

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN I  
DIREKTOR: PROFESSOR DR. J. SCHÖLMERICH  
KLINIKUM  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

---

**Stellenwert des anti-MCV-Antikörpernachweises im  
Vergleich zu Rheumafaktoren und anti-CCP-Antikörpern  
bei Patienten mit Gelenksbeschwerden in der  
rheumatologischen Routinediagnostik**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
Der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Helmut Bedö

2011



AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN I  
DIREKTOR: PROFESSOR DR. J. SCHÖLMERICH  
KLINIKUM  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

---

**Stellenwert des anti-MCV-Antikörpernachweises im  
Vergleich zu Rheumafaktoren und anti-CCP-Antikörpern  
bei Patienten mit Gelenksbeschwerden in der  
rheumatologischen Routinediagnostik**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
Der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Helmut Bedö

2011

Dekan:

Prof. Dr. B. Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Fleck

2. Berichterstatter:

PD. Dr. J. Beckmann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.September 2011

Widmung:

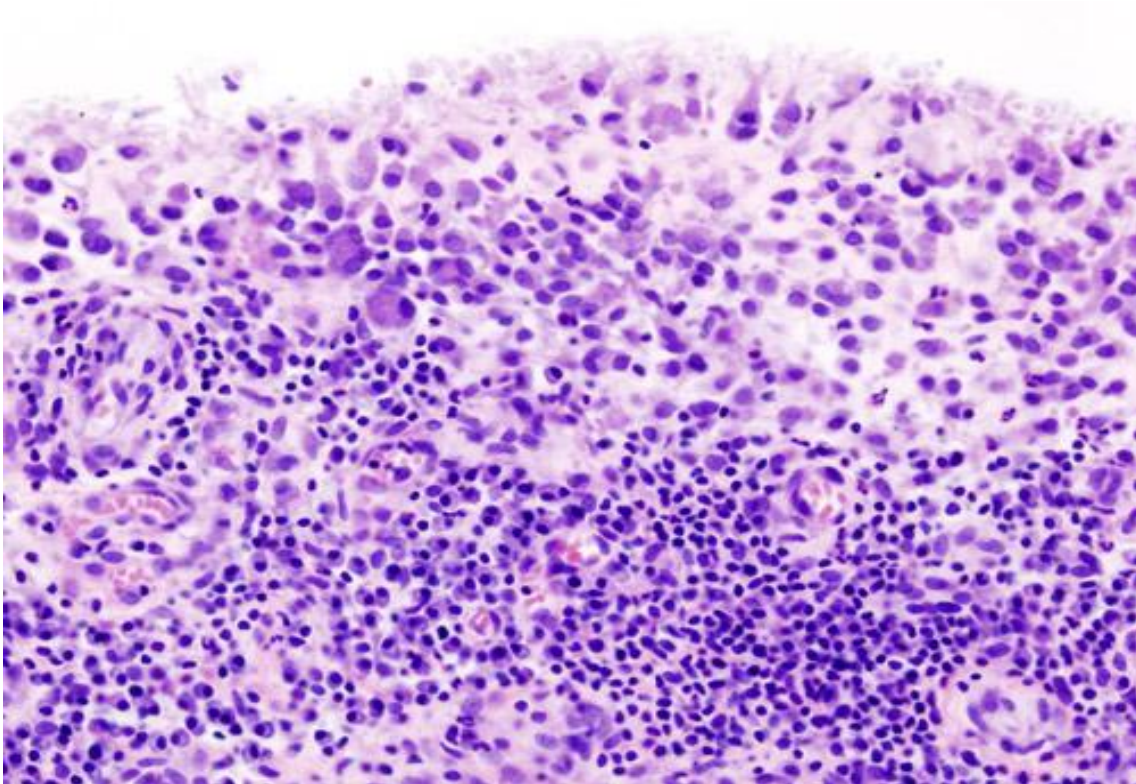
Meiner geliebten Frau  
und meiner Familie

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>Seite 5</b>
1.1 Allgemeines .....	Seite 5
1.2 Die neuen ACR und EULAR Klassifikationskriterien 2010.....	Seite 9
1.3 Geschichte .....	Seite 11
1.4 Rheumafaktoren .....	Seite 14
1.5 RA 33 – Antikörper .....	Seite 15
1.6 Anti-CCP-Antikörper .....	Seite 15
1.7 Anti-MCV-Antikörper .....	Seite 22
1.8 Zielsetzung .....	Seite 24
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>Seite 25</b>
2.1 Patienten .....	Seite 25
2.2 Autoantikörperprofile bei der rheumatoiden Arthritis .....	Seite 26
2.3 Serumgewinnung .....	Seite 26
2.4 Rheumafaktorbestimmung .....	Seite 27
2.5 Anti-CCP-Antikörper Bestimmung.....	Seite 28
2.6 Anti-MCV-Antikörper Bestimmung .....	Seite 30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>Seite 33</b>
3.1 Verteilung der Antikörper im Gesamtkollektiv .....	Seite 33
3.2 Charakterisierung der anti-MCV Subpopulation .....	Seite 35
3.2.1 Arthritis .....	Seite 37
3.2.2 Geschlechterverteilung .....	Seite 38
3.2.3 Klinische Symptomatik und Erkrankungsdauer .....	Seite 41
3.2.4 Anti-MCV Titer und Symptomatik .....	Seite 42
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>Seite 44</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>Seite 55</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>Seite 56</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Die Rheumatoide Arthritis (RA), oder auch chronische Polyarthritits ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung weltweit. Man geht von einer weltweiten Prävalenz von ca. 0,5–1 % aus, wobei Frauen ca. um das 2,5-fache häufiger betroffen sind als Männer. Obwohl die Erkrankung in jedem Lebensalter auftreten kann, findet sich ein Gipfel zwischen dem 40. bis 50. Lebensjahr. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter. Klinisch ist die RA durch eine chronische Gelenkentzündung mit erosiver Polyarthritits charakterisiert. Abnormales Wachstum von synovialen Gewebe sowie Pannusbildung verursachen im Krankheitsverlauf die Zerstörung der Gelenke. [Aho et al. 1986; Lawrence JS et al. 1976] Die Hyperplasie des Synoviums erfolgt bereits im frühen Stadium der Erkrankung. Sie folgt womöglich der vermehrten Einwanderung von Monozyten sowie einer zunehmenden pathophysiologisch relevanten Proliferation synovialer Fibroblasten. Diese Veränderungen spielen sich insbesondere in der Grenzschicht des Synoviums ab. Diese Synovialitis und synoviale Hyperplasie ist histologisch in der Mehrschichtigkeit der Deckzellschicht nachzuweisen. Diese typischen Veränderungen zeigt Abbildung 1. [Tak PP et al. 1997]



*Abb. 1: Synovialitis bei rheumatoider Arthritis mit Verbreiterung der Deckzellschicht*

Die Ätiologie der RA ist noch unbekannt und weiterhin Gebiet der medizinischen Forschung. Dennoch scheint für die Entstehung eine Kombination dreier verschiedener pathophysiologischer Mechanismen verantwortlich zu sein. Ein milder Hypocortisonismus, ein Mangel an Dehydroepiandrosteron (DHEA) sowie das Vorliegen einer bereits durchgestandenen bakteriellen oder viralen Infektion, die zur Aktivierung des Immunsystems führt. Als Auslöser werden auch Erreger mit niedriger Virulenz diskutiert, die Infektionen und Gewebszerstörung in Gelenken sowie gelenknahem Gewebe immunsupprimierter Patienten verursachen. [Jefferies WM et al 1998]

Jahrzehntelang war die Diagnose der RA ausschließlich klinisch zu stellen. [Arnett FC et al. 1988] Jedoch sind besonders im Frühstadium der Krankheit die 1987 vom American College of Rheumatology (ACR) erstellten Kriterien häufig unzureichend, da nur ca. zwei Drittel der Patienten im Frühstadium der RA die erforderlichen



Diagnosekriterien erfüllen. Gerade das macht es so schwierig, eine frühzeitige Diagnose zu stellen und einen raschen Therapiebeginn einzuleiten. [Vallbracht I. et al. 2005]

Wie wichtig eine frühzeitige Diagnose und Therapiebeginn jedoch sind, zeigt die Tatsache, dass häufig bereits in den ersten zwei Jahren des Krankheitsverlaufs radiologisch nachweisbare irreversible Gelenkschäden bei Patienten auftreten können. [Möttönen TT. et al. 1988]



*Abb. 2: Radiologisches Stadium IV bei rheumatoider Arthritis mit Mutilation der Gelenke, Ankylose und Gelenksdestruktion*

<b>Alte ACR-Kriterien der Rheumatoiden Arthritis: (revidiert 1987/1988)</b>	
1	Morgensteifigkeit (in einem Gelenk während mindestens einer Stunde)
2	Arthritis in drei oder mehr Gelenkregionen (objektiv beobachtete fluktuierende Kapselschwellung in mindestens drei von vierzehn Gelenkregionen: beidseits Metacarpophalangealgelenke (MCP), proximale Interphalangealgelenke (PIP), Hand-, Ellenbogen-, Knie-, Sprung- und Metatarsophalangealgelenke (MTP))
3	Arthritis an Hand- oder Fingergelenken (Befall mindestens eines Hand-, Metacarpophalangeal- oder proximalen Interphalangealgelenkes)
4	Symmetrische Arthritis (gleichzeitig beidseitiger Befall der gleichen Gelenkregion)
5	Subkutane Rheumaknoten (objektiv beobachtete subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder gelenknahen Streckseiten)
6	Rheumafaktornachweis (mit einer Methode, deren positiver Nachweis unter 5% einer normalen Kontrollgruppe liegt)
7	Radiologische Veränderungen der Gelenke (typische Veränderungen der dorsovolaren Handaufnahme mit gelenknaher Osteoporose und/oder Erosionen der betroffenen Gelenke)
<p>Von einer rheumatoiden Arthritis ist bei mindestens 4 von 7 Kriterien auszugehen (wobei Kriterien 1 bis 4 während mindestens 6 Wochen bestehen müssen)</p>	

*Tabelle 1: alte ACR-Kriterien der Rheumatoiden Arthritis (1987/1988)*

## 1.2 Die neuen ACR und EULAR Klassifikationskriterien 2010

Die letzte Aktualisierung des „American College of Rheumatology“ datiert aus dem Jahr 1988. Aktuell wurden unter Berücksichtigung neuer Ergebnisse aus Forschung und Klinik die neuen Empfehlungen zur Klassifikation der RA veröffentlicht. [Aletaha et al. 2010]

Die neuen ACR und EULAR Klassifikationskriterien 2010 beinhalten folgende Kriterien: Synovitis in mindestens einem Gelenk bei Fehlen einer adäquaten Alternativdiagnose. Ferner mindestens sechs Punkte der individuellen Scores in den vier Gebieten:

- Gelenkbeteiligung: Anzahl und Lokalisation der Gelenke (0-5)
- Serologie: Rheumafaktor und Antikörper gegen citrullinierte Proteine (0-3)
- Akutphaseproteine: CRP, BSG (0-1)
- Symptombdauer: < 6 Wochen, > 6 Wochen (0-1)

Die folgende Tabelle 2 gibt die genauen aktuellen Klassifikationskriterien wieder:

<b>ACR/EULAR-Kriterien der Rheumatoiden Arthritis 2010:</b>		
<b>A</b>	<b>Betroffene Gelenke</b>	
	1 großes Gelenk:	<b>0</b>
	2 bis 10 große Gelenke	<b>1</b>
	1 bis 3 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	<b>2</b>
	4 bis 10 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung großer Gelenke)	<b>3</b>
	> 10 Gelenke (zumindest ein kleines Gelenk)	<b>5</b>
<b>B</b>	<b>Serologie</b>	
	Rheumafaktor und ACPA negativ	<b>0</b>
	Rheumafaktor oder ACPA niedrig positiv	<b>2</b>
	Rheumafaktor oder ACPA hoch positiv	<b>3</b>
<b>C</b>	<b>Akute-Phase-Reaktion</b>	
	Normales CRP und BSG	<b>0</b>
	Abnormales CRP und BSG	<b>1</b>
<b>D</b>	<b>Dauer der Symptome</b>	
	< 6 Wochen	<b>0</b>
	≥ 6 Wochen	<b>1</b>
Die Punkte in den Kategorien A-D werden zusammengezählt. Bei einem Score von ≥ 6/10 kann von der Diagnose Rheumatoide Arthritis ausgegangen werden.		

Tabelle2: neue ACR/EULAR-Kriterien der Rheumatoiden Arthritis (2010)

### 1.3 Geschichte

Die traditionellen Begriffe „Rheuma“ und „Rheumatismus“ wurden erstmals im „Liber de Rheumatismo et Pleuritide dorsali“ von Guillaume de Baillou (1538 – 1616) verwendet, standen aber nicht für die rheumatoide Arthritis, sondern für das rheumatische Fieber.

Als Erstbeschreiber der RA gilt der Franzose Augustin Jacob Landré-Beauvais (1772-1840), der als Erster die rheumatoide Arthritis als eigenes Krankheitsbild von der Gicht und dem akuten Gelenkrheumatismus - welches wir heute als rheumatisches Fieber kennen - abgrenzte und 1800 in seiner Dissertation beschrieb.

Landré-Beauvais nannte seine Krankheit „goutte asthénique primitive“, was als „primäre asthenische Gicht“ übersetzt werden kann. Diesem missverständlichen Namen hatte er zu verdanken, dass man den Terminus rheumatoide Arthritis dem Briten Sir Alfred B. Garrod (1809-1907) sowie dem Franzosen J.M. Charcot (1825-1893) zuschreibt, der die Krankheit als „rhumatisme articulaire chronique“ beschrieb. Die chronische Polyarthritis gilt bis heute vor allem im deutschsprachlichen Raum als Synonym für die Rheumatoide Arthritis. 1890 aber hat A.E. Garrod, der Sohn Sir Alfred B. Garrods, Landré-Beauvais als Erstbeschreiber der rheumatoiden Arthritis anerkannt.

In seiner Dissertation über eine neue Form der Gicht beschreibt Landré-Beauvais, dass seine neue primitive asthenische Gicht vor allem schwache, schlecht genährte und ärmliche Personen befällt, und nicht wie bei der 1683 von Sydenham beschriebenen „echten“ Gicht oder Podagra vorwiegend Menschen von robuster Konstitution, die sich der Liebe, dem guten Essen und alkoholischen Getränken hingeben und nach einem arbeitsreichen Leben plötzlich nichts mehr tun.

Landré-Beauvais beschrieb als Ursache für die Rheumatoide Arthritis eine schwache und zu Spasmen neigende Konstitution, ein zu sesshaftes Leben, schlechte Verdauung, eine wenig schmackhafte und schwer verdauliche Kost, kalte und

feuchte Wohnungen sowie eine seelische Belastung der betroffenen Patienten. Ferner treffe die Krankheit im Gegensatz zur „echten“ Gicht eher Frauen. Die Differentialdiagnose Landré-Beauvais gegenüber der Gicht und dem Rheumatismus stellt Tabelle 3 dar.

<b>Gicht</b>	<b>Rheumatoide Arthritis</b>	<b>Rheumatismus</b>
überwiegend Männer	überwiegend Frauen	keine Angaben
kräftige Menschen	schwache Menschen	keine Angaben
Lokalisation meist Großzehengrundgelenk	viele Gelenke	meist ein Gelenk
akuter Beginn Schwellung erst nach Abklingen der Schmerzen	weniger akut lang anhaltend Schwellung mit Schmerzen	akuter Beginn kurze Dauer
Tophusbildung	Dauerhafte Gelenkveränderungen Deformierung und Verbindung der Knochen untereinander keine Heilung	Keine Gelenkdeformierung, Heilt meist aus

*Tabelle3: Landré-Beauvais Differenzierung seiner Krankheit gegenüber der Gicht und dem rheumatischen Fieber, Paris 1800*

Lange Zeit wurde vermutet, dass die Rheumatoide Arthritis aus der Neuen Welt stammt und durch Kolumbus nach Europa gekommen sei. In der Nähe von Cincinnati in den USA haben Archäologen an Skeletten von präkolumbianischen Indios (1100-800 v.Chr.) entzündlich-destruierende Gelenkerkrankungen festgestellt, die charakteristische Zeichen für eine RA aufwiesen. Vergleichbare Funde gab es in Europa, Ägypten und Asien lange Zeit nicht.

Dies führte dazu, dass die Rheumatoide Arthritis lange Zeit als eine von den Konquistadoren der Neuen Welt importierte Krankheit angesehen wurde. Allerdings weisen neuere paläontologische Untersuchungen von Steinzeitfunden in Skandinavien darauf hin, dass die Gelenke der gefundenen Skelette erosive Veränderungen im Sinne einer RA zeigen. Auch wird vermutet, dass auf Gemälden flämischer Maler aus dem 16. und 17. Jahrhundert Finger- und Handgelenksveränderungen auf die rheumatoide Arthritis hinweisen. Ferner ist eine schlechte Dokumentation bezüglich Erkrankungen in der Alten Welt wenig aufschlussreich, da man bis ins 18. Jahrhundert hinein völlig andere Konzepte hatte, Krankheiten zu beschreiben und zu dokumentieren. Diese erfolgten in erster Linie ausschließlich klinisch symptomatisch sowie ethnosozial und ökosozial.

Es ist deshalb davon auszugehen, dass die rheumatoide Arthritis als ubiquitäre Erkrankung bereits mehrere Jahrhunderte existiert, sie wurde aber erst im 19. Jahrhundert als solche erkannt, differenziert und beschrieben.

## 1.4 Rheumafaktoren

Rheumafaktoren sind Immunglobuline, die gegen das Fc-Fragment von körpereigenen Immunglobulinen gerichtet sind. Von allen Antikörpern, die mit der Rheumatoiden Arthritis assoziiert werden, sind sie die zuerst entdeckten und meist erforschten Antikörper. Rund dreiviertel der RA-Patienten sind positiv für Rheumafaktoren, wobei am häufigsten Rheumafaktoren vom Typ IgM (IgM-RF) beobachtet werden. IgM-RF ist der einzige Autoantikörper, der 1988 in die revidierten ACR-Kriterien aufgenommen wurde und als „der“ serologische Krankheitsmarker der RA verwendet wurde. Man nimmt an, dass Mikroorganismen die Synthese von Rheumafaktoren positiv beeinflussen. Dies gilt vor allem für solche Organismen, die auf ihrer Oberfläche ein räumliches Arrangement vieler Antigene besitzen und die mit IgG beladen sind [Newkirk M. et al. 2002].

Es gibt unterschiedliche RF-Isotypen (IgG, IgM und IgA) von denen IgM der wichtigste ist. IgM-RF produzierende Plasmazellen werden bei ca. 90% der Patienten gefunden, gefolgt von IgG-RF (ca. 60%) und IgA-RF (ca. 10 %). [Youinou et al. 1984] Ausschließlich bei der Rheumatoiden Arthritis findet man das gleichzeitige Vorliegen von IgM-RF und IgA-RF. Auch ist bei klinisch unauffälligen Patienten diese Kombination der Rheumafaktoren ein Risikofaktor für eine spätere Manifestation einer Rheumatoiden Arthritis [Rantapää-Dahlqvist et al. 2003]. Für die Rheumatoide Arthritis gelten Rheumafaktoren im Mittel zu 79% spezifisch, wobei die Sensitivität bei ca. 60% liegt. [Feist E. et al. 2009]

Der positiv prädiktive Wert ist mit 20-30% eher gering. Mit 93-95% ist der negativ prädiktive Wert allerdings als hoch anzusehen.



Der Nachweis des Rheumafaktors ist standardisiert mittels Latextest, Nephelometrie (Streulichtmessung) und ELISA möglich. Der RF-Latextest wird allerdings wegen seiner begrenzten Krankheitsspezifität allgemein als nicht optimal für die serologische Frühdiagnose der RA angesehen. IgM-RF treten bei vielen Autoimmunerkrankungen wie den Kollagenosen, sowie bei Infektionserkrankungen und in fortgeschrittenem Lebensalter auch bei Gesunden gehäuft auf. [Feist E. et al. 2007]. Aus diesem Grunde wurde stets nach anderen serologischen Biomarkern mit besserer diagnostischer Effizienz gesucht.

### **1.5 RA33-Antikörper**

Anti-RA33-Antikörper haben eine hohe diagnostische Spezifität mit 69-96% für die Rheumatoide Arthritis und gelten als wichtiger zusätzlicher serologischer Parameter. Die Sensitivität schwankt zwischen 26% und 35%. Das korrespondierende Autoantigen ist das A2-Protein des Proteinkomplexes HNRNP-A2. Er ist nicht assoziiert mit dem Auftreten von Rheumafaktoren und ist häufig bei den frühen Formen der seronegativen Rheumatoiden Arthritis nachweisbar. [Nell VP et. al. 2005]

### **1.6 Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid (Anti-CCP)**

Von zahlreichen dahingehend überprüften Autoantikörpern haben sich der bereits 1964 entdeckte Anti-perinukleäre Faktor (APF) und die 1979 beschriebenen Keratin-Antikörper (AKA) wegen ihrer nahezu hundertprozentigen Krankheitsspezifität als

aussichtsreichste serologische Marker profiliert. Anfangs für Antikörper unterschiedlicher Antigenspezifität gehalten, zeigte sich in der Folgezeit, dass sich beide Antikörper gegen citrullinhaltige Filaggrine richten, was zu der Bezeichnung anti-Filaggrin-Antikörper (AFA) führte. Da nicht das Filaggrin an sich, sondern nur seine Citrullylreste für die Reaktion mit den Antikörpern erforderlich sind, werden heute zu deren Nachweis synthetische cyclische Citrullinpeptide eingesetzt, was die neuerliche Umbenennung der Autoantikörper in cyclische Citrullinpeptid-Autoantikörper (anti-CCP-Antikörper) veranlasste. Als perinukleärer Faktor wurden perinukleäre 0.5-5 µm große Keratohyalin granula in den nicht verhornenden Epithelien der Wangenschleimhaut bezeichnet. Mit dem indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) ließen sich Antikörper gegen den perinukleären Faktor (APF) bei 72% (48-90%) der RA-Patienten nachweisen. Sie zeichneten sich durch eine hohe Spezifität von 92% (72 -99%) aus, welche deutlich über der des IgM-RF lag [Rantapää-Dahlqvist et al. 2003]. Keratin-Autoantikörper (AKA) wurden mit dem IFT im Stratum corneum des Rattenösophagus nachgewiesen. Sie reagierten schwächer auch mit dem Stratum corneum der menschlichen Epidermis. Die Sensitivität des AKA-Tests lag mit 36-59% unter der des APF-Tests, seine Krankheitsspezifität war mit 88-99% ebenfalls auffallend hoch.

Beide Antikörper (AFP und AKA) waren bereits in den Frühstadien der RA nachweisbar, fanden sich auch bei über einem Drittel der Patienten mit seronegativer (IgM-RF-negativer) RA und waren mit erosiven Verlaufsformen assoziiert. [Smolen J.S. 1996]

Beide Antikörper reagieren mit deiminierten (citrullinierten), in den Keratohyalin granula der Wangenschleimhaut und in der Epidermis vorkommenden Filaggrinen, deren Vorstufe, das Profilaggrin, als hochmolekulares, stark phosphoryliertes Polyprotein in den Keratinozyten des Stratum granulosum der

Epidermis exprimiert und in Keratohyalin granula gespeichert wird. Bei der Kornifizierung der Keratinozyten, einem der Apoptose vergleichbaren Prozess, wird Profilaggrin partiell dephosphoryliert und durch Peptidylarginindeiminasen deiminiert. Hierdurch werden etwa 20% seiner Arginylreste in Citrullylreste umgewandelt (Abbildung 3).

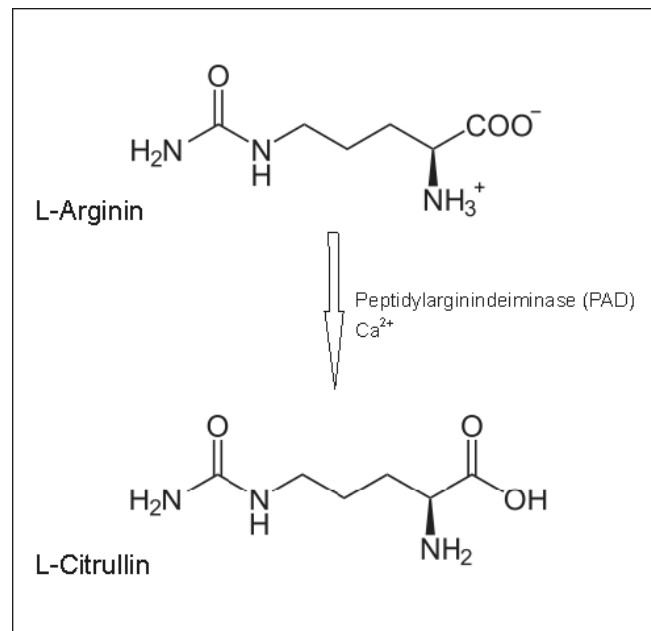


Abb. 3: Grundlage der Citrullinierung von Peptiden: Umwandlung der Aminosäure L-Arginin in L-Citrullin

Anschließend wird es in Filaggrinuntereinheiten aus je 324 Aminosäuren hydrolysiert, die an der Aggregation intermediärer Zytokeratinfilamente (Filaggrin= Filament-Aggregation) beteiligt sind. Ihre Spezifität für citrullinierte Filaggrine erklärt die auf den ersten Blick ungewöhnliche Immunreaktion dieser Autoantikörper mit Keratohyalin granula in der Wangenschleimhaut und mit verhornenden Plattenepithelien im Rattenösophagus. Für den Nachweis der Antikörper werden diese Gewebepreparate durch rekombinante und native citrullinierte Filaggrine ersetzt. Die damit bestimmten Filaggrin-Autoantikörper (AFA) sind ebenso sensitiv

(64%) und spezifisch (bis 99%) für die RA wie APF und AKA und gleichermaßen mit erosiven Läsionen assoziiert [Suzuki et al. 2003].

Für die Reaktion mit den Antikörpern ist nicht das citrullinierte Filaggrinprotein an sich, sondern nur ein Citrullylrest notwendig. Bei der Deiminierung des Arginins wird der positiv geladene Guanidinrest hydrolysiert und die protonenhaltige Iminogruppe durch ein neutrales Sauerstoffatom ersetzt. Im Verbund eines Peptids oder Proteins bestimmt das sauerstofftragende Citrullylepitop die Reaktion mit den Antikörpern, d.h. Antikörper von RA-Patienten können grundsätzlich mit verschiedenen im Körper vorkommenden citrullinierten Peptiden oder Proteinen reagieren, wobei die Reaktionsstärke durch die benachbarten Aminosäurereste moduliert wird.

Die Antikörper sind nicht für Filaggrin spezifisch, sondern für Citrullin im Kontext einer Peptidkette, was insofern von Bedeutung ist, als im Entstehungsort dieser Antikörper, dem entzündlichen Pannus der Synovialmembran, Filaggrine nicht vorkommen. Hier wurden als mögliche Autoantigene citrullinierte alpha- und beta-Ketten von Fibrin identifiziert, die ebenfalls von den Antikörpern erkannt werden. So könnten im Verlauf eines rheumatischen Entzündungsprozesses Arginylreste von Proteinen der Synovialmembran möglicherweise durch die in Monozyten und Makrophagen vorkommenden Peptidylarginindeiminasen zu Citrullylresten deiminiert werden, die dann als neugeformte B-Zellepitope immunkompetenten Zellen präsentiert werden und bei einer entsprechenden genetischen Disposition eine Autoimmunantwort auslösen.

#### *Sensitivität und Spezifität:*

Die Sensitivität eines durchschnittlichen CCP1-Assays liegt bei 40-68%, die Spezifität erreicht 97%. Mit einem Assay der zweiten Generation (CCP2), das cyclische Citrullinpeptide bisher nicht veröffentlichter Sequenz enthält, lässt sich die

Sensitivität auf 80%, die Spezifität auf über 98% steigern. Eine Übersicht über die in verschiedenen Studien gefundenen Werte für Sensitivität und Spezifität der CCP-Assays erster und zweiter Generation und des RF ist Tabelle 4 zu entnehmen.

anti-CCP		RF			
Sens%	Spez. %	Sens. %	Spez. %	Test	Autoren
84	89	70	82	CCP2	Suzuki et al. (2003)
76	92	69	76	CCP2	Hayashi und Kumagai (2004)
65	96	60	70	CCP2	Dubucquoi et al. (2004)
70*	98	73	93	CCP2	Rantapää-Dahlquist et a.(2003)
66	90	72	80	CCP2	Lee und Schur (2003)
77		90		CCP2	Bombardieri et al. (2004)
80	>98			CCP2	Vossenaar et al. (2002)
68	98			CCP1	Schellekens et al. (2000)
48*	96	54	91	CCP1	Schellekens et al. (2000)
79	97	78	62	CCP1	Vasishta (2002)**

Tabelle 4: \* Patienten mit Krankheitsdauer < 6 Monate. \*\* Shield Diagnostics Ltd, Dundee

Damit entspricht die Sensitivität des CCP2-Assays in etwa der des IgM-RF. Allerdings zeigt sich eine wesentlich höhere Spezifität der CCP-Assays im Vergleich zum RF. Die Angaben über die Sensitivität der Assays sind von den untersuchten Patientenkollektiven und von dem Zeitpunkt der Untersuchung abhängig. Die Sensitivität kann nach zweijähriger Krankheitsdauer um 5-17% höher liegen als in der für die Diagnose wichtigen Frühphase der ersten klinischen Symptome (<6 Monate).

Bei etwa 85% der anti-CCP-Antikörper positiven Patienten finden sich auch IgM-RF, wobei allerdings keine nennenswerten Korrelationen zwischen der anti-CCP-Antikörper- und der IgM-RF-Konzentration bestehen. Dass bei bis zu einem Drittel der RF-IgM negativen RA-Patienten ebenfalls anti-CCP-Antikörper vorkommen, ist von diagnostischer Bedeutung. Die Mehrzahl der Untersucher favorisiert derzeit noch bei dem Verdacht auf eine RA die gemeinsame Bestimmung von anti-CCP-Antikörpern und IgM-RF zur Verbesserung der diagnostischen und prognostischen Effizienz [Bombardieri et al. 2004, Dubucquoi et al. 2004].

*Krankheitsassoziationen:*

Aufgrund ihrer hohen Spezifität für die RA finden sich anti-CCP-Antikörper selten bei anderen Erkrankungen. Die Prävalenz für anti-CCP-Antikörper liegt deutlich unter 1-3% bei gesunden Personen, bei systemischen Autoimmunerkrankungen wie SLE (hier jedoch 20% bei der Assoziation mit erosiven Arthritiden), systemischer Sklerose, Sjögren Syndrom und Vaskulitiden, ebenso bei anderen Erkrankungen wie reaktiver Arthritis, Fibromyalgie, Pseudogicht, Sarkoidose, M. Crohn, Colitis ulcerosa und bakteriellen, viralen oder parasitären Infektionen. In kleinen Studienkollektiven wurden bei Polymyalgia rheumatica, Spondyloarthritis und anti-HCV-positiven Arthropathien keine Antikörper gefunden. Höhere Prävalenzen fanden sich bei Patienten mit palindromem Rheumatismus (11-56%), Psoriasis-Arthritis (9-11%), nicht näher definierten entzündlichen Arthritiden (11.5%) und bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (2-15%), dort vor allem bei der polyartikulären Form, meist assoziiert mit IgM-RF und radiographisch darstellbaren Gelenkläsionen. [van Venrooij W.J. et al. 2004]

### *Prognostische Bedeutung:*

Anti-CCP-Antikörper können nach bisherigen Daten als vielversprechende Marker der Frühphase einer RA angesehen werden, da sie sehr frühzeitig, nicht selten schon vor der Manifestation klinischer Symptome auftreten. Sie waren bei 30-40% der späteren RA-Patienten schon bis zu 9 Jahre vor der Manifestation klinischer Symptome vorhanden. Das Risiko, unter diesen Umständen innerhalb von 5 Jahren an einer RA zu erkranken (positiver prädiktiver Wert), liegt bezogen auf die Gesamtbevölkerung bei 5%, steigt bei Risikopatienten jedoch auf 60-70% an, was auch mögliche therapeutische Überlegungen impliziert. Bei unklaren arthritischen Symptomen und positivem anti-CCP-Antikörpertest besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer RA in den nächsten drei Jahren. [Kastbom A. et al. 2004]

Von anti-CCP-Antikörper positiven Patienten mit unklarer Anfangssymptomatik, die als noch undifferenzierte Arthritis eingestuft wurde, entwickelten sogar 93% der Patienten innerhalb von 3 Jahren eine RA, von anti-CCP-Antikörper negativen Patienten dagegen nur 25%. Anti-CCP-Antikörper scheinen auch eine Prognose bezüglich erosiver und nicht erosiver Verlaufsformen der RA zu erlauben, die sich durch die Einbeziehung des IgM-RF in die Beurteilung noch verbessern lässt [Kastbom A. et al. 2004]. Verlaufsstudien über Zeitintervalle von bis zu mehreren Jahren bestätigten die signifikante Korrelation von anti-CCP-Antikörper und ausgeprägteren, radiographisch nachweisbaren erosiven Gelenkläsionen.

### *Anti-CCP-Antikörper - diagnostische Relevanz*

Ein negativer anti-CCP-Antikörpertest und noch weniger ein negativer IgM-RF-Test schließen eine RA jedoch nicht aus. Ein positiver anti-CCP Antikörpertest spricht wegen seiner hohen Krankheitsspezifität bei entsprechender Klinik mit großer

Wahrscheinlichkeit für die Existenz oder für die absehbare Entwicklung einer RA. Der anti-CCP-Antikörpertest kann nach allen vorliegenden Daten die serologische Diagnostik der RA effizienter gestalten.

### **1.7 Anti-MCV-Antikörper**

Im Verlauf der Entzündungsreaktion bei der RA werden endogene Proteine biochemisch modifiziert, wobei Argininreste in Citrullin umgewandelt werden. Die Immunreaktion gegen diese citrullinierten körpereigenen Antigene ist an der Krankheitsentstehung beteiligt und gegen citrullinierte Proteine gerichtete Autoantikörper dienen als wichtiger serologischer Marker für eine rheumatoide Arthritis.

Antikörper gegen synthetische zyklische Peptide anti-CCP-Antikörper waren bisher neben dem Rheumafaktor die ersten Marker, die regelmäßig zur Diagnostik der rheumatoiden Arthritis verwendet wurden. Die Bestimmung von Antikörpern gegen das natürlich vorkommende citrullinierte Vimentin (MCV), ein Protein aus dem Zytoskelett, ist der nächste Schritt hin zu höherer Sensitivität und größerer prognostischer Aussagekraft. Das Vorkommen von Vimentin in den synovialen Zellen bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis und die Beobachtung, dass Makrophagen in Abhängigkeit von proinflammatorischen Signalen Vimentin modifizieren und sekretieren, machen dieses Protein zu einem geeigneten prognostischen Marker für die rheumatoide Arthritis. [Innala L. et al 2008]



*Ursprünglich nach dem Indexpatienten Savoie „Anti-Sa“ benannte Antikörper sind gegen das citrullinierte Vimentin gerichtet [Mathsson L. et al. 2008]. Das Sa-Antigen stellt den Ausgangspunkt für den vor einigen Jahren entwickelten Anti-MCV (Anti-Mutiertes Citrulliniertes Vimentin) ELISA dar [Bang H. et al. 2007]. Der neu entwickelte Anti-MCV-Assay hat eine ähnliche diagnostische Bedeutung wie die Anti-CCP2 genannten ELISA neuerer Generation.*

Der Anti-MCV-Assay erweitert das diagnostische Spektrum jedoch. Anti-MCV-Antikörper positive, anti-CCP-Antikörper negative RA-Patienten haben einen aggressiveren RA-Verlauf als Patienten, die Anti-MCV- und Anti-CCP-Antikörper negativ sind. Bei der frühen RA besitzen anti-MCV-Antikörper gegenüber anti-CCP-Antikörpern bei gleichbleibender Spezifität eine höhere Sensitivität (71 versus 58 %) [Mathsson L. et al. 2008].

Anti-MCV-Antikörper stellen wahrscheinlich auch einen besseren Prognosemarker im Hinblick auf einen gelenkdestruierenden Verlauf bei der frühen RA dar, als anti-CCP-Antikörper. Darüber hinaus eignen sich anti-MCV-Antikörper besser zur Prognose radiographischer Schäden. Eine signifikante hohe Korrelation zeigte sich zwischen Veränderungen der Anti-MCV-Antikörperkonzentrationen und Veränderungen klinischer Parameter. Dazu gehörten die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), die Selbsteinschätzung des Patienten anhand eines standardisierten Fragebogens (HAQ – Health Assessment Questionnaire), die Bewertung der Krankheitsaktivität durch einen Rheumatologen, die Anzahl geschwollener Gelenke und die Beurteilung der Krankheitsaktivität mithilfe des DAS28 (Disease Activity Score) [Mathsson L. et al. 2008].

## 1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die diagnostische Wertigkeit des Seromarkers anti-MCV-Antikörper im Vergleich mit den bereits etablierten Seromarkern anti-CCP-Antikörper und Rheumafaktor zu setzen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die zusätzliche Bestimmung von anti-MCV-Antikörpern im Blutserum von Patienten mit entzündlichen Gelenkbeschwerden die Diagnosestellung einer Erkrankung aus den rheumatischen Formenkreis erleichtern kann. Dies hat angesichts des frühen Interventionsbedarfs im Verlauf einer Rheumatoiden Arthritis eine große Bedeutung, da nur ungefähr zwei Drittel der Patienten im Frühstadium der Rheumatoiden Arthritis die erforderlichen Diagnosekriterien der ACR erfüllen, und somit Biomarkern ein entscheidender diagnostischer Stellenwert zugesprochen wird.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Patienten

Die Akquirierung der Daten und Proben startete am 02. Januar 2005 mit der Analyse der ersten Patientenseren auf die Antikörper anti-CCP, anti-MCV und Rheumafaktoren. Im Zeitraum vom 02. Januar 2005 bis zum 20. Dezember 2008 wurden 2641 konsekutive Patienten, die sich mit Gelenkbeschwerden in der rheumatologischen Klinik Bad Abbach vorstellten, untersucht.

Innerhalb dieser Kohorte waren Patienten mit verschiedenen entzündlichen Gelenkerkrankungen mit unterschiedlichem Befallsmuster (Mon-, Oligo-, bzw. polyarthritischen Gelenkbeschwerden) sowie mit einem geringeren Anteil nicht-entzündliche Gelenkerkrankungen eingeschlossen .

Der Fokus wurde schließlich auf ein Patientenkollektiv von 130 Patienten gelegt, die in der Laboranalyse der Blutseren einen positiven Wert für anti-MCV-Antikörper zeigten, gleichzeitig aber sowohl für Rheumafaktoren als auch für anti-CCP-Antikörper negativ getestet wurden. Dieses Kollektiv wurde anschließend anhand der endgültigen ärztlichen Entlassbriefe genauestens analysiert und den ärztlichen Diagnosen zugeteilt, welche letztendlich in vier Oberkategorien eingeteilt wurden:

- A) Rheumatoide Arthritis
- B) Undifferenzierte Arthritis
- C) Overlap Syndrom
- D) Keine Arthritis

## **2.2 Autoantikörperprofile bei der rheumatoiden Arthritis**

Da bei der Rheumatoiden Arthritis verschieden schwere Verlaufsformen bekannt sind, neben milden schwach-erosiven Arthritiden existieren auch aggressiv-destruierende Formen mit Gelenkdeformationen und Gelenkzerstörungen innerhalb weniger Monate, ist insbesondere zur Frühdiagnostik und zur Beurteilung der Prognose die Bestimmung von spezifischen Laborparametern hilfreich.

## **2.3 Serumgewinnung**

Die Gewinnung der Patientenseren, sowie die weitere Analyse insbesondere die Bestimmung der Antikörperspiegel anti-MCV, anti-CCP und Rheumafaktoren erfolgte im Zentrallabor des Asklepios Klinikums Bad Abbach im Rahmen der klinischen Routinediagnostik. Dem zu analysierenden Patientenkollektiv wurde nach gründlicher Hautdesinfektion der Entnahmestelle mittels Venenpunktion an den Extremitäten (mit Vakuumsystem Vacuette® der Fa. Greiner Bio-One) 8 ml Vollblut entnommen (Serumröhrchen 8ml, Z Serum Beads Clot Activator). Anschließend wurden die Serumröhrchen bei 1567 Umdrehungen pro Minute für acht Minuten zentrifugiert (Firma SIGMA Typ 4K15; RZB 500, Temp. 21 °C, BES 9, BRE 9, ROT 11150), der so erhaltene Überstand wurde abpipettiert. Im nun erhaltenen Blutserum wurden dann die Titer von RF, anti-CCP- und anti-MCV-Antikörper bestimmt.

## 2.4 Rheumafaktorbestimmung

Das Prinzip der Rheumafaktorbestimmung ist der so genannte Immunologische Trübungstest. Dabei agglutinieren humane Rheumafaktoren mit Latexpartikel, die mit humanem IgG beschichtet sind. Der Rheumafaktor bindet an das FC-Stück eines IgG-Antikörpers. Zur Konzentrationsbestimmung der Rheumafaktoren wird der Niederschlag turbidimetrisch bei 583 nm bestimmt. [Westwood et al. 2006]

Die Bestimmung der RF-Spiegel erfolgt mit dem Analysegerät Cobas Integra 400 der Firma Roche Diagnostics GmbH. Dabei wird nach folgendem Pipettierschema vorgegangen:

Reagens 1:            *Reaktionspuffer*    Glycinpuffer: 170 mmol/l, pH: 8,3  
    Polyethylenglykol: 0,05%  
    Rinderserenalbumin; Konservierungsmittel  
    und Stabilisatoren

Reagens 2:            Einlegekassette    Latexpartikel beschichtet mit humanem IgG  
    Glycinpuffer: 170 mmol/l, pH: 7,3  
    Konservierungsmittel und Stabilisatoren

	Reagens 2	Diluens (H2O)
Reagens 1	90 µl	10 µl
Serumröhrchen	30 µl	10 µl
Probe	3 µl	
Gesamtvolumen	143 µl	

*Tabelle 5*

Als unterer Grenzwert des negativen Bereichs galt ein IgM-RF Titer von 7 IU/ml. Als oberer Grenzwert galt ein IgM-RF Titer von 14 IU/ml. Patienten mit einem Rheumafaktortiter über 14IU/ml wurden als rheumafaktorpositiv eingestuft. Einschränkungen im Testverfahren zeigen sich bei Gammopathien, insbesondere bei solchen des Subtyps IgM (Waldenström-Makroglobulinämie), da sie zu unzuverlässigen Ergebnissen führen. Ferner kann ein pathologisch hoher Gammaglobulinspiegel zur signifikanten Erniedrigung der RF-Konzentration führen.

## **2.5 Anti-CCP-Antikörper Bestimmung**

Die Bestimmung von anti-CCP-Antikörpern im Patientenserum erfolgt semiquantitativ mittels Elecsys Anti-CCP Test. Diese Testung wird als Elektro-chemilumineszenz Immunoassay (ECLIA) durchgeführt und misst die humanen IgG Autoantikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide. Der verwendete Elecsys Test der Firma Roche Diagnostics verwendet mehrere cyclische citrullinierte Proteine und ist mit einer Dauer von ca. 18 Minuten ein Testverfahren der zweiten Generation (CCP2).

Verwendete Reagenzien:

- |    |  |
|----|--|
| M  | Streptavidin beschichtete Mikropartikel (Deckel transparent) 6,5 ml<br>Streptavidin beschichtete Mikropartikel 0,72 mg/ml;<br>Konservierungsmittel |
| R1 | CCP-Biotin (Deckel grau) 9ml   |

Biotinylierte cyclische citrullinierte Peptide (synthetisch), ca. 1,1 µg/ml  
Phosphatpuffer 100mmol/l, pH 5,0; Konservierungsmittel

R2 Anti humanes aggregiertes IgG-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (Deckel schwarz) 10 ml  
Ruthenylierter monoklonarer anti-human IgG Antikörper (Maus)  
0,75 µg/ml; Phosphatpuffer 100mmol/l, pH 6,0; Konservierungsmittel

Cal1 Anti-CCP Kalibrator 1 (Deckel weiß) 1,0 ml (lyophilisiert)  
Anti-CCP Antikörper (human) ca. 20 U/ml in Humanserum-Matrix

Cal2 Anti-CCP Kalibrator 2 (Deckel schwarz) 1,0 ml (lyophilisiert)  
Anti-CCP Antikörper (human) ca. 200 U/ml in Humanserum-Matrix

Erste Inkubation: 15 µl Probe werden mit biotinylierten cyclischen citrullinierten Peptiden und ruthenylierten monoklonaren Antikörpern gegen humanes IgG inkubiert und bilden einen Komplex, wenn CCP-spezifische Antikörper in der Probe vorhanden sind.

Zweite Inkubation: Nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex über Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an die Festphase gebunden.

Das Reaktionsgemisch wurde in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert wurden. Danach wurden mit Pro Cell die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer

Spannung wurde die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen.

Die Ergebnisse wurden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wurde durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert.

Der positive anti-CCP-Antikörper Wert für rheumatologische Erkrankungen wurde auf  $\geq 5$  Reaktionseinheiten/ml festgelegt.

## **2.6 Anti-MCV-Antikörper Bestimmung**

Für die anti-MCV-Antikörper wurde der ANTI-MCV-ELISA von ORGENTEC Diagnostika® verwendet. Der anti-MCV ELISA ist ein indirekter Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin (MCV). Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit MCV beschichtet. Im Serum vorhandene Antikörper können an die immobilisierten Antigene binden. Durch Waschen wurden nicht gebundene Serum-Antikörper entfernt. Enzymmarkierte Detektions-Antikörper (HRP-konjugierte Anti-human IgG-Antikörper) heften sich anschließend an die oberflächengebundenen Autoantikörper. Überschüssige Detektionsantikörper wurden durch Waschen entfernt. Ein Enzymsubstrat wurde in Anwesenheit von gebundenen Detektionsantikörpern zu einem blauen Reaktionsprodukt hydrolysiert. Die Zugabe von Säure stoppte die Reaktion ab und das Reaktionsprodukt verfärbte sich gelb. Die Intensität der Gelbfärbung konnte photometrisch bei 450/620 nm bestimmt werden. Die Farbentwicklung war direkt proportional zur gesuchten Autoantikörper-Konzentration. Auf einer Mikrotiterplatte



konnten 96 Bestimmungen durchgeführt werden. Jede Mikrotiterplatte setzte sich aus 12 einzelnen Streifen mit jeweils 8 Kavitäten zusammen. [Orgentec Diagnostika, 2005]

Aufbau Titerplatte:

Eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten. Jede Kavität ist mit MCV beschichtet.

Verwendete Reagenzien:

6 Fläschchen à 1.5 ml Standardreihe mit anti-MCV-Antikörpern in Serum/Puffer Matrix (PBS, NaN<sub>3</sub> <0,1% (w/w)) Skalierung: 0, 20, 40, 100, 300, 1000 U/ml; gebrauchsfertig

2 Fläschchen à 1,5 ml Anti-MCV Positivkontrolle (1) und Negativkontrolle (2) in Serum/Puffer Matrix (PBS, NaN<sub>3</sub> <0,1% (w/w)); gebrauchsfertig

1 Flasche à 20 ml Probenpuffer (Tris-Puffer, NaN<sub>3</sub> <0,1% (w/w)), gelb, Konzentrat (5x)

1 Flasche à 15 ml Konjugat; anti-human IgG, Peroxidase konjugiert, rosa (PBS, PROCLIN 300 <0,5% (v/v)); gebrauchsfertig

1 Flasche, à 15 ml TMB Substratlösung, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin; gebrauchsfertig

1 Flasche, à 15 ml Stopplösung (1 M Salzsäure); gebrauchsfertig

1 Flasche, à 20 ml Waschpuffer (PBS, NaN<sub>3</sub> <0,1% (w/w)), Konzentrat (50x)

Beim Anti-MCV ELISA wurde als Grenzwert folgender Cutoff-Wert festgelegt:

Normal: <20 U/ml

Erhöht: >20 U/ml

### **3. Ergebnisse**

Es wurden Blutseren von 2641 aufeinanderfolgenden Patienten untersucht, die sich zur Abklärung von Gelenkbeschwerden in der rheumatologischen Klinik Bad Abbach vorstellten. Die Patienten kamen mit zum Teil degenerativen Gelenkveränderungen, noch nicht diagnostizierten mon-, oligo-, bzw. polyarthritischen Gelenkbeschwerden oder bereits anbehandelten manifesten Arthritiden wie RA, M. Bechterew, Psoriasisarthritis oder verschiedene Formen von Kollagenosen in die Klinik. Im Rahmen der labordiagnostischen Abklärung wurden die Autoantikörpertiter von anti-CCP-, anti-MCV-Antikörpern und Rheumafaktoren (IgM-RF) bestimmt.

#### **3.1 Verteilung der Antikörper im Gesamtkollektiv**

Bei 1143 (43,3%) Patienten, also fast der Hälfte des Kollektivs, zeigte sich mindestens einer dieser Autoantikörper signifikant erhöht. 1498 (56,7%) Patienten hatten keine der drei bestimmten Autoantikörper im Blut. In der weiteren Aufschlüsselung zeigten sich bei 279 (10,6%) Patienten nur Rheumafaktoren erhöht, bei gleichzeitigem Fehlen von anti-CCP-Antikörpern und anti-MCV-Antikörpern. Bei 130 (4,9%) Patienten fanden sich als alleinige Seromarker anti-MCV-Antikörper. Unter allen 2641 analysierten Patientenseren gab es keine Probe, die sich nur auf anti-CCP-Antikörper positiv zeigte – ohne, dass mindestens einer der anderen Antikörper über dem Cutoff-Wert lag. Bei ca. einem Viertel der Patienten, nämlich 585 (22,2%) Patienten, waren alle drei Antikörper gleichzeitig nachzuweisen. Bei 62 (2,3%) Patienten fand sich die Zweierkombination Rheumafaktoren und anti-MCV-Antikörper. Bei 48 (1,8%) Patienten fand sich die Zweierkombination

Rheumafaktoren und anti-CCP-Antikörper. Zuletzt fand sich bei 39 (1,5%) Patienten die Zweierkombination anti-MCV-Antikörper und anti-CCP-Antikörper.

Die Verteilung der Antikörperprofile ist in Tabelle 6 genau aufgeschlüsselt.

RF	Anti-CCP	Anti-MCV	n	(%)
-	-	-	1498	56,7
+	+	+	585	22,2
+	+	-	48	1,8
+	-	+	62	2,3
-	+	+	39	1,5
+	-	-	279	10,6
-	+	-	0	0
-	-	+	130	4,9

*Tabelle 6: Autoantikörperprofil bei 2641 Patientenseren*

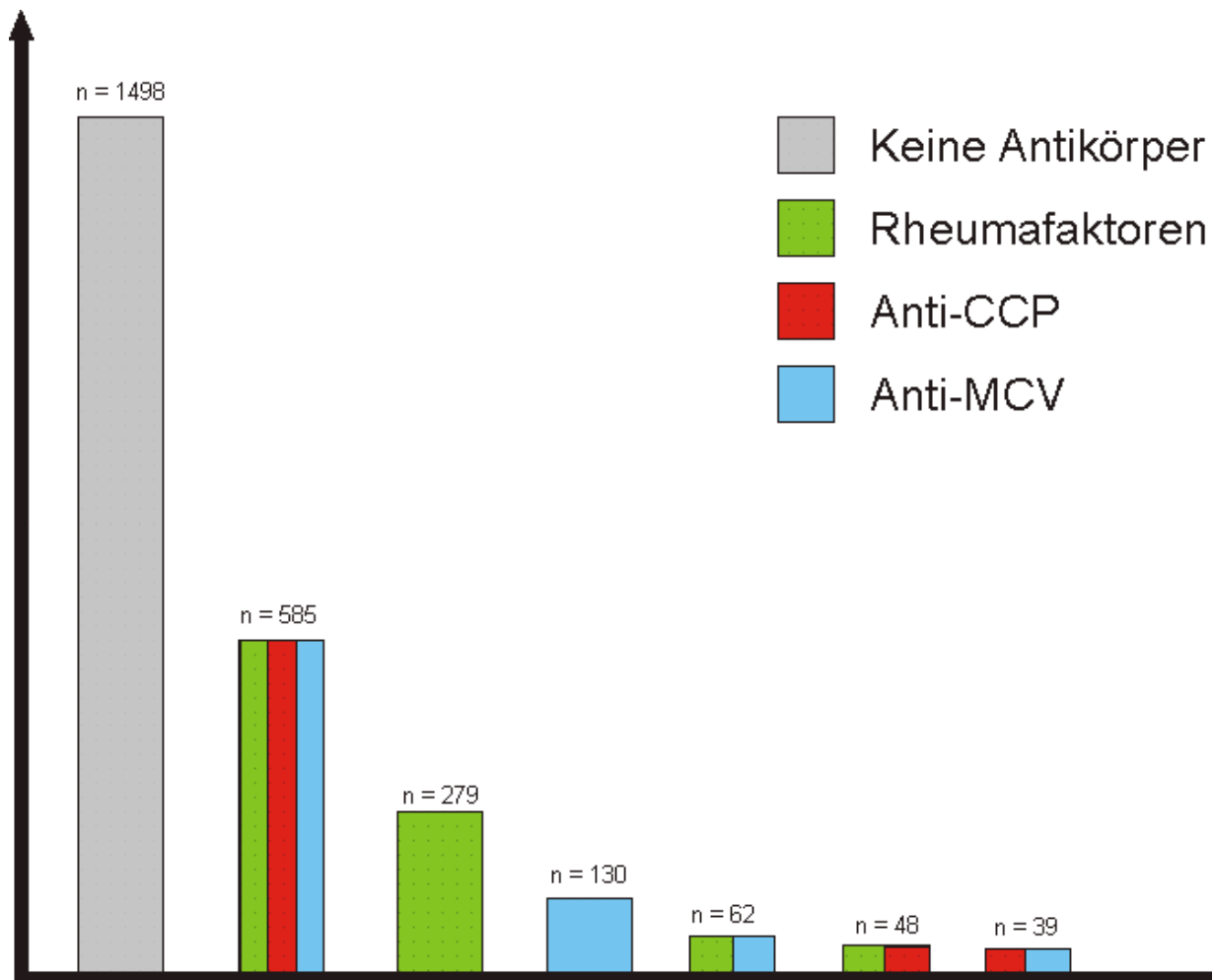


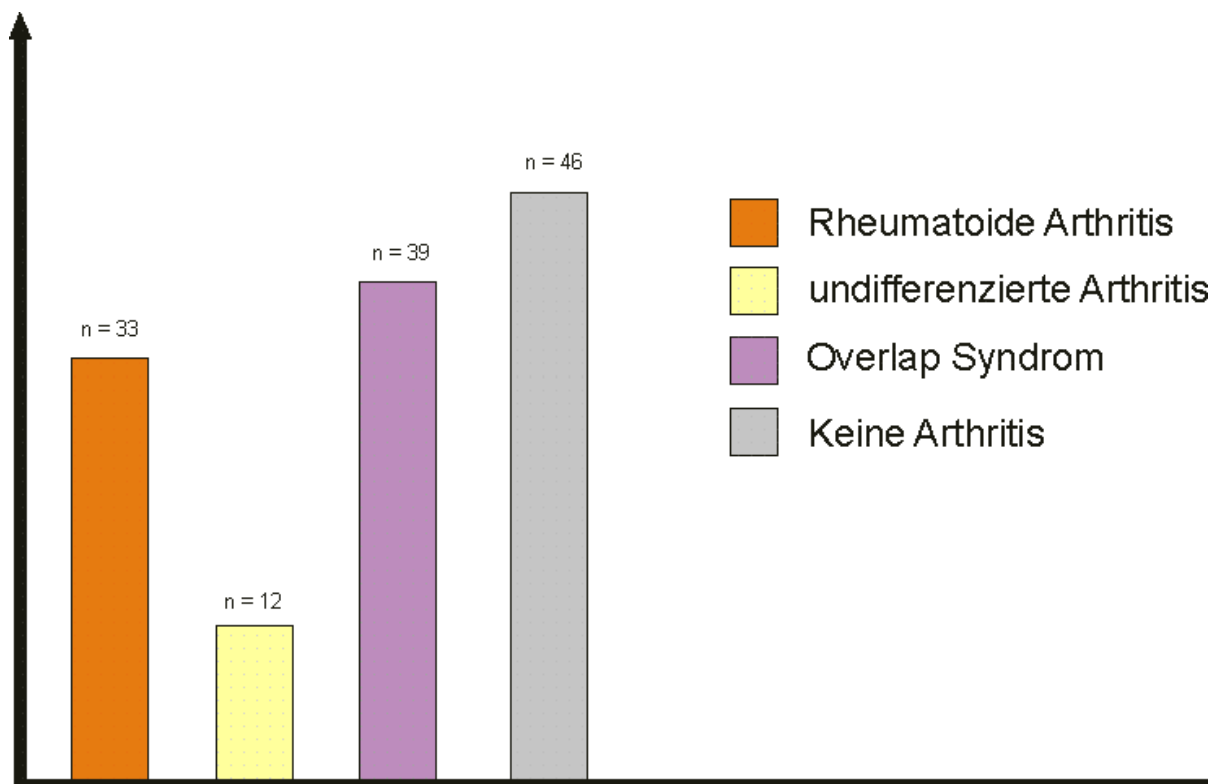
Abb. 4: Antikörperverteilung in 2641 Patientenseren

### 3.2 Charakterisierung der anti-MCV-Antikörper positiven Subpopulation

Die Subgruppe von 130 Patienten (4,9%), bei denen anti-MCV-Antikörper im Serum nachgewiesen werden konnten, die aber gleichzeitig für Rheumafaktor- und anti-CCP-Antikörper negativ getestet wurden, wurde analysiert, wobei das Autoantikörperprofil mit verschiedenen klinischen Parametern korreliert wurde (u.a. Geschlecht, Alter, Erkrankungsdauer, Immunsuppressive Medikation, radiologisch nachweisbare Veränderungen, Tenosynovitis, extraartikuläre Manifestationen sowie die Entzündungswerte CRP und BSG). Anhand der ärztlichen Entlassbriefe wurden ferner die Diagnosen dieser Patienten wie folgt eingeteilt:

Diagnose	Anzahl (n)	Prozentuale Verteilung
Rheumatoide Arthritis	33	25,4 %
Undifferenzierte Arthritis	12	9,2%
Overlap Syndrom	39	30%
Keine Arthritis	46	35,4%

*Tabelle7: Diagnose von 130 Patienten ausschließlich positiv für anti-MCV-Antikörper*



*Abb. 5: Diagnosen von 130 Patienten ausschließlich positiv für anti-MCV Antikörper*

### **3.2.1 Arthritis**

Eine manifeste Entzündung eines oder mehrerer Gelenke fand sich bei 78 der 130 Patienten mit alleinigem anti-MCV-Antikörpernachweis (60%). Neun Patienten gaben Beschwerden in nur einem Gelenk an. Sieben Patienten berichteten Beschwerden an zwei oder drei Gelenken. Schließlich hatten 111 Patienten Probleme an vier oder mehr Gelenken zu beklagen.

Beschwerden an den Gelenken waren zumeist Schmerzhaftigkeit und Bewegungseinschränkung. Nur die Kombination der Entzündungskriterien, Schwellung und Schmerzen wurden in das Kriterium Arthritis eingeschlossen. Dabei wurde zwischen einem mon-, oligo- oder polyartikulären Befallsmuster unterschieden. Die genaue Verteilung verdeutlicht Abbildung 6.

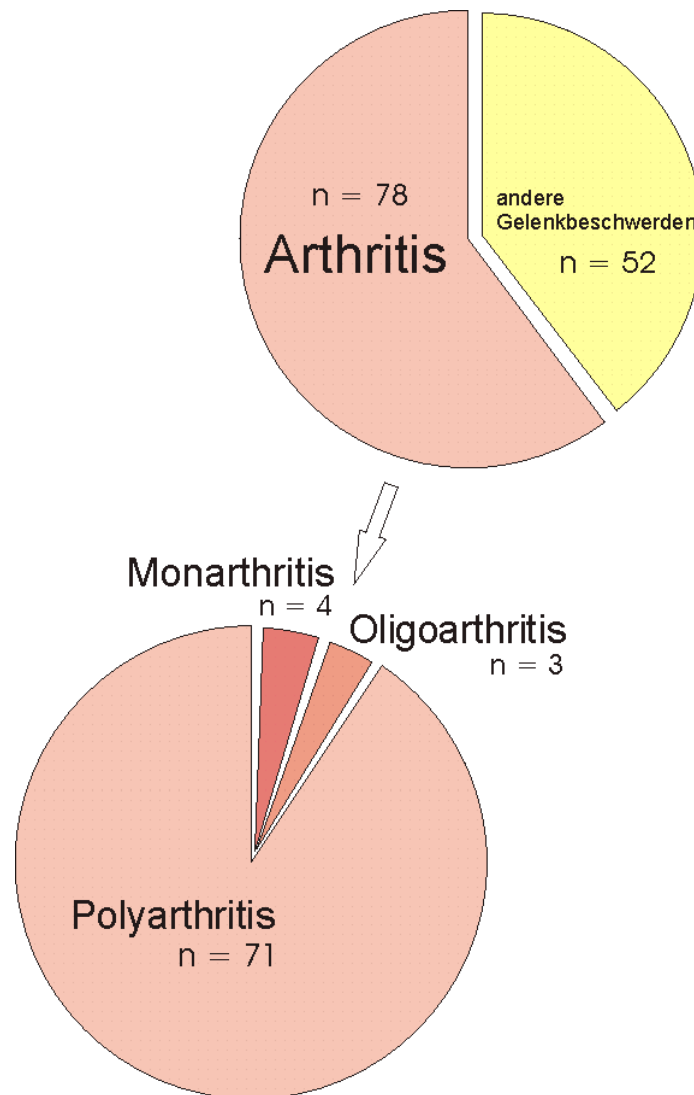


Abb. 6: Verteilung der Arthritiden

### 3.2.2 Geschlechterverteilung

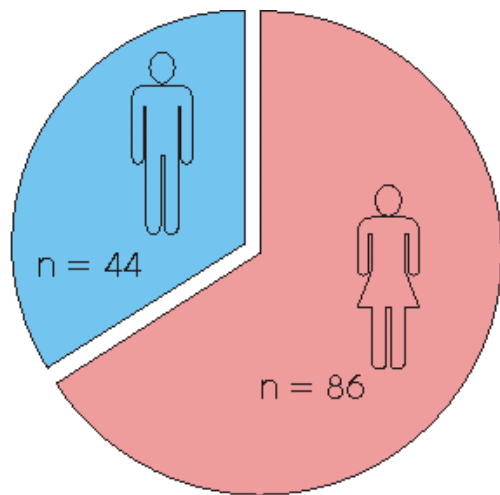
Ausschließlich anti-MCV-Antikörper konnten bei insgesamt 44 Männern und 86 Frauen nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis von Männern zu Frauen von 1:2, das häufig in epidemiologischen Studien für entzündliche Gelenkerkrankungen beobachtet wurde. Die genauere Analyse zeigt eine exakte  $m:w = 1:2$  Verteilung auch bei der Rheumatoiden Arthritis mit 11



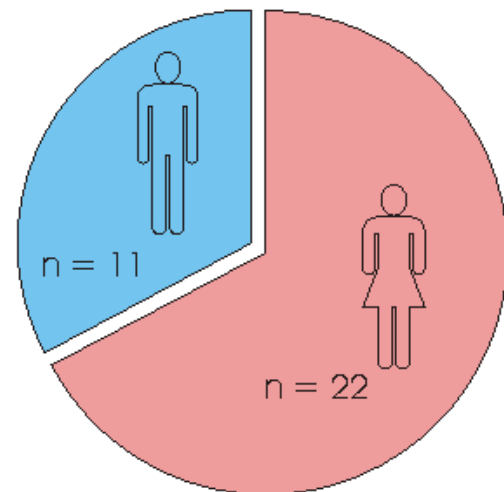
Männern und 22 Frauen. Ähnlich verhält es sich bei den Patienten mit Overlap Syndrom, bei dem neben einer entzündlichen Arthritis auch andere entzündliche Erkrankungen überlappend koexistieren und sich gegenseitig beeinflussen. Auch hier zeigte sich annähernd eine Geschlechterverteilung m:w = 1:2. Eine genaue Aufschlüsselung zeigen Tabelle 8 und Abbildung 7:

Diagnose	Anzahl männlich	Anzahl weiblich	Relativer Wert m	Relativer Wert w	Verhältnis m:w
Gesamt	44	86	33,8%	66,2 %	ca. 1:2
Rheumatoide Arthritis	11	22	33,3%	66,7 %	1:2
Undifferenzierte Arthritis	7	5	58,3%	41,7%	ca. 1,5:1
Overlap Syndrom	17	22	43,6%	56,4%	ca. 1:1,5
Keine Arthritis	9	37	19,6%	80,4%	ca. 1:4

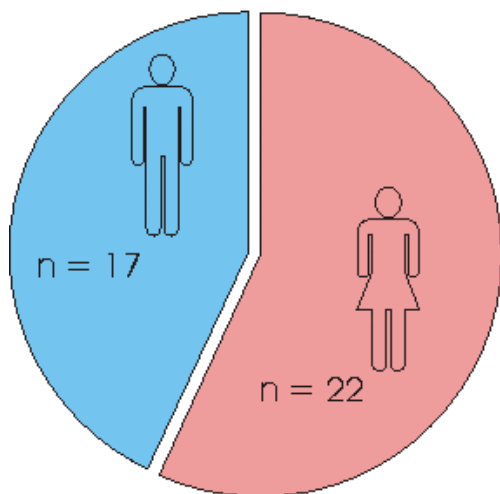
*Tabelle 8: Geschlechterverteilung*



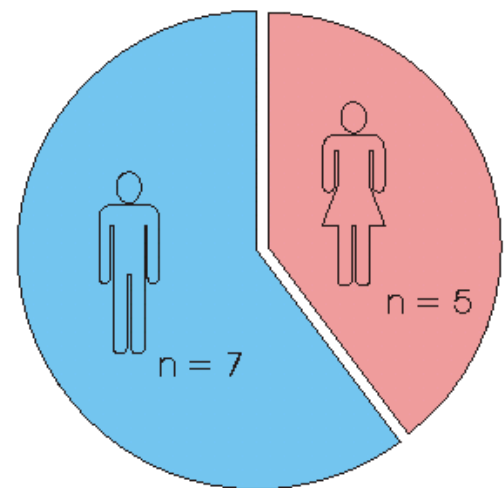
nur Anti-MCV positiv



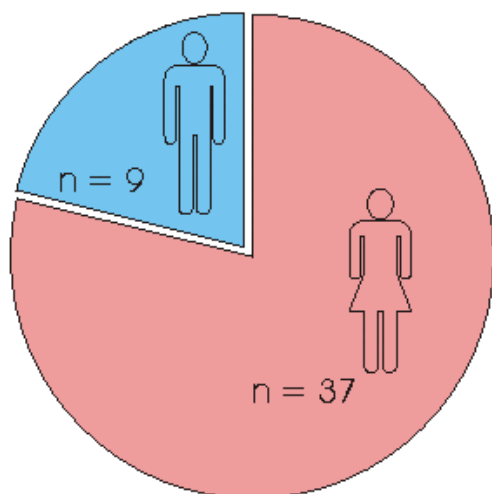
Rheumatoide Arthritis



Overlap Syndrom



undifferenzierte Arthritis



Keine Arthritis

Abb. 7: Geschlechterverteilung

### **3.2.3 Klinische Symptomatik und durchschnittliche Erkrankungsdauer**

Die weitere Analyse insbesondere der klinischen Symptomatik ergab bei den 130 Patienten eine durchschnittliche Erkrankungsdauer von 15,5 Jahren, wobei hier nicht von der Erstdiagnose, sondern dem Beginn erstmaliger Symptome wie Schwellung und Schmerzhaftigkeit der Gelenke ausgegangen wurde.

32 Patienten zeigten in der Arthrosonographie eine eindeutige Tenosynovitis der Handgelenke mit deutlicher synovialer Proliferation. Bei diesen Patienten lag die durchschnittliche Erkrankungsdauer bei 9 Jahren.

Bei zehn Patienten fanden sich radiologisch nachweisbare Zeichen einer entzündlichen Gelenkschädigung mit Erosionen, die im Schnitt seit 19 Jahren bestand.

Eine extraartikuläre Manifestation einer entzündlichen Gelenkserkrankung trat bei 22 Patienten mit ausschließlich positivem Anti-MCV-Antikörperspiegel auf. Davon wurde bei 5 Patienten eine rheumatoide Arthritis, bei 13 Patienten ein Overlap-Syndrom und bei zwei Patienten eine undifferenzierte Arthritis diagnostiziert. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer lag bei ungefähr 12 Jahren.

48 Patienten wurden entweder bereits immunsuppressiv behandelt, oder eine Immunsuppression wurde aufgrund der neu gestellten Diagnose entsprechend den basistherapeutischen Leitlinien neu angesetzt. Auch bei diesen Patienten lag die durchschnittliche Erkrankungsdauer bei ca. 12 Jahren.

	radiologische Gelenkerosionen	Tenosynovitis	extraartikuläre Manifestation	Immunsuppression
Rheumatoide Arthritis	7	16	5	27
undifferenzierte Arthritis	0	7	2	3
Overlap Syndrom	3	8	13	17
keine Arthritis	0	1	2	1
gesamt	10	32	22	48

*Tabelle 9: Symptomatik*

### **3.2.4 Anti-MCV-Titer und Symptomatik**

Der untere Cutoff-Wert für den anti-MCV-Antikörperspiegel wurde entsprechend der Herstellerangaben bei 20 U/ml festgesetzt. Ab 20,1 U/ml anti-MCV-Titer galt ein positiver Nachweis. Die anti-MCV-Antikörper Werte lagen im Patientenkollektiv zwischen 20,1 U/ml und 698 U/ml. Dabei fanden sich bei 24 Patienten sehr stark erhöhte Werte über 60 U/ml und höher. Dies entspricht mehr als dem Dreifachen der positiven Nachweisgrenze.

Sechs Patienten zeigten mit Werten zwischen 400-698 U/ml massiv erhöhte anti-MCV-Antikörper Werte mit bis zu 35fachen anti-MCV-Antikörpertitern über der positiven Nachweisgrenze.

Unter den 24 Patienten mit anti-MCV-Titern über der dreifachen Norm fanden sich 10 Patienten mit rheumatoider Arthritis, 7 mit Overlap-Syndrom, 4 mit undifferenzierter Arthritis sowie 3 Patienten ohne Nachweis einer aktuellen entzündlichen Gelenkerkrankung (Abbildung 8).

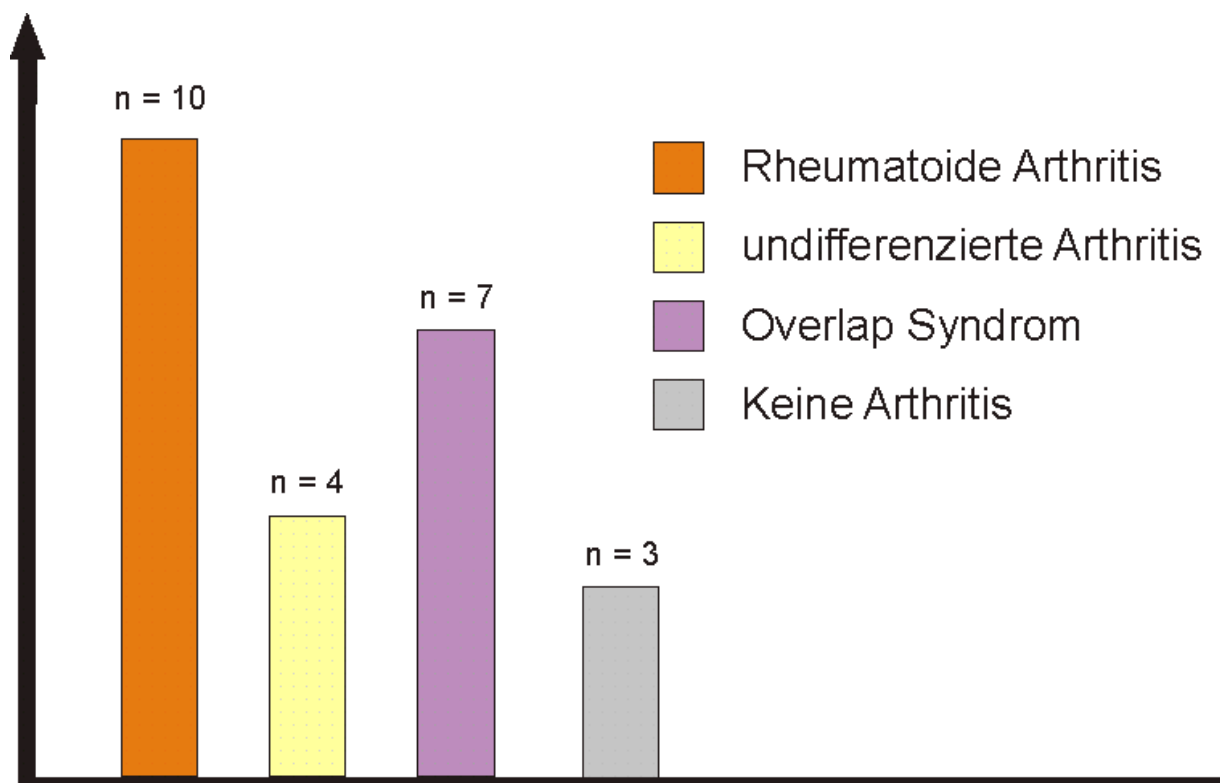


Abb. 8: Diagnose von 24 Patienten mit anti-MCV Antikörper über der 3fachen Norm

Eine genaue Analyse zeigt aber keine signifikante Assoziation zwischen anti-MCV-Antikörpertiter und Entzündungswerten oder extraartikulären Manifestationen, Tenosynovitiden oder radiologisch nachweisbaren Gelenkserosionen.

## 4. Diskussion

Im zeitlichen Verlauf induziert die Rheumatoide Arthritis eine progrediente Gelenkzerstörung, welche zu Funktionsverlust und Einschränkung der Lebensqualität führt. Eine frühzeitig begonnene Therapie hat daher entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Langzeitprognose. Hinsichtlich der Diagnosesicherung standen an serologischen Markern bisher die noch recht unspezifischen Rheumafaktoren sowie anti-CCP-Antikörper in der Routinediagnostik zur Verfügung. Anti-CCP-Antikörper erkennen synthetische Peptide nach Citrullination und nicht das natürliche Antigen z.B.: Filaggrin an sich, sondern nur seine Citrullylreste. Dies bedeutet, dass zu deren Nachweis synthetische cyclische Citrullinpeptide eingesetzt werden. Inzwischen wurden neue Autoantikörper gegen andere citrullinierte Autoantigene identifiziert. Eine besondere Bedeutung haben Antikörper gegen mutiertes Citrulliniertes Vimentin, die als Antikörper gegen natürlich vorkommende Epitope in entzündeten Gelenken von RA-Patienten detektiert werden konnten und eine hohe Spezifität für die RA besitzen.

Angesichts des frühen Interventionsbedarfs im Verlauf einer Rheumatoiden Arthritis wird den Biomarkern ein hoher Stellenwert zugesprochen, da nur ungefähr zwei Drittel der Patienten im Frühstadium der RA die erforderlichen Diagnosekriterien des ACR erfüllen. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit der Stellenwert des Seromarkes anti-MCV-Antikörper im Vergleich zu den bereits etablierten Seromarkern anti-CCP-Antikörper und Rheumafaktor in der täglichen klinischen Routine einer rheumatologischen Fachklinik evaluiert werden. Diese retrospektive Studie erfährt auch eine besondere Bedeutung durch die kontroversen

Studiendaten, die bisher zur Relevanz der anti-MCV-Antikörperbestimmung publiziert wurden.

So bezweifelt eine systematische Datenauswertung im Rahmen einer Metaanalyse von 1966 bis 2008 von Luime et al. aus dem Jahr 2009, dass ein zusätzlicher diagnostischer Wert von anti-MCV-Antikörpertests gegenüber bisherigen Bestimmungen von Rheumafaktoren und anti-CCP-Antikörpern gegeben ist. Die Autoren stellen dar, dass die Spezifität von anti-MCV Antikörpern nur marginal von anti-CCP-Antikörpern abweicht. Bei der Sensitivität seien die anti-MCV-Tests den anti-CCP-Test zwar leicht überlegen [Ursum et al. 2008, Vallbracht et al. 2004]. Jedoch sei der großen Heterogenität der teils diagnostisch prospektiven, diagnostisch retrospektiven und prognostisch prospektiven Studien geschuldet, dass die Vergleichbarkeit der Daten eingeschränkt ist. Ferner erschweren die unterschiedlich ausgewählten Patientenkollektive sowie die unterschiedliche Methodik eine Aussage zur diagnostischen und prognostischen Wertigkeit von anti-MCV-Tests. Bei ausgewerteten diagnostischen Fall-Kontrollstudien gehe man davon aus, dass anti-MCV-Tests alternativ zu anti-CCP- Tests benutzt werden könnten. [Luime et al. 2009]

Die schwierige Vergleichbarkeit der Studien beklagen auch Qin und Kollegen in einer aktuellen Metaanalyse aus dem Jahr 2010. Die Autoren postulieren, dass sich anti-MCV-Antikörper als gute diagnostische Marker selbst für die Frühformen der Rheumatoiden Arthritis bewähren, jedoch fehlen ausreichend vergleichbare klinische Studiendaten, um dies explizit zu validieren. [Qin et al. 2010]

Dass anti-MCV-Antikörper große diagnostische Wertigkeit für die RA haben, können die ausgewerteten Daten aus den 2641 Regensburger Patientenseren nur bekräftigen. Diese zeigen, dass die Bestimmung von Rheumafaktoren und anti-MCV-Antikörper die zusätzliche Bestimmung von anti-CCP-Antikörpern sogar überflüssig machen kann. Im analysierten Kollektiv zeigten sich keine Patienten ausschließlich auf anti-CCP-Antikörper positiv ohne wenigstens eine der beiden anderen Seromarker aufzuweisen. Im Gegensatz dazu aber hätten 130 Patienten (ca. 5% aller Patienten mit rheumatischen Gelenksbeschwerden; entspricht ca. 3% aller untersuchten Patienten mit allgemeinen Gelenksbeschwerden) eine unauffällige Immundiagnostik gezeigt, falls man in der Routinetestung auf die Bestimmung von anti-MCV-Antikörpern verzichtet hätte. Dies ist aber gerade bei der Diagnosestellung der frühen Rheumatoiden Arthritis ein wichtiger Faktor, um die früh- und rechtzeitige Therapie einzuleiten, was die Langzeitprognose entscheidend beeinflusst.

In den letzten Jahren zeigen sich mehr und mehr hinreichende klinische Beweise, dass eine frühe Behandlungsstrategie und eine rechtzeitige Therapie zu einer besseren Kontrolle des Krankheitsausmaßes mit weniger Gelenkschädigung und besserer Langzeitprognose führen. Die aktuell publizierten Studien und Übersichtsarbeiten zeigen diesbezüglich ein reges Interesse an neuen validierten prognostischen und diagnostischen Seromarkern wie anti-MCV und anti-CCP Assays der zweiten und dritten Generation. Eine über zwei Jahre geführte prospektive Studie der Uniklinik Kairo beschreibt eine hohe Sensitivität (79,6%) und Spezifität (96,6%) der anti-MCV-Antikörper bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

Die untersuchten anti-MCV-Antikörper positiven Patienten zeigten höhere DAS28-Werte als anti-MCV-Antikörper negative Patienten. Dies gab den Autoren Hinweise auf progressivere Krankheitsverläufe bei anti-MCV-Antikörper positiven Patienten.



Die Autoren kommen in dieser Studie zu dem Ergebnis, dass die Bestimmung von anti-MCV-Antikörpern zusätzliche Sicherheit hinsichtlich der frühen Diagnosestellung bei RA gibt und auch Untergruppen von Patienten mit frühem und aggressiv-erosivem Verlauf besser detektiert werden können. [Mansour et al. 2010]

Egerer und Kollegen aus Berlin zeigen bestätigend, dass anti-MCV-Antikörper die gleiche Spezifität (90-98%) mit höherer Sensitivität (82%) als die in der deutlichen Mehrheit der Studien verwendeten anti-CCP2-Antikörper (65%) besitzen. [Egerer et al. 2010]

Selbst der CCP3.1 Drittgenerationsassay bleibt mit 70,3% Sensitivität hinter dem anti-MCV ELISA zurück. [nach Produktinformation: Quanta Lite (TM) CCP3.1 IgG/IgA ELISA directional Insert 2010].

Dies bestätigt die Relevanz der in der Uniklinik Regensburg standardisierten Bestimmung von anti-MCV-Antikörpern bei Patienten mit Verdacht auf RA. Weitere Studien müssen noch den Zusammenhang zwischen Aktivitätsindizes und hohen anti-MCV-Antikörper Titern belegen, nachdem die ersten Hinweise zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen anti-MCV-Antikörpern und einer hohen Krankheitsaktivität mit frühem Beginn besteht. [Mansour et al. 2010]

Die Meinung, dass sich anti-MCV-Antikörpertiter auch als Verlaufsparemeter für das Monitoring von Krankheitsaktivitäten eignen [Bang et al. 2007], teilen jedoch nicht alle Forschungsgruppen [Ursum et al. 2008]. Im Vergleich von anti-MCV-Antikörperspiegeln und dem DAS28 Aktivitätsindex fand sich in einer über zwei Jahre geführten Kohortenstudie keine relevante Korrelation. Die Autoren aus Amsterdam empfehlen anti-MCV-Antikörper als Index für Krankheitsaktivität im Verlauf nicht zu verwenden. Jedoch zeigt sich wiederholt, dass das Vorhandensein von anti-MCV-

Antikörpern im Serum mit höheren CRP-Spiegeln, DAS28-Werten und radiologisch nachgewiesenen Gelenkserosionen assoziiert ist. [Ursum et al. 2008]

Insgesamt gehen die Autoren übereinstimmend davon aus, dass Seropositivität mit früherem, erosivem Krankheitsverlauf einhergeht. [Ursum et al. 2008, Mansour et al. 2010, Luime et al. 2009]

Die unterschiedlichen Krankheitsbilder im rheumatologischen Formenkreis müssen eigenständig untersucht werden, und man kann auch bei prinzipiell ähnlichen Pathomechanismen nicht davon ausgehen, dass das, was für die Rheumatoide Arthritis gilt, auch für die anderen Krankheitsbilder zutrifft.

Für die juvenile idiopathische Arthritis zum Beispiel könne man die Bestimmung von Autoantikörpern nicht wie bei den erwachsenen Formen anwenden, da bei zwischen 7 und 15 Jahre alten Kindern und Jugendlichen mit Morbus Still nur in 5,4% der Fälle anti-MCV-Antikörper und 1,8% der Fälle anti-CCP-Antikörper gefunden wurden. Im Vergleich dazu fand man in der Kontrollgruppe aus dem rheumatischen Formenkreis in 23,5% der Fälle anti-MCV-Antikörper. Die Autoren aus Zagreb schlossen deshalb die Verwendbarkeit für Antikörper gegen citrullinierte Proteine für die Diagnostik der juvenilen rheumatoiden Arthritis aus, jedoch könnten sie einzelne schwere Verlaufsfälle identifizieren. Diesbezüglich sind ebenfalls weitere Untersuchungen vonnöten. [Kuna et al. 2009]

Dass ein Verzicht auf teure Transfers zu auswärtigen Laboratorien nicht auf Kosten der frühen klinischen Diagnosestellung gehen muss, analysierten Renger und Kollegen aus der Berliner Charité im Jahr 2010. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass ein einfach durchzuführender Point-of-Care Test zur Bestimmung von Rheumafaktoren und anti-MCV-Antikörpern hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität

ähnliche Ergebnisse liefern, als die oft teureren Untersuchungen mit Hilfe von ELISAs. Die Firma Orgentech Mainz bietet zum Beispiel mit rheumachec® dieses Schnelltestverfahren für Rheumafaktoren mit anti-MCV-Antikörpern an. Der Test kostet im Einzelverkauf 18€ beziehungsweise 15-17€ bei größeren Abnahmemengen. Im Vergleich hierzu kosten die Bestimmungen für Rheumafaktoren in immunologischen Labors im Schnitt ca. 12€, hierzu kommen die Kosten für die anti-MCV-Antikörper, die sich ungefähr bei 30€ bewegen.

Durch die Kombination der Testung von anti-MCV-Antikörpern und Rheumafaktoren erreichen die Schnelltests eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 95% für eine Rheumatoide Arthritis. Ferner sei für die Testdurchführung auch Pflegepersonal oder medizinisch technisches Fachpersonal adäquat ausgebildet und rechtlich befugt. Es wird nur ein Tropfen Kapillarblut des Patienten benötigt und das Ergebnis kann, ähnlich einem frei verkäuflichen Schwangerschaftstest, nach wenigen Minuten abgelesen werden. Dies ist insbesondere für Hausarzt- oder orthopädischen Praxen und solchen medizinischen Einrichtungen von großem Vorteil, die über kein eigenes adäquat ausgestattetes Labor verfügen und somit teure Transport und externe Analysekosten aufbringen müssen. [Renger et al. 2010]

Zur Differenzierung der Vorhersagequalität der aktuell gebräuchlichen Antikörpertests untersuchten van der Linden und Kollegen in Leiden/Niederlande bei Patienten mit Undifferenzierter Arthritis und früher Rheumatischer Arthritis, ob die einzelnen Antikörpertests alleine oder in Kombination zufriedenstellende Vorhersageparameter darstellen, was Krankheitsdifferenzierung und Verlauf betraf und setzten anschließend die Tests zueinander in Relation. Sie stellen fest, dass sich die positiv prädiktiven Werte bei den einzelnen Tests für anti-CCP(2.Generation) mit 67,1%, anti-CCP (3.Generation) mit 64%, anti-MCV mit 56,3% und Rheumafaktoren

61,7% kaum unterscheiden. Wenn man die Konfidenzintervalle bei 95%iger Wahrscheinlichkeit hinzunimmt, können die Autoren keine Aussage treffen, ob ein einzelnes Testverfahren, oder eine definierte Kombination aus zwei oder drei Antikörpertests überlegen ist. Jedoch gibt es wohl keine signifikanten Unterschiede was die Vorhersagequalität betrifft. Die holländische Arbeitsgruppe postuliert deshalb, dass unter Kosten- und Effizienzgesichtspunkten die Bestimmung eines Antikörpertests in Kombination mit der üblichen klinischen Routinediagnostik mit Anamnese, körperlicher Untersuchung, Entzündungslabor und bildgebenden Untersuchungen ausreichen würde. Sie empfehlen anhand ihrer Datenlage nicht eine Kombination von Antikörpertests durchzuführen. In Übereinstimmung mit den Regensburger Ergebnissen beschreiben die Autoren, dass nur 1% aller Patienten mit Rheumatoider Arthritis auf anti-CCP Antikörper alleine positiv getestet wurden. Die meisten Patienten mit nur einem positiven Antikörper im Serum zeigten entweder Rheumafaktoren oder auch anti-MCV-Antikörper. Durch die Kombination dieser zwei Seromarker könnte mit 99% der überwiegende Anteil der untersuchten Patienten mit Rheumatoider Arthritis erkannt werden, was in dem eigenen untersuchten Kollektiv sogar eine vollständige Erfassung (100%) ermöglichen würde [van der Linden et al. 2009]

Dass sich aber die Antikörper und ihr Bindungsspektrum nicht vollständig gleichen und sich im Laufe der Zeit auch durchaus ändern können, zeigte eine Studie aus Rostock 2009. Die untersuchten Antikörper wiesen dabei unterschiedliche Kreuzreaktivitäten auf. Anti-MCV-Antikörper transformierten in den aktiven Bereichen durch Mutation und konnten unter anderem Epitope binden, die ursprünglich von anti-CCP-Antikörpern gebunden wurden. Dadurch ergibt sich eine Variabilität von anti-MCV-Antikörpern mit engem Epitopspektrum und anti-MCV-Antikörpern mit breitem Spektrum. In bisherigen Studien gab es jedoch noch keine Hinweise auf

Unterschiede im prädiktiven Wert im Hinblick auf den Krankheitsverlauf, Ansprechen auf Therapie oder Prognose. [Engelmann et al. 2009]

Auch wird infrage gestellt, dass Blut als Trägermedium für die Seromarker das richtige Material ist. So findet doch der Entzündungsprozess bei der Rheumatoiden Arthritis primär und überwiegend in der Synovialis und Gelenkflüssigkeit der betroffenen Gelenke statt.

Die Forschungsgruppe um Omri Snir in Stockholm beklagt, dass das Vorhandensein von Antikörpern gegen citrullinierte Proteine in Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke nur spärlich erforscht sei, und Synovialflüssigkeit als Probenmaterial gegenüber Blutserum in klinischen Studien diesbezüglich zu wenig beachtet würde. Daten dieser Forschergruppe zeigen, dass die Konzentration von anti-CCP- und anti-MCV-Antikörpern in Synovialflüssigkeit bei den untersuchten Patienten signifikant höher ist, als im Blutserum. Im Studienvergleich mit dem krankheitsunspezifischen Tetanustoxin zeigte sich eine deutliche lokale Anreicherung von anti-MCV-Antikörpern in der Gelenksflüssigkeit als Ort des Entzündungsgeschehens. Somit kann man eine entscheidende Rolle dieser Autoantikörper in der Pathogenese der Autoinflammation vermuten, ohne diese Rolle im Detail gegenwärtig genau zu kennen. Die Analyse von Synovialflüssigkeit könnte sicherere und weitreichendere Erkenntnisse über den Pathomechanismus der Autoantikörper im Zusammenhang mit der Arthritis geben. Dies hätte sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie eine besondere Bedeutung und sollte deshalb weiter erforscht werden. [Snir et al. 2010]

Die Erforschung der Biomarker bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis ist im ständigen Transformationsprozess. Nicht nur die aktuellen Ergebnisse der unterschiedlichen Forschungsgruppen geben Anlass zu neuen Studien. Auch werden die Methodik und das Material hinterfragt und die Parameter verändert, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Auf der einen Seite gibt dies weitreichende und neue, teils bestätigende Erkenntnisse. Auf der anderen Seite bringt dies eine Unschärfe, welche zu mehr Heterogenität und schlechterer Vergleichbarkeit der Studien führt.

Vor diesem Hintergrund sind weitere Untersuchungen nötig, um zuverlässige Aussagen hinsichtlich Kreuzreaktivitäten und diagnostischer bzw. therapeutischer Prognose und Konsequenzen zu treffen. Dies verdeutlicht aber auch, dass bislang für als sinnvoll erachtete Standards in der Diagnostik und Therapie immer wieder überprüft und auf den aktuellen Forschungsstand gebracht werden müssen. Antikörperprofile sind keine statische Größe, sondern zeigen eine Varianz im zeitlichen Verlauf. Auch ist durch die rasche Entwicklung in Forschung und klinischer Erprobung die Gefahr gegeben, dass neue Erkenntnisse möglicherweise vorschnell in Leitlinien übernommen werden, ohne dass ausreichende Langzeitergebnisse vorliegen.

In der Zusammenschau der aktuellen Datenlage zeigt sich, dass die Bestimmung der Antikörper gegen citrullinierte Proteine deutlich an Stellenwert gewonnen hat, was sich in der Aufnahme in die neuen ACR/EULAR Kriterien der Rheumatoiden Arthritis widerspiegelt. [Aletaha et al. 2010]

Zu den bisher regelmäßig bestimmten Seromarkern Rheumafaktor und Anti-CCP-Antikörpern kommt mit dem Test auf anti-MCV-Antikörper ein vielversprechender neuer Biomarker hinzu.

Aufgrund der Heterogenität der vorliegenden Studien können gegenwärtig keine einheitlichen Empfehlungen für die standardisierte Bestimmung von anti-MCV-Antikörpern getroffen werden. Jedoch unterstützen die aktuell in der klinischen Routine erhobenen Daten sowie die publizierten Studienergebnisse folgende Einschätzung:

1. Die Bestimmung von anti-MCV-Antikörpern erhöht die diagnostische Sicherheit der frühen sowie manifesten rheumatoiden Arthritis.
2. Anti-MCV-Antikörper sind mit schwereren, erosiven Krankheitsverläufen assoziiert.
3. Als Verlaufsparemeter eignen sich anti-CCP-Antikörper eher nicht.
4. Anti-MCV-Antikörper können in Kombination mit Rheumafaktoren einen Großteil der Patienten mit früher sowie manifester Rheumatoider Arthritis identifizieren.
5. Eine einfache klinische diagnostische Anwendung ist für die Kombination aus Rheumafaktoren und anti-MCV-Antikörper möglich.

Im Gesundheitswesen spielen zunehmend ökonomische Aspekte eine besondere Rolle. Um die Kosten für die Diagnostik bei frühen Arthritiden zu minimieren könnte aufgrund der gewonnenen Ergebnisse folgende Stufendiagnostik empfohlen werden: Neben der Anamnese mithilfe standardisierter Fragebögen, klinischen Untersuchung mit DAS28-Score, CRP und BSG, ggf. HLA-Status, Sonographie und ggf. Röntgen der Hände und Füße sollten zuerst Rheumafaktoren und anti-MCV-Antikörper bestimmt werden. Bei unauffälligem Befund für diese Biomarker könnte in einem 2.

Schritt die Bestimmung der anti-CCP-Antikörper (2. oder 3. Generation) durchgeführt werden. In dem untersuchten Regensburger Patientenkollektiv wären durch diese Stufendiagnostik alle seropositiven Patienten bereits in der Stufe 1 identifiziert worden.

Die weitere Entwicklung des Stellenwerts von anti-MCV-Antikörpern insbesondere für das Monitoring der Krankheitsverläufe, und Therapieerfolg bleibt abzuwarten. An der neuen RA-Klassifikation der ACR/EULAR 2010 zeigt sich jedoch, dass mit der Aufnahme von ACPA - und nicht explizit anti-CCP-Antikörpern in die Klassifikationskriterien, potenziell neue Seromarker wie anti-MCV-Antikörper Berücksichtigung finden können.



## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die diagnostische Relevanz des Biomarkers anti-MCV-Antikörper mit den bereits etablierten und in die Leitlinien aufgenommenen Biomarkern anti-CCP-Antikörper und Rheumafaktoren verglichen. Diskutiert wird die Aufnahme von anti-MCV-Antikörpern in die rheumatologische Routinediagnostik. Grundlage der retrospektiv analytischen Arbeit waren die Patientenakten sowie die Laborbefunde von 2641 Patienten, die sich mit Gelenkbeschwerden in der rheumatologischen Klinik Bad Abbach im Zeitraum vom 02. Januar 2005 bis zum 20. Dezember 2008 vorstellten. Die Patientenseren wurden auf das Vorliegen von anti-CCP-Antikörper, anti-MCV-Antikörpern und Rheumafaktoren untersucht, und in Zusammenschau mit dem klinischen Beschwerdebild gebracht. Bei 1143 (43,3%) Patienten, also fast der Hälfte des Kollektivs, zeigte sich mindestens einer dieser Autoantikörper signifikant erhöht. Bei 130 (4,9%) Patienten fanden sich als alleinige Seromarker anti-MCV-Antikörper. Unter allen 2641 analysierten Patientenseren gab es keine Probe, die sich ausschließlich auf anti-CCP-Antikörper positiv zeigte. Somit zeigte sich bei den seropositiven Arthritiden anti-MCV-Antikörper als wichtiger diagnostischer Marker. Im analysierten Patientenkollektiv war die Bestimmung von anti-MCV-Antikörpern in Kombination mit Rheumafaktoren völlig ausreichend, um alle seropositiven Patienten mit Arthritiden aus dem rheumatologischen Formenkreis zu diagnostizieren. Der Verzicht auf die Bestimmungen von Anti-CCP-Antikörpern ergab im analysierten Kollektiv keine diagnostische Lücke. Als stufendiagnostisches Modell zeigt sich die Bestimmung von Rheumafaktoren und Anti-MCV-Antikörpern, möglicherweise auch als Bedside-Test, sowohl effizient als auch als kostengünstige Alternative zur bisherigen Bestimmung von Anti-CCP-Antikörpern im rheumatologischen Speziallabor.

## 6. Literaturverzeichnis

**Aho K**, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. (1986) **Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins.** J Rheumatol. 1986 Oct; 13(5):899-902.

**Aletaha D**, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. (2010) **2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** Arthritis Rheum. 2010 Sep; 62(9):2569-81.

**Arnett FC**, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. (1988) **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum. 1988 Mar; 31(3):315-24

**Bombardieri M**, Alessandri C, Labbadia G, Iannuccelli C, Carlucci F, Riccieri V, Paoletti V, Valesini G. (2004) **Role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in discriminating patients with rheumatoid arthritis from patients with chronic hepatitis C infection-associated polyarticular involvement.** Arthritis Res Ther. 2004 6(2):137-41.

**Bang H**, Egerer K, Gaudiard A, Lütke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, Berg W, Feist E, Burmester GR. (2007) **Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum.** 2007 Aug; 56(8):2503-11.

**Dubucquoi S**, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerie L, Sibilia J, Goetz J, Dutoit V, Fauchais AL, Hachulla E, Flipo RM, Prin L. (2004) **Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. Ann Rheum Dis.** 2004 Apr; 63(4):415-9

**Egerer K**, Feist E, Burmester GR. (2009). **The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. Dtsch Arztebl Int.** 2009 Mar; 106(10):159-63.

**Engelmann R**, Brandt J, Eggert M, Karberg K, Krause A, Neeck G, Mueller-Hilke B. (2009) **The anti-mutated citrullinated vimentin response classifies patients with rheumatoid arthritis into broad and narrow responders. J Rheumatol.** 2009 Dec; 36(12):2670-4.

**Feist E**, Egerer K, Burmester GR. (2007) **Autoantibody profile in rheumatoid arthritis. Z Rheumatol.** 2007 May; 66(3):212-4, 216-8.

**Hayashi N**, Kumagai S, Nishimura K. **Topics on immunological tests for rheumatoid arthritis. Rinsho Byori.** 2004 Oct; 52(10):836-43.

**Innala L**, Kokkonen H, Eriksson C, Jidell E, Berglin E, Dahlqvist SR. (2008) **Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides.** J Rheumatol. 2008 Jun; 35(6):1002-8.

**Jefferies WM.** (1998) **The etiology of rheumatoid arthritis.** Med Hypotheses. 1998 Aug; 51(2):111-4

**Kastbom A**, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. (2004) **Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project).** Ann Rheum Dis. 2004 Sep; 63(9):1085-9

**Kuna AT**, Lamot L, Miler M, Harjacek M, Simundic AM, Vrkic N. (2009). **Antibodies to mutated citrullinated vimentin and antibodies to cyclic citrullinated peptides in juvenile idiopathic arthritis.** Clin Chem Lab Med. 2009; 47(12):1525-30.

**Lawrence JS** (1976) **Radiological cervical arthritis in populations.** Ann Rheum Dis. 1976 Aug; 35(4): 365-71.

**Lee DM**, Schur PH. (2003) **Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases.** Ann Rheum Dis. 2003 Sep;62(9):870-4.

**Luime JJ**, Colin EM, Hazes JM, Lubberts E. (2010). **Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of Patients with rheumatoid arthritis? A systematic review.** Ann Rheum Dis. 2010 Feb; 69(2):337-44.

**Mansour HE**, Metwaly KM, Hassan IA, Elshamy HA, Elbeblawy MM. (2010) **Antibodies to mutated citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: diagnostic value, association with radiological damage and axial skeleton affection.** Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord. 2010 May; 24(3):33-42.

**Mathsson L**, Mullazehi M, Wick MC, Sjöberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, Rönnelid J. (2008) **Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides.** Arthritis Rheum. 2008 Jan; 58(1):36-45.

**Möttönen TT.** (1988) **Prediction of erosiveness and rate of development of new erosions in early rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis. 1988 Aug; 47(8):648-53.

**Nell VP**, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, Smolen JS, Steiner G. (2005) **Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis. 2005 Dec; 64(12):1731-6.

**Newkirk MM.** (2002) **Rheumatoid factors: what do they tell us?** J Rheumatol. 2002 Oct; 29(10):2034-40.

**Qin X**, Deng Y, Xu J, Li TJ, Li S, Zhao JM. (2010) **Meta-analysis: diagnostic value of serum anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in patients with rheumatoid arthritis.** Rheumatol Int. Mar 2010. (im Druck)

**Rantapää-Dahlqvist S**, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. (2003) **Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum. 2003 Oct; 48(10):2741-9.

**Renger F**, Bang H, Feist E, Fredenhagen G, Natusch A, Backhaus M, Burmester GR, Egerer K. (2010) **Immediate determination of ACPA and rheumatoid factor – A novel point of care test for detection of Anti-MCV Antibodies and rheumatoid factor using a lateral-flow immuno assay.** Arthritis Res Ther. 2010; 12(3):R 120

**Schellekens GA**, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. (2000) **The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide.** Arthritis Rheum. 2000 Jan;43(1):155-63.

**Smolen JS**, Tohidast-Akrad M, Gal A, Kunaver M, Eberl G, Zenz P, Falus A, Steiner G. (1996) **The role of T-lymphocytes and cytokines in rheumatoid arthritis.** Scand J Rheumatol. 1996;25(1):1-4.

**Snir O**, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Hensen S, Lundberg K, Engstöm A, Venables PJ, Toes RE, Holmadahl R, Klareskog L, Malmström V. (2010) **Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients.** Arthritis Rheum. 2010 Jan;62(1):44-52.

**Suzuki K**, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. (2003) **High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis.** Scand J Rheumatol. 2003; 32(4):197-204.

**Tak PP**, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meijers KA, Brand R, Meinders AE, Breedveld FC. (1997) **Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity.** Arthritis Rheum. 1997 Feb;10(1):87-97

**Ursum J**, Nielen MM, van Schaardenburg D, van der Horst AR, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, Hamann D. (2008) **Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study.** Arthritis Res Ther. 2008; 10(1):R12.

**Vallbracht I**, Rieber J, Oppermann M, Förger F, Siebert U, Helmke K. (2004) **Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis. 2004 Sep; 63(9):1079-84

**Van der Linden MP**, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TW, Toes RE, van der Helm-van Mil AH. (2009) **Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum. 2009 Aug; 60(8):2232-41.

**Van Venrooij WJ**, Vossenaar ER, Zendman AJ. **Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis.** Autoimmun Rev. 2004 Jun; 3 Suppl 1:S17-9.

**Vasishta A.** (2002) **Diagnosing early-onset rheumatoid arthritis: the role of anti-CCP antibodies.** Am Clin Lab. 2002 Aug-Sep;21(7):34-6

**Vossenaar ER**, Despres N, Lapointe E. **Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin.** Arthritis Res Ther. 2004 Jun; 6:142-50

**Westwood O. M. R, Nelson P. N, Hay F.C.** (2006) **Rheumatoid factors: what's new?** Rheumatology(Oxford). 2006 Apr;45(4):379-85

**Youinou P**, Le Goff P. (1994) **Current data on rheumatoid factors.** Rev Rhum Ed Fr. 1994 Dec 15;61(10 Pt 2):185-93.