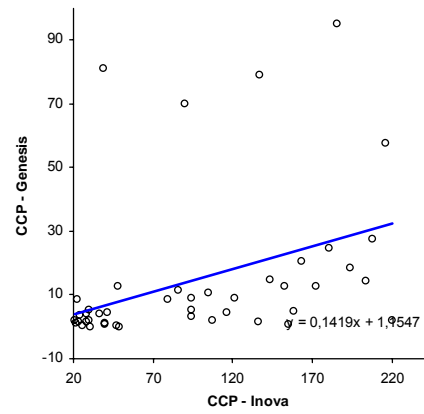
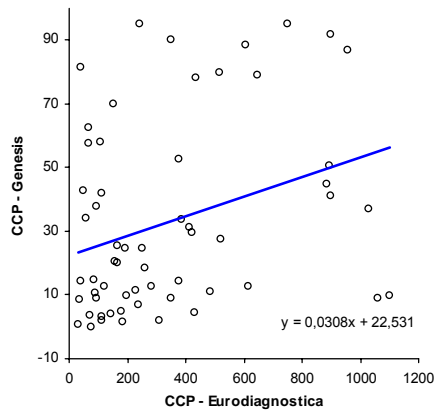


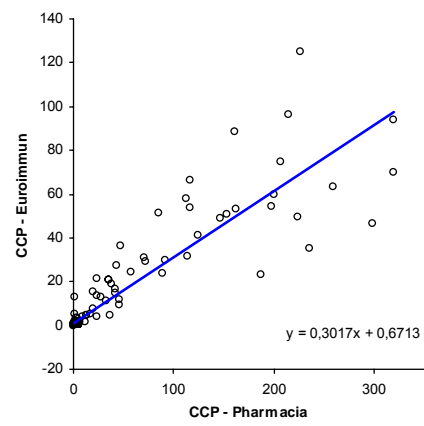
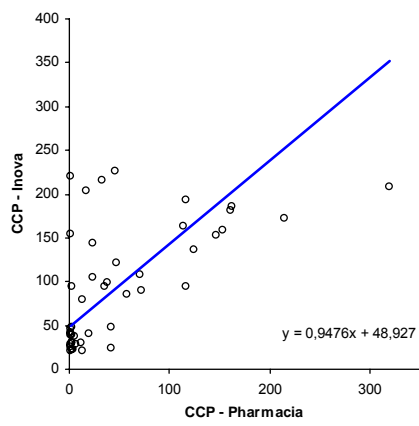
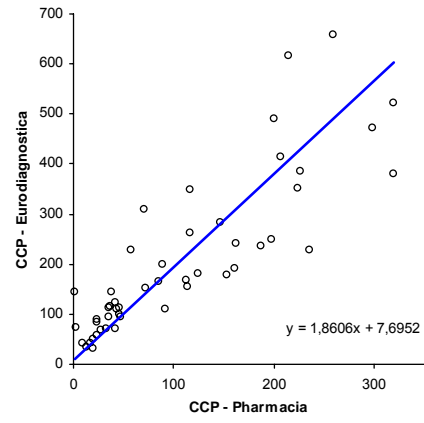
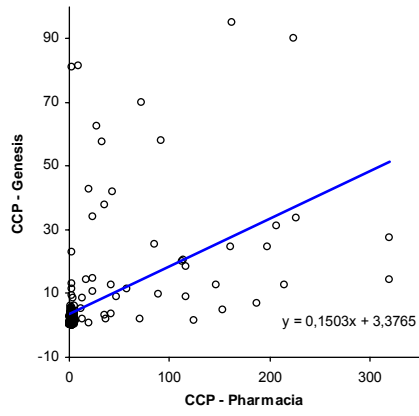
Attachment 5. Results of Pearson correlation (r), Altman-Bland analysis (bias) and Deming regression (intercept and slope).<sup>a</sup>

		y-axis			
		Genesis	Eurodiagnostica	Euroimmun	Inova
x-axis	Eurodiagnostica				
	r	0,31			
	bias	-309,96			
	intercept	22,53			
	slope	0,03			
	Euroimmun				
	r	0,65	0,76		
	bias	-4,89	357,45		
	intercept	2,98	-201,32		
	slope	0,45	9,69		
	Inova				
	r	0,35	0,28	0,56	
	bias	-81,51	79,47	-76,23	
	intercept	1,15	-952,45	-3,73	
	slope	0,14	9,18	0,27	
	Pharmacia				
r	0,48	0,85	0,91	0,59	
bias	-11,85	98,94	-14,52	46,22	
intercept	3,38	7,70	0,67	48,93	
slope	0,15	1,86	0,30	0,95	

<sup>a</sup> Results exceeding the measuring range were excluded from the statistical analysis

Attachment 6: Correlation plots



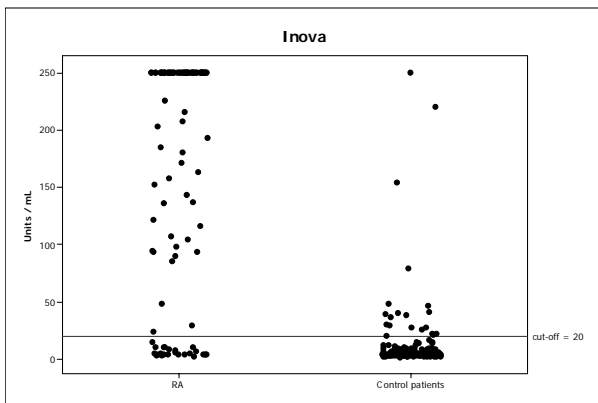
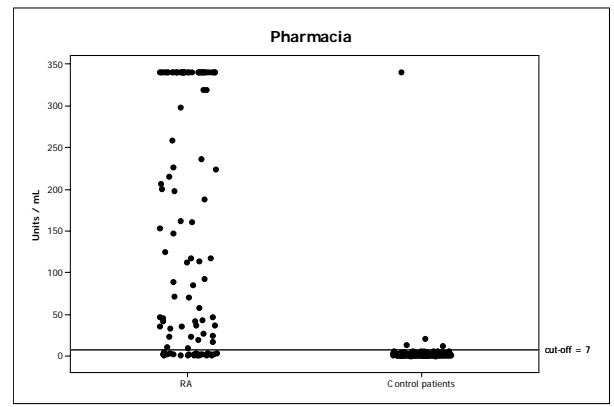
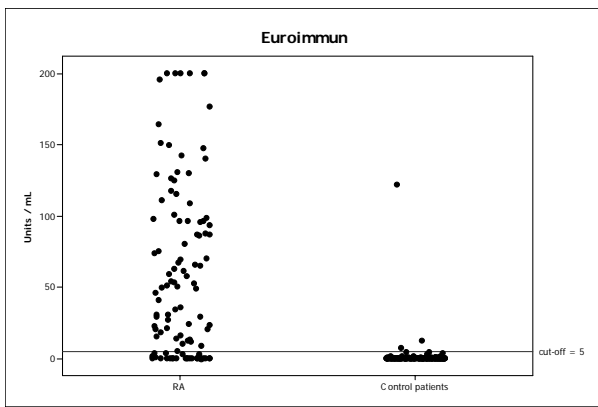
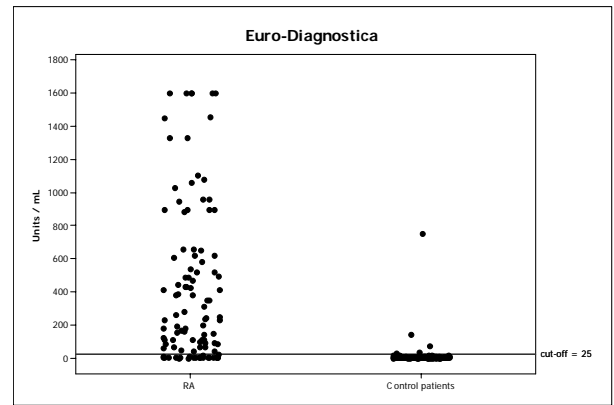
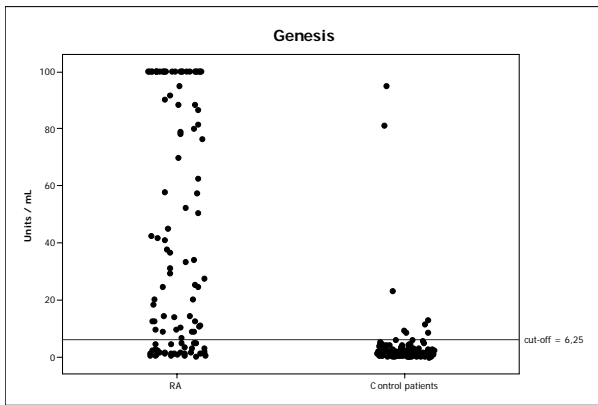


Attachment 7: Anti-citrullinated peptide antibodies in RA patients and control groups.<sup>a</sup>

	Total, n	Genesis Positive, n (%)	Euro-Diagnostica Positive, n (%)	Euroimmun Positive, n (%)	Pharmacia Positive, n (%)	Inova Positive, n (%)	All tests Positive, n (%)
RA patients							
Established RA	40	30 (75,0)	32 (80,0)	31 (77,5)	32 (80,0)	32 (80,0)	29 (72,5)
Early RA	45	29 (64,4)	32 (71,1)	31 (68,9)	32 (71,1)	33 (73,3)	28 (62,2)
Consecutive patients							
RA	16	12 (75,0)	13 (81,2)	12 (75,0)	14 (87,5)	13 (81,2)	12 (75,0)
Non-RA	32	2 (6,2)	0 (0)	0 (0)	1 (3,1)	3 (9,4)	0 (0)
Diseased controls							
Psoriatic arthritis	27	3 (11,1)	3 (11,1)	3 (11,1)	3 (11,1)	3 (11,1)	3 (11,1)
Connective tissue diseases							
Systemic lupus erythematosus	41	2 (4,9)	2 (4,9)	1 (2,4)	1 (2,4)	7 (17,1)	0 (0)
Sjögren syndrome	26	2 (7,7)	2 (7,7)	1 (3,8)	2 (7,7)	3 (11,5)	1 (3,8)
Scleroderma	18	1 (5,6)	2 (11,1)	2 (11,1)	1 (5,6)	6 (33,3)	1 (5,6)
Mixed connective tissue disease	8	0 (0,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)
Polymyositis/dermatomyositis	5	1 (20,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Specific autoantibodies							
Anti-thyroid peroxidase	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Anti-parietal cell	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)
Anti-tissue transglutaminase	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Anti-striated muscle	8	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0 (0)
Anti-mitochondrial	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup>At Manufacturer's cutoff

Attachment 8: Distrubution of the test results for RA and control patients





Attachment 9

	<b>Genesis</b>	<b>Eurodiagnostica</b>	<b>Euroimmun</b>	<b>Pharmacia</b>	<b>Inova</b>
<b>Area under ROC curve (95% CI)</b>	0,869 (0,821-0,918)	0,880 (0,831-0,930)	0,872 (0,820-0,924)	0,896 (0,851-0,941)	0,904 (0,863-0,945)
<b>Manufacturer's cutoff</b>	6,25 units/mL	25 units/mL	5 relative units/mL	7 EliA units/mL	20 units
<b>Sensitivity (95% CI)</b>	70,8% (61,1-79,2)	77,4% (68,2-84,9)	74,5% (65,1-82,5)	78,3% (69,2-85,7)	78,3% (69,2-85,7)
<b>Specificity (95% CI)</b>	95,8% (92,0-98,2)	97,4% (94,0-99,1)	97,9% (94,8-99,4)	97,9% (94,8-99,4)	89,6% (84,4-93,5)
<b>Positive predictive value</b>	90,4%	94,3%	95,2%	95,4%	80,6%
<b>Negative predictive value</b>	85,6%	88,6%	87,4%	89,1%	88,2%
<b>Positive likelihood ratio</b>	16,9	29,8	35,5	37,3	7,53
<b>Negative likelihood ratio</b>	0,305	0,232	0,260	0,222	0,242
<b>Optimum cutoff*</b>	4,59 units/mL	16,62 units/mL	1,66 relative units/mL	6,20 EliA units/mL	79,28 units
<b>Sensitivity (95% CI)</b>	74,5% (65,1-82,5)	79,2% (70,3-86,5)	80,2% (71,3-87,3)	78,3% (69,2-85,7)	75,5% (66,2-83,3)
<b>Specificity (95% CI)</b>	93,2% (88,7-96,3)	97,4% (94,0-99,1)	95,8% (92,0-98,2)	97,9% (94,8-99,4)	98,4% (95,5-99,7)
<b>Positive predictive value</b>	85,9%	94,4%	91,4%	95,4%	96,4%
<b>Negative predictive value</b>	86,9%	89,5%	89,8%	89,1%	87,9%
<b>Positive likelihood ratio</b>	11,0	30,5	19,1	37,3	47,2
<b>Negative likelihood ratio</b>	0,274	0,214	0,207	0,222	0,249

\* based on the highest sum of sensitivity and specificity, does not account for prevalence and spectrum of patients