

Accuratezza diagnostica e standardizzazione dei metodi per la determinazione degli anticorpi anti-peptidi citrullinati

Accuracy and standardization of diagnostic methods for the detection of antibodies to citrullinated peptides

N. Bizzaro¹, M. Tampona²

¹Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, Tolmezzo, Udine;

²Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera, Policlinico di Bari

SUMMARY

Anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) have a very high specificity for rheumatoid arthritis, much more than that of the rheumatoid factor. In addition, ACPA can be found in sera in the pre-clinical phase, are associated with more severe joint destruction and with higher disease activity.

In recent years, keeping pace with new knowledge and with progress made in the antigenic composition of tests and in the characterization of immunogenic epitopes, many immunoenzymatic (ELISA) methods of second and third generation have been produced and marketed commercially, and their use has spread among clinical laboratories. Today, completely automated methods are also available, which are easy to use and with a higher throughput, rendering the diagnostic utility of testing ever faster and more effective.

This review takes into consideration the more important characteristics of the new ACPA-ELISA tests now commercially available, and also considers recent progress in standardizing test results.

Reumatismo, 2009; 61(3):222-228

INTRODUZIONE

Gli anticorpi anti-peptidi citrullinati (ACPA) sono diretti contro proteine, in cui i residui aminoacidici di arginina sono convertiti in citrullina attraverso una reazione post-translazionale catalizzata dall'enzima peptidil-arginina deaminasi (PAD). La caratteristica principale e clinicamente più importante degli ACPA è la loro elevata specificità per l'artrite reumatoide (AR).

Nonostante questi autoanticorpi siano stati descritti più di 40 anni fa utilizzando metodiche in immunofluorescenza indiretta, la difficoltà di stan-

dardizzare le procedure di allestimento dei substrati e le difficoltà di interpretazione dei quadri fluoroscopici, hanno ostacolato l'utilizzo e la diffusione del test.

Nel 1998, Schellekens et al. (1) sintetizzarono dei peptidi lineari citrullinati derivati dalla filaggrina per allestire un test immunoenzimatico in fase solida (ELISA) che dimostrò avere una sensibilità diagnostica per AR tra il 40 e il 50% e una specificità >97%. Per migliorare la sensibilità del test facilitandone il riconoscimento da parte dell'anticorpo, fu successivamente modificata la composizione antigenica e fu prodotto un peptide ciclico citrullinato (CCP), utilizzato per sviluppare un test di prima generazione CCP1 (2) che, a partire dal 2000, è stato introdotto a scopo diagnostico nei laboratori clinici. I numerosi studi prodotti e pubblicati negli anni seguenti dimostrarono che la sensibilità di questo nuovo test diagnostico arrivava al 68%, mantenendo al contempo un'elevata specifi-

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Nicola Bizzaro

Laboratorio di Patologia Clinica

Ospedale Civile

Via Morgagni, 18

33028 Tolmezzo (UD)

E-mail: nicola.bizzaro@ass3.sanita.fvg.it

cità (98%) (3). Oggi sono disponibili e vengono utilizzati metodi di 2^a e 3^a generazione che utilizzano miscele di peptidi sintetici ciclici, con un ulteriore incremento della sensibilità analitica (attorno all'80%) e una specificità diagnostica del 98-99% (4-9).

Accanto al loro elevato valore diagnostico, numerosi studi clinici hanno dimostrato che gli ACPA possono essere implicati in importanti processi patofisiologici come si può evincere dalla loro comparsa in fase precoce di malattia, anche prima dell'insorgenza dei sintomi (10-12), dalla loro associazione con una più severa distruzione articolare (13-15), una più elevata attività di malattia e un decorso di malattia più aggressivo (16-19).

Recenti studi suggeriscono che gli ACPA delineino un'entità eziologia definita nell'ambito dell'AR (20), correlata ad un assetto genetico predisponente, costituito dalla presenza di molecole HLA di classe II (DRB1*0401; shared epitope, SE), presente in pazienti ACPA-positivi e assente in soggetti ACPA-negativi (21, 22). Tuttavia, livelli positivi di ACPA possono essere evidenziati anche in alcuni pazienti affetti da AR che non presentano SE. Questo potrebbe essere dovuto ad una più complessa interazione genica e alla presenza di altre molecole, come l'HLA-DRB1*1501, la cui sintesi è regolata dall'MHC (23). Viceversa, in pazienti con spondilartrite e in pazienti con artrite psoriasica, che hanno fibrina deaminata o altre proteine citrullinate nella membrana sinoviale (24), gli ACPA sono negativi nonostante la presenza di SE in quasi la metà di questi pazienti (25). È evidente pertanto che l'epitopo condiviso SE è coinvolto nella produzione di ACPA, ma che l'MHC da solo non spiega la specificità degli ACPA per l'AR.

Accuratezza diagnostica dei metodi ACPA di ultima generazione

Poco dopo l'immissione sul mercato del primo test ELISA (CCP1) e il miglioramento delle performance ottenuto con il test di seconda generazione (CCP2), ideato dallo stesso produttore, sono stati sviluppati altri metodi ACPA-ELISA. A causa di restrizioni di brevetto, la maggior parte di questi metodi utilizzano l'antigene originale CCP2, ma altri produttori hanno sviluppato test propri con substrati antigenici diversi, e alcuni di essi sono stati commercializzati come metodi di terza generazione (CCP3).

Una recente revisione sistematica di 68 articoli sugli ACPA ha valutato il valore diagnostico di diversi kit (26). Benché solo cinque studi siano stati

specificamente progettati per confrontare l'accuratezza diagnostica dei kit commerciali sugli stessi campioni di siero (27-31), tutti hanno dimostrato che, se la specificità dei test per ACPA è omogeneamente elevata, la sensibilità differisce in modo significativo. Non solo le diverse caratteristiche cliniche dei pazienti, ma anche il diverso valore di cut-off utilizzato nei vari saggi, possono spiegare l'ampio range di sensibilità riportato nei risultati. Emerge che il valore di cut-off utilizzato per definire un risultato positivo varia in maniera significativa anche quando il substrato antigenico è fornito dallo stesso produttore.

In un nostro recente studio (32) sono stati comparati 11 kit commerciali, nove di seconda e due di terza generazione, testando 100 campioni di siero di pazienti affetti da AR e 202 campioni di soggetti sani o di pazienti con altre malattie autoimmuni, virali o neoplastiche. Per quanto riguarda i metodi di seconda generazione, sei di questi utilizzano il peptide CCP2 ma presentano differenze metodologiche per quanto riguarda il volume e la diluizione del siero, il tempo di incubazione, il tipo di coniugato enzimatico e di substrato utilizzato e il valore di cut-off assegnato. I rimanenti kit presentano sostanziali differenze antigeniche: alcuni usano sequenze ricombinanti di peptidi citrullinati virali ottenuti dal virus EBV; altri impiegano isoforme della vimentina ottenuta da una naturale mutazione genetica e citrullinata in vitro, o filaggrina ricombinante citrullinata di ratto. I due metodi di 3^a generazione, il cui substrato è costituito da peptidi multipli sintetici ciclici citrullinati (CCP3), differiscono solo per la specificità del coniugato: uno impiega un coniugato anti-IgG umane e l'altro utilizza due coniugati, uno anti-IgG e uno anti-IgA umane.

Allo stesso valore di specificità del 98,5%, determinato con l'analisi delle curve ROC, i metodi hanno mostrato differente accuratezza diagnostica con un range di sensibilità variabile dal 41% al 74%. Un'elevata concordanza (kappa di Cohen) è stata trovata solo tra i metodi che utilizzano lo stesso antigene CCP2, mentre una bassa concordanza si è osservata tra questi metodi e quelli che utilizzano altri peptidi citrullinati o altre proteine.

In sintesi, i risultati di questo studio hanno dimostrato che variazioni metodologiche nella preparazione dei kit non sono rilevanti per l'accuratezza diagnostica del test, e che le variabili più importanti per la sensibilità diagnostica sono la sorgente antigenica e il numero di epitopi immunogenici presenti. La sorgente antigenica è la variabile più im-

portante anche per la specificità diagnostica, poiché può essere influenzata dalla presenza di proteine o di sequenze peptidiche contaminanti. La conclusione di questo studio è che i metodi commerciali per la rilevazione di ACPA presentano vari gradi di accuratezza diagnostica e che la scelta del metodo è molto importante per ottenere risultati attendibili. Questa informazione che, per quanto riguarda gli aspetti analitici è di pertinenza del Laboratorio, riveste una grande importanza clinica ed è fondamentale che il reumatologo ne sia perfettamente a conoscenza.

Automazione dei test ACPA

I metodi ACPA-ELISA sono oggi disponibili anche su sistemi automatizzati e questo ha comportato una semplificazione delle procedure e una maggiore diffusione del test. Alcuni studi hanno dimostrato che la affidabilità dei test ACPA persiste anche quando il dosaggio è eseguito in completa automazione (33-35). L'imprecisione analitica, espressa come coefficiente di variazione (CV%) nella serie e tra le serie, è ampiamente accettabile se confrontata con quella rilevata per altri test autoanticorpali (36).

Il valore di sensibilità funzionale per questi test automatizzati è ben al di sotto del valore di cut-off utilizzato per la sensibilità clinica e il test di diluizione effettuato in accordo con le linee guida NCCLS (37) mostra profili di precisione con alto grado di affidabilità analitica.

I test multipli per ACPA

Recenti sviluppi nella tecnologia proteomica hanno aperto la possibilità di misurare la reattività nei confronti di un gran numero di peptidi citrullinati contemporaneamente (38, 39).

Microarray dedicati (arthritis chips) sono già stati prodotti e verranno presto introdotti nel mercato. Tali metodi, che sono in grado di analizzare centinaia di anticorpi simultaneamente, includono antigeni proteici, peptidi, acidi nucleici ed enzimi legati alla superficie di supporti vetrosi coattati con poli-L-lisina (40). La reattività dei sieri viene rilevata mediante anticorpi anti-IgG umane coniugate con sostanze fluorescenti. L'obiettivo di tali test si basa sull'assunto che la ricerca di un profilo anticorpale diretto contro più proteine citrullinate aumenterebbe la sensibilità e la specificità per la diagnosi di AR. Al momento, sono necessari studi di valutazione e di validazione sia analitica che clinica di questi nuovi metodi proteomici, nonché algoritmi diagnostici supportati da programmi stati-

stici per valutare il significato di più associazioni anticorpali. In prospettiva, è possibile che i test multiplex possano dimostrarsi utili sia per la diagnosi che per la classificazione delle artriti autoimmuni, così come nella selezione dei pazienti da sottoporre a differenti trattamenti terapeutici.

Standardizzazione dei metodi ACPA

Fin dall'inizio dell'introduzione del test ACPA nei Laboratori clinici e ancor più da quando il suo impiego come test diagnostico principale per l'AR si è diffuso nel mondo clinico, la necessità di poter confrontare i risultati ottenuti con metodi diversi è diventata un'esigenza importante e un obiettivo prioritario. In effetti, i risultati prodotti da metodi diversi ed espressi in unità arbitrarie, differiscono a tal punto che è difficile comparare tra loro i dati ottenuti in studi diversi e valutare se i livelli degli ACPA possano essere utilizzati a scopo prognostico e nel monitoraggio del decorso clinico. È diventato perciò indispensabile e urgente poter disporre di materiale di riferimento in grado di armonizzare i dati ottenuti con metodi analitici diversi.

Venendo incontro a questa esigenza, nel 2008, il Center for Disease Control (CDC) di Atlanta (Georgia, USA) ha preparato un siero di riferimento liofilizzato, ottenuto da un soggetto con AR e da un pool di sieri di soggetti sani, da impiegare come primo standard internazionale per gli ACPA. Noi abbiamo effettuato uno studio preliminare di valutazione del comportamento del siero utilizzando i più diffusi metodi analitici commerciali per verificare se la sua introduzione fosse effettivamente in grado di standardizzare i risultati ottenuti con metodi diversi (41).

I risultati ottenuti in questo primo lavoro di standardizzazione sono stati fortemente positivi e incoraggianti. L'ottima linearità della curva di diluizione dello standard, evidenziata con tutti i metodi utilizzati (Fig. 1), dimostra che il siero standard può essere impiegato come calibratore universale da metodi che differiscono tra loro per substrati antigenici o per composizione del saggio.

Il calcolo del rapporto tra la concentrazione anticorpale dello standard e quella di sieri di pazienti con AR, ha prodotto una notevole omogeneizzazione dei dati, che è risultata migliore per i sieri con concentrazione anticorpale elevata (Fig. 2). D'altra parte è noto che l'imprecisione nella misurazione di qualsiasi analita, è maggiore in presenza di basse concentrazioni di analita ed è indipendente dallo standard impiegato.

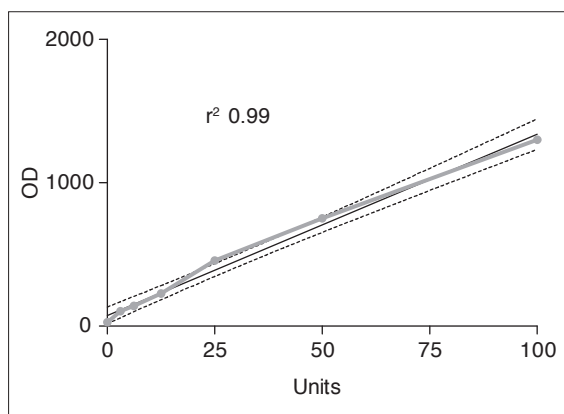


Figura 1 - Linearità della curva di calibrazione di un metodo ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-peptidi citrullinati (ACPA), ottenuta impiegando come calibratori le diluizioni del siero standard. Il valore di regressione lineare (r) è prossimo all'unità (le linee tratteggiate rappresentano l'intervallo di confidenza al 95%).

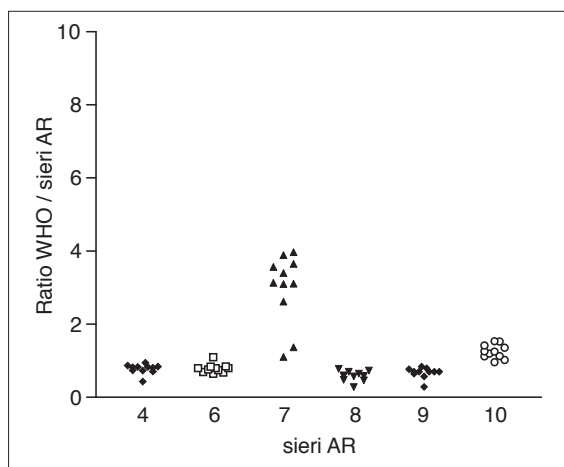


Figura 2 - Il calcolo della ratio tra la concentrazione anticorpale dello standard e quella di 6 sieri di pazienti con AR ACPA-positivi, ha prodotto una notevole omogeneizzazione dei dati, dimostrando che l'utilizzo dello standard internazionale è in grado di ridurre significativamente la dispersione dei valori ottenuti in unità arbitrarie con metodi analitici diversi.

Il risultato più significativo emerso da questo studio è che l'esecuzione delle curve di calibrazione utilizzando diluizioni scalari del siero standard al posto dei calibratori propri di ciascun kit, ha consentito di normalizzare la concentrazione dei sieri esaminati, riducendo significativamente la dispersione dei valori, con una marcata riduzione del CV medio dal 81.4% al 19.1% (Fig. 3).

Questi dati preliminari necessitano ovviamente di essere confermati su casistiche più ampie e in un

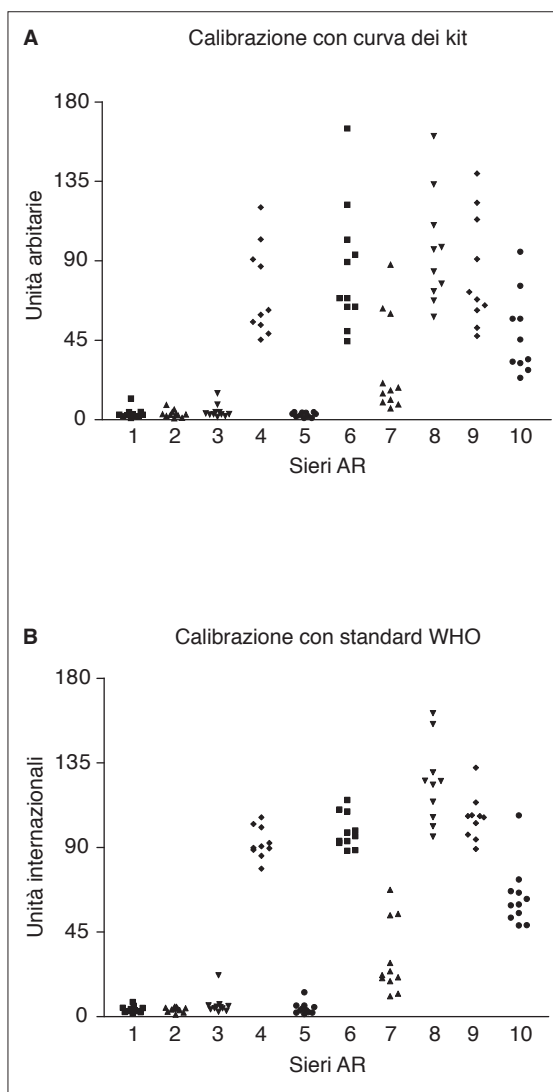


Figura 3 - A) Dispersione dei valori di ACPA ottenuti su 10 sieri di pazienti con AR, con 12 differenti metodi analitici commerciali, utilizzando le curve di calibrazione fornite nei kit. Il coefficiente di variazione globale è risultato del 81.4%. B) L'impiego di diluizioni scalari dello standard internazionale come calibratori, ha prodotto una significativa riduzione della dispersione dei dati, con coefficiente di variazione complessivo del 19.1%.

maggior numero di Laboratori. In ogni caso, sembrano confermare che lo standard per ACPA contribuisce ad omogeneizzare i risultati quantitativi dei diversi metodi commerciali in maniera più significativa di quanto abbiano fatto altri standard o preparazioni internazionali utilizzati nei dosaggi autoanticorpali come, ad esempio, MRC 66/387 per gli anticorpi anti-tireoperossidasi, WHO 65/93 per gli anticorpi anti-tireoglobulina, WHO Wo/80 per gli anticorpi anti-dsDNA, e gli standard di Har-

ris per gli anticorpi anti-cardiolipina (36, 43, 44). Ciò probabilmente è da attribuirsi alle caratteristiche autoantigeniche delle proteine citrullinate e al fatto che molti metodi commerciali per gli ACPA utilizzano lo stesso substrato sintetico.

A questo punto, come già viene proposto per molti altri metodi di dosaggio anticorpale, sono possibili due soluzioni alternative: o esprimere i risultati ottenuti in ratio tra il valore (o la densità ottica) dello standard e il valore (o la OD) dei campioni, oppure utilizzare le diluizioni dello standard per costruire curve di calibrazione omogenee. La prima soluzione è molto semplice ed è in grado di standardizzare significativamente i dati, ma richiederebbe la presenza di una vial di standard primario o secondario in ogni confezione dei kit diagnostici per ACPA. La seconda soluzione è meno semplice ma preferibile, perché consente di esprimere i risultati in termini quantitativi continui di

concentrazione anticorpale. In questo caso, i produttori dovrebbero sforzarsi di adottare lo stesso livello di cut-off o introdurre un fattore di correzione basato sul valore dello standard, per poter ricalcolare in unità internazionali i valori ottenuti in unità arbitrarie.

Una volta raggiunto questo obiettivo analitico, la diffusione dello standard e la conseguente espressione della concentrazione anticorpale in unità internazionali, potrà consentire non solo la comparazione tra test eseguiti in sedi diverse con metodi diversi, ma anche una più accurata definizione del significato diagnostico e prognostico del valore quantitativo degli ACPA e della sua utilità nel monitoraggio delle terapie.

Infine, l'introduzione di uno standard internazionale potrebbe essere utile anche per la definitiva inclusione degli ACPA tra i criteri classificativo-diagnostici di AR (44).

RIASSUNTO

Gli anticorpi anti-peptidi citrullinati (ACPA) hanno un'elevata specificità per l'artrite reumatoide (AR), di molto superiore a quella del fattore reumatoide. Inoltre, ACPA possono essere riscontrati nel siero in fase preclinica, sono associati ad un più severo danno articolare e ad una più elevata attività di malattia.

Negli ultimi anni, con i progressi ottenuti nella composizione antigenica dei test e nella caratterizzazione degli epitopi rilevanti, sono stati prodotti e commercializzati molti metodi immunoenzimatici (ELISA) di seconda e terza generazione, e il loro utilizzo si è diffuso nei laboratori clinici. Sono oggi disponibili anche metodi completamente automatizzati, di facile utilizzo e ad elevata produttività, che rendono più rapido ed efficace l'utilizzo diagnostico del test. Questa rassegna prende in considerazione le più importanti caratteristiche dei nuovi test ACPA-ELISA attualmente in commercio, e i recenti progressi nella standardizzazione dei risultati.

Parole chiave - Accuratezza diagnostica, ACPA, artrite reumatoide, CCP, peptidi citrullinati, rassegna.

Key words - ACPA, CCP, citrullinated peptides, diagnostic accuracy, rheumatoid arthritis, review.

BIBLIOGRAFIA

- Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-81.
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63.
- Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2001; 47: 1089-93.
- Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, et al. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003; 32: 197-204.
- van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TW. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first- and second anti-cyclic citrullinated peptides autoantibody (CCP1 and CCP2) tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1510-2.
- Pinheiro GC, Scheinberg MA, Aparecida Da Silva M, Maciel S. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in advanced rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2003; 139: 234-5.
- Grootenboer-Mignot S, Nicaise-Roland P, Delaunay C, Meyer O, Chollet-Martin S, Labarre C. Second generation anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP2) antibodies can replace anti-filaggrin antibodies and improve rheumatoid arthritis diagnosis. *Scand J Rheumatol* 2004; 33: 218-20.

8. Kamoun M. Diagnostic performance and predictive value of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosis of rheumatoid arthritis: Toward more accurate detection? *Clin Chem* 2005; 51: 12-3.
9. Riedemann JP, Muñoz S, Kavanaugh A. The use of second generation anti-CCP antibody (anti-CCP2) testing in rheumatoid arthritis. A systematic review. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23 (Suppl 39): S69-76.
10. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2741-9.
11. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHM, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380-6.
12. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early rheumatoid arthritis (the TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1085-9.
13. Chan MT, Owen P, Dunphy J, Carmichael C, Turner C, McHugh NJ. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are associated with erosive arthritis in SLE. *Arthritis Rheum* 2005; 52: S611.
14. Forslind, K, Ahlmen, M, Eberhardt, K, Hafstrom, I, Svensson, B. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1090-5.
15. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 120-6.
16. Kroot E, de Jong BAW, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FHJ, van 't Hof M, et al. The prognostic value of the anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1831-5.
17. van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R949-58.
18. Soderlin MK, Kastbom A, Kautiainen H, Leirisalo-Repo M, Strandberg G, Skogh T. Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) and levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in very early arthritis: relation to diagnosis and disease activity. *Scand J Rheumatol* 2004; 33: 185-8.
19. van Gaalen FA, Linn-Rasker S, van Venrooij WJ, de Jong BAW, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 709-15.
20. Hueber W, Utz PJ, Steinman L, Robinson WH. Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease. *Arthritis Res* 2002; 4: 290-5.
21. Huizinga TWJ, Amos CI, van der Helm-van Mil AHM, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 Shared Epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3433-8.
22. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2113-21.
23. Hill JA, Sidney J, Sette A. DRB1*1501 which does not contain the classic shared epitope sequence can bind citrullinated peptides with high affinity and supports anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) production in rheumatoid arthritis patients [abstract]. *Arthritis Rheum* 2005; 52 (Suppl 9): S150.
24. Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, Foulquier C, De Keyser F, et al. Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides. *J Immunol* 2005; 174: 5057-64.
25. Baeten D, Kruithof E, De Rycke L, Vandooren B, Wyns B, Boullart L, et al. Diagnostic classification of spondyloarthritis and rheumatoid arthritis by synovial histopathology: a prospective study in 154 consecutive patients. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2931-41.
26. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 845-51.
27. 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 NY Acad Sci* 2005; 1050: 295-303.
28. Fernández-Suárez A, Reneses S, Wichmann I, Criado R, Núñez A. Efficacy of three ELISA measurements of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1234-9.
29. Dubucquoi 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: 415-9.
30. Garcia-Berrocal B, Gonzalez C, Perez M, Navajo JA, Moreta I, Davila C, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies in IgM rheumatoid factor-positive patients. *Clin Chim Acta* 2005; 354: 123-30.
31. 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.
32. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. Analytical and diagnostic characteristics of 11 2nd- and 3rd-gen-

- eration immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clin Chem* 2007; 53: 1527-33.
33. Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Lapadula G, Pansini N. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies measured by an automated enzyme immunoassay: analytical performance and clinical correlations. *Chim Clin Acta* 2005; 355: 137-44.
 34. Bizzaro N, Fior F, Trinco G, Pesente F. Valutazione di un nuovo metodo per la determinazione di anticorpi anti-CCP in totale automazione. *Riv It Med Lab* 2007; 3 (Suppl): 160.
 35. Mutlu N, Bicakcigil M, Tasan DA, Kaya A, Yavuz S, Ozden I. Comparative performance analysis of 4 different anti-citrullinated protein assays in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2009; 36: 491-500.
 36. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Pradella M, Manoni F, Villalta D, et al. Immunoassay of anti-thyroid autoantibodies: High analytical variability in second generation methods. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 568-73.
 37. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) document EP15-A2. User verification of performances for precision and trueness; approved guideline - second edition. ISBN 1-56238-000-0. Wayne, PA: CLSI; 2005.
 38. Hueber W, Utz PJ, Robinson WH. Autoantibodies in early arthritis: advances in diagnosis and prognostication. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21: S59-64.
 39. Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. Proteomics technologies for the study of autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 885-93.
 40. Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, Lee BJ, Bruce B, Fries JF, et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2645-55.
 41. Bizzaro N. Evaluation of the World Health Organization Standard for anti-citrullinated peptide antibody assays [abstract]. In: 6th International Congress on Autoimmunity. Oporto, Portugal, 2008.
 42. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor. *Clin Chem* 1996; 42: 160-3.
 43. Pierangeli SS, Harris EN. A quarter of a century in anticardiolipin antibody testing and attempted standardization has led us to here, which is? *Sem Thromb Hemost* 2008; 34: 313-28.
 44. Liao KP, Batra KL, Chibnik L, Schur PH, Costenbader KH. Anti-cyclic citrullinated peptide revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 67: 1557-61.