

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**CITRULLINÁLT PROTEINEK/PEPTIDEK ELLENI
AUTOANTITESTEK (ACPA) RHEUMATOID
ARTHRITISBEN**

Dr. Soós Lilla



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2009**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
1.1. A rheumatoid arthritisről és diagnosztikájáról röviden.....	3
1.2. A citrullinált protein/peptid antitestek (ACPA) története	4
1.3. A szöveti citrullináció és anti-citrullin autoimmunitás lényege.....	5
1.4. Az ACPA-k fajtái.....	7
1.4.1. Anti-ciklikus citrullinált peptid (anti-CCP).....	7
1.4.2. Anti-mutáns citrullinált vimentin (MCV)	8
1.4.3. Citrullinált fibrinogén (CF) és fibrin.....	8
1.4.4. Citrullinált α -enoláz peptid.....	9
1.4.5. Viralis citrullinált peptidek (VCP).....	9
1.4.6. Egyéb deiminált autoantigének	10
1.5. Az ACPA-k komplex pathogenetikai szerepe.....	10
1.5.1. MHC és non-MHC gének összefüggései az ACPA termeléssel.....	10
1.5.2. Összefüggés környezeti, életmódi tényezőkkel.....	12
1.6. Az ACPA betegségsspecifitása.....	13
1.7. Az ACPA prediktív és prognosztikai jelentősége.....	14
1.7.1. Az ACPA mint preklinikai és korai prediktív marker	14
1.7.2. Az ACPA termelés prognosztikai jelentősége kialakult RA-ban.....	15
1.8. Autoantitest-szintek változása a betegségfolyás során és a terápia hatására.....	16
1.8.1. ACPA termelés korai arthritiben és a betegség előrehaladtával.....	16
1.8.2. A biológiai terápia és az ACPA termelés összefüggései.....	17
2. Célkitűzések.....	19
3. Betegek és módszerek.....	20
3.1. Betegek.....	20
3.2. ACPA és RF meghatározás.....	20
3.3. HLA-DRB1 genotipizálás.....	21
3.4. Statisztikai analízis.....	22
4. Eredmények.....	23
4.1. Anti-MCV autoantitestek vizsgálata.....	23
4.1.1. Anti-MCV termelés az egyes beteg- és kontrollcsoportokban.....	23
4.1.2. Az anti-MCV, anti-CCP2 és RF tesztek diagnosztikus teljesítménye, a gyártó által ajánlott cutoff értékeket használva.....	24

4.1.3. Az anti-MCV és anti-CCP2 tesztek diagnosztikus teljesítménye optimalizált cutoff értékeket használva.....	25
4.1.4. Az anti-MCV, anti-CCP2 és IgM RF pozitivitás közti összefüggés.....	26
4.1.5. Összefüggés az anti-MCV és a HLA-DRB1 hordozás között.....	28
4.2. Anti-CCP2 izotípusok vizsgálata RA-ban.....	29
4.2.1. IgA és IgM anti-CCP2 izotípusok termelése.....	29
4.2.2. Az IgA és IgM és IgG anti-CCP2 antitestek gyakorisága RA-ban.....	32
4.2.3. Az anti-CCP2 antitestek és RF-k különféle izotípusai közti asszociáció.....	33
4.2.4. Az anti-CCP2 izotípusok összefüggései a HLA-DRB1 SE hordozással.....	33
4.2.5. Az anti-CCP2 izotípusok és a betegségfennállási idő összefüggései.....	34
4.3. A harmadik generációs anti-CCP3 és anti-CCP3.1 ELISA vizsgálata.....	34
4.3.1. Az anti-CCP3.1 pozitivitás gyakorisága RA-ban és kontrollokban.....	34
4.3.2. Az anti-CCP3.1 teszt diagnosztikus hatékonysága a gyártó által megadott cutoff értékek szerint.....	35
4.3.3. Az anti-CCP3 és az anti-CCP3.1 teszt diagnosztikus teljesítménye optimalizált cutoff értékek szerint.....	36
4.3.4. Az anti-CCP3.1 és anti-CCP2 termelés összefüggései.....	36
5. Megbeszélés.....	38
5.1. Anti-MCV autoantitest vizsgálata.....	38
5.2. Anti-CCP2 izotípusok vizsgálata.....	40
5.3. Anti-CCP3 és -CCP3.1 teszt vizsgálata.....	42
6. Összefoglalás - Új eredmények.....	44
7. Summary.....	45
8. Irodalomjegyzék.....	46
9. Tárgyszavak és rövidítések listája.....	61
10. Köszönetnyilvánítás.....	62
11. Publikációs lista.....	63

1. Bevezetés

1.1. A rheumatoid arthritisről és diagnosztikájáról röviden

A rheumatoid arthritis (RA) autoimmun patogenezisű krónikus gyulladással sokízületi megbetegedés, amely földrajzi hovatartozástól függően, a populáció 0,3-2%-át, átlagosan 1%-át érinti (1,2). A klinikailag klasszikusan szimmetrikus polyarthritissel járó, időnként szisztémás tüneteket is mutató kórkép háttérében genetikai, környezeti és autoimmun mechanizmusok állnak. Ezek következtében krónikus, nem specifikus synovitis alakul ki, mely a gyulladással sejtek és mediátorok révén, megfelelő kezelés hiányában, előbb-utóbb az ízületek tönkremeneteléhez, funkcionális károsodáshoz, esetenként rokkantsághoz vezethet (2,3). A modern diagnosztikus lehetőségek és a hatékony terápiás arzenál bevezetésével a betegség prognózisa az utóbbi években jelentősen javult. A kezelés célja ma már nem csupán a tünetek (fájdalom és gyulladás) csillapítása, esetleg részleges klinikai javulás, hanem a strukturális károsodások megelőzése, akár a teljes remisszió, valamint a funkció és életminőség optimalizálása is reális célt jelenthet (1,2).

Sajnos mindez valóban csupán az elmúlt egy-két évtizedben vált elérhetővé. Korábban sem megbízható és specifikus laboratóriumi módszerrel, sem az ízületi károsodást korán kimutató képalkotó eljárással nem rendelkezünk, és a nemcsak klinikailag hatékony, hanem a struktúrát és funkciót hosszabb távon is megőrző betegségmódosító terápia és újabban a biológiai terápia is csak a közelmúltban vált szélesebb körben elérhetővé (2,4-7). A tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) gátlók mellett a B sejtekre, a T sejt kostimulációra ható szerek, legújabbán pedig az interleukin-6 (IL-6) működését gátló antitest is bevezetésre kerültek (2,4-7). Nyilvánvaló, hogy nemcsak az RA kialakulásának feltérképezése és a korszerű diagnosztikai eljárások bevezetése kedvezett a jobb terápiás eredményeknek, hanem fordítva, az igen hatékony, de sokszor költséges új gyógyszerek piaci megjelenése is rámutatott a korai, pontos diagnosztika szükségességére (2).

Ami a laboratóriumi diagnosztikát illeti, az 1960-as évekig csupán a reumatoid faktor (RF) állt rendelkezésre, mint labordiagnosztikai lehetőség. Az IgM izotípusú RF igen szenzitív, de alacsony specificitású markernek bizonyult, mely az RA mellett más reumatológiai kórképekben, tuberkulózisban, egyéb krónikus fertőzésekben, sőt az egészséges, idős populáció 5-10%-ában is pozitívnak bizonyult (8,9). Nyilvánvalóvá vált,

hogy egyéb, specifikusabb biomarkerre van szükség, ez azonban csupán egy évtizede áll rendelkezésünkre.

1.2. A citrullinált protein/peptid antitestek (ACPA) története

Az igazi nagy áttörést a szöveti citrullináció és a citrullinált fehérjék és peptidek elleni autoantitestek (anti-citrullinált protein/peptid antitestek, ACPA) megismerése jelentette (8,10-17). Bebizonyosodott, hogy az ACPA a genetikai tényezőkkel és a környezeti faktorokkal (elsősorban a dohányzással) együttműködve közvetlenül részt vesz az RA kialakulásában (10,11,17-19). Emellett azonban az ACPA igen specifikus laboratóriumi diagnosztikai, valamint fontos prognosztikai marker is. A RA lényegében két alcsoportra osztható ACPA pozitivitás illetve negativitás alapján (10,11,17). Úgy tűnik, a klinikai lefolyás, prognózis tekintetében ennek van a legnagyobb szerepe.

Az ACPA-elődök közül az anti-perinukleáris faktort (APF) már 1964-ben felfedezték, mint az RA korai, kb. 90% specificitású markerét (8,9,20). Sajnos kimutatása technikailag igen nehéz volt: a buccális nyálkahártya hámsejtjeinek indirekt immunfluoreszcens vizsgálatával történt. Ráadásul a donor személyek mindössze 10%-a (volt) alkalmas megfelelő nyálkahártya-preparátum készítésére (9).

Az APF által felismert antigén azonosítása sokáig váratott magára. A következő lépés a patkány nyelvőcső elszarusodó hámrétegével reagáló anti-keratin antitest (AKA) felfedezése volt, 1979-ben (21). Az AKA az APF-hez hasonlóan kevésbé szenzitív, viszont magas specificitású marker, mely nemcsak az RA korai szakában, hanem már a preklinikai stádiumban megjelenik (22). Később derült ki, hogy mind az AKA, mind az APF antigén-specificitása a filaggrin („filament-aggregating protein”), amely a keratinhoz kötődve van jelen az elszarusodó hámsejtekben (23).

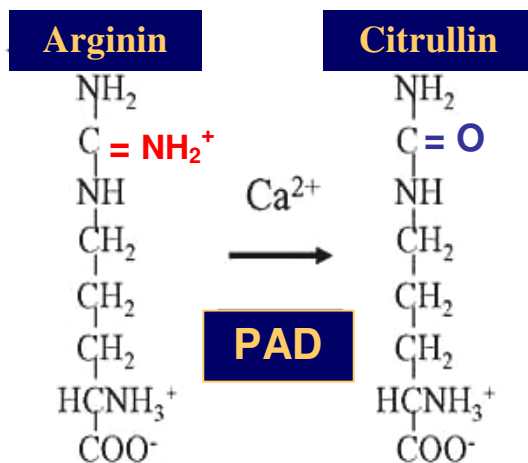
Ezután 1994-ben egy új RA-specifikus autoantitestet azonosítottak, amelyet a beteg neve után anti-Savoie (anti-Sa) antitestnek neveztek el (24). Az új antitest 92-98%-os specificitást mutatott, vagyis gyakorlatilag nem volt kimutatható egyéb autoimmun-reumatológiai kórképekben illetve egészségesekben (25). Az anti-Sa volt az első autoantitest, amely nemcsak magas diagnosztikus értékű volt, hanem már prognosztikai jelentőséget is tulajdonítottak neki, ugyanis a szeropozitív betegekben súlyosabb lefolyású betegség alakult ki (9,25). Az anti-Sa kimutatása Western blot-tal történt; antigénként lép- és placenta kivonatot használva, az antitest egy kb. 50 kDa tömegű ismeretlen molekulával reagált az

immunobloton. Később, a citrullinált antigének jelentőségének felismerése után, az anti-Sa antigénjeként a citrullinált vimentint (CV) azonosították 2004-ben (26).

1.3. A szöveti citrullináció és anti-citrullin autoimmunitás lényege

A citrullin az arginin poszt-transzlációsan módosított, deiminált változata (1. ábra). Az argininből a peptidilarginin-deimináz (PAD vagy PADI) enzim hatására képződik citrullin. A PAD (vagy PADI) enzimnek emlősökben öt változata ismert, a PAD1-4 és PAD6 (14,15,27-29).

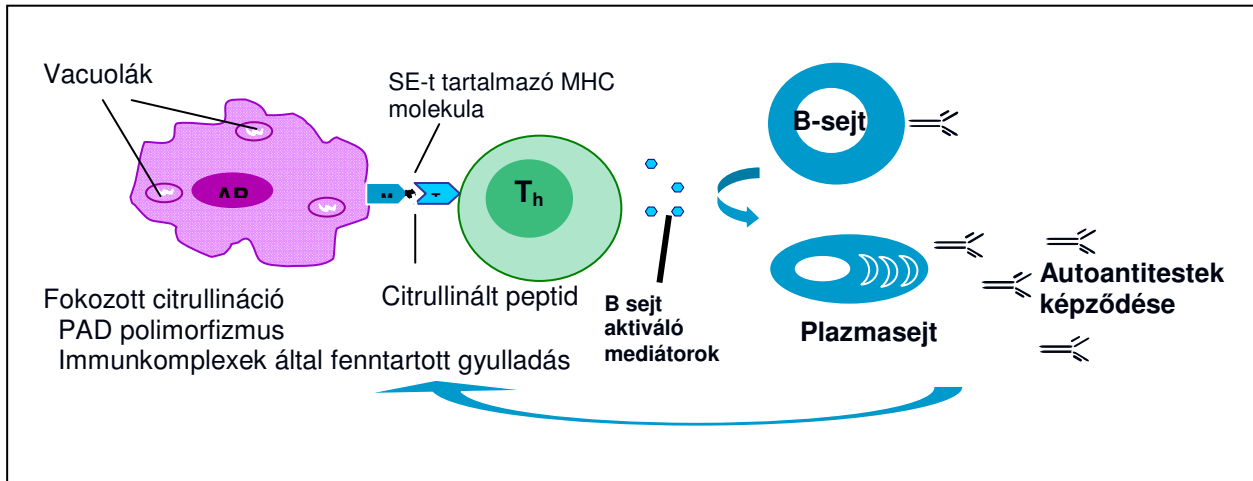
1. ábra Az arginin-citrullin átalakulás



A szöveti citrullináció élettani folyamat, mely az epitheliális sejtek keratinizációja, gyulladás és apoptózis során figyelhető meg (14,16,27,30-33) (2. ábra). A gyulladásos reakcióban résztvevő leukocyták, így a T és B sejtek, szöveti makrofágok, neutrophil granulocyták, valamint a synovialis fibroblastok is expresszálják a citrullináló enzim PAD2 és PAD4 izoformáit (28,29,34,35). A normál synovialis membrán kevés citrullinált fehérjét tartalmaz (29,34). Ezzel szemben a synovitist fokozott citrullináció jellemzi (29,33,34). A citrullinált epitópok *in vivo* elsősorban a gyulladt synovium extravasalis fibrin depozitumaiban illetve extracelluláris fibrinogén aggregátumaiban halmozódnak fel (24,33,35,36). Emellett a jelenlévő nagyszámú makrofágban is citrullináció zajlik: a gyulladás illetve apoptózis az intracelluláris vimentin citrullinációját indukálja (26). A citrullinált autoantigének és a PAD2 az arthritises synoviumban kolokalizációban mutatható ki (36). Az

RA-s synovialis membránban a felszíni réteg és az ez alatti interstitium sejtjei, valamint a fibrin depozitumok tartalmaznak citrullinált fehérjéket (24). A synovialis membrán mellett a

2. ábra A szöveti citrullináció és az ACPA termelés folyamata



synovialis folyadékban is intenzív autoantigén citrullináció zajlik. A folyadékban PAD2 és PAD4 enzimeket detektáltak (37). Mivel a filaggrin egy epidermális protein, amely az ízületekben nincs jelen, nyilvánvalóan nem ez indítja el az autoantitest választ. Más citrullinált fehérjék, mint a fibrin vagy a vimentin viszont az RA-s synoviumban is megtalálhatók, és előszeretettel deiminálódnak, citrullinálódnak (33,38-40). A citrullinált fibrin (CF), mint szolubilis autoantigén, kimutatható az RA-s synovialis folyadékban is (25). *In vivo* a fibrin α és β láncainak deiminált változatát tartják a fő autoantigénnek, mely az ACPA termelést kiváltja (38). Mindezt alátámasztja, hogy a filaggrin és a CF elleni autoantitestek között keresztreaktivitás figyelhető meg (40,41). Bár a legtöbb vizsgálat arra utal, hogy a synoviumban a citrullinált fehérjék expressziója RA-specifikus (2,8,10,11,27,42), a szöveti citrullináció valószínűleg egyéb eredetű arthritisekben, ha kisebb mértékben is, ugyancsak előfordul (24,43).

A synovialis citrullinált fehérjék *in vivo* autoimmun választ indukálnak. A B sejtek antigén-indukált proliferációja figyelhető meg a gyulladt szövetekben, így az RA-s synoviumban is. A synovialis folyadékban található $CD38^+$ B sejtekre a szomatikus hipermutáció és klonális szelekció jellemző (45). Az ACPA termelő plazmasejtekben csökkent $CD95$ expresszió és defektív apoptózis figyelhető meg (46). Az ACPA⁺ RA-s betegek synovialis szövettenyészetek felülúszójában szignifikáns mennyiségű autoantitest mutatható ki (29), és az ACPA IgG 7,5-szörös mennyiségben van jelen az RA-s pannusban a szérumhoz viszonyítva (29). Az anti-CCP⁺ betegek izolált synovialis folyadék B sejtjei *in*

vitro IgM izotípusú anti-CCP-t termelnek (33). Mindezek az adatok arra utalnak, hogy az ACPA-t lokális synovialis plazmasejtek termelik, és az autoantitestek megjelennek a synovialis folyadékban is (29,33). Az ACPA-k nemcsak passzív szemlélői (“innocent bystander”) az RA-t kísérő autoimmun folyamatnak, hanem maguk is közvetlenül részt vesznek a betegség pathogenezisében (47,48). A lokálisan termelődő autoantitestekből immunkomplexek képződnek, amelyek monocyta és neutrophil aktivációt illetve TNF- α termelést indukálnak és ezáltal részt vesznek a synovitis beindításában és fenntartásában (47-49). Ugyancsak a B sejtek által termelt ACPA szerepére utal, hogy a B sejt deplécióról alapuló biológiai terápia (anti-CD20 antitest, rituximab) igen hatékony RA-ban (50-52). Saját vizsgálataink bizonyították, hogy az IgD⁺/CD27⁺ és IgD⁻/CD27⁺ memória B sejtek fokozott, betegség-tartammal szignifikánsan összefüggő akkumulációja figyelhető meg RA-s betegek perifériás vérében (44), ami folyamatos, antigén-indukált immunválasz jelenlétére utal.

1.4. Az ACPA-k fajtái

1.4.1. Anti-ciklikus citrullinált peptid (anti-CCP)

A citrullin az anti-filaggrin antitestek által felismert fehérjeépítőpók esszenciális alkotórészének bizonyult (8,42). A filaggrin molekula citrullinált epitopjainak feltérképezése során felismerték, hogy a különböző betegek szérumában jelenlévő autoantitestek több különböző citrullinált epitóppal képesek reagálni, és egyéni epitop-reaktivitási mintázatok azonosíthatók (42). A leggyakrabban felismert, és legerősebb autoantitestválaszt kiváltó peptidek alkalmazásával szilárd fázisú immunoesszét fejlesztettek ki. Az első ACPA ELISA-k lineáris peptideket tartalmaztak, majd felismerték, hogy a szenzitivitás tovább növelhető ciklikus peptidek kialakításával. Mindez az első generációs anti-CCP assay-k kidolgozásához és kereskedelmi forgalomba való kerüléséhez vezetett (43). Később a módszert még érzékenyebbé tették több- illetve másféle citrullinált peptidek alkalmazásával, és ezáltal újabb generációs (CCP2, CCP3) ELISA-k, valamint ezek még tovább fejlesztett változatai (pl. CCP3.1) kerültek forgalomba. Ezek a tesztek az ACPA-k kvantitatív meghatározására alkalmasak, de a közelmúltban egyszerű, csupán ACPA szeropozitivitást jelző, de ambulanciákon vagy a betegágy mellett is alkalmazható gyorsesztek is megjelentek a piacon (8).

Az anti-CCP kifejlesztése a RA laboratóriumi diagnosztikájában hasonló mérföldkönek tekinthető, mint a RF felfedezése. Az RA betegek 60-70%-a anti-CCP⁺

(8,10,12,13,53). Számos tanulmány adatai alapján az anti-CCP a RF-hoz hasonló szenzitivitású (kb. 70%), de annál jóval specifikusabb (95-98% versus 80-90%) teszt (13,53,54). Az anti-CCP a RF esetek 20-30%-ában is pozitív (55), és gyakran már az első tünetek megjelenése idején, vagy azt megelőzően is jelen van (8,10,13,56).

1.4.2. *Anti-mutáns citrullinált vimentin (MCV)*

A fentiekben már említettük, hogy az anti-Sa antitestről a közelmúltban kiderült, hogy targetje a CV. A vimentin elsősorban mezenchimális sejtekben jelen levő intermedier filamentum. Összesen 43 arginint tartalmaz, így bőven van lehetőség a citrullinációra. A vimentint az apoptotikus macrophagokban a PAD4 enzim citrullinálja (49,60). Mivel macrophagok nagy számban vannak jelen az RA-s szinoviumban, így lehetőség nyílik citrullinált autoantigének lokális képződésére (60,61). Mivel RA-s szinoviumban az eredetitől eltérő szekvenciájú, módosított citrullinált vimentin jelenlétét mutatták ki, az anti-Sa kimutatására a közelmúltban kifejlesztett ELISA tesztben *in vitro* előállított, mutáns citrullinált vimentin antigént (MCV) használtak. Az anti-MCV teszt jelentőségét eddig csak néhány kutatócsoport értékelte. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy az anti-MCV autoantitestet főleg az anti-CCP⁺ betegek szérumában van jelen, ugyanakkor, az anti-CCP⁻ esetek bizonyos százaléka anti-MCV⁺. Az anti-MCV ELISA szenzitivitása kb. 5-8%-al magasabb, mint az anti-CCP teszté, vagyis az ACPA család olyan új tagja, amely szignifikánsan javítani képes a laboratóriumi diagnosztika hatékonyságát (39,62,63) (2. táblázat). Amíg az anti-MCV az RA-s betegek nagy százalékában kimutatható, a betegek egészséges rokonaiból szinte teljesen hiányzik (59). Prediktív és prognosztikai értéke ma még kevésbé ismert (64). Magunk elsők között vizsgáltuk e tekintetben az anti-MCV tesztet.

1.4.3. *Citrullinált fibrinogén (CF) és fibrin*

A filaggrin maga nem expresszálódik az RA-s ízületben ezért önmagában *in vivo* nem lehet felelős az ACPA termelődésért. A betegek kb. 70%-ában azonban CF, illetve ezzel szembeni autoantitest (anti-CF) mutatható ki a szinoviumban illetve szérumban (29,33,53,65). Elsősorban saját készítésű ELISA assay-k használatával többen igazolták az anti-CF autoantitestek jelenlétét az RA-s betegek szérumában (59,66-68) és szynovialis folyadékában (65). Ezen mérések teljesítménye nagyban hasonló volt az anti-CCP2 ELISA-hoz (67,68). Az anti-CF viszont gyakorlatilag negatív RA betegek egészséges rokonaiban (59).

Fibrinből származó 71 citrullinált, 15-mer peptid, öt filaggrin peptid és ACPA⁺ RA-s szérumok segítségével 18 olyan epitópot mutattak ki a fibrin peptideken, amelyek keresztreakciót mutatnak filaggrin epitopokkal. Mindez valóban alátámasztja, hogy ugyanazon ACPA antitestek egyszerre különböző eredetű citrullinált epitópokkal, jelen esetben citrullinált filaggrinnal és fibrinnel egyaránt reagálhatnak (40).

1.4.4. Citrullinált α -enoláz peptid

A *Porphyromonas gingivalis* baktérium által termelt α -enoláz a RA synoviumban is kimutatható és potenciális autoantigénként szerepel (69,70). PAD enzimmel kezelt myeloid HL-60 sejtlizátumból izoláltak α -enolázt és az RA-s betegek 46%-ának széruma keresztreakált ezen enzimmal (70). Az immunológiailag domináns epitóp a citrullinált α -enoláz peptid 1. Az ezen peptid ellen termelt autoantitest RA betegek 37-62%-ában mutatható ki a szérumból, míg egészséges kontrollokban és nem RA-s arthritisekben csupán az esetek 2-3%-ában (53,69,71,72). A peptid 82%-os homológiát mutat a bakteriális enzimmel (69). A citrullináció igen fontos, mert a nem citrullinált α -enoláz antigenicitása elhanyagolható (71,72). A *gingivalis* baktérium által termelt enoláz peptid tehát autoantigénként szerepelhet RA-ban is. Sajnos az α -enoláz elleni autoantitest kevésbé specifikus RA-ra, mivel hasonló százalékban SLE-ben (27%), lupus nephritisben (66%) és sclerodermában (30%) is kimutatták (73). Újabban egyre többet foglalkoznak az RA és a periodontitis összefüggéseivel, amelyben a szájüregi baktériumok által termelt α -enoláz szerepe perdöntő lehet (74).

1.4.5. Viralis citrullinált peptidek (VCP)

Bizonyos arginin-glicin (Arg-Gly) szekvenciákat tartalmazó viralis peptidek is deiminálódhatnak, VCP-k keletkezhetnek és ezáltal felismerhetővé válhatnak ACPA-k számára (75). Így az Epstein-Barr vírus nukleáris antigén 1 (EBNA-1) deiminációt követően valóban kötődik az RA-s betegek szérumában keringő ACPA-khoz (75). Az EBV-ből származó VCP elleni antitest az RA betegek 45%-ának, a kontrollok <5%-ának szérumában mutathatók ki (75). Az anti-VCP termelés egy korábbi tanulmány szerint korrelált az anti-CCP, RF szintekkel és a vérséjsüllyedéssel, de a betegség súlyosságával nem (75). Különböző izotípusú anti-VCP vizsgálata során 146 RA betegből a betegek 27%-a IgG, 3%-a IgA és 7,5%-a IgM izotípusú anti-VCP pozitivitást mutatott. A különböző izotípusok nem

mutattak összefüggést a klinikai lefolyással és a betegség tartammal. Ami a betegség specifitást illeti, az IgA anti-VCP szinte kizárólag RA-ban fordult elő, míg az IgM izotípust kis számban SLE-s, arthritis psoriaticás és kevert cryoglobulinaemiás betegekben is kimutatták. Az antigénhez való legszorosabb affinitást az IgG izotípus mutatta (76).

1.4.6. Egyéb deiminált autoantigének

Egy közelmúltban publikált vizsgálatban 110 korai (<6 hónap), kezeletlen RA-s betegben tömegspektrometriával kerestek újabb deiminált autoantigéneket. A szérumminták gélelektroforézise során összesen 10 csíkot találtak. Ezek között volt a heterogén nukleáris ribonukleoprotein (hnRNP), aldoláz, α -enoláz, calreticulin, 60 kDa hő sokkfehérje (HSP60) és BiP mint korábban már közölt, valamint a foszfoglicerát kináz 1 (PGK1), stressz-indukált foszfoprotein 1, far upstream element-binding protein 1 (FUSE-BP1) és FUSE-BP2 mint új autoantigén jelöltek. Ezek közül deiminált peptideket találtak az aldoláz, α -enoláz, PGK1, calreticulin, HSP60, FUSE-BP1 és -2 fehérjékben. Ezek tehát citrullináció révén autoantigénként viselkedhetnek (71).

A II. típusú kollagén C1 epitópja (C1III) szintén deiminálódhat. Egy 291 beteget tartalmazó vizsgálatban a betegek 41%-a mind anti-C1III⁺, mind anti- α -enoláz⁺ volt. Az anti-C1III nem mutatott keresztreaktivitást az anti-filaggrin és anti-CF autoantitestekkel (53).

1.5. Az ACPA-k komplex pathogenetikai szerepe

1.5.1. MHC és non-MHC gének összefüggései az ACPA termeléssel

Régóta ismert, hogy az RA iránti fogékonyság, valamint a progresszivitás szempontjából genetikai tényezőknek nagy szerepe van. Amíg RA betegekben az ACPA 91%-ban fordult elő, addig a betegek egészséges rokonaiban csupán 19%-ban (59). Ezen belül alapvető a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) II. osztályába tartozó humán leukocytá antigének (HLA) szerepe (30-32,77,78). Bizonyos HLA-DR típusok (HLA-DR1, -DR4), illetve ezen belül a HLA-DRB1 allélek harmadik hipervariábilis szakaszának egy rövid szekvenciája, az ún. „shared epitope” (SE) jelenléte szignifikánsan társul RA-hez (30-32,77-81). A SE nem csak a RA kialakulására, de súlyosabb lefolyású, destruktív betegség lefolyásra, és gyakoribb extraartikuláris tünetekre nézve is rizikófaktor (30-32,82-84). Az SE jelenléte szignifikánsan társul az ACPA termeléssel (31,32,78,85), amit magyar

betegekben is sikerült igazolni (78,80). A HLA-DRB1 allélek közül az ACPA termelés inkább a HLA-DRB1*04 (HLA-DR4), mintsem a HLA-DRB1*01 (HLA-DR1) allélekkel mutat összefüggést (12,53,78,80,86,87). Mint kiderült, a citrullinált epitopokat tartalmazó peptidek jobban illeszkednek és erősebb kötést alakítanak ki SE-t tartalmazó HLA-DRB1 allélek által kódolt fehérjékkel, mint az ugyanazon a helyen arginint hordozó peptidek (88). Egy vagy két SE allél hordozása szoros asszociációt mutat az ACPA pozitivitással (31,78,80,89,90). Mind az SE jelenléte, mind a magas ACPA szérumkoncentráció fontos prognosztikai tényező (lásd később), amelynek segítségével a várhatóan progresszívebb lefolyást mutató eseteket nagy valószínűséggel kiválaszthatjuk (11,40,43,78,81,89,91,92). Ezzel szemben a HLA-DR3 hordozás inkább az ACPA⁻ betegséggel állhat összefüggésben (89). Magunk korábban ugyancsak szignifikáns korrelációt találtunk a SE hordozás és az anti-CCP pozitivitás között (78,80). Ami talán még fontosabb, nemcsak az anti-CCP jelenléte, hanem annak abszolút koncentrációja is korrelál a HLA-DRB1-gyel (78,87). Magunk az ismert SE alléleken (HLA-DRB1*01 és DRB1*04) kívül egyéb DRB1 allélek és az ACPA termelés közti összefüggést is vizsgáltuk. Kiderült, hogy a HLA-DRB1*13 és DRB1*15 allélek hordozása is szignifikáns összefüggést mutat az ACPA termeléssel, míg a DRB1*03, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*11, DRB1*14 és DRB1*16 hordozás nem járt emelkedett szérum anti-CCP szinttel (78). Az anti-CCP mellett a SE az anti-CV (93-95) és anti-CF termelésre is predisponálhat (86).

Ami a nem HLA jellegű egyéb gének lehetséges szerepét illeti, az arginin epitopok citrullinálását végző PAD enzimek közül a PAD2 és PAD4 van jelen a gyulladós szinoviumban (34). Japán kutatók szignifikáns összefüggést mutattak ki bizonyos PAD4 polimorfizmusok és a RA között (15,96), amit később koreai (97) és észak-amerikai betegekben is sikerült kimutatni (98). A megfigyelés logikus kapcsolatot teremtené a genetikai háttér, az anti-CCP antitestek és a RA kialakulása között. Azonban kaukázusi populációkban nem sikerült ezt az összefüggést reprodukálni (99-102). Hazai vonatkozásban nem találtak összefüggést a PAD4_{92G/C} illetve PAD4_{104T/C} polimorfizmusok és az RA között. Ugyancsak nem volt kapcsolat a PAD4 SNP-k és az anti-CCP termelés között sem (80). Mindez arra utal, hogy az ázsiai és európai népek genetikai heterogenitása miatt mások lehetnek a RA-re hajlamosító gének is.

Számos adat utal arra, hogy a PTPN22 és CTLA4 génekben található egyes polimorfizmusok összefüggést mutatnak az RA iránti fogékonysággal (81,90,98,102-105). Magunk és mások kimutatták, hogy a PTPN22 gén C1858T allél (rs2476601) polimorfizmusa az anti-CCP illetve RF pozitív RA-val mutat összefüggést (90,103-105). Ugyanez igaz nem

differentiált arthritis és korai RA eseteire is (103,105). A PTPN22 1858T allél hordozása és az anti-CCP pozitivitás együttesen 100% (!) specificitást jelent az RA diagnózis szempontjából, és ez 8-szor magasabb prediktív értéket jelent, mint az SE-ACPA kombinációé (106). Ezzel szemben a CTLA4 gén rs3087243 polimorfizmusa nem kapcsolódott az ACPA termeléssel (90,102).

Az interferon reguláló faktorok (IRF) közül az IRF5 gén polimorfizmusát összefüggésbe hozták az SLE, majd néhány betegben az RA iránti fogékonysággal. Egy nagy kohorszban az IRF5 gén rs2004640 polimorfizmusa elsősorban az ACPA⁻ RA-val mutatott asszociációt, de kisebb mértékben hajlamosított ACPA pozitív RA-ra is (107). Ezen adatok arra utalnak, hogy bizonyos genetikai faktorok (HLA-DR3, IRF5 SNP-k) ACPA szeronegativitásra, és ezáltal enyhébb betegségfolyásra hajlamosíthatnak (89,107).

Az Fc γ receptorok számos immunológiai folyamatban részt vesznek. Egy munkacsoport az Fc γ receptor IIIA (Fc γ RIIIA) 158V/F SNP összefüggését vizsgálta az RA-val és az ACPA termeléssel. Összesen 945 RA betegben kimutatták, hogy a VV genotípus általában asszociált RA-val. Ezen belül a VV genotípus az ACPA⁺ betegséggel mutatott összefüggést (108).

Mindezek alapján a SE, valószínűleg egyéb MHC gének (HLA-DBP1, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*15) és non-MHC (PTPN22, IRF5, Fc γ RIIIA-158V/F) gének szoros összefüggésben állnak az ACPA pozitivitással. Az utóbbi évek kutatásai szerint ezek a gének valószínűleg nem direkt módon befolyásolják az RA iránti fogékonyságot és a betegség kimenetelét, hanem döntően az ACPA termelésen keresztül. A genetikai vizsgálatokban tapasztalt különbségek azt sugallják, hogy ezek az összefüggések különböző (kaukázusi, ázsiai) népcsoportokban eltérően jelenhetnek meg.

1.5.2. Összefüggés környezeti, életmódi tényezőkkel

Számos, elsősorban skandináv, francia és holland tanulmány jelent meg a környezeti tényezők, elsősorban a dohányzás, valamint a SE és ACPA termelés lehetséges összefüggéseiről. A dohányzóknak megnő az RA extraarticularis manifesztációinak (subcutan csomók, cardiovascularis komplikációk) gyakorisága, viszont a dohányzás úgy tűnik, nem mutat összefüggést a radiológiai progresszióval (19). A dohányzás serkenti a szöveti citrullinációt és ezáltal az ACPA termelést (19,109-113). Egy 515 SE homozigóta beteget magában foglaló dán vizsgálatban az ACPA⁺ RA kialakulásának rizikója erős dohányosokban (≥ 20 „doboz-év“) 53-szoros volt (111). Svéd, dán és francia munkacsoportok a dohányzás és

az ACPA termelés közti összefüggést csak SE hordozókban igazolták (19,109-114). A dohányzás SE hordozókban az anti-CCP abszolút mennyiségét is fokozza (87). Amikor a SE kópiaszámát vizsgálták, az ACPA⁺ RA kialakulásának rizikója nem dohányzó, SE heterozigótákban vagy dohányzó, SE negatívokban 2,4-2,8-szoros; dohányzó, SE heterozigótákban 7,5-szeres, míg dohányzó, SE homozigótákban 16-szoros volt (109-111,113). Érdekes, hogy amíg, mint láttuk, az MHC antigének közül általában leginkább a HLA-DRB1*04 allélek mutattak összefüggést az ACPA termeléssel, addig a dohányzás és MHC kapcsoltsága terén éppen fordítva, a HLA-DRB1*01 allélek mutatták a legszorosabb összefüggést dohányosokban az anti-CCP pozitivitással (87). A dohányzás nem mutat összefüggést a PTPN22 1858T allélhordozással az ACPA termelés tekintetében (19,102,113). A dohányzás kumulatív mennyisége arányos az anti-CCP pozitivitással illetve az ACPA titerrel is (109,113). A dohányzás tehát az RA egyik fő rizikófaktora, mely egyrészt fokozza a betegség iránti fogékonyságot, másrészt fennálló RA esetén a betegség progresszióját (109-111). A háttérben részben a szöveti necrosis és ennek talaján a szöveti citrullináció fokozódása, valamint a citrullinált epitópok szóródása (epitope spreading) állhat (109,112). Más életmódi, környezeti tényezők vonatkozásában, elsősorban skandináv (svéd és dán) betegekben azt találták, hogy amíg a születéskor magasabb testsúly és orális antikoncepciensek szedése fokozza az RA rizikóját, a vörös hús nagymértékű fogyasztása nem befolyásolja az RA iránti fogékonyságot, az alkohol, különösen a bor, valószínűleg védő hatású. A betegség rizikó szempontjából a D vitamin és az ösztrogénbevitel neutrális volt (18,109-111). SE homozigóta dán betegekben az anti-CCP⁺ RA kialakulásának rizikója sok kávét fogyasztókban (>5 csésze/nap) 53-szoros, antikoncepcienst szedőkben 45-szörös volt. A kevés alkohol fogyasztása (<10 italegység/hét) védő hatású volt, a rizikó -2-nek bizonyult. A elhízás az ACPA⁻ RA-ra hajlamosított (111).

1.6. Az ACPA betegségsspecifitása

Mint láttuk, az ACPA elsődlegesen RA-val asszociált, de ritkán egyéb reumatológiai kórképekben is előfordulhat. A spondylarthropathiákat tekintve, amikor psoriasisos, arthritis psoriaticás (PsA) és korai RA-s betegeket hasonlítottak össze, míg az RA-s betegek 74%-a anti-CCP⁺ volt, ezt PsA-s betegek mindössze 7%-ában, psoriasisos (de nem arthritises) betegek 0,7%-ában és az egészséges kontrollok 2%-ában észlelték (115). Egy másik, PsA és RA betegeket magában foglaló tanulmányban a szeropozitív RA betegek 97%-a, viszont a

PsA betegeknek mindössze 6%-a volt anti-CCP⁺ (116). Spondylitis ankylopoetica (SPA) tekintetében lényegében nincs értékelhető közlés. A közelmúltban viszont kiderült, hogy a spondylarthropathiák pathogenezisében kiemelt szerepet játszó HLA-B27 antigének, ezen belül a B*2705 és B*2709 altípusok citrullinálódnak és ez megváltoztatja az antigénprezentációs képességüket (117).

Az autoimmun kötőszöveti betegségeket tekintve SLE-ben írták még le az ACPA pozitivitást. Kínai lupusos betegekben az anti-CCP pozitivitást a betegek 14%-ában észlelték, és az ACPA pozitívitás elsősorban azon betegekben volt kimutatható, akiknek arthritisük is volt (118). Sclerodermában a betegek 3%-ában, RA-scleroderma overlap syndromában 86%-ban, míg ugyanezen kohorszban RA-ban 64%-ban észleltek ACPA pozitívítást (119). Munkacsoportunk 22 RA-scleroderma overlap beteget bemutató vizsgálatában minden beteg (100%) anti-CCP⁺ volt (120). Mint láttuk, az α -enoláz elleni autoantitest is igen magas százalékban SLE-ben (27%) és sclerodermában (30%) is kimutatható volt (73).

Nyilvánvalóan felmerül a kérdés, hogy az ACPA miért elsősorban RA-ban és RA overlap syndromákban termelődik, spondylarthropathiákban vagy primer kötőszöveti betegségekből csak igen kevés betegben. Bár a pontos magyarázatot nem ismerjük, a specificitás egyik oka az epitóp szóródás („epitope spreading”) lehet, melynek során a citrullinált antigének olyan kombinációja (filaggrin+fibrinogén+enoláz) jelenik meg az RA synoviumban, amely más arthritisekben nem (12,109,112). Másrészt, a SE és PTPN22 által meghatározott genetikai hajlam és a dohányzás ACPA termeléssel való összefüggéseit is csak RA-ban sikerült igazolni, így a genetikai és életmódi faktorok is hozzájárulhatnak az ACPA termelés RA-specificitásához (12,18,109,110,112).

1.7. Az ACPA prediktív és prognosztikai jelentősége

1.7.1. Az ACPA mint preklinikai és korai prediktív marker

A reumatológiai rendeléseken számos beteg korai, nem differenciált polyarthritisszel (NDP) jelentkezik. A betegek egy része definitív RA-s lesz, mások évekig megmaradnak az NDP fázisában, míg egy kis hányadban spontán remisszió következik be. Szükségünk van olyan biomarkerekre, melyekkel előre meg lehetne jósolni a kimenetelt (56,121,122). Ismeretes, hogy azokban az egyénekből, akiknél később RA alakul ki, az esetek nagy részében már évekkel korábban jelen lehet az anti-CCP (25% ill. 52% a másfél éven túl, ill.

másfél éven belül kialakuló RA esetében) (13,121,123). Az ACPA jelezheti definitív RA kialakulását NDP-ben (91,121,122). Az ACPA tehát, különösen a genetikai prediszpozíció meghatározásával együtt, igen korai marker lehet, mely előre jelezheti a betegség kialakulását, ezért kiváló eszköz az RA korai diagnosztikájában (11,13,53,56,78,90,104-106,121,122).

1.7.2. Az ACPA termelés prognosztikai jelentősége kialakult RA-ban

Az ACPA-knak igen fontos prognosztikai jelentősége van, mivel már korai RA-ban is nagyobb arányban fordulnak elő azokban a betegekben, akiknél súlyosabb lefolyású, több ízületi erózióval és destrukcióval járó kórkép fejlődik ki (13,43,56,78,81,122,124-129). Az ACPA⁺ betegekben 6-10 éves követés után jelentősebb destrukciót figyeltek meg (31,56,122). Az ACPA⁺ betegekben tartósabb, a DAS28-cal és vérszejtsüllyedéssel jelzett betegségaktivitás és fokozott radiológiai progresszió figyelhető meg. A súlyossággal és kimenetellel való összefüggést mind az anti-CCP, mind az anti-MCV tesztek esetében igazolták (13,24,25,56,64,124-127). Mindez igaz nagyon korai (<3 hónap) RA esetén is (56). Úgy tűnik, a kimenetel szempontjából az ACPA a legjobb marker, prediktív értéke jobbnak bizonyult, mint az SE vagy PTPN22 polimorfizmusé (81) és a 10 év utáni radiológiai progresszió jelzése tekintetében is az ACPA bizonyult az egyik legjobb markernek (129). Az ACF antitestek prediktív értéke is igen jónak bizonyult az egy éve fennálló korai RA diagnózisának felállítása illetve két év után a radiológiai progresszió megítélése szempontjából (68). Egy norvég munkacsoport négy prognosztikai változó prediktív értékét összehasonlítva megállapította, hogy 10 éves követés után az erózió, destrukció szempontjából a legerősebb prediktív értéke az anti-CCP pozitívitásnak volt (OR 4,0), ezen belül a magas ACPA koncentráció 9,9-szeres rizikót jelentett. A másik három indikátor (női nem, vérszejtsüllyedés, RF) prediktív értéke 3,1-3,3 között volt (130). Újabban kiderült hogy a SE önmagában talán nem is olyan jól korrelál a progresszivitással, hanem az ACPA termelésen keresztül, indirekte befolyásolja a kimenetelt (10,84). Mint láttuk, a HLA-DRB1 vagy a PTPN22 az ACPA termeléssel együttesen, komplex prognosztikai markerként használható (53,78,90,104-106).

Igen érdekes, hogy ACPA⁻ polyarthritiben hogyan lehet a diagnózist illetve a kimenetelt megerősíteni. Egy francia tanulmányban 30 NDP-s beteget követtek. Egy év után 16 betegben alakult ki definitív RA. ACPA pozitívítás nem alakult ki, és a hagyományos

röntgen nem tudta megjósolni, hogy melyik betegben alakul ki RA, melyik marad NDP. Az MRI vizsgálat, illetve az alkalmazott RAMRIS pontozás jól jelezte a későbbi kimenetelt (131).

Valószínű tehát, hogy az ACPA pozitivitás illetve negativitás alapján az RA két jól elkülöníthető altípusa definiálható. Bár talán a betegség kezdetén az ACPA alapján a kétféle fenotípus nem különböztethető meg, a későbbi betegségfolyás során az általában SE-és PTPN22 1858T allélt hordozó, dohányzó betegek magasabb ízületi erozivitást és rosszabb prognózist mutatnak szemben a HLA-DR3 illetve PTPN22 1858C pozitív, nem dohányzó betegekkel (11,13,17,78,109,110). A nem differenciált polyarthritisből definitív RA-vá válás predikciójában valószínűleg több prediktív markert (ACPA, SE, PTPN22, MRI) együttesen kell használnunk (11,13,17,130,131).

Alig van adatunk arra vonatkozóan, hogy az ACPA termelés összefüggésben áll-e a túléléssel. Egy finn tanulmányban 604 RA-s beteg keresztmetszeti vizsgálatát végezték el 1987-ben ACPA és RF status tekintetében, majd követték a betegek túlélését. A betegek közül 160 (25%) hunyt el 1999-ig. Míg az RF pozitivitás, valamint az abszolút IgA és IgM RF, valamint anti-CCP szintek korreláltak a mortalitással, az anti-CCP pozitivitás önmagában nem (132). Mint láttuk, saját vizsgálatunkból is az derült ki, hogy nemcsak az ACPA pozitivitás, hanem az abszolút érték is lényeges (78).

1.8. Autoantitest-szintek változása a betegségfolyás során és a terápia hatására

1.8.1. ACPA termelés korai arthritisben és a betegség előrehaladtával

Ismeretes, hogy az ACPA-k megjelenése, legalább a betegek felében, akár évekkel megelőzheti a klinikailag manifesztálódó betegség megjelenését (68,123). Igen korai arthritis (<3 hónap betegségfennállás) esetén a pozitív ACPA teszt aránya valamivel kisebb, mint a már kialakult betegségben, de a definitív, diagnosztikai kritériumoknak megfelelő RA-ban az ACPA státusz csak igen ritkán (kb. 5%) változik (43,56,127,133-135). Egy svéd tanulmány adatai szerint közel 100 RA-s beteg közül két negatív beteg pozitívvá, három pozitív pedig negatívvá vált három éves követés során (127). Mások viszont átlagosan 13 éves követés során az IgG anti-CCP szintek legalább 25%-os csökkenését mutatták ki az RA-s betegek felében, függetlenül az alkalmazott terápiától (133). Az ACPA szint tehát az évek előrehaladtával kismértékű csökkenést mutathat, de az ellenanyag szint változása nem követi

az aktuális állapot, az ízületi gyulladás súlyosságának ingadozását (127,133,134), vagyis nem aktivitási marker. Összességében tehát az ACPA termelés egyes betegekben stabil marad (a RF-nál stabilabb), míg másokban változhat a betegségfolyás során.

1.8.2. A biológiai terápia és az ACPA termelés összefüggései

A modern bázisterápiás és biológiai terápiás szerek számottevően befolyásolhatják az autoantitestek szintjét, sőt jelenlétét is. Másrészt, az ACPA pozitivitás esetleg előre jelezheti a biológiai terápia hatékonyságát. Ami a terápia hatására bekövetkező ACPA változásokat illeti, egy munkacsoport 33 RA beteget kezelt infliximabbal. Mind az anti-CCP, mind az IgA RF termelés csökkent 30 hét után, de a csökkenés 54 hét után már nem volt szignifikáns (136). Egy 66 RA-s beteget érintő tanulmány adatai szerint mind az anti-CCP, mind az IgM RF szint jelentősen csökkent az átlagosan 14 hónapos követési idő alatt, de míg az anti-CCP szint csökkenés a betegség fennállási idejével függött össze, addig a RF szint a kezelésre adott válasz függvényében csökkent (133). Ezzel szemben két másik tanulmány adatai szerint infliximab kezelés hatására a RF szintek szignifikánsan csökkentek, míg az anti-CCP szint stabil maradt (134,137). Ugyanakkor megháromszorozódott az antinukleáris antitest (ANA)⁺ esetek száma a vizsgált csoportban. Egy másik, ugyancsak infliximabbal kezelt csoportban szintén jelentősen megnőtt az ANA⁺, ezen belül az anti-nukleoszóma⁺ és anti-dsDNA⁺ RA-s betegek aránya (138). Ami az adalimumab terápiát illeti, 188 kezelt RA-s betegben azt találták, hogy 28 hét után az IgM RF szintje 31%-kal, míg az anti-CCP szint csupán 8%-kal csökkent. Amíg a terápiára jól reagálók között az ACPA termelés 16%-kal csökkent, addig a terápiarefrakter esetekben ez 4%-kal nőtt. Amíg az RF⁺ betegek 17%-a kezelés hatására szeronegatívvá vált, ezt az ACPA esetében nem észlelték (139,140). Az anti-CV termelés már 18 hónapos infliximab kezelés után csökken (62). Az ACF tekintetében az infliximab 31%-kal, az adalimumab 14%-kal csökkentette az autoantitest termelést (140). Ami az izotípusokat illeti, anti-TNF kezelés hatására elsősorban az IgG4 ACPA izotípus termelése csökkent (140). Mindez arra utal, hogy az ACPA termelés csökkenése összességében nem egyértelmű, anti-TNF kezelés hatására stabil is maradhat. Ezen belül azonban a terápiára jól reagáló betegekben csökkenhet. A RF-ral ellentétben ACPA szeronegatívvá válás alig fordul elő.

A másik aspektusból tekintve úgy tűnik, az ACPA⁺ illetve RF⁺ betegek rosszabbul reagálnak biológiai terápiára. Egy 642 beteget magában foglaló vizsgálatban, ahol infliximab, etanercept vagy adalimumab kezelés történt, mindhárom anti-TNF szer kevésbé volt hatékony anti-CCP és/vagy RF szeropozitív betegekben. Ez a hatás független volt a SE hordozástól

vagy a PTPN22 genotípustól (141). Egy 30 infliximabbal kezelt beteget magában foglaló vizsgálatban a terápia hatékonysága szignifikáns korrelációt mutatott az anti-CCP titerrel (142). Más, szintén az anti-TNF terápia hatékonyságát előre jelző biomarkereket kereső vizsgálatban azonban sem az anti-CCP, anti-keratin, APF, anti- α -enoláz pozitivitás, sem más biomarkerek (pl. proteázok, csontbontás markerei, COMP) termelése nem mutatott összefüggést az infliximab kezelésre adott válasszal (143).

Ezek az adatok egyrészt azt mutatják, hogy a biológiai szerek jelentősen befolyásolják az immunrendszer működését, ezen belül az autoantitestek termelődését, másrészt a szeropozitív és szeronegatív betegek esetleg eltérően reagálhatnak a terápiára. Legjelentősebb változásra az autoantitestek szintjében az anti-CD20 antitest (rituximab) kezelés következtében számíthatunk. Ilyenkor a B sejtek száma igen erősen csökken, ami együtt jár a szérumban immunglobulin szintek csökkenésével (144-146). A szinovialis B sejt szám csökkenése korrelációt mutatott a rituximab klinikai hatékonyságával és a betegségaktivitás csökkenésével (144,146). Mivel az autoantitesteket a B sejtek termelik, a B sejt depléció az ACPA termelésre is kedvezően hat (144,146). A rituximab 36 hét után csökkentette az ACPA termelést (146). Egy kisebb RA-s csoporton végzett tanulmány adatai szerint a rituximab kezelés a betegek többségében jelentős klinikai javulást okozott, amit a CRP szintek csökkenése kísért. Ezzel párhuzamosan valamennyi vizsgált autoantitest (IgM, IgA és IgG RF, anti-CCP) szintje erősen csökkent, és tartósan alacsony is maradt. A betegek többségében idővel (a kezelés abbahagyását és a B limfocita-szám helyreállítását követően 0-17 hónappal) relapszus jelentkezett, amely mindig együtt járt legalább egy autoantitest szintjének szignifikáns emelkedésével (145).

Kezdeti adatok megjelentek a nagy dózisú kemoterápiát követő autológ őssejttranszplantáció (ASCT) kapcsán is. Egy tanulmányban 6 refrakter RA-s beteget transzplantáltak. A három, ASCT-re tartósan (egy éven túl is) jól reagáló betegben szignifikánsan csökkent az ACPA termelés, míg a 3 relapszust mutató betegben nem (147).

2. Célkitűzések

A DEOEC Reumatológiai Tanszékén több évtizede folyik RA-s betegek gondozása, kezelése. Jelenleg mintegy 700 főre tehető a gondozott betegek száma. Jómagam 2004-ben kerültem kapcsolatba rezidensként az arthritis munkacsoporttal és kapcsolódtam be a betegek ellátásába, a kutatásba és oktatásba.

Az RA és az ACPA-k összefüggéseinek vizsgálata kapcsán az alábbi célkitűzéseim voltak:

1. A világon az elsők között alkalmaztuk az új anti-MCV tesztet. Össze kívántuk vetni ezen ELISA diagnosztikus teljesítményét a standard második generációs anti-CCP2 tesztel.

2. Miután az anti-CCP IgG izotípusával kapcsolatban számos kutatás jelent meg, de gyakorlatilag nem állt rendelkezésünkre információ az IgA és IgM izotípusokkal kapcsolatban, célul tűztük ki az IgA és IgM anti-CCP kimutatására alkalmas módszer kidolgozását. Elemezni kívántuk ezen antitestek diagnosztikus értékét és a betegségfolyással párhuzamos változását.

3. A harmadik generációs anti-CCP3 és anti-CCP3.1 ELISA alkalmazása során arra kívántunk választ kapni, hogy az anti-CCP teszt továbbfejlesztése jelent-e diagnosztikus előnyt a második generációs tesztel szemben.

3. Betegek és módszerek

3.1. Betegek

A vizsgálatokhoz 119, a Reumatológiai Tanszéken gondozott RA-s betegtől nyertünk szérummintát. Minden beteg megfelelt az ACR klasszifikációs betegségkritériumainak (148). A 119 RA-s beteg közül 100 nő és 19 férfi volt, átlagéletkoruk (\pm SD) $52,7 \pm 12,5$ év (tartomány: 19-77 év) volt. Ez a koreloszlás statisztikailag nem különbözött a kontrolloktól. Az RA átlagos betegségfennállási ideje $10,2 \pm 9,1$ év volt. Összehasonlításként 118 kontroll személy szérumát vizsgáltuk meg. Ezek közül 74 kontroll egyéb reumatológiai betegségben szenvedett: 37 primer Sjögren szindrómában (pSS), 30 poly-/dermatomyositisben (PM/DM) és 7 osteoarthritisben (OA). A maradék 44 személy egészséges önkéntes volt. A betegek demográfiai adatait az 1. táblázat mutatja. A szérummintákat felhasználásig -80°C -n tároltuk.

1. táblázat A betegek és kontrollok demográfiai mutatói

	Kor (év) ($\text{átlag} \pm \text{SD}$)	Férfi/nő
RA (n=119)	52.7 ± 12.5	19/100
pSS (n=37)	55.9 ± 15.2	2/35
PM/DM (n=30)	47.8 ± 14.5	6/24
OA (n=7)	56.6 ± 16.6	2/5
Egészséges kontroll (n=44)	45.8 ± 10.6	13/29

(RA: rheumatoid arthritis; pSS: primer Sjögren szindróma; PM/DM: poly-dermatomyositis; OA: osteoarthritis)

3.2. ACPA és RF meghatározás

Az anti-CCP2 IgG szintek meghatározása második generációs ELISA (QUANTA Lite™ CCP IgG ELISA; INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) használatával történt. Ebben a tesztben antigénként a mikrotiter lemez felszínéhez kötött szintetikus citrullinált peptideket alkalmaznak. A tesztet a gyártó utasításainak megfelelően végeztük és 20 IU/ml fölötti értékeket tekintettünk pozitívnak.

Az anti-CCP2 IgA és IgM szintek meghatározása során a citrullinált peptidekkel fedett lemezek, a mintahígító oldat, a mosófolyadék, a TMB szubsztrát és a színreakciót leállító stop

oldat a fentiekben leírt QUANTA Lite™ CCP ELISA-ból származott. A szérummintákat 1:100 arányban hígítottuk, és 60 percig inkubáltuk a lemezeken. A megkötött antitesteket tormaperoxidázzal (HRP) konjugált nyúl anti-human IgA és IgM antitestek segítségével detektáltuk (DAKO A/S, Glostrup, Dánia). Az eredményeket optikai denzitás (OD) formájában fejeztük ki. Az optimális cutoff értékeket (IgA anti-CCP2: 0,198; IgM anti-CCP2: 0,513) "receiver operating characteristic" (ROC) görbe analízis révén határoztuk meg.

A harmadik generációs anti-CCP antitestek kimutatása az INOVA Diagnostics új fejlesztésű anti-CCP3 és anti-CCP3.1 IgA/IgG ELISA tesztjeinek használatával történt. Az anti-CCP3 teszt az alkalmazott citrullinált antigén(ek) tekintetében tér el a második generációs tesztektől, míg az anti-CCP3.1 teszt emellett a kimutatott antitest izotípusában is különbözik; IgG és IgA izotípusú antitestek együttesét méri. Ezeket az ELISA kiteket a második generációs anti-CCP2 teszttel vetettük össze a ROC görbék analízise, valamint a szenzitivitás és specificitás meghatározása révén.

Az anti-MCV IgG antitestek meghatározása is ELISA-val történt (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Németország) a gyártó által javasolt protokollnak megfelelően. Ez a teszt kit antigénként rekombináns MCV-t tartalmaz. Az MCV a humán monocytákban található vimentin variánsnak rekombináns formája, amely a natív vimentintől egyrészt a járulékos arginin reziduumok jelenlétében különbözik és egyéb szekvenciákban is eltér attól. A cutoff érték 20 U/ml volt.

Az IgM, IgA, és IgG izotípusú RF meghatározása standard ELISA-val történt (ImmuLisa RF IgM, IgA, és IgG, Immco Diagnostics, Buffalo, NY) a gyártó utasításainak megfelelően. A referencia tartomány felső határa RF IgM esetén 9 IU/ml, RF IgA esetén 25 EU/ml, és RF IgG esetén 25 EU/ml volt.

3.3. HLA-DRB1 genotipizálás

A genomikus DNS izolálása 85 RA-s beteg perifériás véréből, a gyártó ajánlásainak megfelelően, QIAamp Blood Mini Kit (QIA-GEN GmbH, Germany) használatával történt. A HLA-DRB1 tipizálás és szubtipizálás polimeráz láncreakcióval (PCR), szekvenciaspecifikus primerek (Olerup SSP™, GenoVision Inc., PA, USA) segítségével történt, ahogyan azt a korábbiakban leírtuk (77). Az alábbi shared epitop allélek jelenlétét vizsgáltuk: HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0102, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405 és HLA-DRB1*0408.

3.4. Statisztikai analízis

Az RF, anti-CCP és anti-MCV-re vonatkozó diagnosztikus szenzitivitás és specificitás, valamint a pozitív (PPV) és negatív prediktív (NPV) értékeket definíció szerint kiszámoltuk. Az antitest tesztek diagnosztikus hatékonyságát ROC görbe analízis segítségével vizsgáltuk, grafikusán ábrázolva a szenzitivitást az 1-specificitás függvényében különböző cutoff értékeknél. Az optimális cutoff értékek anti-MCV és anti-CCP2 tesztekre vonatkozó értékeinek meghatározása a ROC görbék alapján történt. A különböző csoportok közti antitest szinteket a non-parametrikus Mann-Whitney-féle U-teszttel hasonlítottuk össze. A különböző vizsgálati csoportokban az autoantitestek mennyisége nem Gaussi megoszlást mutatott. Az anti-MCV, anti-CCP és RF szintek közti kapcsolat illetve az anti-CCP2 izotípusok közti összefüggések meghatározására a Spearman-féle korrelációt használtuk. Az anti-CCP2 antitestek és a RF-k különböző izotípusainak előfordulása közti asszociáció, valamint az anti-CCP2 egyes izotípusai, a betegség tartam illetve a HLA-DRB1 SE közti összefüggések vizsgálatára a Fisher-féle exact tesztet alkalmaztuk. Minden esetben a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. Minden statisztikai analízis elvégzéséhez az SPSS Windows (v11.0) statisztikai csomagot használtuk.

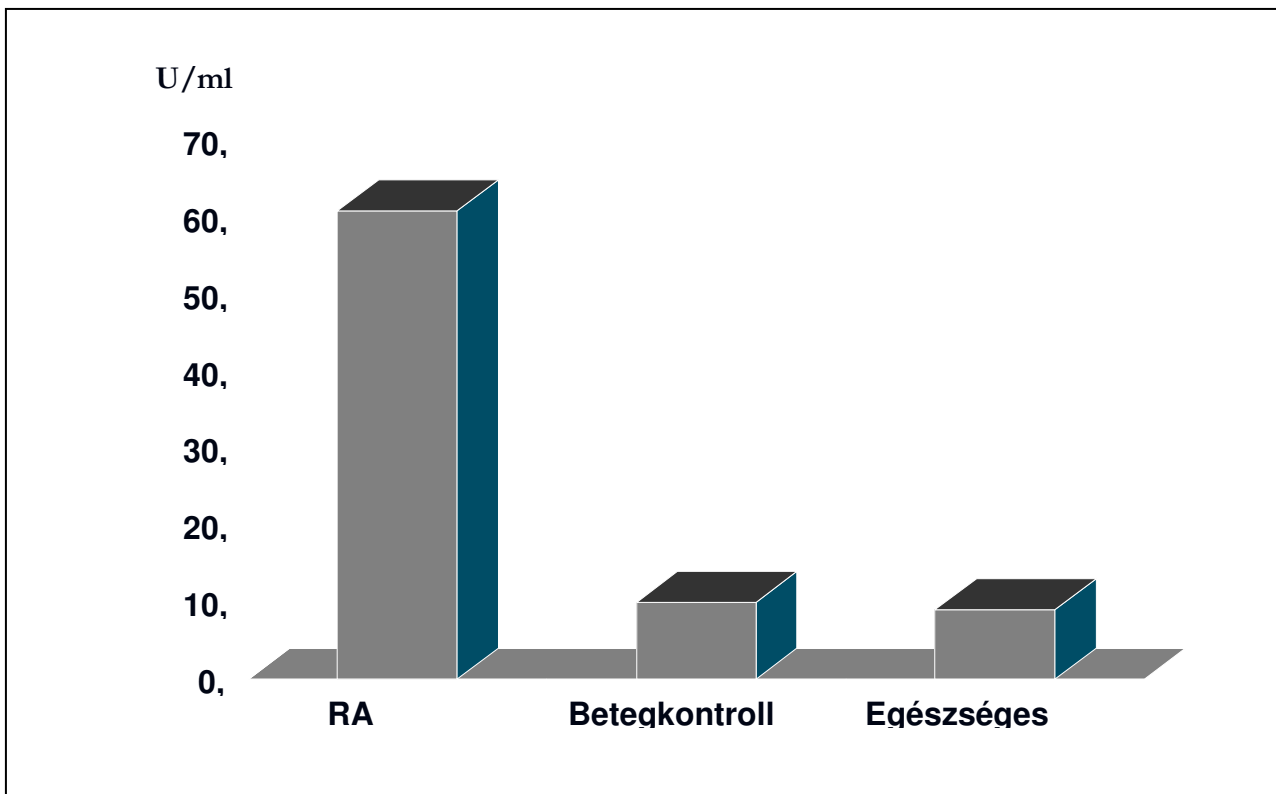
4. Eredmények

4.1. Anti-MCV autoantitestek vizsgálata

4.1.1. Anti-MCV termelés az egyes beteg- és kontrollcsoportokban

Az RA-s betegek szérum anti-MCV koncentrációja szignifikánsan magasabbnak bizonyult (középérték: 60,8 U/ml, interquartilis tartomány [IQR]: 21,2-348,4 U/ml), mint az egészséges kontrolloké (átlag: 8,9 U/ml, IQR: 5,4-13,3 U/ml; $p < 0,0001$) vagy az egyéb reumatológiai betegségben szenvedőké (átlag: 9,8 U/ml; IQR: 3,7-14,7 U/ml; $p < 0,0001$) (3. ábra).

3. ábra Anti-MCV szérumszintek



4.1.2. Az anti-MCV, anti-CCP2 és RF tesztek diagnosztikus teljesítménye, a gyártó által ajánlott cutoff értékeket használva

Amikor mindegyik tesztnél a gyártók által ajánlott cutoff értékeket használtuk, az RA-s betegekben az anti-MCV volt a leggyakrabban pozitív, ami 75,6%-os diagnosztikus szenzitivitást eredményezett (2. táblázat). Ez 4%-kal illetve 9%-kal meghaladta az IgM RF illetve az anti-CCP2 szenzitivitását. Az IgA és IgG izotípusú RF egyaránt viszonylag ritkán volt pozitív, ezen tesztek szenzitivitása 36,9% illetve 37,8% volt. Amikor az RA-s betegeket csak az egészséges egyénekhez hasonlítottuk, az összes vizsgált autoantitest assay specificitása kiváló (95,5-100%) volt (2. táblázat)

Ami a reumatológiai betegkontrollokat illeti, anti-MCV pozitívítás a pSS-s betegek közt 4 esetben, PM/DM-sek közt 3 esetben és az OA-s betegek közül egy esetben volt megfigyelhető. Mindez összességében 91,1%-os specificitást eredményezett.

Ugyanakkor anti-CCP2 pozitívítás a pSS-s és a PM/DM-es betegek közt is 1-1 esetben fordult elő, ami az RA-t tekintve 98,3%-os specificitást eredményezett.

A RF mindhárom izotípusa magas prevalenciát mutatott pSS-s és PM/DM-es betegekben. Az IgM RF a pSS csoport betegeinek 40,5%-ában, a PM/DM csoport betegeinek 16,6%-ában volt jelen. Ennek következtében a különböző izotípusú RF-k diagnosztikai specificitása alacsonynak bizonyult (IgM: 82,2%, IgA: 88,9%, IgG: 87,3%).

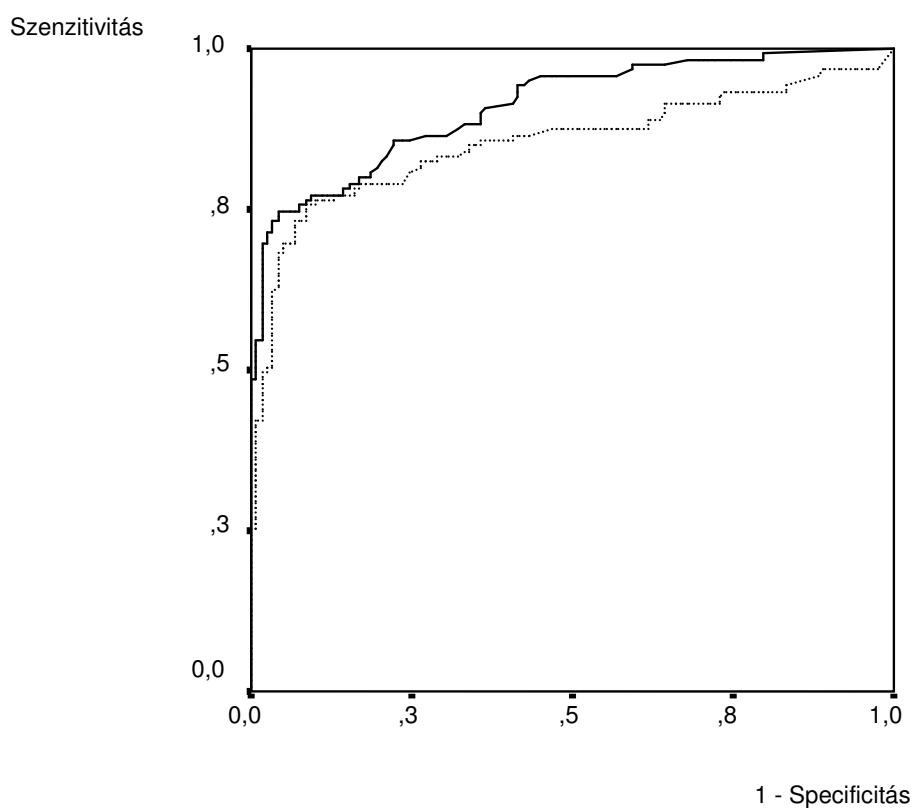
2. táblázat Az IgM RF, anti-CCP2 és anti-MCV tesztek diagnosztikus szenzitivitása, specificitása, pozitív (PPV) és negatív (NPV) prediktív értéke RA-ban, a gyártó által javasolt cutoff értékek figyelembevételével

	IgM RF	Anti-CCP2	Anti-MCV
Szenzitivitás (%)	71.4	66.4	75.6
Specificitás (%) (RA vs egészséges kontrollok)	97.7	100	95.5
Specificitás (%) (RA vs összes kontroll)	82.2	98.3	91.5
PPV (%)	80.2	97.6	90.0
NPV (%)	74.0	74.4	78.8

A tesztek diagnosztikai teljesítményének vizsgálata céljából ROC görbe analízist végeztünk. A számítások alapján a görbe alatti terület (area under curve, AUC) az anti-MCV esetén 0,853 (95% CI: 0,801-0,905), míg az anti-CCP2 esetén 0,910 (95% CI: 0,873-0,946) volt (p= nem szignifikáns) (4. ábra).

Az AUC értékek mind az anti-MCV, mind az anti-CCP2 esetében meghaladták az IgM RF esetén kalkulált értéket (0,788; 95% CI: 0,728–0,847).

4. ábra Az anti-MCV és anti-CCP2 ELISA "receiver operating characteristic" (ROC) görbéi



(Folytonos vonal: anti-CCP2 ELISA; Szaggatott vonal: anti-MCV ELISA)

4.1.3. Az anti-MCV és anti-CCP2 tesztek diagnosztikus teljesítménye optimalizált cutoff értékeket használva

A ROC görbe analízis ugyancsak lehetővé teszi az optimális cutoff érték meghatározását. Optimálisnak tekinthető az a cutoff érték, amely alkalmazásával a maximális diagnosztikus szenzitivitás és specificitás érhető el. Az anti-MCV és az IgM RF esetén az

optimális cutoff értékek (20,3 U/ml illetve 8,3 IU/ml) hasonlónak bizonyultak a gyártók által ajánlott értékekhez, így nem változtatta meg a szenzitivitás és specificitás értékeket. Az anti-CCP2 esetén azonban az optimális cutoff érték 12 U/ml volt, ami a specificitás kismértékű csökkenése mellett (95,8%) a szenzitivitás mintegy 8%-os növekedéséhez vezetett (74,8%). (3. táblázat).

3. táblázat

Diagnosztikus szenzitivitás és specificitás optimalizált cutoff értékek mellett

	Anti-MCV	Anti-CCP2	Anti-MCV és anti-CCP2	Anti-MCV és/vagy anti-CCP2
Szenzitivitás (%)	75.6	74.8	66.4	78.2
Specificitás (%)	91.5	95.8	98.3	91.5

Ugyancsak a ROC analízis eredményeinek felhasználásával, lehetséges az egyes tesztek specificitását egységesíteni, ezáltal szenzitivitásuk egyértelműen összevethető. Autoantitestek esetében a 95%-os specificitás általánosan elfogadott, mint diagnosztikailag optimális érték. Az általunk vizsgált diagnosztikai tesztek esetében a 95%-os specificitás az anti-MCV esetében 26,3 U/ml, az anti-CCP2 esetében 11,7 U/ml, míg az IgM RF esetében 50,3 IU/ml cutoff értéknél valósult meg. Ez az anti-MCV teszt esetében 69,7%, az anti-CCP2 esetén pedig 74,8% szenzitivitást eredményezett, miközben az IgM RF teszt szenzitivitása 33,6%-ra csökkent.

4.1.4. Az anti-MCV, anti-CCP2 és IgM RF pozitivitás közti összefüggés

Mindhárom teszt esetében az optimalizált cutoff értékeket használva, az anti-MCV, anti-CCP2 és IgM RF együttes pozitivitása 70 RA-s betegben (58,8%) volt megfigyelhető. Ezzel szemben 18 beteg (15,3%) mindhárom autoantitestre negatív volt.

Az RA-s csoportban az anti-MCV és IgM RF közti egyezési ráta 81,5%, míg az anti-MCV és anti-CCP2 tesztek közt 88,2% volt. Az anti-MCV és anti-CCP2 kombinációt használva, ezen antitestek egyikének vagy mindkettőnek a pozitivitása, 78,2% / 66,4% szenzitivitást illetve 91,5% / 98,3% specificitást eredményezett. A kettős pozitivitás pozitív prediktív értéke (PPV) RA-ban 97,5% volt.

Fontos hangsúlyozni, hogy RA-ban az IgM RF⁻ esetek 41,2%-a (14 beteg) és az anti-CCP2⁻ esetek 30%-a (9 beteg) anti-MCV⁺ volt. Ugyanakkor az anti-MCV⁻ RA-s betegek 27,6%-a (8 beteg) anti-CCP2⁺-nak bizonyult (4. táblázat).

4. táblázat Az anti-MCV termelés összefüggése az anti-CCP2 illetve IgM RF pozitivitással RA-ban. Az adatok abszolút esetszámot jeleznek (n=119)

A) Anti-MCV versus IgM RF

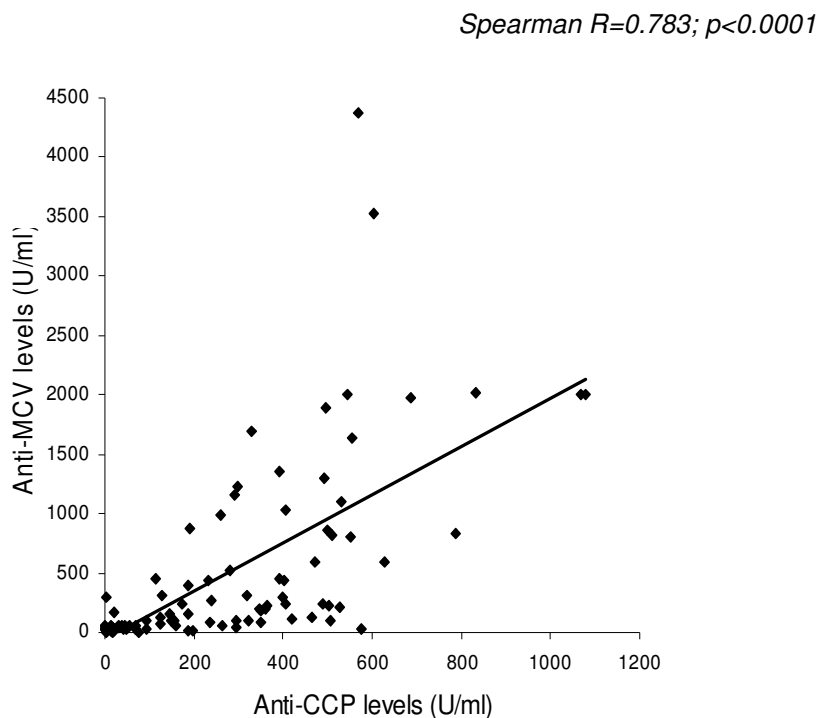
	Anti-MCV ⁺	Anti-MCV ⁻
RF IgM ⁺	76	9
RF IgM ⁻	14	20

B) Anti-MCV versus anti-CCP2

	Anti-MCV ⁺	Anti-MCV ⁻
Anti-CCP2 ⁺	81	8
Anti-CCP2 ⁻	9	21

Mind az anti-MCV, mind az anti-CCP2 az ACPA családba tartozik. A kettőjük közti összefüggésekkel foglalkozó további vizsgálatok során korrelációt kerestünk a szérumban anti-MCV és anti-CCP2 koncentrációk közt, mely RA-ban szignifikánsnak bizonyult (Spearman $R=0.783$; $p<0.0001$) (5. ábra).

5. ábra Korreláció az anti-MCV és anti-CCP2 termelés között



Az anti-MCV pozitívítás illetve negatívítás mellett vizsgáltuk az anti-MCV abszolút szérumkoncentrációit is. Az anti-MCV átlagos szérumszintje magasabbnak bizonyult az anti-MCV⁺/anti-CCP2⁺ RA-s betegekben (n=79; medián antitest szint: 206,5 U/ml, IQR: 59,3-826,3 U/ml), mint az anti-MCV⁺/anti-CCP2⁻ betegekben (n=4; medián antitest szint: 49,5 U/ml, IQR: 38,3-112,7 U/ml; p<0.0001) (nem ábrázolt adatok).

Az átlagos anti-CCP2 szintek szintén szignifikánsan magasabbak voltak az anti-MCV⁺/anti-CCP2⁺ RA-s betegekben (296,6 U/ml, IQR: 120,3-490,2 U/ml), mint azokban, akik csak anti-CCP2⁺-ak voltak (20,4 U/ml; IQR: 16,4-68,7 U/ml; p<0.0001).

Ezek az adatok, a 88,2%-os egyezési rátával és az antitest-szintek közötti szignifikáns korelációval együtt azt sugallják, hogy az anti-MCV és anti-CCP2 antitestek hasonló epitopokhoz kötődnek. Ugyanakkor az egyedi antitest-pozitívítások arra utalnak, hogy mindkét teszt tartalmaz olyan egyedi citrullinált epitopokat, amelyeket kizárólagosan vagy csak egyik vagy csak a másik antitest ismeri fel.

Annak ellenére, hogy a RF nem áll kapcsolatban az ACPA-kkal, statisztikailag szignifikáns korelációt találtunk az IgM RF szerumszintek és az anti-MCV (R=0,25; p=0,01) illetve az anti-CCP2 (R= 0,269; p= 0,007) szérumszintek közt.

4.1.5. Összefüggés az anti-MCV és a HLA-DRB1 hordozás között

RA-ban az IgG anti-CCP2 termelés összefügg a SE hordozással. Ezért megvizsgáltuk annak lehetőségét, vajon ez az összefüggés kiterjedhet-e az anti-MCV antitestre is. A HLA-DRB1 tipizálást és szubtipizálást 85 RA-s beteg esetében végeztük el és 54,1%-ukban heterozigóta vagy homozigóta SE hordozást mutattunk ki. Vizsgálatunkban az MCV elleni antitest jelenléte szignifikánsan társult a SE jelenlétével (p=0,02). Az anti-MCV pozitívítás gyakorisága 86,6% volt a SE-t hordozó RA-s betegek körében, míg 64,1% a SE negatív betegekben. A kópiaszám kismértékben, de nem szignifikánsan befolyásolta az antitest gyakoriságot: az egy (heterozigóta) illetve két (homozigóta) SE-t hordozók között az anti-MCV pozitívítás aránya 82,3% illetve 91,6% volt (5. táblázat). Ugyancsak megerősítettük a szignifikáns asszociációt az anti-CCP2 és a SE jelenléte között (p=0,01). Ugyanakkor a SE és az IgM RF vonatkozásában ilyen összefüggés nem volt kimutatható (nem ábrázolt adatok).

5. táblázat Összefüggés az anti-MCV és a SE hordozás között (n=85)

	SE ⁺	SE ⁻
Anti-MCV ⁺	39 (45,9%)	25 (29,4%)
Anti-MCV ⁻	7 (8,2%)	14 (16,5%)

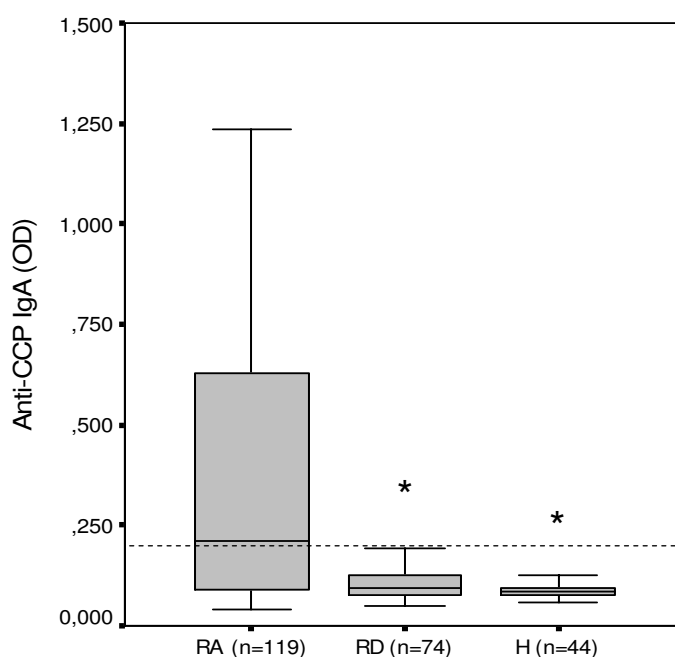
4.2. Anti-CCP2 izotípusok vizsgálata RA-ban

4.2.1. IgA és IgM anti-CCP2 izotípusok termelése

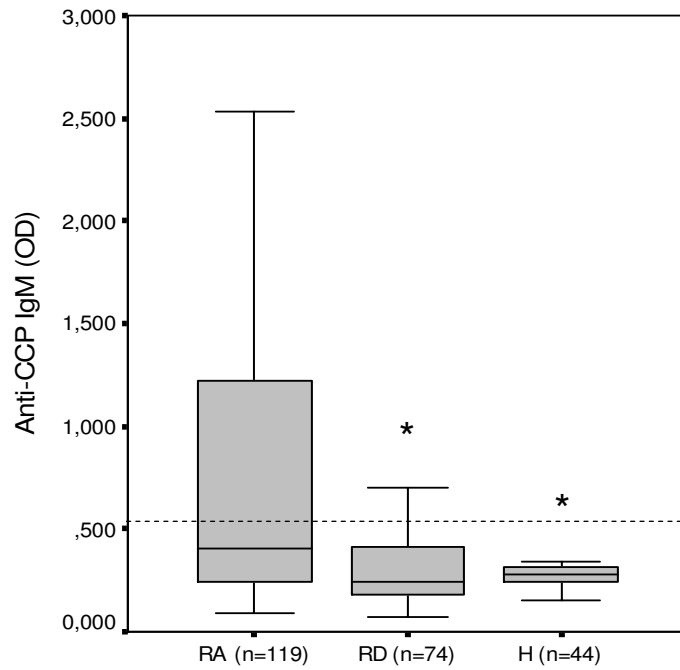
Az RA-s betegek szérumban IgA anti-CCP2 antitest szintje szignifikánsan magasabb volt (medián OD: 0,211; IQR: 0,090-0,630), mint az egészséges egyéneké (medián OD: 0,085; IQR: 0,077-0,096; $p < 0,0001$) illetve a reumatológiai betegkontrolloké (medián OD: 0,096; IQR: 0,076-0,125; $p < 0,0001$). RA-ban az IgM izotípusú anti-CCP2 termelése is szignifikánsan kifejezettebb volt (medián OD: 0,404; IQR: 0,245-1,221) akár az egészséges kontrollokhoz (medián OD: 0,278; IQR: 0,246-0,309; $p < 0,0001$), akár a betegkontrollokhoz képest (medián OD: 0,244; IQR: 0,185-0,411; $p < 0,0001$) (6. ábra, A és B).

6. ábra Anti-CCP2 IgA (A) és IgM (B) antitest szintek az RA-s betegekben (RA), betegkontrollokban (RD) és egészségesekben (H).

A



B

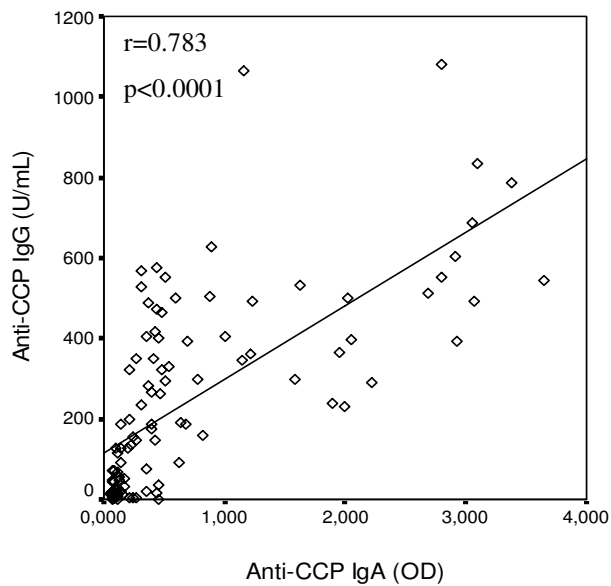


(* $p < 0,0001$ vs RA; Szaggatott vonal: Cutoff OD szint.)

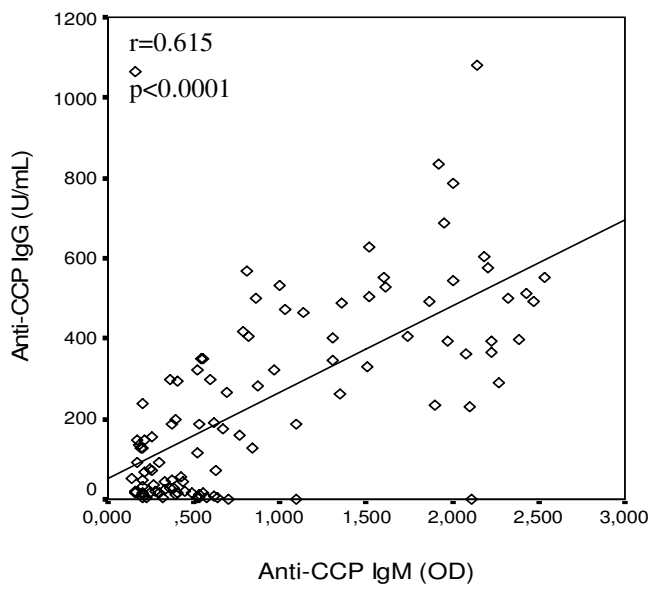
Az IgA és IgM anti-CCP2 szintek egymással és az IgG anti-CCP2 szintekkel is szignifikáns korrelációt mutattak ($p < 0,0001$) (7. ábra, A, B és C).

7. ábra Korreláció az IgG és IgA anti-CCP2 (A), az IgG és IgM anti-CCP2 (B) illetve az IgA és IgM anti-CCP2 (C) között (Spearman korreláció)

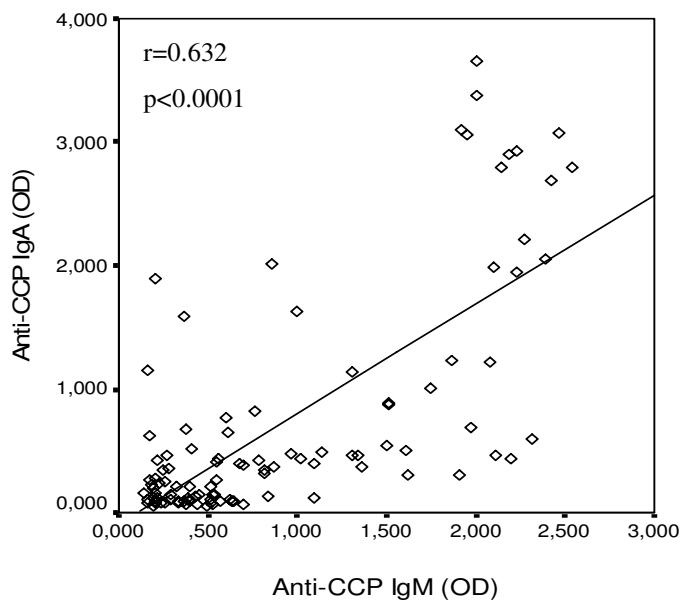
A



B



C



4.2.2. Az IgA és IgM és IgG anti-CCP2 antitestek gyakorisága RA-ban

Az anti-CCP2 különböző izotípusai diagnosztikai hatékonyságát ROC analízissel vizsgáltuk. Az AUC értékek a következők voltak: IgG anti-CCP2: AUC=0,910 (95% CI: 0,873-0,946); IgA anti-CCP2: AUC=0,744 (95% CI: 0,678-0,809); IgM anti-CCP2: AUC=0,704 (95% CI: 0,636-0,772).

Az IgA és IgM anti-CCP2 közti különbség nem volt szignifikáns. Az eredményeket az optimalizált cutoff értékek szerint osztályozva, IgG, IgA és IgM anti-CCP2 antitest pozitívítás sorrendben az RA-s betegek 74,8, 52,9 illetve 44,6%-ában volt megfigyelhető. Bár az IgA és IgM izotípusú anti-CCP2 antitestek leggyakrabban az IgG anti-CCP2⁺ RA-s betegekben jelentek meg; két betegben csak IgM, egy betegben pedig csak IgA izotípusú anti-CCP2 pozitívítás jelentkezett. Az egészséges kontrollokban az anti-CCP2 antitestek egyik izotípusa sem volt kimutatható (6. táblázat). A betegkontroll csoportban az IgG, IgA és IgM anti-CCP2 antitestek sorrendben 5, 5 illetve 9 betegben voltak jelen. Összesen 4 olyan betegkontroll volt, akiknél a különböző izotípusú anti-CCP2 antitestekből egyidejűleg 2 vagy 3 egyszerre jelen volt.

6. táblázat Az IgG, IgA és IgM izotípusú anti-CCP2 és RF diagnosztikus specificitása és szenzitivitása RA-ban optimalizált cutoff értékek mellett

	IgG anti-CCP2	IgA anti-CCP2	IgM anti-CCP2	IgG RF	IgA RF	IgM RF
Szenzitivitás (%)	74.8	52.9	44.5	37.8	37.0	71.4
Specificitás (%)[*] (RA vs egészséges kontrollok)	100.0	100.0	100.0	100.0	97.7	97.7
Specificitás (%)[*] (RA vs összes kontroll)	95.8	95.8	91.6	87.3	89.0	82.2

Az IgA és IgM anti-CCP2 tesztek teljes diagnosztikus specificitása 95,8%-nak illetve 91,6%-nak adódott. Amikor ezeket a különböző RF izotípusok diagnosztikai teljesítményével vettük össze, az anti-CCP2 IgA és IgM antitestek specificitása szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a RF bármelyik izotípusáé (6. táblázat), és szenzitivitásuk meghaladta az IgA vagy IgG RF-k diagnosztikai szenzitivitását (6. táblázat). Az RA-s csoporton belül az anti-

CCP2 bármely két izotípusának együttes pozitivitása 96,6%-os, míg mindhárom izotípus együttes pozitivitása 99,2%-os specificitást eredményezett.

4.2.3. Az anti-CCP2 antitestek és RF-k különféle izotípusai közti asszociáció

Az IgM, IgA és IgG RF pozitív és negatív RA-s betegekben megvizsgáltuk, hogy az anti-CCP2 ugyanezen izotípusaira nézve pozitívak vagy negatívak-e. Szignifikánsan több RA-s betegnek volt IgM anti-CCP2 antitestje az IgM RF⁺-ak közt, mint az IgM RF⁻ szubpopulációban (56,8% illetve 14,7%; $p < 0,0001$). Az IgA anti-CCP2 antitestek gyakorisága szintén magasabb volt az IgA RF⁺ RA betegek közt, az IgA RF⁻ csoporthoz képest (70,5% illetve 42,6%; $p = 0,004$). Azonban annak ellenére, hogy az IgG anti-CCP2 pozitívítás szintén gyakoribb volt az IgG RF⁺ betegek esetében (82,3% illetve 70,2%), ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak (7. táblázat).

7. táblázat. Összefüggés az IgA és IgM anti-CCP2 illetve RF-k között RA-ban. A számok abszolút betegszámot jelentenek ($n = 119$)

A) Összefüggés az IgA anti-CCP2 és RF pozitívítás között ($p = 0,004$)

	IgA Anti-CCP2 ⁺	IgA Anti-CCP2 ⁻
IgA RF ⁺	31 (26,1%)	13 (10,9%)
IgA RF ⁻	32 (26,9%)	43 (36,1%)

B) Összefüggés az IgM anti-CCP2 és RF pozitívítás között ($p < 0,0001$)

	IgM Anti-CCP2 ⁺	IgM Anti-CCP2 ⁻
IgM RF ⁺	48 (40,3%)	37 (31,1%)
IgM RF ⁻	5 (4,2%)	29 (24,4%)

4.2.4. Az anti-CCP2 izotípusok összefüggései a HLA-DRB1 SE hordozással

Ugyancsak megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy az ismert SE - IgG anti-CCP2 kapcsolat kiterjedhet-e az anti-CCP2 antitestek IgA vagy IgM izotípusaira is. Amikor az IgA és IgM anti-CCP2 izotípusokat külön-külön vizsgáltuk, akkor csak kissé, de nem szignifikánsan gyakoribb antitest pozitívítás volt megfigyelhető a SE⁺ betegekben az SE⁻-akhoz képest (IgA: 54,3% illetve 43,6%; IgM: 45,7% illetve 33,3%). Azonban amikor az anti-

CCP2 antitestek izotípusait együttesen vettük figyelembe, szignifikáns összefüggést sikerült kimutatni az anti-CCP2 antitestek és a SE jelenléte között ($p=0,03$). Ez az összefüggés erősebbnek bizonyult, mint a SE allélek és a csak IgG anti-CCP2 izotípus asszociációja ($p=0,04$) (nem ábrázolt adatok).

4.2.5. Az anti-CCP2 izotípusok és a betegségfennállási idő összefüggései

Az anti-CCP2 antitest pozitívitas gyakoriságát és az abszolút szérumszinteket külön is vizsgáltuk mindhárom izotípus esetén korai (betegségtartam <3 év) és késői (betegségtartam >10 év) RA-ban. Korai RA-ban mindhárom antitest izotípus esetén magasabb arányú pozitívítási tendencia volt megfigyelhető, mint hosszabb betegségfennállás esetén (8. táblázat). A különbség egyedül az IgM anti-CCP2 esetében volt statisztikailag szignifikáns (korai: 71,4%; késői: 37,5%; $p=0,03$) (8. táblázat). Hasonló eredményt kaptunk akkor is, amikor a korai RA-t vetettük össze az RA-s betegek fennmaradó hányadával ($p=0,04$) (8. táblázat).

Az anti-CCP2 antitestek átlagos abszolút szérum koncentrációi (csak a pozitív eseteket figyelembe véve) hasonlóak voltak korai illetve késői betegség esetén.

8. táblázat .

Az IgG, IgA és IgM anti-CCP2 pozitívitas aránya korai és tartós RA-ban

	RA tartam < 3 év (n=14)	RA tartam > 10 év (n=40)
Anti-CCP2 IgG	92.8%	70.0%
Anti-CCP2 IgA	76.4%	47.5%
Anti-CCP2 IgM	71.4%	37.5% *
Anti-CCP2 IgG+IgA+IgM	64.3%	35.0%

4.3. A harmadik generációs anti-CCP3 és anti-CCP3.1 ELISA vizsgálata

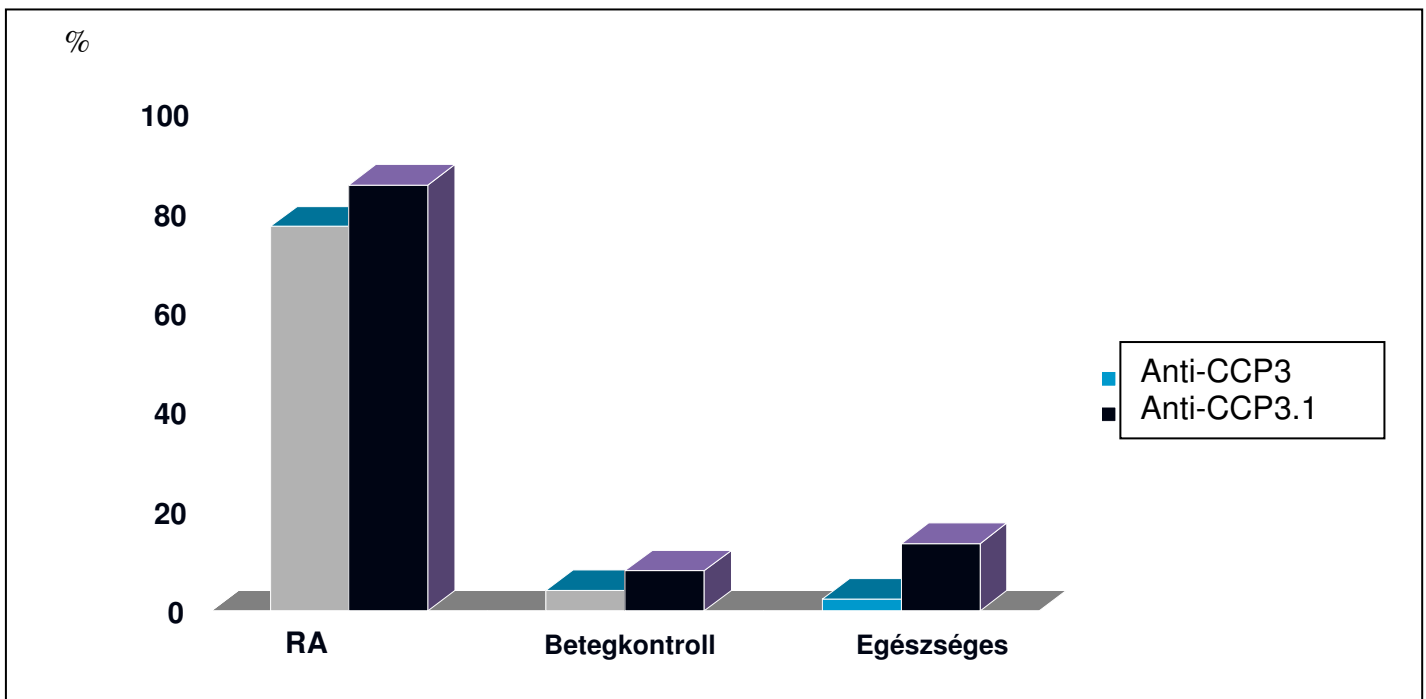
4.3.1. Az anti-CCP3.1 pozitívitas gyakorisága RA-ban és kontrollokban

Az anti-CCP3 és az anti-CCP3.1 teszt eredménye a 119 RA-s beteg közül 92-ben illetve 102-ben (77,3% és 85,7%), a 118 összes kontroll közül 4-ben illetve 12-ben (3,4% és 10,2%), utóbbin belül a 74 betegkontrollból 3 illetve 6 (4,1% és 8,1%), a 44 egészséges kontrollból 1 illetve 6 esetben (2,3% és 13,6%) volt pozitív. Ennek megfelelően RA-ban a

pozitivitás szignifikánsan gyakoribb volt, mint bármelyik kontrollcsoportban ($p < 0,0001$) (8. ábra).

Az anti-CCP2 teszt az RA-s betegek 66,4%-ában, az összes kontroll 1,7%-ában (mind betegkontroll) volt pozitív (nem ábrázolt adatok).

8. ábra Anti-CCP3 és anti-CCP3.1 pozitivitás gyakorisága



4.3.2. Az anti-CCP3.1 teszt diagnosztikus hatékonysága a gyártó által megadott cutoff értékek szerint

Az anti-CCP3 és anti-CCP3.1 tesztek diagnosztikai szenzitivitása/specificitása 77,3/96,6%-nak illetve 85,7/89,9%-nak adódott (9. táblázat). A ROC görbe alatti területek (AUC) értéke ezen tesztek vonatkozásában 0,911 (95% CI 0,868-0,953) illetve 0,945 (95% CI: 0,916-0,974) volt. Összehasonlításképpen, az anti-CCP2 ELISA hasonló adatai 0,910 (95% CI: 0,873-0,946) voltak.

9. táblázat Az anti-CCP3, anti-CCP3.1 és anti-CCP2 szenzitivitása és specificitása standard cutoff értékek mellett

	Anti-CCP2	Anti-CCP3	Anti-CCP3.1
Szenzitivitás (%)	66.4	77,3	85.7
Specificitás (%)	98.3	96,6	89.8

4.3.3. A z anti-CCP3 és az anti-CCP3.1 teszt diagnosztikus teljesítménye optimalizált cutoff értékek szerint

A magasabb AUC érték a CCP3.1 vonatkozásában arra utal, hogy diagnosztikus hatékonysága jobb, mint a CCP3 vagy a CCP2 teszté. Ezért megvizsgáltuk, hogy a cutoff optimális megválasztásával tudjuk-e növelni a CCP3.1 teszt specificitását, a szenzitivitás jelentős megváltoztatása nélkül. Az optimális cutoff szintek meghatározása a ROC görbék analízisén alapult, és az anti-CCP2 esetében 12 U/ml; az anti-CCP3 esetében 15,6 U/ml, míg az anti-CCP3.1 esetében 23.7 U/ml volt. A diagnosztikus teljesítményre vonatkozó eredményeket ezután újraszámoltuk, a fentiekben említett, optimalizált cutoff értékeket használva. Ez 74,8/95,7%, 78,8/96,6% illetve 83,0/98,3% szenzitivitást/specificitást eredményezett az anti-CCP2, anti-CCP3 illetve anti-CCP3.1 teszt esetében (10. táblázat).

10. táblázat Az anti-CCP3.1 és anti-CCP2 teszt szenzitivitása és specificitása optimalizált cutoff értékek mellett

	Anti-CCP2	Anti-CCP3	Anti-CCP3.1
Szenzitivitás (%)	74.8	78,8	83.0
Specificitás (%)	95.7	96,6	98.3

4.3.4. Az anti-CCP3.1 és anti-CCP2 termelés összefüggései

Az RA-s populációban az anti-CCP3.1 és anti-CCP2 antitestek szérumszintje szorosan korrelált egymással ($R=0,845$; $p<0,0001$).

Ugyancsak szoros összefüggést sikerült kimutatni az anti-CCP3.1 és anti-CCP2 pozitivitás illetve negativitás között ($p=0,004$). A vizsgált betegek 72,2%-a anti-CCP3.1⁺/anti-CCP2⁺ volt, 15,1%-uk dupla negatívnak bizonyult. Összesen 12 (10,1%) anti-CCP2⁻ betegben

anti-CCP3.1-et lehetett kimutatni, míg mindössze 3 olyan beteg volt (2,5%), akikben az anti-CCP2 pozitivitást nem kísérte anti-CCP3.1 pozitívítás is (11. táblázat).

11. táblázat Összefüggés az anti-CCP2 és anti-CCP3.1 pozitívítás között (p=0,004)

	Anti-CCP3.1⁺	Anti-CCP3.1⁻
Anti-CCP2⁺	86 (72,2%)	3 (2,5%)
Anti-CCP2⁻	12 (10,1%)	18 (15,1%)

5. Megbeszélés

5.1. Anti-MCV autoantitest vizsgálata

Az ACPA-k specifikus diagnosztikus és prognosztikai markerekként bukkantak fel RA-ben. Ezen autoantitest család legújabb tagját, az anti-Sa-t, mint CV elleni autoantitestet azonosították 2004-ben (24-26). Ezt követően fejlesztették ki az anti-MCV ELISA-t, amely antigénként mutáns citrullinált vimentint alkalmaz. Munkánk ezen részének célja az anti-MCV teszt diagnosztikus értékének meghatározása volt. Emellett az anti-MCV ELISA-t összevetettük az anti-CCP2 illetve RF tesztek diagnosztikai teljesítményével.

A gyártók által ajánlott cutoff értékeket használva, az anti-MCV 9%-kal nagyobb szenzitivitás értéket mutatott, mint az anti-CCP2, és 4%-kal nagyobb szenzitivitást, mint az IgM RF; habár diagnosztikus specificitása alacsonyabb volt, mint az anti-CCP2 teszté (91.5% ill 98.8%). A ROC görbe analízis szerint azonban az RA diagnosztikájában az anti-MCV és anti-CCP2 ELISA diagnosztikai teljesítménye között nem volt szignifikáns a különbség.

Amennyiben, a jobb összehasonlíthatóság kedvéért, a cutoff értékeket egységesítettük, és ezáltal a specificitást minden teszt esetében 95%-ra állítottuk be, az anti-MCV ELISA szenzitivitása lecsökkent (69,7%), miközben az anti-CCP2 teszté emelkedett (74,8%). Fontos megemlíteni, hogy ezen cutoff értékeknél az IgM RF⁻ esetek 41,2%-a (14 beteg) és az anti-CCP2⁻ esetek 30%-a (9 beteg) anti-MCV⁺ volt. Összességében, az anti-MCV és anti-CCP2 együttes pozitivitása 98,3%-os diagnosztikus specificitást eredményezett, 97,6%-os PPV mellett.

Más kutatócsoportok adatai ellentmondásosak e tekintetben. Egyesek szerint az anti-CV diagnosztikus ereje RA-ban hasonló az anti-CCP-hez, ami 70% körüli szenzitivitást és 96% körüli specificitást jelent (149-150). Mások, hozzánk hasonlóan, az anti-MCV tesztet szenzitívebbnek találták, mint az anti-CCP2-t, közel azonos specificitás mellett (152,153). Korai arthritisben az anti-MCV szenzitivitása 59%, míg az anti-CCP2-é 55% volt, azonos (92%) specificitás mellett (39,63).

Egy nagy összehasonlító vizsgálatban hat kereskedelmi forgalomban levő ACPA assayt vetettek össze 102 RA-s és 196 kontroll szérummintában (154). A tesztek között szerepelt az anti-CCP2 IgG ELISA (Euroimmun), a CCP EliA (Phadia), a QuantaLite CCP3 IgG ELISA (Inova), a Citrullinated Protein Antibodies assay (Genesis), az Immunoscan RA (EuroDiagnostica) és az anti-MCV ELISA (Orgentec). A tesztek diagnosztikus szenzitivitása

70-78%, a specificitásuk 88-96% között változott. A tesztek diagnosztikus teljesítményében jelentős különbség nem volt, viszont a reprodukálhatóság szempontjából az egyes tesztek gyengén teljesítettek (154). A közelmúltban egy tanulmányban 11 ACPA assay teljesítményét összevetve a specificitást 98,5%-ra állították be az összehasonlíthatóság érdekében, és ekkor a tesztek szenzitivitása 41-74% között változott. Ebben a vizsgálatban az anti-MCV érzékenysége valamivel alacsonyabbnak bizonyult, mint az anti-CCP-é (155).

A különböző ACPA assay teljesítményében tapasztalható, időnként ellentmondásos különbségek összefüggésben állhatnak az egyes betegekben észlelhető, egyéni epitop-reaktivitási mintázatokkal. Feltételezhető, hogy ezek az antitestek nem meghatározott citrullinált molekulákkal, hanem különböző citrullinált epitopokkal reagálnak. Ugyancsak ez lehet a magyarázata az ACPA-k közötti keresztreaktivitásnak is. Az ACPA-k RA-specifikus antitestek, miközben más típusú arthritisek általában ACPA negatívak (10-12,115,116). Ennek hátterében az állhat, hogy az RA-s betegekben a citrullinált fehérjék szélesebb skálája expresszálódik a synoviumban, mint szeronegatív arthritisekben (10-12,39,40,63,115,116). Így pl. a vimentin széles körben expresszálódik az RA-s synoviumban, különösen a synovialis macrophagokban. (10-12,29,33,60,63,65,156,157).

RA-ban az autoimmun folyamatot beindító antigén összetétele továbbra is azonosítatlan maradt. Az RA-s synoviumot ellepő makrofágokban megjelenő és citrullinálódó vimentin azonban ígéretes molekulának bizonyul e tekintetben. A vimentin 43 arginin reziduumot tartalmaz, amelynek citrullinációját szintén a PAD enzimek végzik, számos különböző citrullinált epitopot eredményezve. Ezért valószínű, hogy a CV elleni antitestek nemcsak a betegség szenzitív és specifikus markerei, hanem az RA patogenezisében közvetlenül is szerepet játszanak.

Miután az anti-CCP2⁻ illetve RF⁻ betegek között is jelentős számban találtunk anti-MCV⁺ egyéneket, többféle teszt kombinálása növelheti a szenzitivitást, és hasznos lehet a diagnosztikában. Ami a prognosztikai értéket illeti, az eddigi tanulmányok adatai szerint az anti-MCV szenzitívebben jelezte előre a tartós aktivitást, a klinikai változásokat és a súlyosabb radiológiai progressziót, mint az anti-CCP2 vagy anti-CCP3 (151,153).

Ismeretes, hogy a HLA-DRB1 SE hordozás összefüggést mutat az anti-CCP2 termeléssel (10,11,78,80). Jelen eredményeink szerint az anti-MCV pozitivitás is szignifikáns korrelációt mutat a SE hordozással RA-ben. Ugyanakkor a RF és a SE jelenléte között nincs szignifikáns összefüggés. Mindez arra utal, hogy bár az anti-MCV és az IgM RF hasonló diagnosztikai szenzitivitású antitestek, valószínűleg különböző betegcsoportokra jellemző

ellenanyagok. Ezen adataink összhangban vannak azokkal a megfigyelésekkel, amelyek szerint a SE jelenléte erős genetikai predisponáló tényező az ACPA-k keletkezésére (10,11), és ez az anti-CCP mellett az anti-MCV-re is vonatkozik.

5.2. Anti-CCP2 izotípusok vizsgálata

A második generációs ELISA tesztek magas szenzitivitással és specificitással az RA-s betegek megközelítőleg 70-75%-ában képesek kimutatni az IgG izotípusú anti-CCP2 autoantitesteket (43). Az IgA és IgM anti-CCP izotípusokról azonban jóval kevesebb információval rendelkezünk. Bár a különféle autoimmun betegségek megítélésében általában az IgG izotípusú autoantitestek tekinthetőek leginkább relevánsnak, bizonyos esetekben az IgA és IgM izotípusok specifikus jelentőséggel bírnak. Például az IgA anti-dsDNS antitestek összefüggést mutatnak az SLE aktivitásával, és a magasabb IgG/IgM anti-dsDNS arány összefügg a veseérintettséggel (158,159). Az antifoszfolipid szindróma egyik klasszifikációs kritériuma az IgM típusú antifoszfolipid antitestek jelenléte, de az IgA antitestek is összefüggnek a betegség specifikus tüneteivel (160-162). RA-ban egy betegben az RF mindhárom izotípusa megjelenhet. Általában az IgG és IgA RF előfordulása ritkább, mint az IgM RF-é, de az IgG és IgA izotípusok specificitása magasabb lehet (54,163). Az IgA RF jelenléte NDP-ben prediktív értékű és az RA kialakulását vetítheti előre. Emellett erózióval járó betegségformával társul (123,125).

Eredményeink azt mutatják, hogy az IgA és IgM anti-CCP2 antitestek szintje az RA-s betegek szérumában emelkedett a kontrollokhoz képest. Bár ezen antitest izotípusokat a vizsgált RA-s populációnak csak megközelítőleg a felében találtuk pozitívnak, diagnosztikai specificitásuk meghaladta a RF bármely izotípusának specificitását, így hasznosabb diagnosztikai tesztnek bizonyultak, mint az IgA vagy IgG RF. Az IgA vagy IgM anti-CCP2 antitestek jelenléte jelentősen megerősíti az RA diagnózist, és a hármas pozitívitás az anti-CCP2 teszt specificitását 99,2%-ra emeli.

Más szerzők az anti-CCP pozitív RA-s betegek 58,0-75,3%-ának szérumában IgA és 47-49,4%-uk szérumában IgM anti-CCP antitesteket mutattak ki (58,59). Átlagosan 7 éves utánkövetés után az IgA és IgG anti-CCP⁺ betegek arányában csökkenés volt megfigyelhető, ellentétben az IgM anti-CCP⁺ betegekkel, ahol ugyanezt a változást nem észlelték. A szerzők azt a következtetést vonták le, hogy az IgM antitestek hosszantartó jelenléte folyamatosan

jelenlévő antigénstimulusra utal, amely egyre újabb B sejteket stimulál. Azonban az adatok elemzése azt mutatja, hogy az IgM anti-CCP antitestek frekvenciájában megfigyelhető viszonylagos „stabilitás” abból fakad, hogy a betegek 12,5%-ában negatívból pozitívvá változott a CCP status, ezzel egyidejűleg a betegek 20,3%-ában pedig pozitívból negatív fenotípus jön létre. Az RA-s betegek egyötödében megszűnő IgM válasz, az IgA és IgG anti-CCP pozitivitás gyakoriságának csökkenésével együtt arra utal, hogy az anti-CCP válasz néhány beteg esetében kiéghet (57,58). Ezen adatok megerősítik eredményeinket, miszerint amellet, hogy a régóta fennálló RA-ban szignifikánsan alacsonyabb az IgM anti-CCP2 pozitivitás gyakorisága, világosan megfigyelhető volt az a tendencia, hogy az IgG és/vagy IgA anti-CCP pozitivitás frekvenciája is lecsökkent. A tripla antitest pozitív betegek esetén, hosszan tartó betegségfennállás után, ez még kifejezettebb volt. Egyelőre nem tisztázott, hogy az egyes anti-CCP izotípusok változása a betegség természetes lefolyásával állt-e összefüggésben vagy a gyógyszeres kezelés hatására következett be.

Egyes közlések szerint az anti-CCP tesztek diagnosztikai szenzitivitása nagyon korai arthritisben alacsonyabb (43,135). Ez ellentmond a mi vizsgálatunkban észlelteknak, hiszen itt korai RA-ban magasabb volt az anti-CCP2 antitestek frekvenciája. Figyelembe kell azonban venni, hogy a mi betegeink között egyetlen NDP-s sem volt; minden beteg megfelelt az ACR kritériumok szerinti definitív RA-nak.

Az RA diagnózisa számos vizsgálat szerint gyakran az első tünetek megjelenéséhez képest késve kerül megállapításra. Azonban az IgG anti-CCP antitestek az RA-s betegek felénél a tünetek kialakulását megelőzően megjelenhetnek (123,164), ami értékes prediktív markerré teszi az IgG anti-CCP antitesteket. Az IgM és IgA anti-CCP antitestek prediktív értéke még nem ismert. Ugyanakkor az IgM anti-CCP2 antitestek magas prevalenciája korai RA-ban kimondottan arra utal, hogy ezek az antitestek vagy egyszerre, vagy korábban jelenhetnek meg, mint az IgG anti-CCP2 antitestek.

Az RA elkülönítése egyéb reumatológiai betegségektől, különösen a Sjögren syndromához társuló polyarthritisektől, bonyolult diagnosztikai problémát jelent. Bár a kettős és hármas anti-CCP2 pozitivitás igen kifejezett diagnosztikus specificitása ezt a differenciálást elősegíti, a téma további vizsgálatokat igényel. Az anti-CCP antitestek, a mi eredményeinkhez hasonlóan, kimutathatóak a Sjögren syndromás betegek 7,5%-ában, amely esetek viszont nem merítik ki az RA kritériumait. Mindenesetre a többszörös anti-CCP pozitivitás magas diagnosztikus specificitása arra utal, hogy az általunk vizsgált betegek közül a kettős vagy hármas izotípus pozitivitást mutató pSS-ban vagy PM esetekben nem vethető el

társuló RA későbbi kialakulása, ezért ezen betegeket klinikailag, laboratóriumi markerekkel és képkötőkkel is követni érdemes.

Mint láttuk, az ACPA válasz kialakulását elősegíti a HLA-DRB1 SE allélek hordozása (11,30-32). A HLA-DR géneknek a CD4⁺ αβ T sejt repertoárra gyakorolt igen kifejezett hatása jól ismert, és a SE allélek által kódolt HLA molekulák hatékonyan prezentálják a saját citrullinált peptideket a CD4⁺ T sejteknek a thymusban (93). Az arginin-citrullin átalakulás jelentősen fokozza az arginin-tartalmú peptidek SE-hoz való affinitását, és a CD4⁺ T sejtek aktivációjához vezet (88). A SE allélek előfordulási gyakorisága és megoszlása a magyar RA-s betegek körében a közlemények tanulsága szerint hasonló, bár valamivel alacsonyabb mint más európai populációkban (77). Jelen vizsgálatban meg tudtuk erősíteni a SE hordozás és az anti-CCP2 antitestek közötti összefüggést, és ki tudtuk terjeszteni ezt az IgA és IgM izotípusokra is.

Összességében elmondható, hogy az RA-s betegekben IgA és IgM anti-CCP2 antitestek vannak jelen, és hasonlóan specifikusak a betegségre, mint az IgG anti-CCP2 izotípusú antitestek. Az IgA és IgM anti-CCP2 antitestek termelődése ugyanolyan szorosan összefügg a HLA-DRB1 SE allélek jelenlétével, mint az IgG anti-CCP2 antitesteké. Az IgM és IgA anti-CCP2 pozitivitás az RA diagnózisát megerősíti, a tripla pozitivitás pedig 99,2%-os diagnosztikus specificitást jelent. Az IgM anti-CCP2 antitestek sokkal gyakoribbak korai RA-ban, mint a régóta fennálló RA esetén, ami azt sugallja, hogy ezek az antitestek leginkább a citrullinált antigének elleni immunválasz első fázisában termelődnek. Adataink azt sugallják, hogy az antitest válasz az RA-s betegek némelyikében csökken, míg másokban változatlan marad a betegség lefolyása során.

5.3. Anti-CCP3 és -CCP3.1 teszt vizsgálata

Az anti-CCP ELISA tesztek újabb generációinak diagnosztikai teljesítményében fokozatos fejlődés észlelhető. Ennek megfelelően a korábbi anti-CCP1 és anti-CCP2 ELISA-k után harmadik generációs assay-k jelentek meg a piacon (165).

Vizsgálatunkban az anti-CCP3 ELISA teljesítménye hasonlóan, az anti-CCP3.1 ELISA diagnosztikus teljesítménye pedig jobbnak bizonyult, mint a második generációs teszté. A CCP3 teszt más citrullinált peptid antigéneket alkalmaz, mint a CCP2 tesztek. Az anti-CCP3.1 ELISA emellett IgG+IgA antitestek összességét detektálja. A CCP3.1 teszt magasabb szenzitivitása valószínűleg részben annak tulajdonítható, hogy IgA és IgG izotípusú antitesteket is detektál, habár saját eredményeink szerint az izolált IgA anti-CCP pozitivitás

extrém ritka RA-ban (1/119). A magasabb szenzitivitás másik forrása a CCP2-től különböző antigén lehet, bár eredményeink azt mutatják, hogy kevés olyan RA-s minta van, amelyik kizárólag a CCP2 peptiddel reagál és a CCP3 peptiddel nem.

A tesztek diagnosztikai teljesítményét mindegyik vizsgálatban növelni tudtuk a ROC analízisen alapuló optimalizált cutoff értékek bevezetésével. Ez alátámasztja a laboratóriumok felelősségét az újonnan bevezetett tesztek értékelésében és optimalizálásában, a betegpopuláció helyi jellegzetességeinek és a laboratóriumok technikai felkészültségének megfelelően.

6. Összefoglalás - Új eredmények

Amíg számos autoimmun-reumatológiai betegségben az adott betegségre jellemző autoantitest-profil megkönnyíti a diagnózist, addig rheumatoid arthritisben (RA) sokáig csak a szenzitív, de nem specifikus rheumatoid faktor meghatározása volt elérhető. Mindez az utóbbi évtizedben, az anti-citrullinált protein/peptid antitestek (ACPA) megjelenésével drámai fordulatot vett. Az ACPA tesztek igen érzékenyek és specifikusak, és lehetővé teszik az RA korai laboratóriumi diagnosztikáját.

Jelen munkánkban újabb adatokat igyekeztünk szolgáltatni az ACPA-k diagnosztikus értékével kapcsolatban. Munkánk új eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A világon az elsők között alkalmaztuk az új anti-MCV tesztet. Kimutattuk, hogy bár az anti-MCV és a korábban alkalmazott második generációs anti-CCP assay diagnosztikus teljesítménye hasonló, a betegek egy része anti-CCP negativitás mellett anti-MCV pozitivitást mutat. Ezért a két teszt kombinált alkalmazása révén a betegek nagyobb hányadát ismerhetjük fel.

2. Vizsgálatainkban a harmadik generációs anti-CCP3, és még inkább a továbbfejlesztett anti-CCP3.1 assay diagnosztikus teljesítménye jobb a második generációs anti-CCP2 teszténél.

3. Elsőként vizsgáltuk az anti-CCP izotípusok esetleges differenciált diagnosztikai szerepét. A széles körben mért IgG izotípus mellett az IgA és IgM izotípusok meghatározásának is jelentősége lehet RA-ban. Az IgM izotípus megjelenése a betegség korai szakában arra utal, hogy ezen izotípus vizsgálata megkönnyítheti a korai RA felismerését.

7. Summary

Anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPA) including anti-CCP and others have emerged as sensitive and specific serological markers of RA. First we examined the diagnostic performance of the newly developed anti-mutated citrullinated vimentin (MCV) antibody assay. In this study, anti-MCV levels together with those of anti-CCP2 and rheumatoid factors (RF) were determined in the sera of 237 individuals including 119 RA patients and 118 controls. Diagnostic properties were compared by receiving operating characteristic curve (ROC) analysis. When using manufacturer recommended cut-off values, sensitivity and specificity of anti-MCV antibodies was 75.6 % and 91.5% in RA, compared to 66.4 % and 98.3% for anti-CCP2. Introducing cut-off values to obtain the same 95% specificity resulted in decreased sensitivity of the anti-MCV test (69.7%), and increased sensitivity of the anti-CCP2 test (74.8%). At optimal cut-off levels, 41% of IgM RF negative cases, as well as 30% of anti-CCP2 negative cases in the RA group were anti-MCV positive. Double positivity for anti-MCV and anti-CCP2 provided 98.3% specificity with 97.5% positive predictive value in RA.

Next, the new generation CCP3 and CCP3.1 assays were also tested in comparison to the standard CCP2 assay. Again, samples from 119 RA patients and 118 controls were assessed. The sensitivity of the CCP3.1, CCP3 and CCP2 assays were 83%, 79% and 75%, respectively, while the specificity of the three assays were 98%, 97% and 96%, respectively. Among RA patients, 15 CCP2-negative subjects were tested positive using the third generation assays.

Finally, while the differential role of RF isotypes is more or less well-characterized, little information is available regarding anti-CCP isotypes. Therefore IgG, IgA and IgM anti-CCP2 and RF levels were measured in the sera of 119 RA patients and 118 controls. We assessed the diagnostic performance of IgA and IgM anti-CCP2 antibodies and their relationship with IgG anti-CCP2, RFs, disease duration and the presence of HLA-DRB1 shared epitope (SE) alleles. Patients with RA had significantly higher serum IgA and IgM anti-CCP2 antibody levels than healthy subjects and patients with other rheumatic diseases ($p < 0.0001$). IgG, IgA and IgM anti-CCP2 antibodies were present in 74.8%, 52.9% and 44.5% of RA patients, and their diagnostic specificity was 95.8%, 95.8% and 91.6%, respectively. The presence of anti-CCP2 antibodies was significantly associated with SE alleles ($p = 0.03$). The frequency of IgM anti-CCP2 positivity was lower in longstanding disease compared to early RA ($p = 0.03$).

In conclusion, the performance of the novel anti-MCV ELISA for the diagnosis of RA is similar to that of the anti-CCP2 test, however, as the diagnostic spectrum of the anti-MCV assay is somewhat different from that of anti-CCP2, the combined application of the two assays can improve the laboratory diagnostics of RA. In our hands, the third generation CCP3 and CCP3.1 ELISAs performed better than the CCP2 assays. The CCP3.1 assay may represent a significant improvement over the other two assays. Furthermore, IgA and IgM anti-CCP2 antibodies are present in RA patients, and they are similarly specific for RA as IgG anti-CCP2. The higher frequency of IgM anti-CCP2 antibodies in early RA suggests that they are mostly generated during the first phase of immune response; nonetheless, their production seems to be sustained in some patients. The introduction of anti-MCV, anti-CCP3.1 assays and the determination of anti-CCP isotypes may enable a more refined characterization of RA patients.

8. Irodalomjegyzék

1. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005;4:130-136.
2. Szekanecz Z, Surányi P, Tamási L. Rheumatoid arthritis. Sanofi-Aventis kiadás, 2006.
3. Szekanecz Z, Koch AE. Update on synovitis. *Current Rheumatol Reports* 2001;3:53-63.
4. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005 May;140(2):195-204.
5. Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G. B lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: targeting of CD20. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:175-92.
6. Ruderman EM, Pope RM. The evolving clinical profile of abatacept (CTLA4-Ig): a novel co-stimulatory modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7 Suppl 2:S21-5.
7. Tamási L, Szekanecz Z. A biológiai terápia lehetőségei az arthritisek és a szisztémás autoimmun betegségek kezelésében. *Orv Hetil* 2007; 148 (13 Suppl 1): 63-70.
8. Lakos G., Soós L, Fekete A, Végvári A, Szabó Z, Szekanecz Z. A rheumatoid arthritis laboratóriumi diagnosztikája. *Magyar Reumatol* 2006;47: 86-96.
9. Smolen JS: Autoantibodies in rheumatoid arthritis. In: *Manual of biological markers of disease* (van Venrooij WJ, Maini RN eds), Kluwer, Dordrecht, 1996;1-18.
10. Klareskog L, Widhe M, Hermansson M, Rönnelid J. Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise, *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:300-305.
11. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis Res Ther* 2008;10:205.
12. Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Végvári A, Sipka S, Szűcs G, Szántó S, Lakos G. Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets? *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;34:26-31.
13. van Venrooij WJ, van Beers JJ, Pruijn GJ. Anti-CCP antibody, a marker for early detection of rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 2008;1143:268-285.
14. Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 2005;10:54-64.
15. Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 2007;1108:323-339.

16. Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, Petit-Teixeira E, Clavel C, Nogueira L, Vincent C, Cornelis F, Roudier J, Serre G. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2004;71:493-502.
17. Skogh T. Does a positive anti-CCP test identify a distinct arthritis entity? *Arthritis Res Ther* 2005;7:230-232.
18. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2009 Mar 21 [Epub]
19. Vittecoq O, Lequerré T, Goeb V, Le Loet X, Abdesselam TA, Klemmer N. Smoking and inflammatory diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:923-935.
20. Nienhuis RLF, Mandema EA. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis*. 1964;23:302-305.
21. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1979;2:97-99.
22. Aho K, von Essen R, Kurki P, Palosuo T, Heliövaara M. Antikeratin antibody and antiperinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. *J Rheumatol*. 1993;20:1278-1281.
23. Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1993;92:1387-1393.
24. Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Menard HA. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994 ;21:1027-1033.
25. Hayem G, Chazerain P, Combe B, Elias A, Haim T, Nicaise P, Benali K, Eliaou JF, Kahn MF, Sany J, Meyer O. Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999;26:7-13.
26. Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ, Menard HA. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther*. 2004;6:R142-50.
27. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*. 2003;25:1106-1118.
28. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, van Venrooij WJ. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2004;63:373-381.

29. Chang, X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiko S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:40-50.
30. van der Helm-van Mil AH, Wesoly JZ, Huizinga TW. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:299-304.
31. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E, van Venrooij WJ, Verweij CL, Toes RE, de Vries RR. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2113-2121.
32. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, Schreuder GM, Wener M, Breedveld FC, Ahmad N, Lum RF, de Vries RR, Gregersen PK, Toes RE, Criswell LA. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005;52:3433-3438.
33. Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3485-3494.
34. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Méchin MC, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M, Serre G. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3 and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum* 2007;56:3541-3553.
35. Hassfeld W, Steiner G, Studnicka-Benke A, Skriner K, Graninger W, Fischer I, Smolen JS. Autoimmune response to the spliceosome. An immunologic link between rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995;38:777-785.
36. De Rycke L, Nicholas AP, Cantaert T, Kruithof E, Echols JD, Vanderkerckhove B, Veys EM, De Keyser F, Baeten D. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2005;52:2323-2330.
37. Kinloch A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, Saxne T, Malmström V, Venables PJ. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2287-2295.
38. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001;166:4177-4184.
39. Soós L, Szekanecz Z, Szabó Z, Fekete A, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Kapitány A, Végvári A, Sipka S, Szegedi G, Lakos G. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007;34:1658-1663.

40. Sebbag M, Moinard N, Auger I, Clavel C, Arnaud J, Nogueira L, Roudier J, Serre G. Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur J Immunol* 2006;36:2250-2263.
41. Aho K, Palosuo T, Lukka M, Kurki P, Isomaki H, Kautiainen H, von Essen R. Antifilaggrin antibodies in recent-onset arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1999;28:113-116.
42. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998;101:273-281.
43. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000;43:155-163.
44. Fekete A, Soós L, Szekanecz Z., Szabó Z, Szodoray P, Baráth S, Lakos G. Disturbances in B and T cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun* 2007;29:154-163.
45. Van Esch WJ, Reparón-Schuijt CC, Hamstra HJ, Van Kooten C, Logtenberg T, Breedveld FC, Verweij CL. Human IgG Fc-binding phage antibodies constructed from synovial fluid CD38+ B cells of patients with rheumatoid arthritis show the imprints of an antigen-dependent process of somatic hypermutation and clonal selection. *Clin Exp Immunol* 2003;131:364-376.
46. Rodríguez-Bayona B, Pérez-Vanegas JJ, Rodríguez C, Brieva JA. CD95-mediated control of anti-citrullinated protein/peptides antibodies (ACPA)-producing plasma cells occurring in rheumatoid arthritis inflamed joints. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:612-616.
47. Masson-Bessière C, Sebbag M, Durieux JJ, Nogueira L, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, Durroux R, Cantagrel A, Serre G. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol.* 2000;119:544-552.
48. Reparón-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten C, Schellekens GA, de Jong BA, van Venrooij WJ, Breedveld FC, Verweij CL. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:41-47.
49. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, Serre G. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcγ receptor IIA engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2008;58:678-688.
50. Brózik M, Szakonyi J, Magyar A, Tobi R, Hudecz F, Böhm U, Merétey K, Gergely P. Antifilaggrin autoantitestek és citrullin tartalmú fehérje antigének szerepe a rheumatoid arthritis pathomechanizmusában és diagnosztikájában. *Magyar Reumatológia* 2002;43:19-24.

51. Smolen JS, Keystone EC, Emery P, Breedveld FC, Betteridge N, Burmester GR és mtsai. Consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:143-150.
52. Szekanecz Z. Rituximab rheumatoid arthritisben. *Magy Immunol* 2007;6:36-41.
53. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engström A, Venables PJ, Lundeberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmström V. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from rheumatoid arthritis patients: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis* 2008 Jul 17 [Epub]
54. Vallbracht I, Helmke K. Additional diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2005;4:389-394.
55. 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;63:1079-1084.
56. Nell-Duxneuner V, Machold K, Stamm T, Eberl G, Heinzl H, Hoefler E, Smolen JS, Steiner G. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis - a follow-up study. *Ann Rheum Dis* 2009 Jan 19 [Epub]
57. Lakos G, Soós L, Fekete A, Szabó Z, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Kapitány A, Gyetvai Á, Szegedi G, Szekanecz, Z. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26: 253-260.
58. Verpoort KN, Jol-van der Zijde CM, Papendrecht-van der Voort EA, Ioan-Facsinay A, Drijfhout JW, van Tol MJ, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE. Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3799-3808.
59. Ioan-Facsinay A, Willemze A, Robinson DB, Peschken CA, Markland J, van der Woude D, Elias B, Menard HA, Newkirk M, Fritzler MJ, Toes RE, Huizinga TW, El-Gabalawy HS. Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. *Arthritis Rheum* 2008;58:3000-3008.
60. Asaga H, Yamada M, Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243:641-646.
61. Tilleman K, Van Steendam K, Cantaert T, De Keyser F, Elewaut D, Deforce D. Synovial detection and autoantibody reactivity of processed citrullinated isoforms of vimentin in inflammatory arthritides. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:597-604.
62. Nicaise Roland P, Grootenboer Mignot S, Bruns A, Hurtado M, Palazzo E, Hayem G, Dieudé P, Meyer O, Chollet Martin S. Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R142.

63. Szekanecz Z, Lakos G: Rheumatoid arthritis diagnosis with anti-MCV ELISA by Orgentec Diagnostika. *Expert Opin Medical Diagn* 2008;2:1083-1090.
64. El-Gabalawy HS, Wilkins JA. Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenic significance to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:86-89.
65. Takizawa Y, Suzuki A, Sawada T, Ohsaka M, Inoue T, Yamada R, Yamamoto K. Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 2006;65: 1013-1020.
66. Hill JA, Al-Bishri J, Gladman DD, Cairns E, Bell DA. Serum autoantibodies that bind citrullinated fibrinogen are frequently found in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:2115-2119.
67. Vander Cruyssen B, Cantaert T, Nogueira L, Clavel C, De Rycke L, Dendoven A, Sebbag M, Deforce D, Vincent C, Elewaut D, Serre G, De Keyser F. Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R122.
68. Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, Aarden L, Dijkmans BA, Hamann D. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1199-1204.
69. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 2008;58:3009-3019.
70. Kinloch A, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, Moyes D, Taylor PC, Venables PJ. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1421-R1429.
71. Goeb V, Thomas-L'otellier M, Daveau R, Charlionet R, Fardellone P, Le Loet X, Tron F, Gilbert D, Vittecoq O. Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R38.
72. Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R, Fardellone P, Lange C, Marvin L, Machour N, Le Loet X, Gilbert D, Tron F. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1196-1201.
73. Pratesi F, Moscato S, Sabbatini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol* 2000;27:109-115.
74. de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:218-224.

75. Anzilotti C, Merlini G, Pratesi F, Tommasi C, Chimenti D, Migliorini P. Antibodies to viral citrullinated peptide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:647-651.
76. Anzilotti C, Riente L, Pratesi F, Chimenti D, Delle Sedie A, Bombardieri S, Migliorini P. IgG, IgA, IgM antibodies to a viral citrullinated peptide in patients affected by rheumatoid arthritis, chronic arthritides and connective tissue disorders. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1579-1582.
77. Kapitány A, Zilahi E, Szántó S, Szűcs G, Szabó Z, Végvári A, Rass P, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z. Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary. *Ann NY Acad Sci* 2005;1051:263-270.
78. Kapitány A, Szabó Z, Lakos G, Aleksza M, Végvári A, Soós L, Karányi Z, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J (IMAJ)*, 2008;10:32-36.
79. Ollier W, Thomson W. Population genetics of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992;18:741-759.
80. Poór G, Nagy ZB, Schmidt Z, Brózik M, Merétey K, Gergely P jr. Genetic background of anticyclic citrullinated peptide autoantibody production in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 2007;1110:23-32.
81. Goeb V, Dieudé P, Daveau R, Thomas-L'otellier M, Jouen F, Hau F, Boumier P, Tron F, Gilbert D, Fardellone P, Cornélis F, Le Loet X, Vittecoq O. Contribution of PTPN22 1858T, TNFR2 196R and HLA-shared epitope alleles with rheumatoid factors and anti-citrullinated protein antibodies to very early arthritis diagnosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1208-1212.
82. Kaltenhauser S, Wagner U, Schuster E, Wassmuth R, Arnold S, Seidel W, Troltsch M, Loeffler M, Hantzschel H. Immunogenetic markers and seropositivity predict radiological progression in early rheumatoid arthritis independent of disease activity. *J Rheumatol* 2001;28:735-744.
83. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, Sturfelt G, Nyhall-Wahlin BM, Truedsson L, Dechant SA, Matteson EL. The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1386-1393.
84. dr Vries-Brouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Verpoort KN, Schreuder GM, Ewals JA, terwiel JP, Roday HK, kerstens PJ, Toes RE, de Vries RR, Breedveld FC, Dijkmans BA, Huizinga TW, Allaart CF. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis Rheum* 2008;58:1293-1298.
85. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1117-1121.

86. Auger I, Sebbag M, Vincent C, Balandraud N, Guis S, Nogueira L, Svensson B, Cantagrel A, Serre G, Roudier J. Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2005;52:3424-3432.
87. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2007;56:425-432.
88. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 2003;171:538-541.
89. Irigoyen P, Lee AT, Wener MH, Li W, Kern M, Batliwalla F. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 2005;52:3813-3818.
90. Karlson EW, Chibnik LB, Cui J, Plenge RM, Glass RJ, Maher NE, Parker A, Roubenoff R, Izmailova E, Coblyn JS, Weinblatt ME, Shadick NA. Associations between human leukocyte antigen, PTPN22, CTLA4 genotypes and rheumatoid arthritis phenotypes of autoantibody status, age at diagnosis and erosions in a large cohort study. *Ann Rheum Dis* 2008;67:358-363.
91. Vander Cruyssen B, Hoffman IE, Peene I, Union A, Mielants H, Meheus L, De Keyser F. Prediction models for rheumatoid arthritis during diagnostic investigation: evaluation of combination of rheumatoid factor, anti-citrullinated protein/peptide antibodies and the human leukocyte antigen-shared epitope. *Ann Rheum Dis* 2007;66:364-369.
92. Ding B, Padyukov L, Lundström E, Seielstad M, Plenge RM, Oksenberg, JR, Gregersen PK, Alfredsson L, Klareskog L. Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 2009;60:30-38.
93. Roudier J. Association of MHC and rheumatoid arthritis. Association of RA with HLA-DR4: the role of repertoire selection. *Arthritis Res* 2000;2:217-220.
94. Verpoort KN, Cheung K, Ioan-Facsinay A, van der Helm-van Mil AH, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Drijfhout JW, de Vries RR, Breedveld FC, Huizinga TW, Pruijn GJ, Toes RE. Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 2007;56:3949-3952.
95. Szekanecz Z, Szabó Z, Kapitány A, Gyetvai Á, Szegedi G, Sipka S, Lakos G. Association of anti-CCP and anti-MCV antibodies with HLA-DRB1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66 Suppl:534.
96. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding

citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003;34:395-402.

97. Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum* 2005;54:90-96

98. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Wolfe F, Kastner DL, Alfredsson L, Altshuler D, Gregersen PK, Klareskog L, Rioux JD. Replication of putative candidate-gene association with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4 and PADI4. *Am J Hum Genet* 2005;77:1044-1060.

99. Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, Worthington J. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum* 2004;50:1117-1121.

100. Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, Bongiorno F, Moscato S, Pratesi F, Pierlot C, Osorio J, Chapuy-Regaud S, Guerrin M, Cornelis F, Serre G, Migliorini P; ECRAF. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann Rheum Dis* 2005;64:587-593.

101. Martinez A, Valdivia A, Pascual-Salcedo D, Lamas JR, Fernandez-Arquero M, Balsa A, Fernandez-Gutierrez B, de la Concha EG, Urcelay E. PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:1263-1266.

102. Costenbader KH, Chang SC, De Vivo I, Plenge R, Karlson EW. Genetic polymorphisms in PTPN22, PADI-4 and CTLA-4 and risk for rheumatoid arthritis in two longitudinal cohort studies: evidence of gene-environment interactions with heavy cigarette smoking. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R52.

103. Kokkonen H, Johansson M, Innala L, Jidell E, Rantapää-Dahlqvist S. The PTPN22 1858C/T polymorphism is associated with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-positive early rheumatoid arthritis in northern Sweden. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R56.

104. Farago B, Talian GC, Komlosi K, Nagy G, Berki T, Gyetvai A, Szekanecz Z, Nyarady Z, Kiss CG, Nemeth P, Czirjak L, Melegh B. Protein tyrosine phosphatase gene C1858T allele confers risk for rheumatoid arthritis in Hungarian subjects. *Rheumatol Int* 2008 Nov 26 [Epub]

105. Feitsma AL, Toes RE, Begovich AB, Chokkalingam AP, de Vries RR, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH. Risk of progression from undifferentiated arthritis to rheumatoid arthritis: the effect of the PTPN22 1858T allele in anti-citrullinated peptide antibody positive patients. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1092-1095.

106. Johansson M, Ariestig L, Hallmans G, Rantapää-Dahlqvist S. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R19.

107. Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, de la Serna AR, Fernandez-Gutierrez B, Castaneda S, Largo R, Joven B, Narvaez J, Navarro F, Marengo JL, Vicario JL, Blanco FJ, Fernandez-Lopez JC, Caliz R, Collado-Escobar MD, Carreno L, Lopez-Longo J, Canete JD, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1264-1274.
108. Thabet MM, Huizinga TW, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Bakker AM, Kurreeman FA, White S, Toes RE, van der Helm-van Mil AH. The contribution of Fc gamma receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008 Nov 19 [Epub]
109. Klareskog L, Padyukov L, Lorentzen J, Alfredsson L. Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. *Nature Clin Pract Rheumatol* 2006;2:425-433.
110. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk for seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3085-3092.
111. Pedersen M, Jacobsen S, Garred P, Madsen HO, Klarlund M, Svejgaard A, Pedersen BV, Wohlfahrt J, Frisch M. Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: a nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum* 2007;56:1446-1453.
112. Verpoort KN, Papendrecht-van der Voort EA, van der Helm-van Mil AH, Jol-van der Zijde CM, van Tol MJ, Drijfhout JW, Breedveld FC, de Vries RR, Huizinga TW, Toes RE. Association of smoking with the constitution of the anti-cyclic citrullinated peptide response in the absence of HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 2007;56:2913-2918.
113. Michou L, Teixeira VH, Pierlot C, Lasbleiz S, Bardin T, Dieudé P, Prum B, Cornélis F, Petit-Teixeira E. Associations between genetic factors, tobacco smoking and autoantibodies in familial and sporadic rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:466-470.
114. Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, Kloppenburg M, de Vries RR, le Cessie S, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* 2006;65:366-371.
115. Alenius GM, Berglin E, Rantapää-Dahlqvist S. Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) in psoriatic patients with or without joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 2006;65:398-400.
116. Korendowych E, Owen P, Ravindran J, Carmichael C, McHugh N. The clinical and genetic associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1056-1060.

117. Beltrami A, Rossmann M, Fiorillo MT, Paladini F, Sorrentino R, Saenger W, Kumar P, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B. Citrullination-dependent differential presentation of a self-peptide by HLA-B27 subtypes. *J Biol Chem* 2008;283:27189-27199.
118. Zhao Y, Li J, Li XX, Li C, Li L, Li ZG. What can we learn from the presence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in systemic lupus erythematosus? *Joint Bone Spine* 2009 Mar 14 [Epub]
119. Morita Y, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:542-547.
120. Szűcs G, Szekanecz Z, Zilahi E, Kapitány A, Baráth S, Szamosi S, Végvári A, Szabó Z, Szántó S, Czirják L, Kiss CG. Systemic sclerosis-rheumatoid arthritis overlap syndrome: a unique combination of features suggests a distinct genetic, serological and clinical entity. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46: 989-993.
121. El-Gabalawy H. The preclinical stages of RA: lessons from human studies and animal models. *Best Pract Clin Res Rheumatol* 2009;23:49-58.
122. Raza K, Filer A. Predicting the development of RA in patients with early undifferentiated arthritis. *Best Pract Clin Res Rheumatol* 2009;23:25-36.
123. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2741-279.
124. 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.
125. 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;42:677-680.
126. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, Nicaise-Roland P, Sibilia J, Combe B. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003;62:120-126.
127. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004;63:1085-1089.
128. Chapuy-Regaud S, Sebbag M, Baeten D, Clavel C, Foulquier C, De Keyser F, Serre G. Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides. *J Immunol* 2005;174:5057-5064.
129. Courvoisier N, Dougados M, Cantagrel A, Goupille P, Meyer O, Sibilia J, Daures JP, Combe B. Prognostic factors of 10-year radiographic outcome in early rheumatoid arthritis: a prospective study. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R106.

130. Syversen SW, Gaarder PI, Goll GL, Odegard S, Haavardsholm EA, Mowinckel P, van der Heijde D, Landewé R, Kvien TK. High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 2008;67:212-217.
131. Solau-Gervais E, Legrand JL, Cortet B, Duquesnoy B, Flipo RM. Magnetic resonance imaging of the hand for the diagnosis of rheumatoid arthritis in the absence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies: a prospective study. *J Rheumatol* 2006;33:1760-1765.
132. Sihvonen S, Korpela M, Mustila A, Mustonen J. The predictive value of rheumatoid factor isotypes, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, and antineutrophil cytoplasmic antibodies for mortality in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:2089-2094.
133. Mikuls TR, O'Dell JR, Stoner JA, Parrish LA, Arend WP, Norris JM, Holers VM. 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;50:3776-3782.
134. Caramaschi P, Biasi D, Tonolli E, Pieropan S, Martinelli N, Carletto A, Volpe A, Bambara LM. Antibodies against cyclic citrullinated peptides in patients affected by rheumatoid arthritis before and after infliximab treatment. *Rheumatol Int* 2005;26:58-62. 137.
135. Matsui T, Shimada K, Ozawa N, Hayakawa H, Hagiwara F, Nakayama H, Sugii S, Ozawa Y, Tohma S. Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:2390-2397.
136. Ahmed MM, Mubashir E, Wolf RE, Hayat S, Hall V, Shi R, Berney SM. Impact of treatment with infliximab on anticyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. *South Med J* 2006;99:1209-1215.
137. De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, Van den Bosch F, Hoffman IE, Veys EM, De Keyser F. Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:299-302.
138. Eriksson C, Engstrand S, Sundqvist KG, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibody formation in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF alpha. *Ann Rheum Dis* 2005;64:403-407.
139. Bos WH, Bartelds GM, Wolbink GJ, de Koning MH, van de Stadt RJ, van Schaardenburg D, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. Differential response of the rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies during adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008;35:1972-1977.
140. Bos WH, Bartelds GM, Vis M, van der Horst AR, Wolbink GJ, van de Stadt RJ, van Schaardenburg D, Dijkmans BA, Lems WF, Nurmohamed MT, Aarden L, Hamann D. Preferential decrease in IgG4 anti-citrullinated protein antibodies during treatment with tumour necrosis factor blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:558-563.

141. Potter C, Hyrich KL, Tracey A, Lunt M, Plant D, Symmons DP, Thomson W, Worthington J, Emery P, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs J, Barton A, BRAGGSS. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:69-74.
142. Braun-Moscovici Y, Markovits D, Zinder O, Schapira D, Rozin A, Ehrenburg M, Dain L, Hoffer E, Nahir AM, Balbir-Gurman A. Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;33:497-500.
143. Lequerré T, Jouen F, Brazier M, Clayssens S, Klemmer N, Ménard JF, Mejjad O, Daragon A, Tron F, Le Loet X, Vittecoq O. Autoantibodies, metalloproteinases and bone markers in rheumatoid arthritis patients are unable to predict their responses to infliximab. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:446-453.
144. Kavanaugh A, Rosengren S, Lee SJ, Hammaker D, Firestein GS, Kalunian K, Wei N, Boyle DL. Assessment of rituximab's immunomodulatory synovial effects (ARISE trial). 1: clinical and synovial biomarker results. *Ann Rheum Dis* 2008;67:402-408.
145. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Salden M, Bodman-Smith M, Webster AD. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2146-2154.
146. Vos K, Thurlings RM, Wijbrandts CA, van Schaardenburg D, Gerlag DM, Tak PP. Early effects of rituximab on the synovial cell infiltrate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:772-778.
147. Teng YK, Verburg RJ, Verpoort KN, Diepenhorst GM, Bajema IM, van Tol MJ, Jol-van der Zijde EC, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM. Differential responsiveness to immunoablative therapy in refractory rheumatoid arthritis is associated with level and avidity of anti-cyclic citrullinated protein autoantibodies: a case study. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R106.
148. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-324.
149. Poulson H, Charles PJ. Antibodies to citrullinated vimentin are a specific and sensitive marker for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;34:4-10.
150. Dejaco C, Klotz W, Larcher H, Duftner C, Schirmer M, Herold M. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R119.
151. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjöberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, Rönnelid J. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as

compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 2008;58:36-45.

152. Bang H, Egerer K, Gaudiard A, Lüthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, Berg W, Feist E, Burmester GR. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2503-2511.

153. Innala L, Kokkonen H, Eriksson C, Jidell E, Berglin E, Dahlqvist SR. Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic citrullinated peptides. *J Rheumatol* 2008;35:1002-1008.

154. Coenen D, Verschueren P, Westhovens R, Bossuyt X. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2007;53:498-504.

155. Bizzaro N, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D. Analytical and diagnostic characteristics of 11 2nd and 3rd-generation immunoenzymatic methods for the detection of antibodies to citrullinated proteins. *Clin Chem* 2007;53:1527-1533.

156. Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz DM. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* 2003;5:59-63.

157. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, Zendman AJ, Harris HE. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R458-R467.

158. Witte T, Hartung K, Matthias T, Sachse C, Fricke M, Deicher H, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schmidt RE. Association of IgA anti-dsDNA antibodies with vasculitis and disease activity in systemic lupus erythematosus. SLE Study Group. *Rheumatol Int.* 1998;18:63-69.

159. Miltenburg AM, Roos A, Slegtenhorst L, Daha MR, Breedveld FC. IgA anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: occurrence, incidence and association with clinical and laboratory variables of disease activity. *J Rheumatol.* 1993;20:53-58.

160. Miyakis S, Lockshin M. D, Atsumi T, Branch D. W, Brey R. L, Cervera R, Derksen R. H. W. M, De Groot P.G, Koike T, Meroni P. L, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyannopoulos P. G, Krilis S. A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4:295-306.

161. Lee SS, Cho ML, Joo YS, Kim WU, Hong YS, Min JK, Lee SH, Park SH, Cho CS, Kim HY. Isotypes of anti-beta2-glycoprotein I antibodies: association with thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2001;28:520-524.

162. Lakos G, Kiss E, Regeczy N, Tarjan P, Soltesz P, Zeher M, Bodolay E, Szakony S, Sipka S, Szegedi G. Isotype distribution and clinical relevance of anti-beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) antibodies: importance of IgA isotype. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:574-579.
163. Silvestris F, Goodwin JS, Williams RC Jr. IgM, IgA and IgG rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis and normal donors. *Clin Rheumatol.* 1985;4:392-398.
164. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004;50:380-386.
165. Szekanecz Z, Tumpek J, Szabó Z, Soós L, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Sipka S, Lakos G.: The Inova CCP3.1 IgA/IgG ELISA represents significant improvement in the laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56 (9 Suppl): S716.

9. Tárgyszavak és rövidítések listája

Tárgyszavak: rheumatoid arthritis, citrullin, anti-citrullinált protein/peptid antitestek, ACPA, HLA-DR, shared epitóp, környezeti faktorok, dohányzás, génpolimorfizmus

Keywords: rheumatoid arthritis, citrulline, anti-citrullinated protein/peptide antibodies, ACPA, HLA-DR, shared epitope, environmental factors, smoking, gene polymorphism

ACPA	anti-citrullinált protein/peptid antitest
AKA	anti-keratin antitest
APF	anti-perinukleáris faktor
AUC	görbe alatti terület (area under curve)
CCP	ciklikus citrullinált peptid
CD	sejtfelszíni marker osztályozás (cluster of designation)
CF	citrullinált fibrinogén
COMP	porc oligomer fehérje (cartilage oligomeric protein)
CV	citrullinált vimentin
DAS	betegségaktivitási skála (disease activity scale)
DM	dermatomyositis
ELISA	enzimkötött immunsorbens teszt (enzyme-linked immunosorbent assay)
FUSE-DP1	far upstream element binding protein 1
HLA	humán leukocita antigén
HSP	hősokkfehérje (heat shock protein)
Ig	immunglobulin
IQR	interkvartilis tartomány (interquartile range)
IRF	interferon reguláló faktor
MCV	mutáns citrullinált vimentin
MHC	major hisztokompatibilitási komplex
MRI	mágneses magrezonancia vizsgálat
NDP	nem differenciált polyarthritis
NPV	negatív prediktív érték
OA	osteoarthritis (arthrosis)
OD	optikai denzitás
PAD/PADI	peptidilarginin-deimináz
PGK1	foszfoglicerát kináz 1
PM	polymyositis
PPV	pozitív prediktív érték
PsA	psoriasisos arthritis
pSS	primer Sjögren szindróma
PTPN22	protein tyrosin phosphatase non-receptor típus
RA	rheumatoid arthritis
RF	rheumatoid faktor
ROC	receiver operating characteristic
SE	megosztott epitóp (shared epitope)
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SNP	egyszerű nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
SPA	spondylitis ankylopoetica
TNF	tumor nekrozis faktor
VCP	virális citrullinált peptid

10. Köszönetnyilvánítás

Tisztelettel köszönöm a munkám létrejöttében nyújtott segítségét

- Témavezetőimnek, Dr. Lakos Gabriellának és Prof. Dr. Szekanecz Zoltánnak.
- Dr. Szabó Zoltánnak és Dr. Végyvári Anikónak, valamint a Reumatológia Tanszéken dolgozó minden munkatársamnak.
- Prof. Dr. Sipka Sándornak, Dr. Baráth Sándornak, Kapitány Anikónak, Dr. Gyetvai Ágnesnek, Dr. Fekete Andreának és az Immunológiai Laboratórium minden dolgozójának.
- Prof. Dr. Szegedi Gyulának, Prof. Dr. Zeher Margitnak, Dr. Dankó Katalinnak, Dr. Horváth Ildikó Fanninak és a III. Belklinikán dolgozó volt kollégáimnak.
- Családomnak.

11. Publikációs lista

11.1. Az értekezést megalapozó közlemények jegyzéke:

1. Lakos G., **Soós L.**, Fekete A., Végvári A., Szabó Z., Szekanecz Z.: A rheumatoid arthritis laboratóriumi diagnosztikája. *Magyar Reumatol*, 47: 86-96, 2006.

2. **Soós L.**, Szekanecz Z., Szabó Z., Fekete A., Zeher M., Horváth IF., Dankó K., Kapitány A., Végvári A., Sipka S., Szegedi G., Lakos G.: Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 34: 1658-1663, 2007.

IF 3.151

3. Szekanecz Z. *, **Soós L.** *, Szabó Z., Fekete A., Kapitány A., Végvári, A., Sipka, S., Szűcs G., Szántó S., Lakos, G.: Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets? *Clin Rev Allergy Immunol*, 34: 26-31, 2008. (*Co-first authors with equal contribution.)

IF 3.533

4. Lakos G., **Soós L.**, Fekete A., Szabó Z., Zeher M., Horváth IF, Dankó K., Kapitány A., Gyetvai Á., Szegedi G., Szekanecz, Z.: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope. *Clin Exp Rheumatol*, 26: 253-260, 2008.

IF 2.364

5. **Soós L.**, Lakos G, Kapitány A, Fekete A, Gyetvai Á, Gergely P jr, Pazár B, Szabó Z, Vánca A, Poór Gy, Szekanecz Z. A citrullinált fehérje elleni antitestek (ACPA) patogenetikai, diagnosztikus és prognosztikai jelentősége. *Immunológiai Szemle*, 1: 4-12, 2009.

11.2. Egyéb közlemények:

1. Szekanecz, Z, Kerekes G, Dér, H., Sándor Z., Szabó Z., Végvári A., Simkovics E., **Soós L.**, Szentpétery Á., Besenyei T., Szűcs G., Szántó S., Tamási L., Szegedi G., Shoenfeld Y., Soltész P.: Accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci*, 1108: 349-358, 2007.

IF 1.731

2. Szekanecz É, Sándor Z, Antal-Szalmás P., **Soós L.**, Lakos G., Besenyei T., Szentpétery Á., Simkovics E., Szántó J., Kiss E., Koch AE., Szekanecz Z.: Increased production of the soluble tumor-associated antigens CA19-9, CA125 and CA15-3 in rheumatoid arthritis: potential adhesion molecules in synovial inflammation ? *Ann NY Acad Sci*, 1108: 349-358, 2007.

IF 1.731

3. Fekete A., **Soós L.**, Szekanecz Z., Szabó Z., Szodoray P., Baráth S., Lakos G.: Disturbances in B and T cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. J Autoimmun. 29: 154-163, 2007.

IF 3.391

4. Kapitány A., Szabó Z., Lakos G., Aleksza M., Végvári A., **Soós L.**, Karányi Z., Sipka S., Szegedi G., Szekanecz Z.: Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. Isr Med Assoc J (IMAJ), 10: 32-36, 2008.

IF 0,626

5. Gyetvai Á, Szekanecz Z, **Soós L**, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Teodorescu M, Sipka S, Lakos G. New classification of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis: Different association patterns for rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. Rheumatology (Oxford), Epub 17 November 2009 (doi: 10.1093/rheumatology/kep338)

IF 4.136

11.3. Kongresszusi abstractok:

1. **Soós L.**, Végvári, A., Pákozdi, A., Szekanecz, Z.: Lőfgren szindróma: a reumatológia és pulmonológia határterületi kérdései. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2003 évi vándorgyűlése, Szeged. Magyar Reumatol. 44: 174, 2003.

2. **Soós, L.**, Végvári, A., Pákozdi, A., Szekanecz, Z.: Lőfgren szindróma: a reumatológia és a pulmonológia határterületi kérdései. A Magyar Belgyógyász Társaság Észak-Kelet Magyarországi Szakcsoportjának Tudományos Ülése, Debrecen. Magyar Belorv Arch., 56 Suppl 4: 24, 2003.

3. Szekanecz, Z., Végvári, A., Szabó, Z., Szántó, S., Csépany, T., Szűcs, G., Surányi, P., Veres, K., **Soós, L.**, Simon, Z., Vánca, A., Pákozdi, A., Gáspár, L., Soltész, P.: Central nervous system demyelination in rheumatoid arthritis: common pathogenetic pathways ? 4th International Congress of Autoimmunity, Budapest. Autoimmun Rev., 3 Suppl 2: 131, 2004.

4. **Soós, L.**, Szántó, S., Szűcs, G., Szekanecz, Z.: A Felty szindrómáról két eset kapcsán. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2005. évi vándorgyűlése, Sopron. Magyar Reumatol. 46: 169, 2005.

5. Kapitány, A., Szabó, Z., Lakos, G., Aleksza, M., Végvári, A., **Soós, L.**, Karányi, Z., Sipka, S., Szegedi, G., Szekanecz, Z.: Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in patients with rheumatoid arthritis. 7th Annual European Congress of Rheumatology, Amsterdam, Ann Rheum Dis 65 Suppl II, 299, 2006.

6. **Soós, L.**, Szabó, Z., Fekete, A., Zsuzsanna, M., Horváth, I.F., Dankó, K., Sipka, S., Szegedi, Gy., Szekanecz, Z., Lakos, G.: A mutáns citrullinált vimentin elleni antitest a rheumatoid arthritis új, szenzitív laboratóriumi markere. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2006. évi vándorgyűlése, Debrecen. Magyar Reumatol. 47: 168, 2006.

7. Szabó, Z., Kapitány, A., Lakos, G., Aleksza, M., Végvári, A., **Soós, L.**, Karányi, Zs., Szekanecz, Z.: Összefüggés a szérum anti-CCP antitest és rheumatoid faktor koncentrációk, valamint a HLA-DR4 hordozás között rheumatoid arthritises betegekben. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2006. évi vándorgyűlése, Debrecen. Magyar Reumatol. 47: 181, 2006.
8. **Soós, L.**, Szántó, S., Szűcs, G., Szekanecz, Z.: Hátfájalmat okozó myeloma multiplex két eset kapcsán. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2006. évi vándorgyűlése, Debrecen. Magyar Reumatol. 47: 187, 2006.
9. Lakos, G., **Soos, L.**, Szabo, Z., Fekete, A., Zeher, M., Horváth, I., Dankó, K., Kapitány, A., Szegedi, G., Sipka, S., Szekanecz, Z. : Antibodies directed against mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) are more sensitive serological markers of rheumatoid arthrtiis than anti-CCP. 7th Annual European Congress of Rheumatology, Amsterdam, Ann Rheum Dis 65 Suppl II, 151, 2006.
10. Lakos G, **Soós L**, Szabó Z, Fekete A, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Kapitány A, Szegedi G, Szekanecz Z.: Anti-citrullinated vimentin is a more sensitive marker of rheumatoid arthritis than anti-CCP. 5th International Congress on Autoimmunity, Sorrento, Italy. Autoimmun Rev, Suppl:209, 2006.
11. Szekanecz É, Antal-Szalmás P, Sándor Z, **Soós L**, Lakos G, Szántó J, Kiss E, Koch AE, Szekanecz Z.: Increased production of the soluble tumor-associated antigens CA-19-9, CA125 and CA15.3 with adhesive properties in rheumatoid arthritis. 5th International Congress on Autoimmunity, Sorrento, Italy. Autoimmun Rev, Suppl: 211, 2006.
12. Szekanecz Z., Fekete A, **Soós L.**, Szodoray P., Szabó Z., Végvári A., Gyetvai Á., Szegedi G., Lakos G.: CD27+ memory B cell and CD8+ terminally differentiated memory T cell populations expand during the progression of rheumatoid arthritis. 8th Annual European Congress of Rheumatology, Barcelona, Ann Rheum Dis 66 Suppl: 637, 2007.
13. Szabó Z., Lakos G., **Soós L.**, Fekete A., Zeher M., Horváth IF, Dankó K., Kapitány A., Gyetvai Á., Szegedi Gy., Szekanecz Z.: Ciklikus citrullinált peptid elleni antitestek izotípus megoszlása rheumatoid arthritises betegekben. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2007. évi vándorgyűlése, Szeged. Magyar Reumatol. 48: 173-174, 2007.
14. Szekanecz, Z., Fekete A., **Soós L.**, Szabó Z., Szodoray P., Baráth S., Lakos G.: Disturbances in T and B cell homeostasis are associated with disease duration and disease-specific autoantibody levels in rheumatoid arthritis. 71st Congress of the American College of Rheumatology, Boston, MA, USA. Arthritis Rheum., 56 (9 Suppl): S760, 2007.
15. Lakos G., **Soós L.**, Fekete A., Szabó Z., Zeher M., Horváth IF, Dankó K., Kapitány A., Gyetvai Á., Szegedi G., Szekanecz, Z.: Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of the shared epitope. 71st Congress of the American College of Rheumatology, Boston, MA, USA. Arthritis Rheum., 56 (9 Suppl): S438, 2007.
16. Szekanecz, Z., Tumpek J, Szabó Z, **Soós L**, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Sipka S, Lakos G.: The Inova CCP3.1 IgA/IgG ELISA represents significant improvement in the

laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis. 71st Congress of the American College of Rheumatology, Boston, MA, USA. Arthritis Rheum., 56 (9 Suppl): S716, 2007.

17. **Soós L**, Szűcs G, Szekanecz Z: Granulomatous gyulladás TNF gátló kezelés mellett. Magyar Reumatológusok Egyesülete Ifjúsági Fóruma, Noszvaj. Magyar Reumatol 49: 37, 2008.

18. Szekanecz Z., Tumpek J, Szabó Z, **Soós L**, Zeher M, Horváth IF, Dankó K, Sipka S, Lakos G. The Inova CCP3.1 IgA/IgG ELISA represents significant improvement in the laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis. 9th Annual European Congress of Rheumatology, Paris, Ann Rheum Dis 67 Suppl II:568, 2008.

19. Szekanecz Z., **Soós L**, Fekete A, Szabó Z, Horváth IF, Zeher M, Dankó K, Kapitány A, Gyetvai Á, Szegedi G, Lakos G. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotype in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope. 9th Annual European Congress of Rheumatology, Paris, Ann Rheum Dis 67 Suppl II: 569, 2008.

20. Szántó S, Bodnár N, Szabó Z, Pethő Zs, **Soós L**, Kurkó J, Szűcs G, Szekanecz Z.: Spondylarthritis ankylopoeticás betegek keresztszervi vizsgálata: a betegség aktivitásának, a betegek életminőségének, funkcionális állapotának és az alkalmazott kezelés hatásának összefüggése. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2008. évi vándorgyűlése, Budapest. Magyar Reumatol. 49:140-141, 2008.

21. **Soós L**, Balogh I, Bakó Gy, Szabó Z, Szűcs G, Szántó S, Szekanecz Z.: A biológiai terápia szemészeti hatásai reumatológiai betegségtársulásokban – három eset kapcsán. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2008. évi vándorgyűlése, Budapest. Magyar Reumatol. 49:161, 2008.

22. Szabó Z, Szekanecz Z, Tumpek J, **Soós L**, Sipka S, Lakos G. Anti-citrullinált protein antitestek előfordulása és diagnosztikai jellemzői rheumatoid arthritisben és szisztémás autoimmun kórképekben. Magyar Reumatológusok Egyesülete Ifjúsági Fóruma, Hajdúszoboszló. Magyar Reumatol 50: 29, 2008.

23. Gyetvai Á, Szekanecz Z, **Soós L**, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Sipka S, Lakos G. New classification of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis: different association patterns for rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. 10th Annual European Congress of Rheumatology, Copenhagen, Ann Rheum Dis 68 Suppl 3: 727, 2009.

24. **Soós L**, Szekanecz Z: Juvenilis arthritisből szisztémás lupus erythematosus – és egy kis közhaté. Magyar Reumatológusok Egyesülete (MRE) 2009. évi vándorgyűlése, Kecskemét. Magyar Reumatol. 50:159-160, 2009.

Összes impakt faktor: 20,663