

Linee guida per la diagnosi immunologica di artrite reumatoide

N. Bizzaro^a, V. Ricciari^b, G.D. Sebastiani^c, D. Villalta^d, G. Valesini^b, C. Montecucco^e
per il Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA)

^aLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, Tolmezzo

^bCattedra e Divisione di Reumatologia, Policlinico Umberto I, Università Sapienza, Roma

^cUnità Operativa Complessa di Reumatologia, Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini, Roma

^dAllergologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli, Pordenone

^eCattedra e Divisione di Reumatologia, IRCCS Policlinico S. Matteo, Università di Pavia

Riassunto

Queste linee guida per la diagnosi immunologica di artrite reumatoide sono state prodotte dal gruppo di studio interdisciplinare FIRMA sulla base delle più recenti evidenze della letteratura scientifica e con il metodo del consenso tra esperti. Lo scopo è quello di mettere a disposizione dei reumatologi, dei medici di medicina generale e dei patologi clinici, delle linee di indirizzo sul significato e sull'utilizzo più appropriato dei marcatori anticorpali per la diagnosi, la prognosi e il monitoraggio dell'artrite reumatoide.

Summary

Guidelines for the immunological diagnosis of rheumatoid arthritis

Key recommendations for the immunological diagnosis of rheumatoid arthritis were developed, based on evidence in the literature and expert consensus, by a panel of rheumatologists, immunologists and clinical pathologists of the Italian FIRMA group. Recommendations were made to adopt a diagnostic strategy that is consistent with current evidence and facilitate appropriate laboratory test use and interpretation. These recommendations are directed to rheumatologists, general practitioners and laboratory physicians and scientists who are involved in the diagnosis and care of patients with rheumatoid arthritis.

Key words: guidelines, anti-citrullinated peptide antibody, rheumatoid arthritis, rheumatoid factor.

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica a patogenesi autoimmune che colpisce prevalentemente le articolazioni diartrodiali (o articolazioni mobili) dotate di membrana sinoviale. I segni principali sono il dolore, la rigidità e una marcata limitazione della funzione articolare. La sua prevalenza nella popolazione italiana è dello 0.4%, predilige il sesso femminile con un rapporto di 4:1 e presenta un picco di insorgenza nella 5^a decade di vita¹.

L'impatto economico della malattia è amplificato dall'elevato grado di impotenza funzionale che essa può causare. Infatti, se non trattato, circa il 30% dei pazienti con AR può raggiungere un certo grado di disabilità

permanente entro i primi 3 anni dalla diagnosi².

La diagnosi clinica di AR è difficile all'esordio allorché l'interessamento sistemico è generalmente assente e i sintomi si possono manifestare in maniera fugace e sfumata. Per questo motivo, benché i criteri classificativi adottati dall'American College of Rheumatology (ACR)³ siano utili per l'inquadramento diagnostico, essi mancano tuttavia di sufficiente sensibilità negli stadi precoci della malattia^{4,5}.

La disponibilità di test di laboratorio in grado di discriminare tra AR e altre forme artritiche è perciò clinicamente molto importante, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia quando non si sono ancora svilup-

pate lesioni articolari tali da rendere il danno irreversibile e la terapia immunosoppressiva è particolarmente efficace nel ridurre o addirittura arrestare la progressione del danno articolare^{6,7}.

Marcatori immunologici

Anche nell'AR come nel lupus eritematoso sistemico (LES) la risposta autoanticorpale è molto eterogenea, e numerosi sono gli anticorpi che sono stati descritti in associazione con la malattia. Il fattore reumatoide (FR), gli anticorpi anti-proteine/peptidi citrullinati (ACPA), gli anticorpi anti-RA33 (anti-hnRNP-A2) e gli anticorpi anti-Sa, sono marcatori dotati di buona sensibilità e specificità. Nei pazienti con AR è possibile ritrovare in percentuale variabile la presenza di molti altri anticorpi, quali gli anti-nucleo (ANA), anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) per lo più con specificità anti-lattoferina, anti-collagene tipo II, anti-fibronectina, anti-p68/BPI, anti-calpastatina, anti-glucosio 6-fosfato isomerasi, anti-Ro e anti-La. Tuttavia, per quasi tutti questi anticorpi, la sensibilità diagnostica è in genere bassa o molto bassa, così come la loro specificità, per cui la loro utilità pratica è scarsa.

Gli ANA possono essere riscontrati in circa il 50% dei pazienti con AR⁸. Nella maggior parte dei casi sono presenti a titolo non elevato, non sono associati ad un particolare subset clinico e non correlano con l'evoluzione della malattia. La loro determinazione può essere utile nella diagnostica differenziale, come test di prima istanza, per distinguere l'AR da altre malattie autoimmuni sistemiche che si presentano con un quadro clinico simil-reumatoide, mentre non riveste alcuna utilità per il monitoraggio della malattia⁹.

I fattori reumatoidi

I FR sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro determinanti antigenici presenti nella regione costante (frammento Fc) delle catene pesanti delle IgG. Possono appartenere a tutte le classi anticorpali, anche se la più rappresentata è la classe IgM. I FR presenti nell'AR riconoscono le IgG umane, sono dotati di affinità elevata e possono essere di isotipi differenti. Al contrario, i FR associati ad altre malattie sono in genere polispecifici, a bassa affinità e di isotipo IgM.

Metodi di dosaggio del FR

I metodi di dosaggio del FR sono numerosi. Il primo test ad essere impiegato e ancora parzialmente in uso, è la classica reazione di Waaler-Rose, non molto sensibile ma dotata di elevata specificità, che nella sua formulazione originale utilizzava emazie di montone sensibilizzate con immunoglobuline di coniglio. Oggi è stata sostituita da una variante in cui al posto delle emazie di montone si utilizzano particelle di lattice. Ulteriori varianti del test sono state messe a punto successivamente, utilizzando carrier diversi, quali particelle di bentonite, eritrociti di specie diverse dalla pecora,

etc. Tutti questi metodi si basano sul principio della agglutinazione e sono semiquantitativi.

Nella maggior parte dei laboratori, però, tali metodiche sono state ampiamente sostituite da metodi nefelometrici, che usano particelle di lattice sensibilizzate con IgG umane, oppure nefelometrici o turbidimetrici basati sulla precipitazione di aggregati solubili di IgG umane^{10,11}. Tali sistemi sono quantitativi, standardizzati sulla preparazione internazionale di riferimento¹², riproducibili e automatizzabili. Va comunque segnalato che il principale limite delle procedure sopra descritte è rappresentato dal fatto che sono in grado di rilevare preferenzialmente FR di tipo IgM. La scoperta del coinvolgimento di FR di altre classi immunoglobuliniche, il fatto che queste a volte sono presenti in assenza di FR IgM e che sono associate ad alcune manifestazioni cliniche della AR, hanno portato alla messa a punto di metodi radioimmunologici e immunometrici che consentono di differenziare FR di diverse classi immunoglobuliniche. In particolare, la determinazione del FR IgA potrebbe risultare utile essendo risultata maggiormente specifica e predittiva dell'isotipo IgM^{13,14} e maggiormente correlata a malattia severa e refrattaria al trattamento¹⁵. La standardizzazione di questi metodi è tuttavia insufficiente e non scevra da false positività e false negatività¹⁶; il loro impiego è perciò limitato a laboratori clinici di comprovata esperienza e a scopo di ricerca.

Valore diagnostico del FR

La sensibilità diagnostica del FR per l'AR è abbastanza elevata (tra il 75 e l'80%) e comunque è fortemente influenzata dalla selezione clinica dei pazienti e dalla durata della malattia, dal momento che la percentuale di positività aumenta in genere col passare del tempo. Nella pratica clinica si ricerca usualmente il FR IgM. Qualora il sospetto clinico di AR sia elevato la determinazione di FR di isotipo differente può avere una certa importanza nei casi di negatività del FR IgM.

Uno dei maggiori problemi del FR è che, pur essendo uno dei criteri classificativi di malattia proposti dall'ACR³, non è del tutto specifico potendosi riscontrare, anche ad alto titolo, in numerose malattie del connettivo come la sindrome di Sjögren, dove può essere presente fino al 70% dei casi, ma anche nel LES e nella sclerodermia, così come nella crioglobulinemia, in alcune malattie linfoproliferative e in numerose malattie infettive, sia batteriche che virali. Inoltre, il FR può essere presente, senza significato clinico, anche nel 4-5% dei soggetti sani, percentuale che può arrivare al 15% nei soggetti al di sopra dei 60 anni¹⁷. La specificità del FR si colloca dunque attorno al 80% e, in linea generale il suo valore predittivo positivo, ovvero la probabilità che il paziente sia affetto da AR, è aumentato se il FR è presente ad alto titolo o è presente in più dosaggi consecutivi.

Tabella I. Sensibilità e specificità degli anticorpi anti-proteine citrullinate e del FR-IgM in diverse patologie e in individui sani.

	ACPA %	FR-IgM %
Sensibilità		
Artrite reumatoide	75-80	75-80
Specificità		
Artrosi	1-5	10
Artriti croniche giovanili	5	15-20
Artrite psoriasica	4-10	10
Psoriasi	0.5-1	1
Sindrome di Sjögren	3	70
Altre connettiviti	5-10	20-30
Epatopatie autoimmuni	8	25
Crioglobulinemia	7	70
Infezioni virali	1-2	25
Infezioni batteriche	5-10	10-15
Infezioni parassitarie	2	20
Soggetti sani	0.5-1	5-10
Valore medio	97	80

Valore prognostico del FR

E' noto che i pazienti sieropositivi hanno forme cliniche più severe rispetto ai sieronegativi e che titoli più elevati si associano a una prognosi peggiore a lungo termine^{18,19}. Per quanto riguarda le classi immunoglobuliniche, il FR IgA è associato con un decorso più severo e rapidamente progressivo dell'AR, caratterizzato da erosioni ossee e manifestazioni sistemiche^{14,20}. Analogamente, anche il FR di isotipo IgG sarebbe associato a forme più severe di malattia. Il riscontro di più di un isotipo di FR, in particolare a livello sinoviale, è altamente suggestivo di AR^{16,21,22}.

Alcuni studi hanno anche dimostrato una correlazione tra l'efficacia del trattamento farmacologico e la diminuzione del livello di FR sia con le terapie di fondo tradizionali, quali il methotrexate, che più recentemente con i nuovi farmaci biologici²³⁻²⁶.

Gli anticorpi anti-ra33

Gli anti-RA33, diretti contro proteine del complesso ribonucleoproteico "heterogeneous nuclear" (hnRNP), sono autoanticorpi associati all'AR, con una sensibilità diagnostica attorno al 20%. Pur non essendo anticorpi AR-specifici, potendosi riscontrare nel 25% dei soggetti con LES e altre connettiviti, sono tuttavia presenti nel 30% dei soggetti con AR negativi per il FR e compaiono in fase molto precoce di malattia. Rilevati classicamente solo con metodi di immunoblot, di recente si sono resi disponibili metodi immunoenzimatici (ELISA) che ne consentono la misurazione quantitativa in casistiche più ampie. Alcuni studi hanno dimostrato che un 15-20% dei pazienti con AR sono positivi solo per questo anticorpo e negativi per ACPA e FR, indicando che esiste un sottogruppo di pazienti che può essere individuato solo con questo test²⁷. Tuttavia, la scarsa specificità di questi anticorpi ne limita

fortemente l'impiego nella diagnosi dell'AR.

Gli anticorpi anti-fattori perinucleari, anti-cheratina e anti-filaggrina

Gli anticorpi anti-fattori perinucleari (APF) sono anticorpi di classe IgG, che reagiscono con i granuli cheratojalini che si trovano nelle cellule della mucosa buccale²⁸, mentre gli anticorpi anti-cheratina (AKA), anch'essi prevalentemente di classe IgG, producono una fluorescenza di aspetto laminare, localizzata sullo strato corneo delle porzioni media e superiore di esofago di ratto²⁹.

La sensibilità diagnostica degli APF per l'AR varia tra il 33 e il 91% e la specificità tra l'80 e il 98%; la sensibilità degli AKA tra il 26 e il 60% e la specificità tra il 90 e il 100%³⁰⁻³².

L'utilizzo di anticorpi monoclonali con specificità per la (pro)filaggrina, che colocalizzavano sia nei granuli perinucleari che nello strato corneo dell'esofago, ha consentito di identificare la filaggrina come la proteina bersaglio di entrambi gli anticorpi e di confermare che gli APF e gli AKA costituiscono in realtà lo stesso anticorpo evidenziato con tecniche di immunofluorescenza indiretta su substrati diversi³³.

La successiva dimostrazione che l'epitopo riconosciuto da tutte e due gli anticorpi era costituito da residui di citrullina^{34,35} ha portato al loro progressivo abbandono ai fini diagnostici e alla sostituzione con la ricerca degli ACPA.

Gli anticorpi anti-Sa

Un altro sistema anticorpale specifico per l'AR è quello degli anticorpi anti-Sa, descritto nel 1994 da Despres³⁶. Questi anticorpi, evidenziati in immunoblotting su estratti di placenta o su tessuto sinoviale di soggetti con AR, hanno una sensibilità attorno al 40% e

una specificità del 97%, sovrapponibile a quella degli anticorpi anti-filaggrina^{36,37}. L'analisi molecolare ha dimostrato che l'antigene Sa è in realtà vimentina citrullinata^{38,39}. E' dunque verosimile che proprio la vimentina citrullinata costituisca il neoantigene verso il quale vengono prodotti gli anticorpi anti-citrullina nelle articolazioni ove è presente una reazione flogistica.

Anticorpi anti-proteine o peptidi citrullinati

Gli ACPA sono tra gli autoanticorpi più interessanti degli ultimi anni per la diagnostica dell'AR in quanto sono in grado di coniugare una buona sensibilità con una elevata specificità (Tab. I). Essi riconoscono come target antigenico epitopi citrullinati presenti in diverse proteine, generati per digestione enzimatica ad opera della peptidilarginin-deiminasi (PAD), in grado di trasformare residui di arginina in citrullina^{34,40}.

Metodi di dosaggio

Gli ACPA sono anticorpi di classe IgG e possono essere evidenziati con metodiche ELISA di tipo quantitativo, la cui specificità e sensibilità dipende dal tipo di antigene utilizzato.

Infatti diverse proteine naturali o di origine ricombinante possono essere utilizzate come substrato antigenico; la diversa provenienza presenta però degli inconvenienti. Le proteine di origine naturale, quali la filaggrina, la mielina e il fibrinogeno, seppur ricche di arginina, presentano un numero limitato di epitopi citrullinati; inoltre antigeni naturali, con un grado di purezza adeguato e costante non sono facilmente disponibili in grandi quantità. L'insufficiente purezza dell'antigene, sia esso naturale o ricombinante, può essere causa di ridotta specificità dei test per la presenza di reattività aspecifiche nei confronti di altre componenti, parti non citrullinate dell'antigene stesso o anche contaminanti presenti in natura; la variabilità dei preparati antigenici tra lotti diversi può invece compromettere la standardizzazione del test⁴¹.

L'uso di peptidi citrullinati sintetici (CCP) nei test destinati ad identificare gli ACPA sembrerebbe ovviare ad alcuni degli inconvenienti legati all'uso di antigeni di natura estrattiva. La produzione e la purificazione di peptidi sintetici è economica e facilmente standardizzabile e consente la produzione di grandi quantità di antigeni. Inoltre, più residui citrullinati possono essere incorporati durante la sintesi peptidica, con una produzione omogenea di molecole citrullinate. La ciclizzazione degli antigeni infine rappresenta un ulteriore miglioramento nel riconoscimento di epitopi conformazionali con aumento della sensibilità del test⁴¹⁻⁴³.

I kit di seconda e terza generazione per la misurazione degli anticorpi anti-CCP attualmente in commercio utilizzano tutti lo stesso substrato antigenico, ma differiscono per il tipo di coniugato, i tamponi di diluizione e di lavaggio e la concentrazione dei calibratori. In ogni caso la loro sensibilità e specificità diagnostica è largamente

mente sovrapponibile⁴⁴.

Per l'identificazione degli ACPA sono state proposte anche metodiche di line-immunoassay, il cui antigene è costituito da filaggrina citrullinata ricombinante murina, dotate di una elevata specificità ma non di adeguata sensibilità (circa il 60%). Recentemente è stato messo a punto da ricercatori italiani un test che impiega come antigene un peptide di derivazione virale, da sequenze dell'antigene EBNA-1 del virus di Epstein Barr⁴⁵. Per questi test però non sono ancora disponibili studi su vaste casistiche cliniche per cui, per il momento, non sono ancora da considerare utilizzabili come unico test per la determinazione degli ACPA nella pratica clinica.

Valore diagnostico degli ACPA

Gli ACPA presentano le migliori performances diagnostiche tra tutti gli anticorpi AR-associati^{46,47}. Gli attuali metodi di seconda e terza generazione per la misurazione degli ACPA hanno dimostrato di avere una sensibilità diagnostica attorno o superiore all'80% a seconda delle caratteristiche della popolazione in esame, comparabile o superiore a quella del FR, e una specificità nettamente superiore a quella del FR (>97%). Ciò anche nei pazienti anziani, in cui maggiore è la percentuale di false positività del FR. Inoltre, titoli medio-alti di ACPA sono da considerare altamente specifici e quindi un livello anticorpale elevato è fortemente associato all'AR^{42,48-52}.

A ragione della sua elevata specificità, il test è particolarmente utile nella diagnosi differenziale tra AR e altre forme clinicamente simili all'AR e che possono essere FR positive, come ad esempio, l'epatite cronica da virus C che presenta spesso una poliartrite simmetrica⁵³⁻⁵⁵, la sindrome di Sjögren^{50,56} e il LES⁵⁷.

Inoltre gli ACPA si sono rivelati di grande utilità in quanto possono essere presenti nel siero anche molti anni prima della diagnosi clinica di AR^{20,58}. Che la presenza di ACPA sia in grado di predire il successivo sviluppo di AR è stato dimostrato in numerosi studi che hanno evidenziato come la contestuale positività per il FR IgM e per gli ACPA sia in grado di selezionare quali pazienti con artrite precoce e non ancora definita svilupperanno AR^{41,59,60}.

Valore prognostico degli ACPA

Gli ACPA sembrano correlare con l'andamento della malattia; la loro presenza all'esordio viene considerata un fattore prognostico sfavorevole e depone per una forma di AR più aggressiva^{14,34,61,62}.

Gli ACPA hanno infatti dimostrato di possedere un elevato valore predittivo per lo sviluppo di lesioni articolari erosive^{5,49,61,63-67} e pertanto questo marcatore ha una notevole potenzialità clinica nel selezionare i pazienti con artrite precoce da sottoporre a trattamenti terapeutici aggressivi.

Il fatto che gli ACPA risultino positivi in circa il 20% delle AR FR-negative^{13,63,68,69} e che esista un 15-20% di

pazienti con AR che è positivo solo per il FR e non per gli ACPA comporta che l'uso combinato dei due test aumenti significativamente la sensibilità diagnostica dei test immunologici^{42,49,50}. La contemporanea positività per il FR e per gli ACPA aumenta inoltre la specificità e il valore predittivo positivo portandoli a valori prossimi al 100%^{58,70}.

Nonostante il loro elevato valore predittivo per l'artrite erosiva, non è ancora chiaro se gli ACPA siano un parametro utile nel monitoraggio della terapia che, d'altra parte, si è dimostrata particolarmente efficace nel limitare o ridurre la progressione delle lesioni erosive e nel migliorare la qualità di vita dei pazienti^{7,71}.

Mentre, in generale, i livelli di FR diminuiscono contestualmente al trattamento e al miglioramento del quadro clinico^{15,25,26,72,73}, i livelli di ACPA sembrerebbero ridursi di poco o rimanere immutati suggerendo che FR e ACPA rappresentino due sistemi anticorpali diversi^{24,65,73-75}.

Raccomandazioni per l'impiego clinico dei marcatori immunologici nella diagnosi di artrite reumatoide

- 1) La ricerca dei marcatori immunologici a scopo diagnostico va effettuata solo in presenza di sintomi clinici che suggeriscono l'AR.
- 2) Tra i numerosi marcatori immunologici disponibili, quelli che, allo stato attuale delle nostre conoscenze, dimostrano una sufficiente accuratezza diagnostica sono il FR-IgM e gli ACPA.
Per quanto riguarda gli altri autoanticorpi:
 - a) La ricerca degli APF e degli AKA in immunofluorescenza è da considerarsi superata e completamente sostituita dal test ACPA.
 - b) La ricerca di anticorpi anti-Sa può essere sostituita dalla ricerca degli ACPA, dal momento che gli epitopi riconosciuti dai due anticorpi sono gli stessi.
 - c) La ricerca degli anticorpi anti-RA33 potrebbe essere utile nell'individuare soggetti con AR sieronegativa per FR e ACPA. Tuttavia, la scarsa specificità del test ne consiglia per il momento l'utilizzo solo a scopi di ricerca.
- 3) La ricerca dei FR va effettuata:
 - a scopo diagnostico, anche se il test è dotato di bassa specificità, in quanto esistono casi di AR positivi solo per i FR.
 - a scopo prognostico, in quanto elevati livelli di FR sono predittivi di una maggior gravità dell'AR.
 - anche se alcuni studi suggeriscono che la concentrazione dei FR correla con l'attività di malattia, e che alcuni farmaci utili nella terapia dell'AR sono in grado di ridurre i livelli sierici dei FR, l'utilità del test per monitorare l'attività di malattia non è universalmente condivisa. Per il monitoraggio della AR, invece, i parametri ematochimici più utili sono la proteina C reattiva (PCR) e la velocità di eritrosedimentazione (VES).

- 4) La ricerca di FR di isotipo differente dall'IgM va effettuata in genere a scopo di ricerca.
- 5) La determinazione del FR dovrebbe essere eseguita con un metodo quantitativo e i dati espressi in UI/mL. Metodi qualitativi o semiquantitativi (Waller-Rose e sue varianti), che in passato venivano eseguiti come secondo test per il FR allo scopo di aumentarne la specificità e quindi il valore predittivo positivo, sono attualmente di minore utilità da quando è possibile associare la ricerca degli ACPA.
- 6) La ricerca degli ACPA va effettuata:
 - a scopo diagnostico perché gli ACPA risultano positivi in circa il 60-80% dei pazienti affetti da AR e nel 20% delle AR FR-negative.
 - nella diagnostica differenziale tra AR e altre forme cliniche con artrite. Inoltre, livelli anticorpali elevati sono da considerare ancor più specifici e fortemente associati all'AR.
 - a scopo prognostico perché la loro presenza all'esordio depone per una forma di AR più aggressiva e per un più rapido sviluppo di lesioni articolari erosive.
- 7) Per una corretta determinazione degli ACPA è opportuno utilizzare sieri di controllo positivi e negativi. I risultati, anche se ancora non è disponibile un siero internazionale di riferimento, è opportuno che vengano espressi in termini quantitativi (unità arbitrarie).
- 8) I metodi commerciali per la ricerca degli ACPA presentano diversi livelli di accuratezza diagnostica, per cui è necessario che vengano impiegati metodi che garantiscano le migliori caratteristiche di sensibilità e specificità.
- 9) Per un corretto iter diagnostico dell'AR viene consigliata la contemporanea esecuzione della ricerca di ACPA e di FR, in quanto l'uso combinato dei due test aumenta la sensibilità diagnostica e la contemporanea presenza di entrambi gli anticorpi aumenta la specificità e il valore predittivo positivo portandoli vicino al 100%.
- 10) Nel 10-15% circa dei soggetti affetti da AR non sono rilevabili FR o ACPA (AR sieronegative). Tuttavia, in alcuni casi, questi marcatori possono non essere presenti nelle fasi iniziali di malattia e comparire solo successivamente. Nei soggetti che siano risultati negativi a questi anticorpi e nei quali il sospetto clinico di AR rimanga elevato, può essere perciò utile ripetere la ricerca dei due marcatori a distanza di tempo.

Bibliografia

1. Salaffi F, De Angelis R, Grassi W; MArche Pain Prevalence INvestigation Group (MAPPING) study. Prevalence of musculoskeletal conditions in an Italian population sample: results of a regional community-based study. I. The MAPPING study. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23:819-28.
2. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines for the Management of

- Rheumatoid Arthritis 2002 Update. *Arthritis Rheum* 2002; 46:328-46.
3. 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.
 4. Saraux A, Berthelot JM, Chales G, Le Henaff C, Thorel GB, Hoang S, et al. Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. *Arthritis Rheum* 2001;44: 2485-91.
 5. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JMW. How to diagnose rheumatoid arthritis early. A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:357-65.
 6. O'Dell JR. Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity? *Arthritis Rheum* 2002; 46:283-5.
 7. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Furst D, Weisman MH, et al. Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with Infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1051-65.
 8. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1601-11.
 9. Valesini G, Riccieri V, Bizzaro N. L'artrite reumatoide. In: Tozzoli R, Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, eds. *La diagnosi di Laboratorio delle Malattie Reumatiche Autoimmuni*. Bologna: Esculapio Editore; 2007. pp. 413-31.
 10. Muic V, Dezelic G, Dezelic N, Richter B. A photometric latex test for rheumatoid factors. *Scand J Rheumatol* 1972; 1:181-7.
 11. Jones CE, Rousseau RJ, Maxwell KW. Quantitation of rheumatoid factor activity by nephelometry. *Am J Clin Pathol* 1979; 72:432-6.
 12. Anderson SG, Bentzon MV, Houba V, Krag P. International reference preparation of rheumatoid factor. *Bull WHO* 1970; 42:311-8.
 13. Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M, Forger F, Siebert U, Helmke K. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1079-84.
 14. Berglin E, Johansson T, Sundin U, Jidell E, Wadell G, Hallmans G, Rantapää-Dahlqvist S. Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:453-8.
 15. Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Alpini C, Avalle S, Epis OM, Klersy C, et al. High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:302-7.
 16. Børretzen M, Mellbye OJ, Thompson KM, Natvig JB. Rheumatoid factors. In: Peter JB and Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*, 1996, Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 706-15.
 17. van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 2002;4:87-93.
 18. Shmerling RH, Delbanco TL. The Rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *Am J Med* 1991; 91:528-34.
 19. Aman S, Palmela L, Leirisalo-repo M, Risteli J, Kautiainen N, Helve T, et al. Prediction of disease progression in early rheumatoid arthritis by ICTP, RF, and CCP. A comparative 3-years follow-up study. *Rheumatology* 2000; 39: 1009-13.
 20. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2741-9.
 21. Wested ML, Herbrink P, Molenaar JL, de Vries E, Verlaan P, Stijnen T, et al. Rheumatoid factors in rheumatoid arthritis and vasculitis. *Rheumatol Int* 1985; 5:209-14.
 22. Teitsson I, Withrington RH, Seifert MH, Valdimarsson H. Prospective study of early rheumatoid arthritis. I. Prognostic value of IgA rheumatoid factor. *Ann Rheum Dis* 1984; 43:673-87.
 23. Alarcon GS, Schrohenjoher RE, Bartolucci AA, Ward JR, Williams HJ, Koopman WJ. Suppression of rheumatoid factor production by metotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Evidence for differential influences of therapy and clinical status on IgM and IgA rheumatoid factor expression. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1156-61.
 24. Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avalle S, Bugatti S, Montecucco C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:R264-R272.
 25. Spadaro A, Riccieri V, Sili Scavalli A, Taccari E, Zoppini A. One year treatment with low dose methotrexate in rheumatoid arthritis: effect on class specific rheumatoid factors. *Clin Rheumatol* 1993; 12:357-60.
 26. Alessandri C, Bombardieri M, Papa N, Cinquini M, Magrini L, Tincani A, et al. Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1218-21.
 27. Nell VPK, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, et al. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1731-6.
 28. Nienhuis RLF, Mandema EA. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23:302-5.
 29. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979; 2:97-9.
 30. Sondag-Tschroots IRJM, Aaij G, Smit JW, Feltkamp TEW. The antiperinuclear factor. I. The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1979; 38:248-51.
 31. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2:236-43.
 32. Vincent C, Serre G, Lapeyre F, Fournié B, Ayrolles C, Fournié A, et al. High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus

- epithelium, so-called 'antikeratin antibodies'. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:712-22.
33. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995; 95:2672-9.
 34. Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101:273-81.
 35. Girbal-Neuhausser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999; 162:585-94.
 36. Després N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Ménard HA. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21:1027-33.
 37. Hueber W, Hassfeld W, Smolen JS, Steiner G. Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; 38:155-9.
 38. Palosuo T, Lukka M, Alenius H, Kalkkinen N, Aho K, Kurki P, 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; 115:294-302.
 39. Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:R142-50.
 40. van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2:249-51.
 41. Vittecoq O, Incaugarat B, Jouen-Beades F, Legoedec J, Letourneur O, Rolland D, et al. Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2004; 135:173-80.
 42. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2001; 47:1089-93.
 43. van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TW. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first- and second anti-cyclic citrullinated peptides autoantibody (CCP1 and CCP2) tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1510-2.
 44. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta V. Analytical and diagnostic characteristics of 11 second- and third-generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clin Chem* 2007; 53:1527-33.
 45. Anzilotti C, Merlini G, Pratesi F, Tommasi C, Cimenti D, Migliorini P. Antibodies to viral citrullinated peptide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006; 33:647-51.
 46. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43:155-63.
 47. Bizzaro N. Antibodies to citrullinated peptides: a significant step forward in the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:150-7.
 48. Dubucquoi S, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerie L, Sibilia J, Goetz J, et al. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:415-9.
 49. De Rycke L, Peene I, Hoffman IE, Kruihof E, Union A, Meheus L, et al. Rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1587-93.
 50. Sauerland U, Becker H, Seidel M, Schotte H, Willeke P, Schorat A, et al. Clinical utility of the anti-CCP assay. Experiences with 700 patients. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1050:314-8.
 51. Palosuo T, Tilvis R, Strandberg T, Aho K. Filaggrin related antibodies among the aged. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:261-3.
 52. Matsui T, Shimada K, Ozawa N, Hayakawa H, Hagiwara F, Nakayama H, et al. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006; 33:2390-7.
 53. Leone N, Pellicano R, Ariata Maiocco I, Modena V, Marietti G, Rizzetto M, et al. Mixed cryoglobulinaemia and chronic hepatitis C virus infection: the rheumatic manifestations. *J Med Virol* 2002; 66:200-3.
 54. Wener, MH, Hutchinson, K, Morishima, C, Gretch, DR. Absence of antibodies to cyclic citrullinated peptide in sera of patients with hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2305-8.
 55. Bombardieri M, Alessandri C, Labbadia G, Iannuccelli C, Carlucci F, Ricciari V, et al. 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:R137-R141.
 56. Gottenberg JE, Mignot S, Nicaise-Rolland P, Cohen-Solal J, Aucouturier F, Goetz J, et al. Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:114-7.
 57. Mediwake R, Isenberg DA, Schellekens GA, van Venrooij WJ. Use of anti-citrullinated peptide and anti-RA33 antibodies in distinguishing erosive arthritis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:67-8.
 58. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHM, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50:380-6.
 59. Jansen LM, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma IE, van der Stadt RJ, de Koning MHM, Dijkman BAC. The predictive value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in early arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30:1691-5.
 60. van Gaalen FA, Linn-Rasker S, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to

- cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:709-15.
61. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:120-6.
 62. Forslind K, Ahlmen M, Eberhardt K, Hafstrom I, Svensson B. Prediction of radiological outcome in early RA in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1090-5.
 63. Kroot E, de Jong BAW, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FHJ, van 't Hof M, et al. The prognostic value of the anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1831-5.
 64. Saraux A, Berthelot JM, Devauchelle V, Bendaoud B, Charles G, Le Henaff C, et al. Value of antibodies to citrulline-containing peptides for diagnosing early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30:2535-9.
 65. Vencovský J, Macháček S, Šedová L, Kafková J, Gatterová J, Pesaková V, et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:427-30.
 66. Jansen AL, van der Horst-Bruinsma IE, van Schaardenburg D, van de Stadt RJ, de Koning MHM, Dijkmans BAC. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptide differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29:2074-6.
 67. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during three years in early rheumatoid arthritis (the TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1085-9.
 68. van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 2002; 60:383-8.
 69. Quinn MA, Gough AK, Green MJ, Devlin J, Hensor EM, Greenstein A, et al. Anti-CCP antibodies measured at disease onset help identify seronegative rheumatoid arthritis and predict radiological and functional outcome. *Rheumatology* 2006; 45:478-80.
 70. 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* 2003; 42:677-80.
 71. Nell V, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004; 43:906-14.
 72. Mikuls TR, O'Dell JR, Stoner JA, Parrish LA, Arend WP, Norris JM, et al. Association of rheumatoid arthritis treatment response and disease duration with declines in serum levels of IgM rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3776-82.
 73. De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, van den Bosch F, Hoffman IEA, Veys EM, et al. Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by Infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:299-302.
 74. Lequerre T, Jouen F, Brazier M, Clayssens S, Klemmer N, Ménard JF, et al. Autoantibodies, metalloproteinases and bone markers in rheumatoid arthritis patients are unable to predict their responses to infliximab. *Rheumatology* 2007; 46:445-53.
 75. Spadaro A, Riccieri V. Methotrexate effect on anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1241-2.