

## Wartość oznaczenia przeciwciał przeciwko cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi w diagnostyce młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów

*Clinical utility of the anti-cyclic citrullinated peptide assay in children with juvenile idiopathic arthritis*

Zbigniew Żuber, Agata Piegza, Małgorzata Sobczyk, Alicja Garlicka

Oddział Reumatologii i Poradnia Reumatologiczna Wojewódzkiego Specjalistycznego Szpitala Dziecięcego im. św. Ludwika, Kraków, dyrektor Szpitala lek. Stanisław Stępniewski

**Słowa kluczowe:** młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, reumatoidalne zapalenie stawów, przeciwciała anti-CCP.

**Key words:** juvenile idiopathic arthritis, rheumatoid arthritis, anti-CCP antibodies.

### Streszczenie

Przeciwciała przeciwko cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anti-CCP) są wysoko specyficznym markerem reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Oceniano wartość oznaczenia obecności przeciwciał anti-CCP w surowicy krwi u dzieci z rozpoznaniem młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (MIZS). Badanie przeprowadzono w grupie 51 dzieci chorych na MIZS. Rozpoznanie postawiono zgodnie z kryteriami ILAR z 1997 r., średni wiek chorych dzieci wyniósł 10,75 roku (3–17 lat), czas trwania choroby średnio 2,5 roku (3-mies., do 13,5 roku). Grupę kontrolną stanowiło 21 dzieci bez stanu zapalnego stawów, u których rozpoznano choroby neurologiczne. Badanie obecności przeciwciał anti-CCP w surowicy krwi wykonano metodą ELISA. Wartości powyżej 5 j.m./ml uznano za wynik pozytywny. Przeciwciała anti-CCP stwierdzono u 3 chorych (5,88%) dziewczynek w wieku powyżej 10 lat z MIZS o początku wielostawowym, z obecnością czynnika reumatoidalnego (RF). W odróżnieniu od RZS występowanie przeciwciał anti-CCP u dzieci z MIZS jest znacznie rzadsze, nie może być użyte jako wysoko specyficznego marker w rozpoznaniu choroby.

Obecność przeciwciał anti-CCP w specyficznej grupie chorych: u dziewczynek z wielostawowym początkiem MIZS i obecnością RF, być może pozwoli wyodrębnić grupę pacjentów z przebiegiem choroby najbardziej zbliżonym do klasycznego RZS u dorosłych.

### Summary

Antibodies against cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) are considered to be specific for rheumatoid arthritis (RA). Aim: to correlate serum anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels with juvenile idiopathic arthritis (JIA). The study group comprised 51 patients with JIA (16 boys, 35 girls). Diagnoses were made using ILAR criteria from 1997, patients mean age was 10.75 years (from 3 to 17 years old), mean disease duration was 2.5 years (from 3 months to 13.5 years). As a control group, anti-CCP were tested in sera of 21 children with neurological diseases.

Anti-CCP were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serum, values above 5 relative units (>5 RU/ml) were regarded as positive.

Positive anti-CCP values were found in sera of three girls with seropositive polyarticular JIA (5.88%). Anti-CCP positivity is identified rarely in JIA patients; it cannot be used as a diagnostic test with high specificity. Detection of anti-CCP positivity in a specific group of patients: girls with seropositive polyarticular JIA, allow to separate picture closest to the classical form of RA in adult patients.

---

### Adres do korespondencji:

dr med. Zbigniew Żuber, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital Dziecięcy, ul. Strzelecka 2, 31-503 Kraków, tel. +48 12 421 13 44, faks +48 12 421 37 65; e-mail: zbzyszczkzuber@interia.pl

**Praca wpłynęła:** 29.03.2006 r.

## Wstęp

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) jest najczęstszą przewlekłą artropatią w wieku rozwojowym. Jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, o nieustalonej etiologii. Charakteryzuje się różnorodnością obrazu klinicznego i przebiegu. W jego przebiegu często następuje uogólnienie procesu chorobowego i zaburzeń rozwojowych na skutek postępującej destrukcji stawów i następczych zaburzeń wzrastania.

MIZS różni się od reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) u dorosłych. Różnica dotyczy zarówno obrazu klinicznego, przebiegu choroby, jak również obecności markerów immunologicznych – u dzieci znacznie rzadziej wykrywa się obecność czynnika reumatoidalnego klasy IgM. Trwają badania oceniające przydatność bardziej czułych i specyficznych markerów diagnostycznych w MIZS pozwalających na szybkie wykrycie i klasyfikację choroby, a tym samym szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia i zminimalizowanie rozwoju trwałych uszkodzeń stawów.

U chorych na RZS wykrywane są przeciwciała skierowane przeciwko fillagrynie, białku występującym w naskórku. Rolą fillagryny jest utrzymywanie połączeń pomiędzy filamentami keratyny. Częstość występowania przeciwciał przeciwko fillagrynie u pacjentów z RZS wynosi 40–60% [1]. Występujący w fillagrynie aminokwas – cytrulina jest najistotniejszym składnikiem epitopu antygeny. Zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej oznaczenia przeciwciał skierowanych przeciwko cytrulinie znacznie poprawiło możliwości diagnostyczne w RZS.

Jakość oznaczeń stała się lepsza szczególnie po wprowadzeniu do testu białka o strukturze kolistej – *cyclic cytrulinated peptid* (CCP). Przeciwciała przeciwko CCP (anty-CCP) stały się wysoko specyficznym markerem RZS [1–3].

Cytrulina to aminokwas powstający poprzez translację z aminokwasu argininy przy udziale deaminazy białkowo-argininowej (PAD). Białka cytrulinowe (np. fibryna) odkładające się w błonach maziowych stawów stanowią przyczynę autoimmunizacji, powstają przeciwko nim przeciwciała anty-CCP. Są one obecne u znacznej grupy dorosłych chorujących na RZS – zarówno w krwi obwodowej, jak i w płynie stawowym. Przeciwciała przeciwko CCP należą przeważnie do klasy IgG.

W odróżnieniu od czynnika reumatoidalnego (RF) i przeciwciał przeciwjądrowych (ANA), przeciwciała anty-CCP pojawiają się nawet 10 lat przed wystąpieniem pełnoobjawowego RZS [3, 4]. Mają one dużą wartość prognostyczną: u pacjentów z obecnością przeciwciał anty-CCP częściej obserwuje się ciężką destrukcyjną postać choroby, z wczesnymi zmianami radiologicznymi.

Istotna jest wysoka specyficzność przeciwciał anty-CCP, która dla RZS sięga 97% [2, 5].

W porównaniu z czynnikiem reumatoidalnym przeciwciała przeciwko CCP są bardziej specyficzne (anty-CCP: 97% vs RF: 62%), przy zachowaniu podobnej czułości (anty-CCP: 80% vs RF: 79%) [1]. Według niektórych autorów [6], czułość jest niższa i wynosi 40–75%.

Przeciwciała te wykrywa się u 70% pacjentów we wczesnym okresie choroby [7].

## Cel pracy

Celem badania było określenie przydatności testu wykrywającego obecność przeciwciał anty-CCP w diagnozowaniu, leczeniu i rokowaniu MIZS.

## Materiał i metody

Badanie obecności przeciwciał anty-CCP w surowicy wykonano w grupie dzieci chorujących na MIZS, pozostających w stałym leczeniu na Oddziale i w Poradni Reumatologicznej Wojewódzkiego Specjalistycznego Szpitala Dziecięcego św. Ludwika w Krakowie w okresie od 28.10.2002 do 28.10.2005 r.

Badanie obecności przeciwciał anty-CCP wykonano w laboratorium Szpitala Uniwersyteckiego w II Klinice Chorób Wewnętrznych w Krakowie, przy użyciu metody ELISA. Oznaczenia dokonywano w surowicy krwi. Ponieważ nie istnieje międzynarodowa surowica referencyjna do oceny przeciwciał anty-CCP, kalibrację przeprowadza się w jednostkach względnych (*relativ unit*; RU/ml).

Zakres wartości referencyjnych dla powyższego testu wynosił 0–5 j.m./ml.

Grupę pacjentów chorujących na MIZS stanowiło 51 dzieci w wieku od 3 lat i 6 mies. do 17 lat i 2 mies. (średnio 9 lat i 9 mies.), w tym 35 dziewczynek (68,62%) i 16 chłopców (31,38%). Uwzględniając klasyfikację *International Ligue anti-Rheumatism* (ILAR) z 1997 r. [8]:

- u 2 dzieci (3,92%) rozpoznano MIZS o początku uogólnionym,
- u 18 dzieci (35,29%) rozpoznano MIZS o początku wielostawowym,
- u 31 dzieci (60,78%) rozpoznano MIZS o początku nielicznostawowym.

Obecność czynnika reumatoidalnego (RF) stwierdzono u 6 dzieci płci żeńskiej (11,76% ogółu chorych) z MIZS o początku wielostawowym.

Czas trwania choroby u badanych dzieci wynosił od 3 mies. do 13 lat i 6 mies. (średnio 2 lata i 6 mies.).

Aktywność choroby oceniano na podstawie obrazu klinicznego, skali bólu VAS, nawrotów wysięków w stawach, czasu trwania sztywności porannej oraz laboratoryjnych wskaźników stanu zapalnego. Szczególną uwagę w ocenie zaawansowania procesu chorobowego zwracano na zaburzenia wzrastania, zarówno opóźnienie wzrostu – niskorosłość, jak i nierównomierność wzrastania

kończyn. Oceny dokonywano na podstawie badań antropometrycznych. U wszystkich dzieci wykonywano badania obrazowe RTG i USG zajętych stawów.

Na podstawie laboratoryjnych wskaźników stanu zapalnego dokonano podziału chorych na 2 grupy: o niskiej i wysokiej aktywności choroby. Oceniano następujące parametry: OB, CRP, leukocytozę, liczbę płytek krwi oraz stężenie alfa2-globulin i gamma-globulin.

Do grupy chorych o niskiej aktywności choroby (1) zaliczono 14 chorych z wartościami OB poniżej 28 mm/godz. oraz CRP poniżej 20 mg/l, do grupy chorych o wysokiej aktywności choroby (2) zaliczono chorych z wartościami OB powyżej 28 mm/godz. i CRP powyżej 20 mg/l.

W pierwszej grupie chorych (1) średnia wartość OB wynosiła 12 mm/godz., średnia wartość CRP – 7 mg/l, średnia wartość leukocytozy –  $6,7 \times 10^9/l$ , średnia wartość liczby płytek krwi –  $210 \times 10^9/l$ , średnie stężenie alfa2-globulin – 0,94 g/dl, średnie stężenie gamma-globulin – 1,24 g/dl.

W drugiej grupie chorych (2) średnia wartość OB wynosiła 48 mm/godz., średnia wartość CRP – 29 mg/l, średnia wartość leukocytozy –  $13,5 \times 10^9/l$ , średnia wartość liczby płytek krwi –  $341 \times 10^9/l$ , średnie stężenie alfa2-globulin – 0,98 g/dl, średnie stężenie gamma-globulin – 1,40 g/dl.

Sztynność poranną trwającą poniżej 30 min. stwierdzono u 23 chorych, a u 28 chorych trwała ona ponad 30 min.

Ze względu na czas trwania choroby wyróżniono 3 grupy chorych z rozpoznaniem MIZS:

- grupę 14 dzieci z czasem trwania choroby od 3 do 12 mies. (średnio 6 mies.),
- grupę 17 dzieci z czasem trwania choroby od 12 do 36 mies. (średnio 18 mies.),
- grupę 20 dzieci z czasem trwania choroby powyżej 36 mies. (średnio 60 mies.).

W grupie kontrolnej było 21 dzieci leczonych z innych niż MIZS powodów, najczęściej z powodu chorób neurologicznych (przewlekłych napięciowych bólów głowy, migreny, padaczki), u których nie obserwowano dolegliwości stawowych. Było to 13 dziewczynek (62%) oraz 8 chłopców (38%) w wieku 3–17 lat (średnio 10 lat i 9 mies.). Wskaźniki laboratoryjne stanu zapalnego u wszystkich dzieci z grupy kontrolnej były prawidłowe. Nie stwierdzono u nich obecności czynnika reumatoidalnego w surowicy krwi.

## Wyniki

W grupie dzieci chorujących na MIZS obecność przeciwciał anti-CCP stwierdzono jedynie u 3 dziewcząt, co stanowi 5,88% ogółu chorych (u jednej chorej poziom przeciwciał anti-CCP wyniósł 59,87 j.m./ml, u dwóch

pozostałych powyżej 100 j.m./ml). W pozostałej grupie badanych poziom przeciwciał anti-CCP nie przekraczał wartości referencyjnych, a jego średnia wartość wynosiła 0,605 j.m./ml.

Wśród chorych z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym (RF+) obecność przeciwciał anti-CCP stwierdzono u 3 chorych dzieci. Wśród chorych z MIZS o początku wielostawowym odsetek chorych z obecnością przeciwciał anti-CCP wynosi 16,66%. W grupie chorych na MIZS z postacią o początku uogólnionym i nielicznostawowym nie stwierdzono obecności przeciwciał anti-CCP.

W grupie kontrolnej nie stwierdzono obecności przeciwciał anti-CCP u żadnego z pacjentów, a średnia wartość wynosiła 0,59 j.m./ml.

Dziewczynki, u których stwierdzono obecność przeciwciał anti-CCP, chorowały na MIZS o początku wielostawowym z obecnością czynnika reumatoidalnego (RF+) w surowicy krwi. Miały powyżej 10 lat, chorowały ponad 3 lata, u wszystkich stwierdzono wysoką aktywność choroby (OB – wartość średnia 94 mm/godz., CRP – wartość średnia 22,6 mg/l), ze sztywnością poranną trwającą dłużej niż 30 min (wartość średnia 120 min).

## Omówienie

W badanej grupie dzieci obecność przeciwciał anti-CCP zanotowano jedynie u 3 chorych (5,88%), natomiast u 48 chorych (94,12%) wynik był ujemny. Wyniki dodatnie obserwowano w charakterystycznej grupie: tylko u dziewczynek w wieku powyżej 10 lat chorujących ponad 3 lata na MIZS o początku wielostawowym, o wysokiej aktywności choroby, z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym w surowicy krwi.

Zbyt mała grupa badanych nie może stanowić odniesienia dla wszystkich dzieci chorujących na MIZS, wymaga to dalszych badań i obserwacji, jednak wyniki uzyskane w tej grupie potwierdzają dodatnią korelację pomiędzy obecnością przeciwciał anti-CCP a wysoką aktywnością choroby i pewnym prawdopodobieństwem przebiegu choroby w sposób zbliżony do klasycznej postaci RZS u dorosłych.

Trudności diagnostyki serologicznej u dzieci chorujących na MIZS potwierdza badanie autorów niniejszej pracy. Podobnie jak przy oznaczaniu czynnika reumatoidalnego (u dzieci tylko 15–20% postaci seropozytywnych), również oznaczenie przeciwciał anti-CCP nie może być traktowane jako test potwierdzający rozpoznanie MIZS. Zbyt mała liczba chorych z obecnością przeciwciał anti-CCP nie pozwala na wyciąganie zbyt daleko idących wniosków. Być może przy dużej liczbie przebadanych pacjentów uda się wyodrębnić grupę chorych o przebiegu choroby zbliżonym do klasycznego RZS u dorosłych [11].

Obecność wysokiego poziomu przeciwciał anti-CCP, podobnie jak u dorosłych jest związana z destrukcyjną postacią choroby. Występuje tylko u dzieci starszych (dziewczynek) w zaawansowanym stadium choroby. Nie stwierdzono obecności przeciwciał anti-CCP u chorych na MIZS o początku uogólnionym i nie-licznostawowym.

W przypadku chorych dorosłych z rozpoznaniem RZS można uznać przeciwciała anti-CCP za czuły i specyficzny marker, jednak w przypadku dzieci z rozpoznaniem MIZS takiego stwierdzenia nie można użyć. Zbyt mała liczba pacjentów *anti-CCP-pozytywnych* w grupie dzieci i młodzieży nie pozwala na wyciąganie tak daleko idących wniosków. W materiałach firmy Euroimmun (producenta testu) odsetek chorych z rozpoznaniem MIZS *anti-CCP-pozytywnych* wyniósł 23%. Wyraźnie niższy niż u dorosłych z RZS jest odsetek dzieci chorych na MIZS z obecnością przeciwciał anti-CCP. W dostępnej literaturze [9–12] są to wartości od 2 do 14%.

W badaniu Hromadnikowej [10] odsetek chorych na MIZS z obecnością przeciwciał anti-CCP określono na 5% spośród 140 przebadanych, w materiale Kasapcopur [11] oraz Avcin i Cimaz [9] odsetek chorych z rozpoznaniem MIZS i obecnością przeciwciał anti-CCP wynosi odpowiednio 2% i 1,8% na 122 i 109 przebadanych pacjentów. Jedynie w doniesieniu van Rossuma [12] określono odsetek chorych na MIZS z obecnością przeciwciał anti-CCP na 14% spośród 71 badanych.

Różnice te wynikają najprawdopodobniej z różnorodności doboru pacjentów w zakresie poszczególnych postaci MIZS. Wyraźnie rysuje się korelacja pomiędzy postacią wielostawową MIZS a obecnością przeciwciał anti-CCP. W badaniu Kasapcopur [11] obecność przeciwciał anti-CCP stwierdzono jedynie u trojga dzieci z MIZS o wielostawowym początku na 122 przebadanych. W badaniu van Rossuma [12] obecność przeciwciał anti-CCP stwierdzono u 73% chorych na MIZS o początku wielostawowym *RF-pozytywnych*, natomiast w innych postaciach MIZS odsetek chorych *anti-CCP-dodatnich* określono na 3%.

W badaniu Hromadnikowej [10] odsetek chorych z obecnością przeciwciał anti-CCP wyniósł 5%, tj. 7 spośród 140 przebadanych, w tej grupie u 5 pacjentów rozpoznano MIZS o początku wielostawowym, u dwojga chorych rozpoznano inne postaci MIZS.

Na podstawie dostępnej literatury obecność wysokich poziomów przeciwciał anti-CCP można uznać za bardzo istotny czynnik rokowniczy. Może on być przydatny jako dodatkowe wskazanie do włączenia intensywnego leczenia immunosupresyjnego lub antycytokinowego we wczesnym okresie choroby, w celu szybkiego zahamowania rozwoju destrukcyjnej postaci choroby w tej grupie młodych chorych.

Musimy pamiętać o ciężkich następstwach choroby u dzieci, szczególnie o zaburzeniach wzrastania, zajęciu narządu wzroku oraz obniżeniu jakości życia znacznego stopnia. Wczesne rozpoznanie pozwala stosunkowo szybko ustalić prognozę przebiegu choroby, a co za tym idzie – wdrożyć właściwe leczenie.

Trudne rozpoznanie MIZS zmusza nas do dalszego poszukiwania skutecznych metod diagnostycznych, szczególnie przydatnych we wczesnych okresach choroby, przed wystąpieniem pełnoobjawowego zespołu chorobowego, co umożliwi wdrożenie optymalnego leczenia.

Ze względu na odmienności przebiegu choroby i niedojrzałość układu immunologicznego jest to trudne. Jak wyraźnie widać na podstawie analizowanego materiału badawczego, tak czuły (80%) i wysoko specyficzny (97%) marker RZS, jak obecność przeciwciał anti-CCP u dzieci z rozpoznaniem MIZS, jest wykrywany tylko u kilku procent chorych, co nie pozwala na wyciąganie wiążących wniosków.

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonego badania można stwierdzić, że obecność przeciwciał anti-CCP nie może być wykorzystywana jako badanie skryningowe czy wysoko specyficzny marker diagnostyczny u wszystkich pacjentów chorujących na MIZS. Tym bardziej, że obecność przeciwciał anti-CCP u dzieci nie jest do końca wyjaśniona [9, 11, 12]. Pod uwagę należy wziąć hipotezę niedojrzałości układu immunologicznego u dzieci i młodzieży. Jednak obecność przeciwciał anti-CCP stanowi bardzo ważny czynnik rokowniczy u pacjentów chorujących na MIZS o ciężkim, trudno poddającym się leczeniu przebiegu. Na podstawie przeprowadzonych badań oraz przytoczonego piśmiennictwa można wysnuć wniosek, że obecność przeciwciał anti-CCP u dzieci płci żeńskiej z MIZS o początku wielostawowym, z obecnością RF sugeruje w tej grupie chorych rozwój choroby najbardziej zbliżony do klasycznej postaci RZS u dorosłych.

## Piśmiennictwo

1. van Jaarsveld CH, ter Borg EJ, Jacobs JW, et al. The prognostic value of antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 7: 689-97.
2. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1831-5.
3. Visser H, le Cessie S, Vos K, et al. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 357-65.
4. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43:155-63.

5. Quinn MA, et al. Anti-CCP antibodies predict radiographic progression. *Arthritis Rheum* 2001; 44 (Suppl 9), Abstract 741.
6. Szmyrka-Kaczmarek M, Dziemianko I, Szechiński J. Przeciwciała antycytrulinowe w RZS, znaczenie diagnostyczne i prognostyczne. *Pol Arch Med Wew* 2003; 110: 915-20.
7. Dubucquoi P, Solau-Gevais E, Lefranc D, et al. Evaluation of anti-citrullinated fillagrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 415-19.
8. Romicka A, Musiej-Nowakowska E, Szymańska-Jagiętko W. MIZS. Zasady rozpoznawania i leczenia. *Reumatologia* 2004; 42 (Supl. 1): 17-26.
9. Avcin T, Cimaz R, Falcini F, et al. Prevalence et clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in JIA. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 608-11.
10. Hromadnikova I, Stechova K, Pavla V, et al. Anti-cyclic cytrullinated peptide antibodies in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity* 2002; 35: 387-401.
11. Kasapcopur O, Altun S, Aslan M. Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1687-9.
12. van Rossum M, van Soesbergen R, de Kort S, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in children with JIA. *J Rheumatol* 2003; 30: 825-8.