

Articolo Originale

Risposta della proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP) alla terapia con Infliximab o Adalimumab in pazienti affetti da artrite reumatoide: impatto della variabilità biologica

M. Tampoia^a, V. Brescia^a, P. Falappone^b, A. Zucano^a, A. Fontana^a, G. Lapadula^b, F. Diserio^a

^aLaboratorio Patologia Clinica I, Azienda Policlinico di Bari

^bClinica Reumatologica, Università degli Studi di Bari

Riassunto

Premesse. Il dosaggio della proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP) è stato proposto come marcatore biologico di distruzione cartilaginea utile nella valutazione a breve e a medio termine dei pazienti affetti da Artrite Reumatoide (AR). Scopo del lavoro è stato di valutare l'impatto della variabilità biologica della COMP nelle variazioni di concentrazione della proteina durante il monitoraggio farmacologico di pazienti affetti da Artrite Reumatoide (AR).

Pazienti e metodi. 31 pazienti affetti da AR, ACR classificati, 27 femmine e 4 maschi, età media 40.7 anni (range 18-66) sono stati valutati prima e dopo trattamento. 21 pazienti hanno assunto infliximab, 10 pazienti adalimumab. Al tempo 0 e dopo 6 mesi dal trattamento sono state eseguite valutazioni cliniche ed indagini di laboratorio. Il dosaggio della COMP è stato eseguito con metodica immunoenzimatica (COMP Assay, Menarini) in

completa automazione (Etimax, Diasorin). Il Valore di Reference Change Value (RCV) è stato tratto dai dati della letteratura.

Risultati. Dopo 6 mesi di trattamento la concentrazione media dei livelli sierici di COMP si è ridotta significativamente nei pazienti che hanno avuto una risposta secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR), ACR responder. La riduzione percentuale, calcolata in ciascun paziente in relazione al valore di RCV, è risultata superiore al valore stabilito in 9 dei 23 (39.1%) pazienti responder al trattamento. Nessuno dei pazienti non responder ha presentato una riduzione percentuale più elevata del valore di RCV.

Conclusioni. I nostri dati dimostrano che la COMP può essere utilizzata come marcatore sierico di monitoraggio. La risposta al trattamento farmacologico o la progressione di malattia devono essere valutati nel singolo paziente come variazioni percentuali in rapporto al RCV.

Summary

Response of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) to infliximab or adalimumab in patients with Rheumatoid Arthritis: impact of biological variability

Background. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is a biomarker for the cartilage turnover and is described as a valuable parameter for the assessment of response to therapy in patients with rheumatoid arthritis (RA). The aim of this study was to assess the

impact of reference change value (RCV) to evaluate the changes in serum-COMP following infliximab or adalimumab treatment in patients with RA.

Methods. Thirty-one patients with established RA, were studied before and after 6 months from treatment. Twenty-one of them received infliximab and ten adalimumab. Serum-COMP was measured by ELISA (COMP Assay, Menarini). The RCV data (95% confidence), was obtained from literature.

Results. After 6 months on treatment, serum-COMP

decreased significantly in ACR responder patients. The average decrease, calculated for each individual patient, showed that serum-COMP changed more than RCV in 39.1% of patients who responded to treatment.

Conclusions. The COMP is potentially a marker for monitoring response to therapy in patients with

rheumatoid arthritis (RA). The calculation of RCV is important to determine how they responded.

Keywords: Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP); Rheumatoid Arthritis (RA); Biological Variability; Reference Change Value (RCV); Monitoring.

Introduzione

L'Artrite Reumatoide (AR) è una patologia infiammatoria cronica, caratterizzata da una sinovite erosiva, che esita nella degenerazione della cartilagine e nella distruzione delle strutture articolari¹.

La comprensione dei meccanismi immunologici ed infiammatori del danno articolare, che portano alla disorganizzazione delle strutture articolari e alla compromissione funzionale, è fondamentale per lo sviluppo di terapie efficaci².

La somministrazione di farmaci di fondo, DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs), è in grado di alleviare soprattutto i sintomi relativi ai processi flogistici, ma risulta meno efficace nel ritardare la progressione del danno articolare e può non essere tollerata da tutti i pazienti^{3,4}.

L'avvento di farmaci in grado di bloccare l'azione di citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α , ha modificato profondamente la strategia terapeutica dell'AR, rendendola più efficace nel ridurre sia la sinovite che il danno articolare⁵.

Marcatori sierologici di turnover cartilagineo si mostrano come utili indicatori per monitorare gli effetti della terapia sulla cartilagine⁶. Tra questi vi è la COMP (cartilage oligomeric matrix protein), proteina pentamerica, originariamente isolata dalla cartilagine⁷, che sembra avere un ruolo strutturale nella formazione della matrice extracellulare e nell'interazione tra la matrice e le sue proteine⁷.

Numerosi studi indicano che variazioni dei livelli sierici di COMP sono correlati ai processi di danno cartilagineo⁸ e possono essere un utile indicatore prognostico di danno articolare nell'inquadramento della early arthritis⁹.

Il dosaggio di tale molecola, mediante metodica immunoenzimatica, ha mostrato buone performances analitiche in termini di precisione ed accuratezza, può essere automatizzato¹⁰ ed introdotto nella pratica clinica come valido supporto ai parametri clinici e strumentali nella valutazione immediata della progressione della distruzione della cartilagine articolare e/o dell'effetto del trattamento farmacologico¹¹⁻¹⁴.

Quando un marcatore molecolare viene usato per valutare variazione dello stato di malattia di un soggetto o l'effetto di un trattamento è importante conoscere la sua variabilità biologica¹⁵. Il modo migliore per utilizzare questo marcatore è quello di comparare i ri-

sultati analitici seriali tra loro e non in rapporto ai range di riferimento¹⁵. Con questo approccio la risposta ad un trattamento viene valutata come percentuale della differenza del valore prima e dopo ed è correlata ad un indicatore di variabilità, noto in laboratorio come RCV (reference change value). Il calcolo per RCV deriva da una formula che include il dato relativo alla variabilità biologica, alla variabilità analitica ed uno Z-score ad uno o due livelli di probabilità (95% e 99%). La differenza tra due risultati seriali è considerata significativa e biologicamente rilevante se è maggiore della somma della variabilità analitica e biologica¹⁵.

In letteratura sono numerosi i dati su come fattori biologici (sesso, etnia, esercizio fisico prolungato)¹⁶⁻¹⁸ possano influenzare i livelli sierici di COMP ma solo recentemente è stato riportato il dato relativo all'RCV¹⁹.

Nel nostro lavoro abbiamo valutato se il dato del RCV del COMP può migliorare la valutazione del monitoraggio della terapia con farmaci biologici in soggetti affetti da AR.

Pazienti e metodi

Sono stati valutati 31 pazienti, affetti da AR, classificati secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR) (1988)²⁰, 27 femmine e 4 maschi con età media di 40.7 anni (range 18-66) e con mediana di anni di malattia di 8.0 anni (range 1-33). Tutti i pazienti avevano presentato una mancata risposta o una intolleranza al trattamento con DMARDs e quindi sono stati sottoposti a trattamento con farmaci biologici: 21 pazienti hanno assunto infliximab (Remicade, Schering-Plough, Segrate), anticorpo monoclonale chimerico umano-murino anti-TNF- α , con posologia di 3 mg/kg in infusione e.v. alle settimane 0, 2, 6, e poi ogni 8 settimane e 10 pazienti hanno assunto adalimumab (Humira, Abbott Laboratories, Kent, Regno Unito), anticorpo monoclonale ricombinante umano, antagonista recettoriale di TNF- α , con posologia di 40 mg sottocute alle settimane 0, 2, 4, e poi ogni 2 settimane.

La valutazione clinica dei pazienti è stata eseguita al tempo 0 e dopo 6 mesi dall'inizio del trattamento utilizzando l'indice di Ritchie ed il DAS28. L'indice di Ritchie²¹ è un punteggio finale, compreso tra 0 e 78, ricavato dalla somma dei punteggi relativi alla risposta stimolata sul paziente esercitando una digito-p pressione sulle rime di articolazioni "signal" o mobilizzando passivamente i distretti la cui pressione manuale non è ap-

Tabella I. Caratteristiche cliniche e di laboratorio dei 31 pazienti affetti da AR al tempo 0.

<i>Pazienti</i>	<i>infliximab (n=21)</i>		<i>adalimumab (n=10)</i>		<i>Differenza valore P</i>
	<i>media</i>	<i>range</i>	<i>media</i>	<i>range</i>	
Età (anni)	40.3	18-66	41.6	30-66	0.79
Durata di malattia (anni)*	10	1-33	8	2-22	0.37
Livelli sierici di COMP (U/L)	9.8	4.3-21.9	8.5	5.8-11.6	0.37
Proteina C reattiva (PCR) (mg/L)	43	4-179	19	1.5-49	0.07
Indice di attività di malattia (DAS28)	4.9	2.7-7.3	5.2	4.5-6.3	0.54
Indice di Ritchie	16.24	4-48	19.3	9-36	0.45

Il valore della P dimostra che non vi sono differenze significative tra i pazienti sottoposti a trattamento con infliximab e i pazienti sottoposti a trattamento con adalimumab.

n = numero di pazienti per gruppo; mediana della durata di malattia.

plicabile. Questa risposta viene quantificata mediante una scala ordinale: 0= non dolente; 1= dolente; 2= dolente e reattivo alla palpazione; 3= dolente, reattivo e ritratto alla palpazione. Il Disease Activity Score²² è un altro indice di valutazione dell'attività di malattia che applica una formula matematica basata sui seguenti parametri: la conta del numero di articolazioni dolenti, la conta del numero di articolazioni tumefatte, la misurazione della VES o della PCR, il giudizio del paziente sul proprio complessivo stato di salute espresso mediante scala visuo-analogica (GH).

La risposta alla terapia è stata valutata come risposta secondo i criteri dell'American College of Rheumatology (ACR): sono stati considerati "responder" i pazienti che, dopo 6 mesi dall'inizio del trattamento, avevano ottenuto una risposta ACR 50 o ACR 70, e "non responder" i pazienti che avevano raggiunto una risposta uguale o inferiore ad ACR 20.

I sieri dei pazienti sono stati raccolti, aliquotati e congelati a -20 °C e sono stati processati nella stessa seduta analitica per ridurre al minimo le variazioni inter-assay.

Per calcolare la media e la distribuzione delle concentrazioni di COMP in soggetti sani abbiamo valutato 33 volontari, 25 femmine e 8 maschi, età media 41.1 anni (range 20-50).

Il dosaggio della COMP è stato eseguito con metodica immunoenzimatica a sandwich (AnaMar Medical AB, Lund, Svezia), nella quale due anticorpi monoclonali adesi alla fase solida, riconoscono due differenti determinanti antigenici della molecola della COMP umana. Durante l'incubazione, la COMP presente nel campione reagisce con anticorpi anti-COMP legati alla perossidasi (coniugato). Il coniugato legato, non rimosso da una precedente fase di lavaggio, viene rilevato tramite una reazione colorimetrica tra la perossidasi e la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (substrato), bloccata dall'aggiunta di acido solforico 0,5M. L'intensità della colorazione, letta con spettrofotometro a 450 nm, è funzione dell'enzima coniugato al complesso ed è misurata in unità di assorbanza. La concentrazione della proteina presente nel campione, viene stimata dal-

l'interpolazione di una curva costruita con 5 calibratori a differente concentrazione (4U/L, 7U/L, 12U/L, 18U/L, 32U/L).

Il dosaggio è stato eseguito su strumentazione ETI-Max (DiaSorin, Saluggia), analizzatore per micropiastre completamente automatico, che esegue il trattamento dei campioni (pre-diluizione e dispensazione) e la dispensazione dei reagenti, l'incubazione, il lavaggio, la lettura fotometrica e l'interpolazione dei risultati. Lo strumento è controllato tramite un software che consente di eseguire il test secondo le specifiche del kit. L'esecuzione semplice e veloce permette di ottenere risultati dopo circa 3 ore.

Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma GraphPad Prism 3.0. Il t-test di Student è stato utilizzato per le comparazioni. Il test di Pearson è stato utilizzato per le correlazioni. Il chi quadro test è stato utilizzato per valutare le differenze tra proporzioni dei gruppi. E' stato considerato significativo un valore di $P < .05$. La variazione della concentrazione della COMP, per ogni singolo paziente, è stata espressa come differenza del valore prima e dopo trattamento, percentualizzata. Solo un decremento superiore al valore di RCV tratto dalla letteratura¹⁹ è stato ritenuto clinicamente rilevante. Come descritto tale valore è differente a seconda del sesso: 19.9% nelle femmine, 27.4% nei maschi.

Risultati

Valutazioni cliniche-laboratoristiche al tempo 0

Le caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti affetti da AR, sono riportate nella Tabella I.

Non vi sono state differenze tra i pazienti trattati con infliximab e quelli trattati con adalimumab per quanto riguarda l'età media e la durata media di malattia, la concentrazione media dei livelli sierici di proteina C reattiva (PCR) e di COMP. Il calcolo del Disease Activity Score (DAS28) e dell'indice di Ritchie ha riportato un valore medio statisticamente non differente.

La concentrazione media di COMP nel gruppo con-

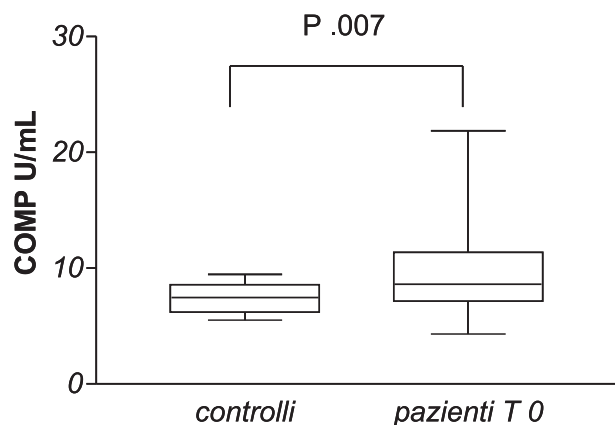


Figura 1. Concentrazioni medie di COMP nei controlli e nei pazienti affetti da AR al tempo 0.

trollo è stata di 7.4 U/L (95% IC 7.0 a 7.9). La concentrazione media di COMP nei pazienti prima del trattamento è risultata significativamente più elevata rispetto alla media dei controlli ($P = .007$) (Fig. 1).

I livelli sierici di COMP al tempo 0 non correlavano con l'indice di Ritchie e con il DAS, $r = 0.08$, $P = 0.63$; $r = -0.01$, $P = 0.94$, rispettivamente

Valutazione clinico-laboratoristiche al follow up (tempo 6 mesi)

A 6 mesi dall'inizio del trattamento 23 dei 33 (69.6%) pazienti sono risultati ACR responder. In questi pazienti la concentrazione media di COMP è risultata significativamente ridotta rispetto al tempo 0 ($P = .008$), non si è modificata nei pazienti non responder ($P = 0.14$) (Fig. 2).

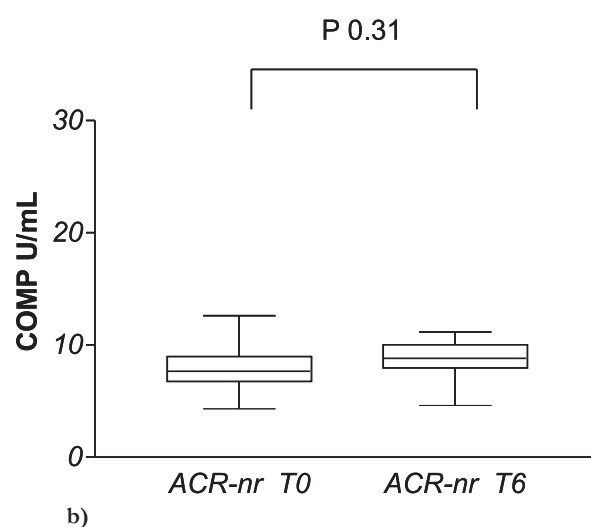
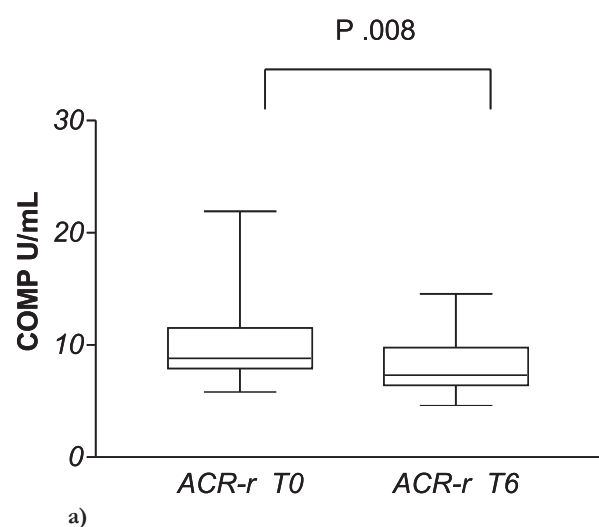


Figura 2. Variazioni delle concentrazioni medie di COMP a 6 mesi dal trattamento nei pazienti ACR responder (a) e nei, pazienti ACR non responder (b).

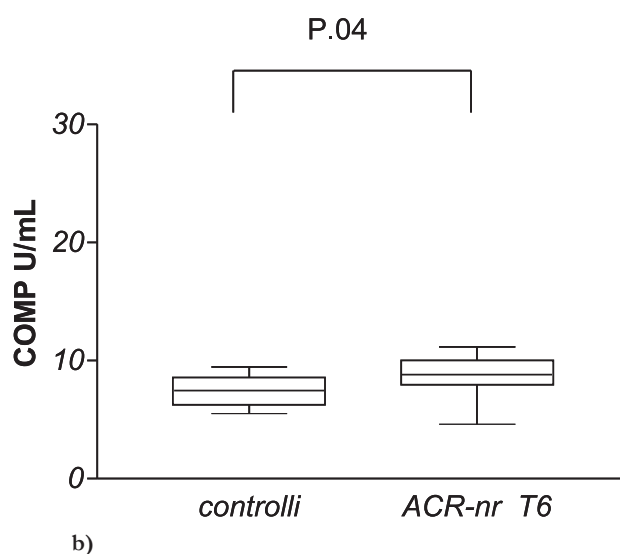
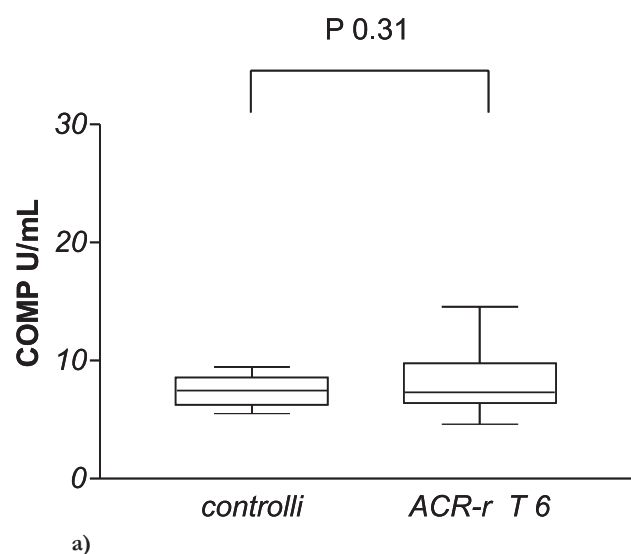


Figura 3. Confronto tra la media di concentrazione di COMP nei controlli e nei pazienti ACR responder (a) e non responder (b) al tempo 6 mesi.

Tabella II. Livelli sierici di COMP al tempo 0 (T0) e dopo 6 mesi di trattamento (T6) nei pazienti responder (1-23) e non responder al trattamento (24-31). Sono indicate le percentuali di variazione registrate al T6 in riferimento alla concentrazione media dei controlli ed in riferimento alla concentrazione al T0 per ciascun paziente.

paziente	sesso	età	T0	T6	(T6 - media controlli)		(T6 - T0)		trattamento	ACR-R
			U/L	U/L	U/L	% variazione	U/L	% variazione		
1	F	29	21,90	14,56	7,16	96,76	-7,34	-33,52	infliximab	sì
2	F	44	6,10	6,38	-1,02	-13,78	0,28	4,59	infliximab	sì
3	F	50	20,10	5,42	-1,98	-26,76	-14,68	-73,03	infliximab	sì
4	F	56	8,10	6,81	-0,59	-7,97	-1,29	-15,93	infliximab	sì
5	F	35	10,40	10,69	3,29	44,46	0,29	2,79	infliximab	sì
6	F	31	11,30	9,01	1,61	21,75	-2,29	-20,26	infliximab	sì
7	F	33	8,40	7,10	-0,30	-4,05	-1,30	-15,48	infliximab	sì
8	F	53	12,20	10,84	3,44	46,49	-1,36	-11,15	infliximab	sì
9	M	43	6,40	6,24	-1,16	-15,68	-0,16	-2,50	infliximab	sì
10	F	62	9,40	7,10	-0,30	-4,05	-2,30	-24,47	infliximab	sì
11	F	51	8,40	8,79	1,39	18,78	0,39	4,64	infliximab	sì
12	F	51	7,70	5,15	-2,25	-30,41	-2,55	-33,12	infliximab	sì
13	F	32	12,30	11,41	4,01	54,19	-0,89	-7,24	infliximab	sì
14	F	44	11,40	7,10	-0,30	-4,05	-4,30	-37,72	adalimumab	sì
15	F	66	8,10	7,10	-0,30	-4,05	-1,00	-12,35	adalimumab	sì
16	F	40	6,80	5,80	-1,60	-21,62	-1,00	-14,71	adalimumab	sì
17	F	41	9,10	7,20	-0,20	-2,70	-1,90	-20,8	adalimumab	sì
18	F	30	6,10	6,20	-1,20	-16,22	0,10	1,64	adalimumab	sì
19	F	39	8,80	7,40	0,00	0,00	-1,40	-15,91	adalimumab	sì
20	F	39	8,60	7,30	-0,10	-1,35	-1,30	-15,12	adalimumab	sì
21	F	37	5,80	3,30	-4,10	-55,41	-2,50	-43,10	adalimumab	sì
22	F	39	9,00	8,40	1,00	13,51	-0,60	-6,67	adalimumab	sì
23	F	41	11,60	8,40	1,00	13,51	-3,20	-27,59	adalimumab	sì
24	F	20	6,50	8,33	0,93	12,57	1,83	28,15	infliximab	no
25	F	54	9,30	10,02	2,62	35,41	0,72	7,74	infliximab	no
26	F	36	7,00	7,56	0,16	2,16	0,56	8,00	infliximab	no
27	M	35	12,60	11,17	3,77	50,95	-1,43	-11,35	infliximab	no
28	F	18	4,30	4,59	-2,81	-37,97	0,29	6,74	infliximab	no
29	F	66	8,60	8,54	1,14	15,41	-0,06	-0,70	infliximab	no
30	M	21	7,90	9,07	1,67	22,57	1,17	14,81	infliximab	no
31	M	26	7,35	9,95	2,55	34,46	2,60	35,37	infliximab	no

La concentrazione media di COMP è risultata statisticamente non differente rispetto alla media dei controlli nei pazienti responder ($P=0.32$), è rimasta più elevata nei pazienti non responder ($P=.04$) (Fig. 3).

La valutazione dei valori di COMP, eseguita per singolo paziente, è riportata in Tabella II.

14 dei 23 (60.9%) pazienti responder al trattamento hanno evidenziato livelli di concentrazione inferiori alla concentrazione media dei controlli riportando un decremento percentuale del valore T6 rispetto alla media dei controlli. Un solo paziente ACR non responder mostrava una concentrazione di COMP inferiore alla media dei controlli.

La valutazione della risposta al trattamento, intesa come riduzione della concentrazione rispetto al tempo

0 di ciascun paziente, ha evidenziato un decremento percentuale in 19 pazienti responder e in due pazienti non responder. Tale decremento tuttavia è risultato superiore al valore di RCV e quindi biologicamente significativo solo in 9 dei 23 (39.1%) pazienti trattati.

La valutazione della risposta al trattamento, intesa come riduzione delle concentrazioni di COMP, ha evidenziato differenze significative se eseguita mediante il confronto con il valore medio di riferimento del gruppo controllo, oppure mediante il confronto con il valore dell'RCV (chi-quadro 3.136, $P=.03$). Infatti, pazienti responder, che presentavano, dopo trattamento, livelli di concentrazione superiori al valore di riferimento hanno mostrato percentuali di riduzione superiori al valore di RCV, -33.53%, -20.26% e -27.59%, e quindi

significative, e viceversa pazienti con livelli di concentrazione inferiori al valore di riferimento hanno mostrato percentuali di riduzione non significative, inferiori al valore di RCV.

I livelli sierici di COMP al tempo 6 mesi non correlavano con l'indice di Ritchie e con il DAS nei pazienti responder $r = -0.21$, $P = 0.31$; $r = -0.37$, $P = .01$, rispettivamente.

Nessuna correlazione è stata dimostrata tra la riduzione percentuale dei livelli di COMP nel singolo paziente e la riduzione percentuale dell'indice di Ritchie dopo trattamento ($r = 0.51$, $P = .07$, ns).

Discussione

Recenti studi dimostrano l'utilità clinica di marcatori di turnover cartilagineo nell'inquadramento diagnostico e nel monitoraggio dei pazienti affetti da AR²³. La COMP, marcatore biochimico di distruzione articolare, è ritenuta un valido indicatore di progressione di malattia: elevati livelli di COMP riflettono l'entità e l'evoluzione del danno cartilagineo in pazienti affetti da AR, senza documentati segni radiografici²³.

Rispetto all'esame radiologico il test di laboratorio può fornire una valutazione più immediata dell'efficacia terapeutica di un farmaco, perché non richiede lunghi periodi di follow-up²⁴. Infatti, molti studi sembrano concordare che il tempo minimo richiesto per valutare la presenza di lesioni-erosioni radiologicamente quantificabili nei pazienti affetti da AR sia di due anni dalla diagnosi^{25,26}.

L'utilizzo della COMP per valutare variazioni dell'attività di malattia o l'effetto di un trattamento nel paziente affetto da AR è validato da specifiche di qualità coerenti con i goal analitici proposti da Fraser²⁷ ed è supportato da una marcata individualità biologica, evidenziata dal basso indice di individualità¹⁹ di questo analita. Questo significa che la dispersione dei valori per ciascun individuo si estende solo per una piccola parte dell'intervallo di riferimento che risulta poco utile per valutare le variazioni di concentrazione. Per questi motivi, il confronto con i valori precedenti ha molti vantaggi e l'uso del dato di RCV è altamente raccomandato per valutare la significatività di variazioni di risultati seriali di pazienti in monitoraggio²⁸⁻³⁰.

Nella nostra casistica la concentrazione media dei livelli di COMP, è risultata ridotta nei pazienti responder ad entrambi i trattamenti. Questo dato concorda con quelli già presenti in letteratura, supportando l'ipotesi che i farmaci inibitori del TNF-alfa, intervengono nei meccanismi coinvolti nella distruzione dell'integrità cartilaginea.

La risposta al trattamento, intesa come riduzione delle concentrazioni di COMP nel singolo paziente, è stata valutata in relazione al valore di riferimento e al valore di RCV. Tale riduzione si è verificata solo in alcuni pazienti ACR responder, senza nessuna differenza tra i

due trattamenti. La percentuale di pazienti che ha presentato tale riduzione, tuttavia, è risultata differente in rapporto al metodo di verifica utilizzato. Il nostro studio ha dimostrato, in questo modo, l'importanza di utilizzare l'RCV, come criterio per confrontare i risultati di un individuo con i suoi precedenti, piuttosto che con la distribuzione della concentrazione del marcatore nella popolazione (valori di riferimento).

Un bias al nostro studio è stato l'impossibilità di documentare una correlazione dei livelli sierici di COMP con un parametro clinico-strumentale di danno cartilagineo. L'indice di Ritchie e il DAS28, solitamente utilizzati nella valutazione clinica del paziente in follow-up non sono parametri di danno cartilagineo e non correlano con i livelli sierici di un marcatore di degradazione cartilaginea. L'esame radiologico, tradizionalmente considerato indicatore di danno cartilagineo, non presenta caratteristiche di sensibilità diagnostica tali da poter essere utilizzata nel follow-up a breve e medio termine del paziente in trattamento. Più promettente nel valutare l'attività di malattia e il danno articolare è la tecnica di immagini con Risonanza magnetica (RM), che elabora indicatori e score di erosione, edema e sinovite, utile nel follow-up del paziente affetto da AR³¹. L'introduzione di tale metodologia nella pratica clinica è tuttavia condizionata dal contesto in cui si opera ed è gravata ancora da un elevato costo.

Il laboratorio attraverso il RCV fornisce uno strumento di facile utilizzo che permette di valutare le variazioni di risultati seriali nel monitoraggio della terapia e consente di trasmettere informazioni relative a performance analitiche nelle decisioni cliniche.

Bibliografia

1. Humby F, Manzo A, Kirkham B, Pitzalis C. The synovial membrane as a prognostic tool in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007; 6:248-52.
2. van den Berg WB. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. *Arthritis Res* 2001; 3:18-26.
3. Cash JM, Klippel JH. Second-line drug therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1994; 330:1368-75.
4. Fries JF. Effectiveness and toxicity considerations in outcome directed therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 1996; 44:102-6.
5. Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Burmester GR, Bijlsma JW, et al. Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases, 2004. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 Suppl 2:ii2-12.
6. Roux-Lombard P, Eberhardt K, Saxne T, Dayer JM, Wollheim FA. Cytokines, metalloproteinases, their inhibitors and cartilage oligomeric matrix protein: relationship to radiological progression and inflammation in early rheumatoid arthritis. A prospective 5-year study. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:544-51.
7. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, et al. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected

- only in cartilage. *J Biol Chem* 1992; 267:132-6.
8. Vilim V, Olejarova M, Machacek S, Gatterova J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:707-13.
 9. Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64: 196-201.
 10. Tampoia M, Zucano A, Brescia V, Fontana A, Scioscia E, Lapadula G, et al. Livelli sierici di COMP in pazienti affetti da artrite reumatoide prima e dopo trattamento con infliximab: performance analitiche e correlazioni cliniche. *RIMeL / IJLaM* 2006; 2:229-35.
 11. Kullich WC, Mur E, Aglas F, Niksic F, Czerwenka C. Inhibitory effects of leflunomide therapy on the activity of matrix metalloproteinase-9 and the release of cartilage oligomeric matrix protein in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24:155-60.
 12. Skoumal M, Haberhauer G, Feyertag J, Kittl EM, Bauer K, Dunky A. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP): a rapid decrease in patients with active rheumatoid arthritis undergoing intravenous steroid treatment. *Rheumatol Int* 2006; 26:1001-4.
 13. Yamamoto M, Takahashi H, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, et al. [Evidence of cartilaginous benefit of treatment with infliximab in rheumatoid arthritis using measurement of serum COMP] *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2007; 30:41-7.
 14. Morozzi G, Fabbroni M, Bellisai F, Cucini S, Simpatico A, Galeazzi M. Low serum level of COMP, a cartilage turnover marker, predicts rapid and high ACR70 response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007; 25:373-7.
 15. Ricos C, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Iglesias N, Jimenez CV, et al. The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 175-84.
 16. Andersson ML, Thorstensson CA, Roos EM, Petersson IF, Heinegard D, Saxne T. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2006; 7:98-104.
 17. Andersson ML, Petersson IF, Karlsson KE, Jonsson EN, Mansson B, Heinegard D, et al. Diurnal variation in serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in patients with knee osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:1490-4.
 18. Kong SY, Stabler TV, Criscione LG, Elliott AL, Jordan JM, Kraus VB. Diurnal variation of serum and urine biomarkers in patients with radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2496-504.
 19. Brescia V, Tampoia M. Biological variation of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): A proposal to interpret laboratory serial testing. *Clin Chim Acta* 2007; 380(1-2):248-9.
 20. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-24.
 21. Ritchie DM, Boyle JA, McInnes JM, Jasani MK, Dalakas TG, Grievson P, et al. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med* 1968; 37:393-406.
 22. van der Heijde DMFM, van't Hof MA, van Riel PLCM, van der Putte LBA. Development of a disease activity score based on judgement in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol* 1993; 20:579-81.
 23. Christgau S, Cloos PAC. Current and future applications of bone turnover markers. *Clin Lab* 2003; 49:439-46.
 24. Ory PA. Interpreting radiographic data in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:597-604.
 25. Emery P. Is it time for a European consensus on the pharmacological management of early RA? *J Rheumatol Suppl* 2002; 66:1-2.
 26. Scott DL. The diagnosis and prognosis of early arthritis: rationale for new prognostic criteria. *Arthritis Rheum* 2002; 46:286-90.
 27. Fraser CG, Petersen PH. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* 1993; 39:1447-53; discussion 1453-5.
 28. Fraser CG. Clinically useful limits (CUL) criteria best based on within-subject biologic variation. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:256-7.
 29. Fraser CG, Fogarty Y. Interpreting laboratory results. *BMJ* 1989; 298:1659-60.
 30. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27:409-37.
 31. Conaghan PG, McQueen FM, Peterfy CG, Lassere MN, Ejbjerg B, Bird P, et al. The evidence for magnetic resonance imaging as an outcome measure in proof-of-concept rheumatoid arthritis studies. *J Rheumatol* 2005; 32: 2465-9.