

Il laboratorio nella diagnosi e nel monitoraggio dell'Artrite Reumatoide

Marilina Tampona

Laboratorio di Patologia Clinica I Azienda Policlinico di Bari

I pazienti affetti da Artrite Reumatoide (AR) presentano un decorso clinico variabile in riferimento allo stato funzionale o all'assetto radiologico del danno articolare. L'identificazione precoce dei pazienti affetti da AR e, in particolare, di quelli che verosimilmente presenteranno una forma più rapidamente progressiva di malattia, è importante per il possibile beneficio indotto dall'intervento terapeutico precoce con agenti che possano modificare il decorso clinico della malattia. Questo obiettivo ha stimolato la ricerca ed il dosaggio di numerosi "markers" biologici nel sangue e nel liquido articolare, che possano servire come indicatori di prognosi e di risposta alla terapia. Sebbene alcuni dei markers considerati sono eseguibili nella pratica routinaria, altri sono tuttora ad uno stato di valutazione sperimentale e richiedono il ricorso di tecnologie specialistiche.

I potenziali markers biologici possono essere suddivisi in quattro categorie

- Autoanticorpi
- Markers genetici
- Proteine della fase acuta
- Marcatori tissutali specifici

AUTOANTICORPI

Molti autoanticorpi sono associati alla presenza di AR.

Fattori Reumatoidi

I Fattori Reumatoidi (FR) sono autoanticorpi diretti contro la porzione FC delle immunoglobuline IgG. Essi si riscontrano dal 75% all'80% dei pazienti affetti da AR ad un certo punto del decorso della malattia. Alti titoli di IgM RF sono relativamente specifici per la diagnosi di AR nel contesto di una poliartrite cronica, e rimangono il criterio sierologico più utilizzato, tuttavia hanno un basso valore predittivo nella popolazione generale in cui la prevalenza generale della malattia è relativamente bassa (1%).

FR sono, inoltre, presenti in altre patologie. Ad esempio, alcune malattie del connettivo, come il LES e la sindrome di Sjögren primaria, possono essere associate alla presenza di RF. In aggiunta, RF possono essere misurati in pazienti con alcune infezioni, come la malaria e la rosolia, ed possono comparire in seguito a pratiche vaccinali.

FR possono avere un valore prognostico in relazione a manifestazioni cliniche ed attività di malattia, come la severità delle erosioni articolari. L'AR sieropositiva, cioè AR associata alla positività del test per FR, è spesso associata ad una malattia articolare più aggressiva, e complicata più frequentemente da manifestazioni extrarticolari piuttosto che l'AR sieronegativa [1-6]. Ad esempio:

- i noduli reumatoidi e la vasculite insorgono quasi esclusivamente nei pazienti sieropositivi [3-7] e questo riscontro è associato ad un incremento della mortalità [8].

- la progressione del danno articolare documentata con la radiologia può essere molto più rapida nei pazienti con FR positivo [9,10].

- analisi retrospettive in pazienti con "early" AR hanno dimostrato che pazienti con FR persistentemente positivo presentano erosioni, più gravi noduli, manifestazioni extrarticolari, disabilità funzionale ed elevata attività di malattia rispetto ai pazienti sieronegativi, o con sieronegatività intermittente, seguiti per un periodo di follow-up di 6 anni [11] e che l'insorgenza di nuove erosioni tra i pazienti sieropositivi correla con i titoli di FR [12].

Questi dati, tuttavia, non sono stati confermati [13] e gli studi sul valore prognostico del FR risultano contrastanti.

La positività del FR può anche precedere lo stesso sviluppo clinico dell'AR. Uno studio finlandese, condotto su soggetti sani ha dimostrato che 9 dei 129 soggetti risultati positivi al test di agglutinazione con emazie di pecora hanno sviluppato, dopo un periodo di osservazione di 10 anni, AR sieropositiva, contro solo 12 dei 7000 soggetti negativi al test [14]; pertanto la presenza di un test di agglutinazione positivo in un soggetto sano è associato ad un rischio relativo di sviluppare AR approssimativo di 40 volte.

Anticorpi anti-fattore perinucleare e anticheratina

Altri marcatori di AR studiati da più di 20 anni sono gli anticorpi anti-fattore perinucleare (APF) e gli anticorpi anti-cheratina (AKA). Entrambi questi auto anticorpi riconoscono come antigene, la filaggrina dell'epidermide, proteina associata al filamento intermedio che interviene nel processo di cornificazione dell'epidermide stessa [15].

Anti-APF e anti-AKA - La sensibilità e la specificità di APF e AKA varia in relazione al metodo di laboratorio utilizzato per la loro determinazione.

- metodo di immunofluorescenza indiretta:

APF detectati su epitelio buccale (Fig. 1), hanno riportato una specificità per AR dal 73 al 99% [16-18], e una sensibilità dal 49 al 87% [16,17,19].

AKA, detectati usando esofago di ratto come substrato [20] presentano una specificità che eccede il 90% e una sensibilità tra 40 e 60% [17,21].

- metodo di immunoblotting:

la determinazione degli AKA, utilizzando tre proteine antigeniche estratte dall'epitelio dell'esofago di ratto, e separate mediante elettroforesi su gel di poliaccrilamide, ha dimostrato che gli AKA hanno una sensibilità dal 43 al 50% e una specificità del 99% per l'AR. [22]. L'intensità

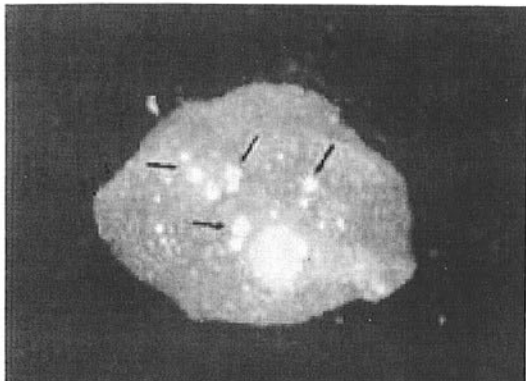


Figura 1

Anticorpi anti-fattore perinucleare (freccia) detectati mediante metodica di immunofluorescenza indiretta su cellule di epitelio buccale. Per cortesia del dott. Nicola Bizzarro, laboratorio di Patologia Clinica di San Donà del Piave (VE).

del segnale delle tre proteine antigeniche dell'epitelio di esofago di ratto, e così la filaggrina dell'epidermide umana quando viene testata mediante immunoblotting, sembra correlare con i titoli di APF dei sieri [15].

Nonostante la scarsa diffusione dei tests per la determinazione di AKA e APF (e anticorpi anti-filaggrina), l'identificazione della loro presenza in un dato paziente può avere importanti implicazioni in quanto AKA ed APF sono stati dimostrati in pazienti con AR negativi al FR [17,20].

-Il significato prognostico degli AKA e APF è stato ampiamente studiato in pazienti affetti da "early" AR durante follow-ups di tre e otto anni [10,23,24]. Tutti i pazienti con AKA positivi hanno erosioni articolari entro la fine degli otto anni di follow-up [24]. La presenza iniziale degli AKA è stata associata ad una forma attiva e resistente al trattamento oltre tre anni di osservazione ma non è stata predittiva di progressione radiologica [25].

Allo stesso modo del RF, la presenza di AKA, APF, o anticorpi anti-filaggrina può precedere le manifestazioni cliniche dell'AR [26-28]. In aggiunta, la positività degli AKA o degli APF in un soggetto normale con un test di emoaagglutinazione positivo aumenta ulteriormente il rischio relativo di sviluppare AR con FR positivo di cinque volte.[27], anche se un numero significativo di pazienti con anticorpi positivi non sviluppa la malattia.

Una negatività per AKA potrebbe aiutare ad escludere una diagnosi di AR in pazienti che sono FR positivi e presentano sintomi suggestivi di AR, ma sono affetti da altre patologie. Per esempio, la prevalenza di AKA in pazienti affetti da epatite da virus C (HCV), FR positivi, con artralgia o artriti, è stata del 8% comparata al 61% in pazienti con diagnosi di AR che erano RF positivi e non infettati dal virus C [29].

Le positività dei tests per RF, AKA o APF prima delle manifestazioni cliniche della malattia possono precedere i sintomi clinici di alcuni anni. Questa possibilità ha profonde implicazioni per gli studi epidemiologici nel tentativo di ricercare una causa iniziale di AR.

La combinazione di test AKA e RF (IgM ELISA e metodo

al lattice) potrebbe avere un valore nei pazienti con poliartrite non diagnosticata. Sono stati testati e seguiti in follow-up per due anni 270 pazienti con "early" artrite. Le diagnosi finali più comuni sono state di AR, spondiloartropatia, e artriti indifferenziate (94, 56 e 61 rispettivamente) [30]. La sensibilità e la specificità dei tre tests in combinazione per un eventuale diagnosi di RA sono state 75% e 82%, rispettivamente se almeno uno dei tests risultava positivo. Se tutti e tre i tests erano positivi la sensibilità era del 33%, specificità del 99%, e il valore predittivo positivo del 97%.

Anti-CCP

I tests ELISA, basati sull'utilizzo di alcuni peptidi della filaggrina derivati da cute umana o peptidi sintetici, hanno dimostrato una elevata specificità e sensibilità per AR [31,32]. L'aminoacido target nella filaggrina è la citrullina, residuo di arginina modificato post-traslazione [32]. I tests ELISA utilizzando una combinazione di varianti di peptidi citrullinati hanno una sensibilità e una specificità variabile dal 56 al 76 e dal 90 al 96% per AR, rispettivamente [32,33].

La combinazione dei tests autoanticorpali anti-CCP e IgM RF risulta essere la migliore per confermare o escludere la diagnosi di AR rispetto a quella conseguibile con la ricerca di un solo autoanticorpo. Questo è stato dimostrato comparando i risultati dei tests sierologici in pazienti con diagnosi clinica di AR e in soggetti controllo; i principali risultati in riferimento alle performances dei tests sono stati i seguenti:[33]:

Anti-CCP: sensibilità 56%, specificità 90%

IgM RF: sensibilità 73% e specificità 82%

RfIgM and anti-CCP: sensibilità 48% e specificità 96%

Il test ELISA per la determinazione degli anti-CCP può dimostrarsi utile nella diagnosi differenziale degli stadi precoci AR, particolarmente abile nel distinguere l'AR dalla Sjogren Primaria o dal LES. Esso inoltre potrebbe essere prezioso nell'identificare quei pazienti che sono ad elevato rischio di danno articolare progressivo[34]. Il test è stato approvato dal United States FDA per l'utilizzo nella diagnosi di AR e la sua diffusione è in incremento.

Tra i pazienti con oligo o poliartrite precoce, il test anti-CCP appare avere un valore predittivo positivo nel sottogruppo di pazienti con IgM-RF negativo [35]. La progressione radiologica (più di 5 unità dello Sharp score) è stata più frequente nei pazienti con anti-CCP positivi piuttosto che nei pazienti con il test negativo (40 versus 5%, valore predittivo negativo 95%). Gli anti-CCP test hanno predetto correttamente se ci sarebbe stata o no una progressione del danno radiologico nell' 83 dei pazienti con IgM-RF negativo.

Anticorpi anti-p68 (BiP)

L'autoantigene p68, chiamato BiP (heavy chain binding protein) è una proteina che serve come matrice nel reticolo endoplasmatico e lega le catene leggere delle immunoglobuline. Un' aumentata risposta delle T-cell proliferative contro BiP è stata notata nei pazienti con AR e gli autoanticorpi diretti contro la proteina possono essere un marcatore di ma-

lattia. Autoanticorpi anti-BiP hanno presentato una sensibilità del 68% e una specificità del 96% per AR [36], valori comparabili con quelli degli anticorpi anti-filaggrina (Fig. 2)

Anticorpi anti-RA33

Metodi di Immunoblot che utilizzavano estratti nucleari solubili provenienti da cellule HeLa hanno dimostrato la possibilità di riconoscere un autoanticorpo diretto verso un antigene di 33 kD (anti RA33) in pazienti con AR rispetto a pazienti affetti da spondilite anchilopoietica o psoriasi artropatica [37].

L'anticorpo anti-RA33 è diretto contro una componente funzionale dello spliceosome ed è stato riscontrato anche in pazienti affetti da lupus erythematosus sistemico (LES) e da malattia mista del connettivo (MCTD); dove il pattern su immunoblot è però distinguibile da quello di AR per la simultanea presenza di bande Sm (BB', D) e U1 RNP (A, C), rispettivamente [38] (Fig. 3).

Anticorpi anti-RA33 sono presenti in pazienti con artrite importante ma affetti da MCTD e LES [39], suggerendo una relazione tra questo autoanticorpo e la patologia articolare infiammatoria autoimmune in genere. E' stato anche ipotizzato che anticorpi anti-RA33 sono un marcatore precoce e stabile di AR, in quanto pazienti inizialmente affetti da un artrite non classificata con anti-RA33 positivi hanno sviluppato AR entro tre anni [37]. La loro presenza, tuttavia, non è associata ad un aumentato rischio di progressione del danno articolare [10].

Anticorpi anti-Sa

La presenza di anticorpi anti-Sa (dal nome del pazien-

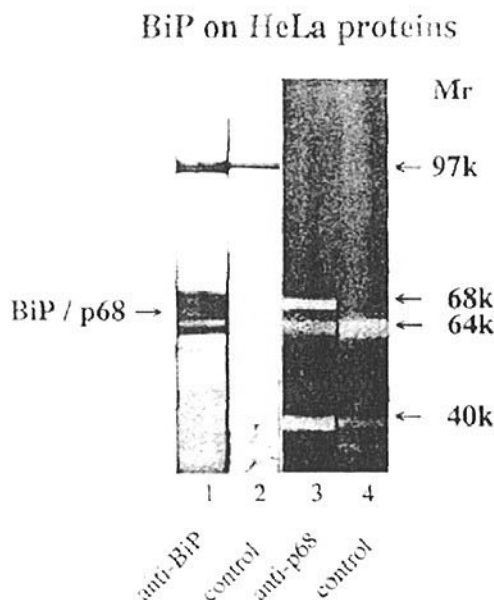


Figura 2
 Immunoblot di proteine di cellule HeLa reagenti con controllo positivo anti-p68 (linea 1) e controllo negativo (linea 2), con siero di paziente affetto da AR (linea 3) e con siero negativo (linea 4)

te Savioie in cui furono riscontrati per la prima volta) può rappresentare un test diagnostico accurato e predittivo per AR con valori di sensibilità del 68% e specificità del 79% [40] e valore predittivo positivo e negativo del 75 e del 71%, rispettivamente.

Nei pazienti affetti da "early" AR, la positività a questi anticorpi riveste un valore prognostico per lo sviluppo di erosioni articolari entro un anno dalla comparsa.[41].

Anticorpi anti-citoplasma dei granulociti neutrofili

Pazienti affetti da AR possono avere anticorpi anti-citoplasma dei granulociti neutrofili, usualmente con pattern atipico p-ANCA. Tuttavia gli aspetti vasculitici dell'attività dell'AR, la severità, e la cronicità non sono correlati allo stato degli ANCA. Alcuni autori riportano che pazienti con AR e positività p-ANCA abbiano una maggiore progressione radiologica del danno articolare [42]. Tuttavia, finché questi dati non vengono confermati su ampie casistiche, l'utilità clinica della ricerca degli ANCA in pazienti con RA è scarsa.

Anticorpi anti α -enolasi - Elevati livelli sierici di autoanticorpi anti enzima della via glicolitica; α -enolasi, sono stati riscontrati nel 25% di pazienti con early artrite successivamente risultati affetti da AR [43]. Metà dei pazienti con AR e anticorpi anti-enolasi non presentava il fattore reumatoide o anticorpi anti-antifilaggrina.

FATTORI GENETICI

Il rischio di sviluppare AR è associato con il comportamento di determinati alleli HLA. Un tipo di HLA-DR del paziente e altri fattori genetici possono giocare un ruolo anche nel determinare la severità del malattia.

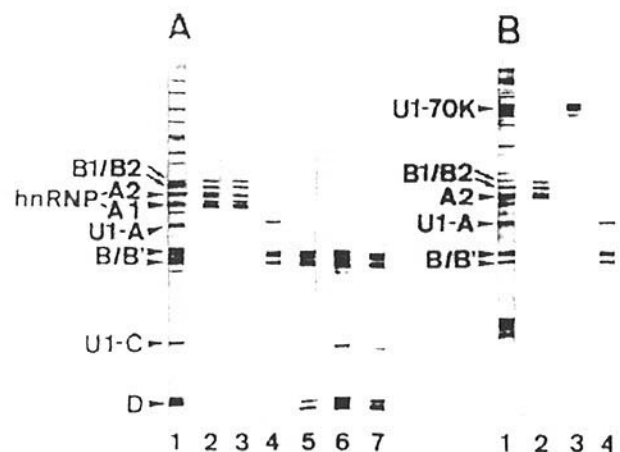


Figura 3
 Immunoblot di due sieri positivi per anti RA33 (A2 e A1) di pazienti affetti da LES, siero A e da MCTD, siero B

Epitopo reumatoide o epitopo condiviso

L'AR è positivamente associata con alcuni alleli HLA-DR (in particolare HLA DR4) che codificano per una sequenza aminoacidica conservata nella terza regione ipervariabile della catena DRB1. Questo epitopo è presente nell'80 - 90% di pazienti con malattia [44,45].

Diverse forme severe di RA sono associate in modo significativo con genotipi che contengono gli alleli Dw4/Dw14 e Dw4/DR1 [46,47].

Studi hanno suggerito il potenziale vantaggio della tipizzazione HLA nel predire la severità della malattia e nel guidare nella terapia delle forme precoci aggressive [8,10,47,49-53].

Genotipo delle matrix metalloproteinasi -Le matrix metalloproteinasi possono degradare il collagene e contribuire alla distruzione della cartilagine e dell'osso nell'AR. Il comportamento di un polimorfismo nella regione promoter del gene delle matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) potrebbe essere associata ad una forma più severa di AR [54]. Questo comportamento omozigote di un particolare polimorfismo nella regione promoter del gene MMP-3 (6A/6A) è stato associato alla presenza di danno articolare più severo all'esordio e dopo 4 anni di follow up ad una maggiore progressione dell'erosione articolare e ad un restringimento dello spazio articolare.

Genotipo promoter dell'Interleukina-10

Una associazione è stata dimostrata tra polimorfismo del gene promoter dell'interleukina-10 (IL-10) e la severità, clinica dell'AR [55]. Non vi era differenza tra i pazienti e i controlli sani nella prevalenza dei due polimorfismi del gene promoter dell'IL-10 (-2849 G and A), né una differenza significativa all'esordio sulla severità radiografica del loro danno articolare. Comunque, tra i pazienti con almeno un allele associato ad un'aumentata produzione di IL-10 vi è uno score di danno articolare medio significativamente più alto rispetto ai pazienti privi di un allele [55].

PROTEINE DELLA RISPOSTA DELLA FASE ACUTA

I marcatori della risposta della fase acuta, come la proteina C reattiva (PCR), la velocità di eritrosedimentazione (VES), e interleukin-6, sono stati valutati come potenziali marcatori di attività di malattia in AR.

Proteina C reattiva

Per più di 20 anni, la proteina C reattiva (PCR) è stata invocata come misuratore obiettivo dell'attività di malattia in AR. Al contrario della VES, la PCR può essere misurata in campioni di siero stoccati ed è indipendente dalla concentrazione di emoglobina. Il danno radiologico, così come dimostrato dalla conta delle erosioni nell'AR, è significativamente più vicino a progredire quando PCR e VES sono elevati, al contrario della presenza o assenza del FR, e dell'intervento terapeutico [10,56].

L'aumento di entrambe associate VES e PCR è indicazione più forte della progressione radiologica della PCR da sola [57]. L'assenza o la progressione di danni articolari dopo due anni sono correttamente predetti in 83% di pazienti utilizzando l'associazione attività di malattia all'esordio (documentato da VES, PCR or disease activity score), DR4 e positività RF [49].

Una correlazione altamente significativa è stata documentata tra progressione radiologica e l'aumento totale dell'PCR [58]. Tuttavia, anche una grande variabilità è stata documentata nella relazione tra il grado di modificazioni radiografiche e i livelli di PCR in particolare tra i pazienti con bassi livelli di PCR. Questa variabilità interindividuale potrebbe non essere dovuta al HLA DR4, alla positività RF, al sesso, o età, e limita il valore delle valutazioni seriali delle proteine di fase acuta nel predire la progressione radiologica.

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ha un grande effetto stimolatorio sulla sintesi epatica delle proteine di fase acuta svolge un ruolo regolatorio nella produzione di piastrine [59,60]. Quindi, vi sono evidenze che suggeriscono, che IL-6 abbia un ruolo patogenetico nella anemia delle malattie infiammatorie croniche [61].

La sinovia infiammata è ritenuta essere la sorgente principale di IL-6 plasmatica in RA, poiché IL-6 è spesso ritrovata in alte concentrazioni nel liquido sinoviale. Quindi, si ritiene che le concentrazioni plasmatiche di IL-6 possano riflettere l'infiammazione articolare meglio che i livelli delle proteine della fase acuta. Comunque, in pazienti con early AR, non vi è una relazione tra progressione radiologica e livelli plasmatici di IL-6 nonostante ci sia una significativa correlazione tra IL-6 e risposta della fase acuta. [62]. Questi dati contrastano con la relazione tra reperti radiologici e valori circolanti di PCR e VES precedentemente presentati.

MARCATORI TESSUTALI SPECIFICI

Molti markers biochimici di danno articolare sono stati descritti nell'AR. Queste molecole possono essere di sintesi o di degradazione e la loro presenza nei fluidi biologici è conseguente al metabolismo dei tessuti di origine. Essi derivano prevalentemente da singoli tessuti come la cartilagine, l'osso, o la sinovia, e possono essere rilevati principalmente con indagini immunoenzimatiche nel liquido sinoviale, nel siero o nelle urine. Metodi appropriati non sono ruttinariamente disponibili, e il liquido sinoviale non è prontamente disponibile (a parte quello del ginocchio), rispetto al siero e alle urine. Nonostante limiti conoscitivi circa l'utilizzo dei marcatori tessuto specifico quali parametri dell'attività di malattia o della risposta alla terapia in AR. Alcuni marcatori possono essere utili a scopi prognostici.

Markers specifici della sinovia

La sinovia è ritenuta essere la sorgente principale

dell'acido ialuronico sierico, un marcatore che è fortemente elevato nel siero dei pazienti con AR [63,64]. Studi in vitro hanno dimostrato che linee cellulari di sinovia da articolazioni reumatoidi producono quantità rilevabili di acido ialuronico, mentre ciò non si verifica nei controlli [65]. Malgrado un tempo di dimezzamento di 15 minuti o meno, le concentrazioni sieriche di acido ialuronico correlano con l'attività di malattia [64], e almeno uno studio prospettico ha suggerito che, in early RA, l'acido ialuronico sierico può riflettere l'insorgenza del danno articolare, e può quindi predire i successivi danni articolari [66]. Tuttavia, livelli sierici elevati di acido ialuronico potrebbero essere non specifici poichè variano con l'attività fisica indipendentemente dal grado di sinovite [67].

Altri marcatori che possono essere prevalentemente rilasciati dalla sinovia sono le matrix metalloproteinasi 1 e 3 (MMP-1 and MMP-3), enzimi che degradano la matrice del collagene. Elevati livelli di MMP-3 [68] e/o MMP-1 [69] possono correlare con l'incremento del danno articolare radiologico.

Markers specifici della cartilagine

Marcatori del metabolismo cartilagineo possono avere un valore prognostico in pazienti con AR. In early RA, ad esempio, livelli sierici di proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP), un membro della famiglia delle proteine delle trombospondine, predicono la gravità della malattia caratterizzata dalla progressiva distruzione delle grandi e piccole articolazioni [70,71] e concentrazioni sieriche aumentate di COMP sono state ritrovate in tutti i pazienti che avevano sviluppato rapidamente distruzione della giuntura femorale [71].

Il contenuto di aggregano del liquido sinoviale dell'articolazione del ginocchio è anche ritenuto essere predittivo della distruzione della giuntura del ginocchio e del femore [72]. La regione ricca di condroitin solfato di aggregano è detectabile più abbondantemente nei liquidi sinoviali provenienti da articolazioni con poca evidenza radiologica di danno articolare, mentre la regione che lega l'acido ialuronico della proteina del core è rilevabile in articolazioni danneggiate più severamente [73].

Lo stesso studio che ha valutato i livelli sierici di COMP in pazienti con RA, ha anche valutato i livelli sierici di un putativo marcatore di sintesi di aggregano cartilagineo, epitopo 846, localizzato nell'area ricca di condroitin solfato della molecola di aggregano. I livelli di epitopo 846 sono stati ritrovati elevati solo in un gruppo di pazienti con un basso danno articolare, in confronto ad un gruppo di pazienti, matched per età, sesso e durata di malattia ma con un danno articolare più elevato [71]. Questi dati suggeriscono la presenza di processi di riparazione cartilaginea nel gruppo di pazienti a decorso più benigno, e suggeriscono che elevati livelli di 846 epitope sono indicatori di una prognosi più favorevole.

I livelli del peptide c-terminale del collagene tipo II urinari possono produrre alcune informazioni prognostiche. Una correlazione tra l'escrezione di questi peptici e

la progressione radiografica dopo quattro anni è stata notata pazienti con early RA [74].

Markers specifici dell'osso

Come con la cartilagine, molti marcatori specifici dell'osso sono disponibili e possono avere un utilizzo nei pazienti con AR.

La sialoproteina ossea è una proteina derivata dagli osteoblasti preferenzialmente espressa nell'osso iuxtaarticolare. I livelli di sialoproteina ossea nel liquido sinoviale correlano con la distruzione articolare del ginocchio in entrambe le patologie RA e osteoarthritis [75]. Al contrario, i livelli di sialoproteina ossea sono elevati nel siero di pazienti con AR senza una correlazione tra concentrazione e distruzione articolare.

La degradazione ossea, dimostrata dal dosaggio di cross-links delle piridinoline in urine, correla con l'attività di malattia RA e diminuisce dopo trattamento con glucocorticoidi pulsati e DMARDs [76].

Metodi di immunoenzimatica sono ora disponibili per il dosaggio del telopeptide carbossiterminale del collagene di tipo I (ICTP), importante marcatore sierico di degradazione del collagene osseo. In pazienti con early RA sono stati riscontrati livelli elevati di ICTP comparati con i controlli sani. Durante il follow-up i livelli sierici di ICTP correlavano con i parametri infiammatori e dopo il primo anno, con le variazioni radiologiche annualmente rilevate. I livelli iniziali di ICTP correlavano meglio con altre variabili di attività di malattia come la successiva progressione erosiva articolare, suggerendo che il loro dosaggio possa servire come marcatore prognostico del danno articolare in early RA [77]; questo risultato è stato poi confermato in pazienti con early RA [74]. Uno studio successivo ha trovato che i livelli di ICTP nel liquido sinoviale correlavano meglio con la prognosi rispetto ai livelli sierici [78].

BIBLIOGRAFIA

1. Egeland, T, Munthe, E. The role of the laboratory in rheumatology. Rheumatoid factors. Clin Rheum Dis 1983; 9:135.
2. Jacoby, RK, Jayson, MI, Cosh, JA. Onset, early stages, and prognosis of rheumatoid arthritis: a clinical study of 100 patients with 11-year follow-up. Br Med J 1973; 2:96.
3. Masi, AT, Maldonado-Cocco, JA, Kaplan, SB, et al. Prospective study of the early course of rheumatoid arthritis in young adults: comparison of patients with and without rheumatoid factor positivity at entry and identification of variables correlating with outcome. Semin Arthritis Rheum 1976; 4:299.
4. Aho, K, Steiner, G, Kurki, P, et al. Anti-RA 33 as a marker of rheumatoid arthritis in a Finnish population. Clin Exp Rheumatol 1993; 11:645
5. Alarcon, GS, Koopman, WJ, Acton, RT, et al. Seronegative rheumatoid arthritis. A distinct immunogenetic disease? Arthritis Rheum 1982; 25:502.
6. Westedt, ML, Herbrink, P, Molenaar, JL, et al. Rheumatoid factors in rheumatoid arthritis and vasculitis. Rheumatol Int 1985; 5:209.
7. Sharp, JT, Calkins, E, Cohen A, et al. Observations on the clinical, chemical and serological manifestations of rheuma-

- toid arthritis based on the course of 154 cases. *Medicine* 1964; 43:41.
8. Erhardt, CC, Mumford, PA, Venables, PJW, et al. Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: An eight year prospective study. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:7.
 9. Listing, J, Rau, R, Muller, B, et al. HLA-DRB1 genes, rheumatoid factor, and elevated C-reactive protein: independent risk factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Berlin Collaborating Rheumatological Study Group [In Process Citation]. *J Rheumatol* 2000; 27:2100.
 10. Combe, B, Dougados, M, Goupille, P, et al. Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1736.
 11. Van Zeben, D, Hazes, JMW, Zwiderman, AHD, et al. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow-up study. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:1029.
 12. Sievers, K. The rheumatoid factor in definite rheumatoid arthritis. An analysis of 1279 adult patients with a follow-up study. *Acta Rheumatol Scand* 1965; 11:1.
 13. Aho, K, Tuomi, T, Palosuo, T, et al. Is seropositive rheumatoid arthritis becoming less severe? *Clin Exp Rheumatol* 1989; 7:287.
 14. Aho, K, Heliövaara, M, Maatela, J, et al. Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991; 18:1282.
 15. Sebbag, M, Simon, M, Vincent, C, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995; 95:2672.
 16. Nienhuis, RLF, Mandema, F. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23:302.
 17. Hoet, R, van Venroij, WJ. The antiperinuclear factor (APF) and antikeratin antibodies (AKA) in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatoid Arthritis*, Smolen, JS, Kalden, JR, Maini, RN (Eds), Springer-Verlag, Berlin 1992. p.299.
 18. Vivino, FB, Maul, GG. Histological and electron microscopic characterization of the antiperinuclear factor antigen. *Arthritis Rheum* 1990; 33:960.
 19. Janssens, X, Veys, EM, Verbruggen, G, et al. The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1988; 15:1346.
 20. Young, BJJ, Mallya, RK, Leslie, RDG, et al. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979; 2:97.
 21. Hoet, RMA, Boerbooms, AmTh, Arends, M, et al. Antiperinuclear factor, a marker antibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:611.
 22. Gomes-Daudrix, V, Sebbag, M, Girbal, C, et al. Immunoblotting detection of so-called 'antikeratin antibodies': A new assay for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53:735.
 23. von Essen, R, Kurki, P, Isomaki, et al. Prospect for an additional laboratory criterion for rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1993; 22:267.
 24. Kurki, P, von Essen, R, Kaarela, K, et al. Antibody to stratum corneum (antikeratin antibody) and antiperinuclear factor: Markers for progressive rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1997; 26:346.
 25. Paimela, L, Palosuo, T, Aho, K, et al. Association of autoantibodies to filaggrin with an active disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:32.
 26. Kurki, P, Aho, K, Palosuo, T, et al. Immunopathology of rheumatoid arthritis: antikeratin antibodies precede the clinical disease. *Arthritis Rheum* 1992; 35:914.
 27. Aho, K, von Essen, R, Kurki, P, et al. Antikeratin antibody and the perinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. *J Rheumatol* 1993; 20:1278.
 28. Aho, K, Palosuo, T, Heliövaara, M, et al. Antifilaggrin antibodies within "normal" range predict rheumatoid arthritis in a linear fashion.[In Process Citation]. *J Rheumatol* 2000; 27:2743.
 29. Kessel, A, Rosner, I, Zukerman, E, et al. Use of antikeratin antibodies to distinguish between rheumatoid arthritis and polyarthritis associated with hepatitis C infection. *J Rheumatol* 2000; 27:610.
 30. Saroux, A, Berthelot, JM, GC, GC, et al. Value of laboratory tests in early prediction of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 47:155.
 31. Palosuo, T, Lukka, M, Alenius, H, et al. Purification of filaggrin from human epidermis and measurement of antifilaggrin autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115:294.
 32. Schellekens, GA, de Jong, BA, van den Hoogen, FH, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101:273.
 33. Bas, S, Genevay, S, Meyer, O, Gabay, C. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42:677.
 34. Meyer, O, Labarre, C, Dougados, M, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:120.
 35. Jansen, LM, van Schaardenburg, D, van der Horst-Bruinsma I, et al. The predictive value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in early arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30:1691.
 36. Blass, S, Union, A, Raymackers, J, et al. The stress protein BiP is overexpressed and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44:761.
 37. Hassfeld, W, Steiner, G, Grainger, W, et al. Autoantibody to the nuclear antigen RA33: A marker for early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1993; 32:199.
 38. Hassfeld, W, Steiner, G, Studnicka-Benke, A, et al. Auto-immune response to the spliceosome: an immunological link between rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38:777.
 39. Isenberg, DA, Steiner, G, Smolen, JS. Clinical utility and serological connections of anti-RA33 antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994; 21:1260.
 40. Hayem, G, Chazerain, P, Combe, B, et al. Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26:7.
 41. Goldbach-Mansky, R, Lee, J, McCoy, A, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2:236.
 42. Mustila, A, Paimela, L, Leirisalo-Repo, M, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with early rheumatoid arthritis: An early marker of progressive erosive disease. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1371.
 43. Saulot, V, Vittecoq, O, Charlionet, R, et al. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1196.
 44. Gregersen, PK, Silver, J, Winchester, RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.

- Arthritis Rheum 1987; 30:1205.
45. Wordsworth, BP, Lanchbury, JSS, Sakkas, LI, et al. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:10049.
 46. Lanchbury, JSS, Jaeger, EEM, Sansom, DM, et al. Strong primary selection for the Dw4 subtype of DR4 accounts for the HLA-DQw7 association with Felty's syndrome. *Hum Immunol* 1991; 32:56.
 47. Wordsworth, BP, Pile, KD, Buckley, JD, et al. HLA heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1992; 51:585.
 48. van Zeven, D, Hazes, JMW, Zwiderman, AH, et al. Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:822.
 49. van der Heijde, DMFM, van Riel, PLCM, van Leeuwen, et al. Prognostic factors for radiographic damage and physical disability in early rheumatoid arthritis. A prospective follow-up study of 147 patients. *Br J Rheumatol* 1992; 31:519.
 50. Ollier, W, Venables, PJW, Mumford, PA, et al. HLA antigen associations with extra-articular rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1984; 24:279.
 51. Weyand, CM, Hicok, KC, Conn, DL, et al. The influence of HLA DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117:801.
 52. Weyand, CM, McCarthy, TG, Goronzy, JJ. Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1995; 95:2120.
 53. Gough, A, Faint, J, Salmon, M, et al. Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1166.
 54. Constantin, A, Lauwers-Cances, V, Navaux, F, et al. Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms: Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1754.
 55. Lard, LR, van Gaalen, FA, Schonkeren, JJ, et al. Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1841.
 56. Amos, RS, Constable, TJ, Crockson, RA, et al. Rheumatoid arthritis: relation of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rates to radiographic changes. *Br Med J* 1977; 1:195.
 57. Davis, MJ, Dawes, PT, Fowler, PD, et al. Comparison and evaluation of a disease activity index for use in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1990; 29:111.
 58. van Leeuwen, MA, van Rijswijk, MH, van der Heijde, DM, et al. The acute phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease. *Br J Rheumatol* 1993; 32(Suppl) 3:9.
 59. Gaudie, J, Richards, C, Harnish, D, et al. Interferon b2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:7251.
 60. Van Gameren, MM, Willemsse, PHB, Mulder, NH, et al. Effects of a recombinant human interleukin-6 in cancer patients; a phase I-II study. *Blood* 1994; 84:1434.
 61. Means, RT, Krantz, SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anaemia of chronic disease. *Blood* 1992; 80:1639.
 62. van Leeuwen, MA, Westra, J, Limburg, PC, et al. Clinical significance of interleukin-6 measurement in early rheumatoid arthritis: relation with laboratory and clinical variables and radiological progression in a three year prospective study. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:674.
 63. Engstrom-Laurent, A, Hallgren, R. Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis: Relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* 1985; 44:83.
 64. Poole, AR, Witter, J, Roberts, N, et al. Inflammation and cartilage metabolism in rheumatoid arthritis. Studies of the blood markers hyaluronic acid, orosomucoid and keratan sulfate. *Arthritis Rheum* 1990; 33:790.
 65. Dahl, IMS, Husby, G. Hyaluronic acid production in vitro by synovial lining cells from normal and rheumatoid joints. *Ann Rheum Dis* 1985; 44:647.
 66. Paimela, L, Heiskanen, A, Kurki, P, et al. Serum hyaluronate levels as a predictor of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:815.
 67. Manicourt, D, Poilvache, P, Nzeusseu, A, et al. Serum levels of hyaluronan, antigenic keratan sulfate, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 change predictably in rheumatoid arthritis patients who have begun activity after a night of bed rest. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1861.
 68. Yamanaka, H, Matsuda, Y, Tanaka, M, et al. Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:852.
 69. Green, MJ, Gough, AK, Devlin, J, et al. Serum MMP-3 and MMP-1 and progression of joint damage in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42:83.
 70. Forslind, K, Eberhardt, K, Jonsson, A, et al. Increased serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992; 31:593.
 71. Mansson, B, Carey, D, Alini, M, et al. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* 1995; 95:1071.
 72. Mansson, B, Geborek, P, Saxne, T. Cartilage and bone macromolecules in knee joint synovial fluid in rheumatoid arthritis: relation to development of knee or hip joint destruction. *Ann Rheum Dis* 1997; 56:91.
 73. Saxne, T, Heinegard, D. Synovial fluid analysis of two groups of proteoglycan epitopes distinguishes early and late cartilage lesions. *Arthritis Rheum* 1992; 35:385.
 74. Garnero, P, Landewe, R, Boers, M, et al. Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2847.
 75. Saxne, T, Zunino, L, Heinegard, D. Increased release of bone sialoprotein into synovial fluid reflects tissue destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:82.
 76. Kollerup, G, Hanswens, M, Horslev-Peterson, K. Urinary hydroxyproline cross-links of collagen in rheumatoid arthritis, relation to disease activity and effects of methyl prednisolone. *Br J Rheumatol* 1994; 33:816.
 77. Paimela, L, Leirisalo-Repo, M, Risteli, L, et al. Type I collagen degradation product in serum of patients with early rheumatoid arthritis: relationship to disease activity and radiological progression in a three year follow-up. *Br J Rheumatol* 1994; 33:1012.
 78. Aman, S, Risteli, J, Luukkainen, R, et al. The value of synovial fluid analysis in the assessment of knee joint destruction in arthritis in a three year follow up study. *Ann Rheum Dis* 1999; 58:559.