

# Prueba de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico para el diagnóstico de la artritis reumatoide

Código SCPC (Sociedad Colombiana de Patología Clínica): 51820. Código CUPS (Codificación Única de Procedimientos en Salud): 906442. Sección: Inmunología. Nivel de complejidad: Alto. Metodología: Inmunoensayo quimioluminiscente de macropartículas (CMIA). Sinónimos: Anti-CCP, anti-citrulina.

## Definición

La prueba de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico es una prueba de laboratorio que detecta y mide de forma semi-cuantitativa los niveles en sangre (suero o plasma) de auto-anticuerpos de clase IgG específicos para el péptido citrulinado cíclico mediante una prueba de inmunoensayo quimioluminiscente de macropartículas (CMIA), como ayuda diagnóstica de la artritis reumatoide. Esta prueba representa uno de los parámetros, que en conjunto con otra información clínica relevante, constituyen los criterios en el proceso diagnóstico de esta enfermedad.

## Espectro clínico de aplicación

La artritis reumatoide es una enfermedad común, sistémica, autoinmune que afecta aproximadamente el 1% de la población mundial. Está caracterizada por inflamación crónica de la sinovia que conlleva a la destrucción de la articulación, discapacidad y reducción en la calidad de vida [1]. Los sueros de personas que sufren esta enfermedad, incluso antes de la aparición de los síntomas, tienen gran variedad de auto-anticuerpos como el factor reumatoideo y los anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico [2].

En 2010, el Colegio Americano de Reumatología, publicó los criterios de clasificación de la artritis reumatoide como base para distinguir esta enfermedad de otros tipos de artritis y algunas enfermedades inflamatorias. Estos criterios deben ser aplicados a cualquier paciente con evidencia de sinovitis clínica activa (inflamación), en al menos una articulación, determinada por el médico, por imágenes radiográficas, o ambas, y que no sea explicada por otra enfermedad como lupus eritematoso sistémico, artritis psoriásica y la gota (ver tabla 1) [3].

Para el diagnóstico de la artritis reumatoide, además de los criterios clínicos, se encuentran las pruebas serológicas del factor reumatoideo y los anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico (ver tabla 1). El factor reumatoideo fue el primer auto-anticuerpo asociado a la artritis reumatoide y es el más ampliamente usado en el diagnóstico de la enfermedad; puede ser principalmente de tipo IgM, IgA o IgG y está dirigido contra la fracción constante (fracción Fc) de las IgG [4]. Este tipo de anticuerpos se encuentra en el 80% de los pacientes con artritis reumatoide, lo que le confiere una buena sensibilidad, sin embargo, puede ser detectado en pacientes con otras enfermedades reumáticas o inflamatorias e incluso en algunos individuos sanos (principalmente ancianos), por lo que no tiene una gran especificidad (aproximadamente 69%) [5, 6].

**Tabla 1. Criterios de clasificación de la Artritis Reumatoide del Colegio Americano de Reumatología, (2010)****Población de estudio. ¿Quién debe ser evaluado? Pacientes que:**

1. Tengan al menos una articulación con sinovitis clínica activa (inflamación)
2. Con sinovitis no explicada por otra enfermedad

**Criterios de clasificación de artritis reumatoide (algoritmo basado en puntaje: añada un puntaje para las categorías A-D. Un puntaje mayor o igual a 6 de 10 clasifica a un paciente con artritis reumatoide)**

	<b>Puntaje</b>
<b>A. Compromiso de la articulación (dolor o inflamación)</b>	
1 articulación grande*	0
2 – 10 articulaciones grandes	1
1 – 3 articulaciones pequeñas** (con o sin compromiso de articulaciones grandes)	2
4 – 10 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de articulaciones grandes)	3
> 10 articulaciones (al menos una articulación pequeña)	5
<b>B. Serología (al menos una prueba)</b>	
Negativa para factor reumatoideo y negativa para anticuerpos anti-péptido de citrulina	0
Positivo débil para factor reumatoideo o positivo débil para anticuerpos anti-péptido de citrulina	2
Fuertemente positivo para factor reumatoideo o fuertemente positivo para anticuerpos anti-péptido de citrulina	3
<b>C. Reactantes de fase aguda (al menos una prueba)</b>	
Proteína C reactiva normal y velocidad de sedimentación globular normal	0
Proteína C reactiva alterada y velocidad de sedimentación globular alterada	1
<b>D. Duración de los síntomas</b>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

\*Articulación grande: hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos

\*\*Articulación pequeña: articulaciones metacarpofalángicas, articulaciones interfalángicas proximales, segundo a quinto articulaciones metatarsofalángicas, articulaciones interfalángicas del pulgar, y muñecas

Modificado de [3]

Años atrás, se reconocieron los anticuerpos anti-factor perinuclear y anti-queratina como altamente específicos (aproximadamente 93%) para la artritis reumatoide, ambos dirigidos contra la filagrina (proteína de unión a filamentos). Esta proteína es producida en células epiteliales mamíferas que están ausentas en la sinovia, y fisiológicamente forma enlaces cruzados de filamentos de queratina para formar estructuras del citoesqueleto muy rígidas [4, 5, 7]. Los epítopes reconocidos por este tipo de anticuerpos han demostrado ser residuos citrulinados de la filagrina, sin embargo, la sensibilidad de los anticuerpos anti-filagrina ha demostrado ser menor que el factor reumatoideo (aproximadamente 48%) [6].

La citrulina se produce tras modificaciones post-traduccionales de residuos del aminoácido arginina presente en ciertas proteínas humanas, por acción de la enzima peptidil arginina deaminasa, la cual elimina los grupos amino terminal de la arginina convirtiéndola en citrulina (ver figura 1) [4]. Estas modificaciones suceden durante diferentes eventos biológicos incluyendo la inflamación [8].

Con base en este conocimiento, se sintetizaron péptidos lineales de citrulina y su reactividad se probó en sueros de pacientes con artritis reumatoide. Esto permitió desarrollar las pruebas de primera generación de anticuerpos anti-péptido de citrulina usando el método de ELISA, las cuales mostraron una especificidad y una sensibilidad del 96% y 76%, respectivamente [9]. Estudios posteriores, demostraron que la variante cíclica de estos péptidos, denominados péptidos citrulinados cílicos, eran igual de específicos de la artritis reumatoide (98%), pero más sensibles que los péptidos lineales (68%) [10].

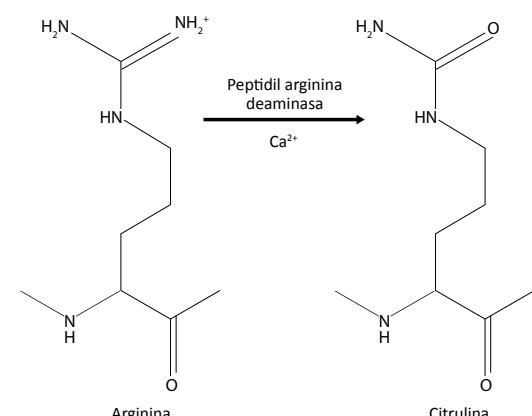


Figura 1. Proceso de citrulinación. El grupo amino es eliminado, por lo que el aminoácido arginina pierde su carga positiva y se convierte en citrulina. Modificado de [4].

Con el fin de mejorar la sensibilidad de las pruebas que contenían los péptidos citrulinados cílicos, se rastrearon librerías de péptidos que contienen citrulina en sueros de pacientes con artritis reumatoide, lo que permitió descubrir un grupo de péptidos citrulinados que fueron incorporados en las pruebas de segunda generación, con una sensibilidad comparable a la del factor reumatoideo (aproximadamente del 80%), pero con una especificidad mucho mayor (aproximadamente 96%) [6, 11, 12]. Por tal razón, actualmente son considerados como la mejor prueba de laboratorio para el diagnóstico de la artritis reumatoide. Además, se ha demostrado que los anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico pueden ser detectados en etapas tempranas de la enfermedad, incluso antes de la positividad del factor reumatoideo, por lo que tienen una alta capacidad predictiva [8, 13] y facilitan el inicio de un tratamiento temprano, evitando las complicaciones asociadas. Lo anterior, motivó a incluir los anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico como un nuevo biomarcador y criterio diagnóstico de la artritis reumatoide en la versión de 2010 del Colegio Americano de Reumatología [3].

## Fundamento

La prueba de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico es un inmunoensayo de dos pasos (con un pretratamiento automatizado de la muestra) para la determinación semi-cuantitativa de auto-anticuerpos de tipo IgG específicos contra el péptido citrulinado cíclico en suero o plasma humano, usando la tecnología del inmunoensayo quimioluminiscente de macropartículas (CMIA). Para este tipo de ensayo, la muestra es prediluida en un tampón de lavado y combinada con micropartículas paramagnéticas recubiertas con péptidos de forma cíclica con numerosos residuos de citrulina, a las cuales se unen los anticuerpos específicos contra los péptidos cílicos citrulinados presentes en la muestra de los pacientes. Para el segundo paso, se realiza un lavado y se incorpora un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con acridinio que reconoce los anticuerpos tipo IgG unidos a los péptidos citrulinados cílicos. Luego de otro ciclo de lavado, se añaden soluciones de pre-activación y activación a la mezcla de reacción. La reacción quimioluminiscente resultante se mide en unidades relativas de luz (RLU), las cuales son directamente proporcionales a la cantidad de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico en la muestra [14].

## Preparación del paciente y manejo de las muestras

### Preparación del paciente

Para este tipo de prueba no se requiere una preparación previa del paciente.

### Tipo de muestra

Los siguientes tipos de muestras son recomendados según la casa comercial ARCHITECT para las pruebas de detección de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico:

- Suero humano a partir de sangre venosa recolectada en tubos secos (tapa roja) o en tubos separadores de suero (tapa amarilla).
- Plasma humano recolectado en tubos separadores de plasma con heparina de litio (tapa verde) o EDTA de potasio (tapa morada).

### Manejo y conservación de las muestras

Las muestras pueden ser almacenadas o procesadas en un plazo máximo de 22 horas a temperatura ambiente o hasta siete días después de 2 °C a 8 °C.

Si la realización de la prueba se toma más tiempo del indicado, se recomienda tomar el suero o el plasma del coágulo, la sangre o del gel separador y almacenarlo a -20 °C.

Para el transporte de muestras se recomienda que el suero o plasma sean separados del coágulo, los glóbulos rojos o el gel separador, y que sean transportados en hielo o hielo seco, debidamente rotulados según la reglamentación departamental y nacional para el transporte de muestras clínicas y sustancias infecciosas.

### Valores esperados

Los resultados se expresan en unidades/mL (U/mL) y dependen del estuche usado. En el ensayo de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico proporcionado por ARCHITECH se pueden obtener los siguientes resultados:

Negativo: menor que 5,0 U/mL

Positivo: mayor o igual a 5,0 U/mL

### Interpretación de resultados

Un resultado negativo indica la ausencia de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico o niveles inferiores al rango de detección de la técnica (rango de detección para el ensayo de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico proporcionado por ARCHITECH: 0,5 U/mL a 200,0 U/mL).

Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado y sugiere la posibilidad de tener artritis reumatoide, sin embargo no hace el diagnóstico.

Según los criterios del Colegio Americano de Reumatología (2010) [3], un resultado negativo corresponde a los valores de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico que son menor o igual al límite superior de lo normal; positivo débil hace referencia a los valores que son mayores que el valor límite superior de normalidad, pero menor o igual a tres veces el valor límite superior de normalidad, y un resultado fuertemente positivo a los valores que son mayores a tres veces el valor límite superior de normalidad de la prueba aplicada. De esta manera, tenemos que para la prueba de detección de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico de ARCHITECH, los valores de referencia son:

- Negativo: menor que 5,0 U/mL
- Positivo débil: 5,0 – 15,0 U/mL
- Fuertemente positivo: mayor que 15,0 U/mL

Teniendo en cuenta estos valores se aplica el puntaje para cada resultado según los criterios diagnósticos del Colegio Americano de Reumatología de 2010 (negativo = 0, positivo débil = 2 y fuertemente positivo = 3), que junto a los criterios clínicos y otras pruebas de laboratorio, confirmarán la presencia de la artritis reumatoide cuando se obtiene un puntaje total mayor o igual a 6 de 10 puntos posibles (ver tabla 1) [3].

### Interferentes

- No se recomiendan usar muestras con las siguientes condiciones:
  - Inactivadas por calor
  - Severamente hemolizadas
  - Con contaminación microbiana evidente
  - Muestras diferentes a suero humano o plasma
- Las muestras deben estar libres de fibrina, glóbulos rojos y otras partículas. En caso de presentarse se recomienda centrifugar a 10.000 gravedades o más, por 10 minutos antes del análisis.
- Las muestras deben estar libres de burbujas. Si están presentes pueden removerse con el palillo de un aplicador estéril.
- Las muestras de pacientes con terapia anticoagulante o trombolítica pueden tener residuos de fibrina debido a fallas en la formación del coágulo. Estos residuos deben eliminarse.
- Las muestras lipídicas deben ser centrifugadas y transferidas a un nuevo tubo que no contenga la porción lipídica.

### Limitaciones

- Para el diagnóstico de artritis reumatoide los resultados de la prueba deben correlacionarse con otros datos clínicos; si los resultados obtenidos son inconsistentes con la clínica del individuo se recomienda realizar pruebas adicionales para confirmar el resultado.
- Los valores de anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico en artritis juvenil no han sido determinados.
- Algunas muestras pueden encontrarse por fuera de la linearidad de la prueba, debido a la heterogeneidad de los auto-anticuerpos con respecto a las propiedades física-químicas.

- No deben usarse muestras de otro tipo ni con anticoagulantes diferentes a los recomendados por la casa comercial.
- Los anticuerpos heterófilos en muestras humanas pueden reaccionar con las inmunoglobulinas presentes en los reactivos del estuche comercial e interferir con el resultado.
- Cada laboratorio debe validar que el uso de estas pruebas entregue resultados que se encuentren en los límites aceptables con base en la población, casa comercial del estuche, metodología y equipos utilizados.

## Observaciones adicionales de importancia

Un resultado positivo para la prueba de anticuerpos anti-peptido cítrulínado cíclico no hace diagnóstico de la artritis reumatoide. Los resultados deben ser analizados por el médico en correlación con los hallazgos clínicos y de otras pruebas de laboratorio, según los criterios recomendados por el Colegio Americano de Reumatología (2010), para poder dar un diagnóstico definitivo de la artritis reumatoide [3].

## Bibliografía

1. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. Am J Manag Care 2012; 18: S295-302.
2. Moez S, John P, Bhatti A. Anti-citrullinated protein antibodies: role in pathogenesis of RA and potential as a diagnostic tool. Rheumatol Int 2013; 33: 1669-1673.
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum 2010; 62: 2569-2581.
4. Farid S, Azizi G, Mirshafiey A. Anti-citrullinated protein antibodies and their clinical utility in rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis 2013; 16: 379-386.
5. Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Dorner T. Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. Autoimmun Rev 2010; 9: 431-435.
6. Dubucquois S, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerie L, Sibilia J, Goetz J, et al. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. Ann Rheum Dis 2004; 63: 415-419.
7. Coenen D, Verschueren P, Westhovens R, Bossuyt X. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. Clin Chem 2007; 53: 498-504.
8. Willemze A, Toes RE, Huizinga TW, Trouw LA. New biomarkers in rheumatoid arthritis. Neth J Med 2012; 70: 392-399.
9. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 1998; 101: 273-281.
10. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 2000; 43: 155-163.
11. Vossenaar ER, van Venrooij, W.J.. Anti-CCP antibodies, a specific marker for (early) rheumatoid arthritis. Clin Appl Immunol Rev 2004; 4: 239-262.
12. van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. Neth J Med 2002; 60: 383-388.
13. Trouw LA, Huizinga TW, Toes RE. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens--common principles. Ann Rheum Dis 2013; 72 Suppl 2: ii132-136.
14. Abbot. Anti-CCP. Reino Unido: Abbot Laboratories; 2009.