



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI
INDIRIZZO IN SCIENZE REUMATOLOGICHE
CICLO XXVII

**CONTRIBUTO ALLA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI
ANTICARDIOLIPINA E ANTI - β 2 GLICOPROTEINA I**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Amelia Ruffatti

Dottoranda: Dr.ssa Elena Mattia

Ad Alessandra e Simone

INDICE

- RIASSUNTO..... pag. 1
- SUMMARY..... pag. 7
- INTRODUZIONE..... pag. 11
- SCOPI..... pag. 29
- CONTRIBUTO ALLA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI
ANTICARDIOLIPINA E ANTI- β 2 GLICOPROTEINA I:
CONFRONTO TRA UN ELISA HOME MADE ED UN
FLUORESCENCE ENZYME IMMUNOASSAY..... pag. 31
- LA PERFORMANCE CLINICA DI UN CHEMILUMINESCENT
IMMUNOASSAY NELLA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI
ANTICARDIOLIPINA E ANTI- β 2 GLICOPROTEINA I.
CONFRONTO CON UN ELISA HOME MADE..... pag. 51
- LA POSITIVITA' DEGLI ANTICORPI ANTICARDIOLIPINA
E ANTI- β 2 GLICOPROTEINA I DI CLASSE IGA,
DETERMINATI CON IL FLUORESCENCE ENZYME IMMUNOASSAY
NELLA SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI PRIMARIA..... pag. 61
- DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-DOMINIO I
DELLA β 2 GLICOPROTEINA I, RILEVATI CON IL
CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY NELLA SINDROME
DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI PRIMARIA..... pag. 69
- BIBLIOGRAFIA..... pag. 77

RIASSUNTO

Introduzione. Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi specifici per complessi fosfolipide-proteina o proteine leganti i fosfolipidi. La loro presenza in pazienti con trombosi e/o complicanze ostetriche definisce la sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS). L'APS viene considerata primaria (PAPS) se presente in forma isolata, altrimenti secondaria se associata ad altra malattia autoimmune sistemica che solitamente è il lupus eritematosus sistemico (LES). I criteri di laboratorio per la classificazione di APS includono la presenza di tre aPL ed in particolare del lupus anticoagulant (LA) e/o di livelli medio-alti di anticorpi anticardiolipina (aCL) IgG/IgM e/o di livelli medio-alti di anticorpi anti- β 2glycoproteina I (anti- β 2GPI) IgG/IgM, tutti confermati non prima di 12 settimane. Attualmente, le metodiche ELISA per la determinazione degli aCL e anti- β 2GPI di classe IgG/IgM, nonostante svariati tentativi, non sono ancora standardizzate. Di recente, alcuni studi hanno confrontato le performance dei test ELISA con quelle di altre tecnologie anche completamente automatizzate tra le quali rientrano sia il fluorescence enzyme immunoassay (FEIA) che il chemiluminescence immunoassay (CLIA). Questi lavori, tuttavia, hanno prodotto risultati non concordanti.

Gli anticorpi aCL e anti- β 2GPI di classe IgA non sono ancora considerati criterio di laboratorio per la classificazione dell'APS e la loro rilevanza clinica è al momento oggetto di dibattito. Inoltre gli aPL non sono considerati soltanto strumenti di classificazione dell'APS, ma anche parametri per la stratificazione del rischio di sviluppare le manifestazioni cliniche della malattia. In particolare, gli anticorpi anti- β 2GPI specifici per un preciso epitopo situato nel Dominio I della molecola sembrano essere associati maggiormente al rischio di trombosi piuttosto che all'impegno ostetrico e di conseguenza sarebbero correlati a un quadro clinico più severo dell'APS.

Obiettivi. Lo scopo della tesi è stato di confrontare la performance di un ELISA home made con quella delle tecniche FEIA e CLIA nel rilevamento degli anticorpi aCL IgG/IgM e anti- β 2GPI IgG/IgM in un'ampia e omogenea coorte di pazienti affetti da sindrome da anticorpi antifosfolipidi primaria (PAPS) e in un gruppo di soggetti con i criteri clinici per la classificazione di APS ma ELISA negativi per i criteri di laboratorio. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in un gruppo di controllo comprendente donatori sani e pazienti con malattie autoimmuni diverse dall'APS.

Successivamente è stata valutata la rilevanza clinica degli aCL e anti- β 2GPI di classe IgA e degli anticorpi anti-Dominio I (anti-DI) di isotipo IgG in un'ampia ed omogenea coorte di pazienti affetti esclusivamente da PAPS. Inoltre, la sensibilità diagnostica di questi anticorpi è stata valutata in un gruppo di pazienti sieronegativi per gli aPL convenzionali, ma con manifestazioni cliniche di APS. Di entrambi gli anticorpi è stato anche indagato il valore prognostico nell'ambito dell'APS.

Metodi. Gli aCL e gli anti- β 2GPI di classe IgG/IgM/IgA sono stati determinati usando il metodo FEIA (EliA TM, Phadia AB, Sweden). Inoltre gli aCL e anti- β 2GPI di classe IgG/IgM sono stati anche analizzati assieme agli anticorpi anti-DI IgG utilizzando il metodo CLIA (HemosIL AcuStar®). Le raccomandazioni del produttore sono state seguite scrupolosamente per entrambe le tecniche. Per il confronto dei risultati ottenuti con le diverse metodiche è stato usato un test ELISA home made, eseguito seguendo le raccomandazioni del Forum europeo sugli aPL. Tutti i sieri sono stati testati anche per LA seguendo le linee guida aggiornate utilizzando il tempo di veleno di vipera Russell ed il tempo di protrombina parziale attivata, entrambi con fosfolipidi diluiti, come tests di screening.

Risultati e Conclusioni. (1) Confronto ELISA home made con FEIA. Le sensibilità delle tecniche ELISA home made e FEIA sono risultate essere simili ad eccezione degli aCL di classe IgM che sono risultati significativamente più frequenti nei pazienti PAPS con il metodo ELISA. I due metodi avevano una specificità simile, un'elevata concordanza e una

correlazione significativa tra i livelli anticorpali. Inoltre il metodo FEIA non ha rilevato alcuna significativa prevalenza degli anticorpi antifosfolipidi nei pazienti ELISA negativi, ma con manifestazioni cliniche di APS.

In conclusione, questi risultati suggeriscono che il metodo FEIA è paragonabile al test ELISA home made. Se confermato da altri studi su ampie casistiche di pazienti affetti da PAPS, questi risultati potrebbero supportare l'uso del FEIA nella determinazione degli aCL e anti- β 2GPI nell'analisi di routine.

Risultati e Conclusioni. (2) Confronto ELISA home made con CLIA. Quando è stata confrontata la tecnica ELISA home made con la tecnica CLIA, è emerso che il metodo CLIA aveva una sensibilità significativamente più bassa per gli aCL IgM e gli anti- β 2GPI IgG/IgM rispetto a quella dell'ELISA; invece la sua specificità è risultata significativamente più alta per gli anticorpi aCL IgM e anti- β 2GPI IgM. Le due tecniche hanno mostrato un'alta e significativa concordanza e una significativa correlazione dei titoli anticorpali. Inoltre il CLIA ha rilevato gli anticorpi aCL IgG/IgM e anti- β 2GPI IgG nei pazienti sieronegativi in ELISA. Vi era infatti una prevalenza di aCL IgG e di anti- β 2GPI IgG significativamente maggiore nei pazienti sieronegativi con i criteri clinici di APS che nella popolazione sana di controllo.

In conclusione, il metodo CLIA, nonostante una minore sensibilità, ha mostrato una specificità più alta per alcuni aPL e un buon livello di concordanza e di correlazione con la metodica ELISA home made. Il CLIA, inoltre, è stato in grado di rilevare gli aCL IgG e gli anti- β 2GPI IgG nei pazienti sieronegativi non identificati dall'ELISA. Se confermato da ulteriori studi, il CLIA potrebbe essere considerato un metodo valido per la valutazione di pazienti con manifestazioni cliniche di APS, ma con gli aPL negativi al test ELISA home made.

Risultati e Conclusioni. (3) Gli aCL e gli anti- β 2GPI di classe IgA: Gli aCL e gli anti- β 2GPI di classe IgA sono stati testati con il metodo FEIA e sono risultati significativamente presenti rispettivamente nel 19% e nel 50% dei pazienti affetti da PAPS. I loro titoli medi

erano più elevati nei pazienti con impegno trombotico rispetto alle pazienti con impegno ostetrico. Tuttavia solo gli anti- β 2GPI IgA erano significativamente associati alla trombosi. Quando sono stati analizzati i pazienti FEIA negativi per aCL IgG/IgM e per anti- β 2GPI IgG/IgM ma con le caratteristiche cliniche di APS, nel 10,6% di essi sono stati trovati gli anticorpi anti- β 2GPI IgA. Questo dato è risultato essere significativo nel confronto con la popolazione sana di controllo.

In conclusione, la positività per gli anticorpi anti- β 2GPI IgA definita con il metodo FEIA è risultata clinicamente rilevante nei pazienti PAPS. Inoltre la presenza di anticorpi anti- β 2GPI IgA era significativa nei pazienti sieronegativi per gli isotipi IgG e IgM. Questi risultati suggeriscono che nei pazienti con segni/sintomi clinici di APS, ma che non soddisfano i criteri di laboratorio per gli anticorpi antifosfolipidi convenzionali si potrebbero determinare gli anticorpi anti- β 2GPI di classe IgA al fine di incrementare la sensibilità diagnostica per APS.

Risultati e Conclusioni. (4) Gli anti-DI IgG: La sensibilità e la specificità degli anticorpi anti-DI IgG rilevati con il metodo CLIA erano paragonabili a quelle degli anticorpi aCL IgG e anti- β 2GPI IgG. Si è riscontrata una significativa concordanza, un'associazione e una correlazione dei titoli anticorpali degli anti-DI IgG con gli aCL IgG e gli anti- β 2GPI IgG. Inoltre gli anticorpi anti-DI IgG hanno mostrato una minore prevalenza e titoli medi più bassi nelle complicanze ostetriche rispetto ai pazienti con trombosi e ai pazienti con entrambi i coinvolgimenti clinici. Per quanto riguarda i profili anticorpali degli aPL convenzionali, il gruppo con la triplice positività antifosfolipidica ha mostrato una maggiore prevalenza e maggior titoli medi degli anticorpi anti-DI, rispetto ai gruppi con singola e duplice positività. In conclusione, gli anti-DI, rilevati con la tecnica CLIA, possono essere considerati dei promettenti biomarkers per la valutazione del rischio clinico di trombosi vascolare e di triplice positività per gli aPL convenzionali, solitamente associata ai quadri clinici più severi di APS.

Pertanto, essi possono costituire uno strumento aggiuntivo utile per eventuali decisioni cliniche e terapeutiche.

SUMMARY

Background. Antiphospholipid (aPL) antibodies are a heterogeneous group of autoantibodies directed against plasma protein-phospholipid complexes or single plasma proteins. Their presence in patients with thrombosis and/or pregnancy morbidity defines antiphospholipid syndrome (APS). APS is considered as primary (PAPS) if present alone, or secondary if associated with other systemic autoimmune diseases, particularly with systemic lupus erythematosus (SLE). Laboratory criteria for APS classification include lupus anticoagulant (LA) and/or medium-high levels of IgG/IgM anticardiolipin (aCL) and/or medium-high levels of IgG/IgM anti- β 2glycoprotein I (anti- β 2GPI) antibodies, all confirmed no earlier than 12 weeks later. Currently, ELISA assay for detection of aCL and anti- β 2GPI antibodies, despite several attempts, is not a standardized technique. Recently, few studies have compared the performance of ELISA with that of other technologies also fully automated including the fluorescence enzyme immunoassay (FEIA) and the chemiluminescence immunoassays (CLIA), but they have produced debatable results.

The search for new markers of APS through the use of laboratory techniques alternatives to ELISA, such as FEIA and CLIA methods is currently under interest. IgA aCL and IgA anti- β 2GPI antibodies are not considered one of the recommended laboratory criteria for APS classification, and their clinical relevance is as yet controversial. Moreover, aPL are not only considered as a tool for APS classification, but they could be useful parameters to stratify the risk for developing clinical manifestations of the disease. In particular, anti-anti- β 2GPI antibodies directed against the Domain I (anti-DI) of the molecule, were reported to be associated to thrombotic risk in antiphospholipid syndrome (APS), so correlating them with a more severe clinical picture.

Objectives. The aim of the study was to compare the performance of a home-made ELISA with that of FEIA and CLIA assays in detecting aCL and anti- β 2GPI antibodies in a large,

homogeneous cohort of PAPS patients and in a group of subjects with clinical criteria for APS classification but ELISA negative for laboratory criteria. The results were compared with those obtained in a control group including healthy blood donors and patients with autoimmune diseases different from APS.

Subsequently, the clinical relevance of IgA aCL, IgA anti- β 2GPI antibodies and of IgG anti-DI antibodies was evaluated in a large homogeneous cohort of PAPS patients. Their diagnostic sensitivity was investigated in a group of seronegative patients for conventional aPL but with clinical manifestations of APS. Moreover, prognostic value of these antibodies in APS patients was studied.

Methods. IgG/IgM/IgA aCL and IgG/IgM/IgA anti- β 2GPI antibodies were determined using FEIA, (EliA TM, Phadia AB, Sweden). aCL/anti- β 2GPI of IgG isotype and IgG anti-DI antibodies were assayed using CLIA (HemosIL AcuStar®, Inova, USA). The manufacturer's recommendations were followed carefully for both techniques. A home-made ELISA performed following the European Forum on aPL recommendations was used for the comparison between methods. All sera were also tested for LA following updated guidelines using diluted Russell viper venom time and diluted activated partial thromboplastin time as screening tests.

Results and Conclusions. (1) Comparison between an ELISA home made and FEIA technique. The sensitivities of the ELISA and FEIA techniques were similar with the exception of IgM aCL which was found to be significantly higher in the PAPS patients using the ELISA method. The two assays had a comparable specificity, a high significant agreement and a significant correlation between the antibody levels. FEIA testing uncovered no significant prevalence of any antiphospholipid antibody in the ELISA negative patients.

In conclusion, our results suggest that FEIA technique is comparable to a home-made ELISA. If confirmed by large scale studies on PAPS patients, these results could support FEIA's routine use in detecting aCL and anti- β 2GPI antibodies.

Results and Conclusions. (2) Comparison between an ELISA home made and CLIA technique. When compared with the ELISA technique, it came to light that the CLIA method had a significantly lower sensitivity for IgM aCL and IgG/IgM anti- β 2GPI antibodies; while, its specificity was higher with respect to ELISA for IgM aCL and IgM anti- β 2GPI antibodies. The two techniques showed a high, significant agreement and a significant antibody titer correlation. CLIA also detected IgG/IgM aCL and IgG anti- β 2GPI antibodies in the seronegative patients using ELISA method. There was a significantly higher prevalence of IgG aCL and IgG anti- β 2GPI antibodies in those patients with respect to that in the control population.

In conclusion, despite a lower sensitivity, CLIA showed a higher specificity for some aPL and a good level of agreement and correlation with a home made ELISA. CLIA also detected some aCL and anti- β 2GPI antibodies in the seronegative patients not usually identified by home made ELISA. If confirmed by further studies, CLIA could be considered a valuable method to assess patients with clinical manifestations of APS but testing negative for aPL using a home made ELISA.

Results and Conclusions. (3) ACL and anti- β 2GPI antibodies of IgA isotype. Present respectively in 19% and 50% of the PAPS patients studied, IgA aCL and IgA anti- β 2GPI antibody frequencies were both statistically significant .The mean titers of both IgA aCL and IgA anti- β 2GPI antibodies were higher in the thrombotic patients, but only the latter were significantly associated with thrombosis. When analyzed, the patients FEIA negative for conventional IgG/IgM aPL, but with the clinical features of APS, in 10.6% of cases were tested positive for anti- β 2GPI IgA, this data was found to be significant.

In conclusion, positivity to IgA anti- β 2GPI antibody detected using FEIA was found to be clinically relevant in PAPS patients. Moreover, the prevalence of isolated IgA anti- β 2GPI antibody positivity was significant in the seronegative patients. These results suggest that patients with clinical signs/symptoms of APS but who do not meet conventional

antiphospholipid antibody laboratory criteria could undergo at least of IgA anti- β 2GPI antibody testing using FEIA technique.

Results and Conclusions. (4) IgG anti-DI antibodies. The sensitivity and specificity of IgG anti-DI antibodies were comparable to those of IgG aCL and IgG anti- β 2GPI antibodies. There was a significant agreement, association and antibody titre correlation between IgG anti-DI and IgG aCL as well as IgG anti- β 2GPI antibodies. IgG anti-DI antibody showed lesser prevalence and mean titres in the pregnancy morbidity than in thrombotic and PAPS patients with both involvements. Regarding the conventional aPL antibody profiles, the triple positivity group had higher prevalence and mean titres than single and double positivity ones. In conclusion, as regards the anti-DI antibodies this study provides further evidence that these antibodies detected by CLIA, can be considered a promising biomarker for risk assessment particularly in patients having vascular thrombosis and triple conventional aPL positivity, which is considered an antibody profile associated to the most severe features of APS. Thus, anti-DI antibodies might constitute an additional useful tool in clinical and therapeutic decisions.

INTRODUZIONE

GLI ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI

Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro fosfolipidi, proteine leganti i fosfolipidi o complessi fosfolipide-proteina. La loro presenza unita a eventi trombotici e/o specifiche complicanze ostetriche definisce la sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) malattia sistemica autoimmune che venne per la prima volta descritta nel 1983 da Graham Hughes [1].

I principali aPL attualmente riconosciuti, sono gli anticorpi anticardiolipina (aCL), anti- β 2 Glicoproteina I (anti- β 2GPI) ed il lupus anticoagulant (LA) [2].

Gli aCL sono specifici per complessi fosfolipidi-proteine o fosfolipidi di carica elettrica negativa, principalmente la cardiolipina, così chiamata da Pangborn che nel 1941 la isolò da un estratto alcolico di miocardio bovino che veniva usato come sorgente di antigene per il test VDRL [3]. Successivamente, Moore e Mohr nel 1952 descrissero la falsa positività di questo test in soggetti che non presentavano evidenza clinica di infezione luetica e invece, ne venne segnalata la presenza in pazienti affetti da malattie autoimmuni [4]. Nel 1983 venne messo a punto da Nigel Harris un metodo radioimmunologico per la determinazione degli aCL che risultava diverse centinaia di volte più sensibile della VDRL nel rilevare tali anticorpi nei pazienti affetti da LES. Gli aCL svelati con tale metodo erano fortemente associati con i LA, la falsa positività per la VDRL e le trombosi [5]. Al metodo radioimmunologico seguirono ben presto le metodiche immunoenzimatiche (ELISA), oggi in uso [6]. Tali metodiche sono di facile esecuzione e vengono utilizzate per la determinazione degli anticorpi specifici per i fosfolipidi, per i complessi fosfolipidi-proteine e per le proteine leganti i fosfolipidi.

Gli anti- β 2GPI rappresentano i principali anticorpi anti-cofattore. La scoperta dei cofattori risale all'inizio degli anni '90 quando due gruppi dimostrarono che il vero bersaglio antigenico degli anticorpi antifosfolipidi non sono i fosfolipidi di per sé, ma delle proteine

plasmatiche, denominate appunto cofattori, legate ad una superficie anionica, non necessariamente antifosfolipidica [7-9]. I cofattori possono reagire con gli anticorpi specifici sia da soli sia legati ai fosfolipidi anionici tra cui la β_2 -GPI [7-8, 10], la protrombina [11-13], l'annessina V [14], la proteina C attivata e la proteina S [15], le LDL ossidate [16]. Il più noto fra i cofattori è la β_2 GPI. In vitro essa si comporta come un inibitore della coagulazione impedendo l'attivazione della protrombina da parte dei fattori Xa e Va su una superficie fosfolipidica. Essa inoltre fungerebbe da antiaggregante piastrinico, inibendo l'aggregazione ADP-dipendente. In vivo, invece, il suo ruolo non è noto, dato che la sua carenza non sembra associata ad un aumento del rischio trombotico. E' dimostrato che gli anticorpi anti-cofattore sono più specifici per malattia autoimmune pur essendo stati descritti anche in altre forme di malattia, in particolare quelle di natura infettiva [6-8].

La β_2 GPI è formata da 326 residui aminoacidici organizzati in cinque domini CCP (complement control protein) ripetuti chiamati domini "sushi" (DI-DIV). I DI-DIV sono formati da 60 aminoacidi e ciascun dominio contiene due ponti disolfuro. Il DV è aberrante essendo formato da 82 aminoacidi derivanti da un'inserzione di sei residui e da un'estensione di 19 residui all'estremità C-terminale unite da un ponte disolfuro aggiuntivo. Il DV è responsabile del legame della proteina con i PL attraverso un gruppo di aminoacidi carichi positivamente (282-287); lo stesso gruppo di aminoacidi è anche coinvolto nell'adesione della proteina con le cellule bersaglio degli aPL incluse le cellule del trofoblasto e quelle endoteliali [17, 18]. Sono state descritte tre conformazioni della β_2 GPI; la forma circolante della proteina, analizzata con microscopio elettronico, è stata vista essere di forma circolare [19], appena si lega ad una superficie anionica adatta, come alla cardiolipina (CL), ad altri PL o a lipopolissacaridi (LPS), la proteina si apre nella conformazione a "J", come rivelato dall'analisi della sua struttura cristallina [20, 21]. Recentemente è stata osservata con l'uso della diffrazione a raggi X a piccolo angolo una configurazione intermedia definita ad "S" [22]

I LA sono anticorpi anti- β_2 GPI, anti-protrombina e antifosfolipidi anionici che in vitro determinano l'allungamento del tempo di coagulazione. Conley ed Hartmann nel 1952 per la prima volta li individuarono nel siero di due pazienti affetti da LES [23], questi anticorpi agiscono inibendo l'attivazione della protrombina in trombina e quindi del fibrinogeno in fibrina, con conseguente ritardo nella formazione del coagulo. In generale la positività per LA viene considerata più specifica per APS, a differenza degli anticorpi aCL che sono ritenuti i più sensibili [24]. Nonostante la frequente concordanza fra i LA e gli aCL [25] e gli anti- β_2 GPI [26], questi anticorpi non sono identici. Infatti, alcuni LA reagiscono con fosfolipidi diversi dalla cardiolipina o con proteine diverse dalla β_2 -GPI [27, 28], mentre alcuni aCL [25] e alcuni anti- β_2 GPI [26] non hanno attività anticoagulante lupica.

LA SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI

L'APS è una patologia autoimmune caratterizzata da manifestazioni trombotiche e/o complicanze ostetriche ben definite, associate alla presenza nel sangue degli anticorpi antifosfolipidi aCL IgG/IgM e anti- β_2 GPI IgG/IgM a titolo medio-alto e alla presenza del LA. La sindrome è definita primaria se non è associata ad un'altra ben definita malattia autoimmune, altrimenti viene detta secondaria ed in questo caso è associata prevalentemente al Lupus Eritematoso Sistemico (LES). Il termine Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi fu coniato negli anni ottanta [1], ma solo nel 1999 [29] vennero stabiliti dei criteri ufficialmente accettati per la classificazione della Sindrome, in seguito all'International Workshop di Sapporo. Tali criteri sono stati rivisti nel corso dell'XI Congresso Internazionale sugli Anticorpi Antifosfolipidi, tenutosi a Sidney nel 2004 e pubblicati nel 2006 [2].

Sulla base dei vigenti criteri è possibile porre diagnosi di APS qualora siano soddisfatti almeno uno tra i criteri clinici ed almeno uno fra i criteri di laboratorio, distanti non meno di 12 settimane e non più di 5 anni l'uno dall'altro.

Criteri clinici

1. Trombosi vascolari

Uno o più episodi clinici di trombosi arteriosa, venosa, o del microcircolo, in qualsiasi tessuto od organo. La trombosi deve essere dimostrata mediante imaging o studio doppler o istopatologico. Dal punto di vista istopatologico, la trombosi deve essere presente senza segni evidenti d'inflammazione della parete vasale.

2. Impegno ostetrico

Una o più morti endouterine di un feto morfologicamente normale dalla 10° settimana gestazionale in poi (normale morfologia fetale dimostrata con esame ecografico e/o autoptico), non spiegabili altrimenti; *e/o* una o più nascite premature di un neonato morfologicamente normale prima della 34° settimana gestazionale a causa di: eclampsia o severa pre-eclampsia definite secondo criteri standard, oppure insufficienza placentare; *e/o* tre o più aborti spontanei consecutivi prima della 10° settimana di gestazione, non spiegabili altrimenti, dopo aver escluso anomalie anatomiche ed ormonali materne e anomalie cromosomiche dei genitori.

La trombosi venosa a carico dei vasi degli arti inferiori e superiori rappresenta la manifestazione più comune [30], mentre la trombosi arteriosa è meno frequente e la sua gravità clinica dipende dalla sede interessata, da quanto è estesa l'occlusione e dalla velocità con cui avviene. La trombosi nell'APS si considera generalmente una trombosi "fredda" perché non è presente infiammazione della parete vasale all'esame istologico [2].

Un'altra manifestazione che si può presentare in corso di APS è la sindrome catastrofica (CAPS), con una prevalenza dell'1% nell'APS e caratterizzata dall'interessamento clinico di tre o più organi, in un breve periodo di tempo (meno di una settimana) con riscontro a livello istopatologico di occlusioni multiple dei piccoli vasi, confermata dalla presenza degli aPL. [31].

Vi sono poi alcune manifestazioni cliniche che non rientrano tra i criteri clinici per la diagnosi di APS e sono considerati sintomi non-criterio. Queste sono la malattia valvolare cardiaca in assenza di altre cause, l'ischemia coronaria, le disfunzioni ventricolari, la livedo reticularis, la trombocitopenia usualmente non severa, la nefropatia principalmente microangiopatica o ischemica e per finire le manifestazioni neurologiche quali deficit cognitivi, emicrania, sclerosi multipla, mielite trasversa, epilessia [2]. Per quanto riguarda l'impegno ostetrico, in letteratura sono state descritte numerose altre complicanze gravidiche sia materne che fetali che non sono incluse nei criteri, ma che si verificano abbastanza frequentemente nelle pazienti con APS. Tra le complicanze materne, la sindrome HELLP (haemolysis, liver enzymes, low platelets) e la sindrome sierositica post-partum. Tra le complicanze fetali vi sono il ritardo di crescita intrauterino (IUGR), l'oligoidramnios, il distacco intempestivo di placenta, il parto pretermine, o per rottura prematura delle membrane o indotto per sofferenza fetale [32].

Criteri di laboratorio

1. Presenza nel plasma del LA, in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane, rilevato secondo le linee guida della Società Internazionale di Trombosi ed Emostasi. [33, 34]
2. Presenza nel siero di anticorpi aCL di classe IgG e/o IgM, presenti a titolo medio/alto (> 40 GPL/MPL, o > 99°percentile), in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane, rilevati mediante un metodo ELISA in accordo ai Consensus Internazionali [35-37].
3. Presenza nel siero di anticorpi anti-β2GPI di classe IgG e/o IgM (a titolo > del 99° percentile), presenti in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane, rilevati mediante un metodo ELISA in accordo alle Raccomandazioni Internazionali [38].

Una raccomandazione rilevante emersa dal Consensus del 2006 è l'invito a suddividere i pazienti in base al profilo anticorpale nelle seguenti categorie [2]:

- Positività a due o più tipi di aPL (in qualsiasi combinazione) (categoria I)
- Positività ai soli LA (categoria II a)
- Positività ai soli aCL (categoria II b)
- Positività ai soli anti- β 2GPI (categoria II c)

Alcuni studi hanno dimostrato come una singola positività antifosfolipidica corrisponda ad un basso rischio di avere manifestazioni cliniche di APS a differenza di una triplice positività che risulta essere quella più ad alto rischio [39, 40]. Si rileva inoltre, che la trombosi può essere più frequente quando coesistono più fattori di rischio e che la positività antifosfolipidica multipla è associata con una forma più severa di malattia aumentando in maniera significativa il rischio trombotico [41].

Rispetto ai precedenti criteri classificativi [29], vi sono alcune differenze anche per quanto riguarda il laboratorio, dove è stato introdotto come criterio la positività degli anticorpi anti- β 2GPI ed è stata consigliata l'espressione del livello anticorpale in percentili. Il livello soglia per la positività è stato fissato arbitrariamente al 99° percentile in riferimento a valori ottenuti da un campione di donatori di sangue.

Inoltre è stato modificato l'intervallo di tempo fra la prima determinazioni degli aPL e il test di conferma (da 6 a 12 settimane). Questo aumento di tempo trae il suo valore dal fatto che nella pratica clinica non è infrequente riscontrare una positività anticorpale transitoria, legata per esempio ad infezioni intercorrenti tanto che si assiste a variazioni spontanee degli aPL in circa ¼ dei pazienti [34, 42].

TESTS PER GLI ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI E STANDARDIZZAZIONE

La diagnosi di APS, come già accennato, richiede la presenza di almeno un criterio clinico unito ad uno di laboratorio. I criteri classificativi di sindrome pubblicati a Sapporo nel 1999 furono revisionati nel 2006 [2, 29]. I criteri contenuti in questo *consensus* sono molto più rigidi e specifici e hanno portato sicuramente ad un miglioramento nell'identificare l'APS. Tuttavia, la diagnosi di malattia rimane molto difficile. La diagnosi di APS si basa prevalentemente sui risultati di laboratorio visto che l'incidenza dei sintomi clinici è alta e questi sono spesso determinati da altri fattori sottostanti. Un'accurata diagnostica di laboratorio, pertanto, è obbligatoria visto che una sotto o una sopra valutazione potrebbero avere delle gravi implicazioni. Il dimostrare per esempio che un paziente avente avuto trombosi è anche portatore di positività antifosfolipidica può inquadralo come paziente APS ed essere trattato come tale dal punto di vista terapeutico [43]; diversamente risultati falsamente negativi potrebbero indurre a sottovalutare il rischio trombotico. E' quindi molto importante avere dei test di laboratorio con alto potere diagnostico, alta sensibilità ed alta specificità.

I correnti criteri di laboratorio comprendono tre tipi di test: un saggio emocoagulativo per l'identificazione del Lupus Anticoagulant, un saggio immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione degli anticorpi aCL e un saggio immunoenzimatico per gli anticorpi anti- β 2GPI. Esistono, inoltre, soggetti che presentano le caratteristiche cliniche tipiche di APS ma negativi per i criteri di laboratorio [44, 45]. Questi cosiddetti "pazienti sieronegativi" non sono classificati come pazienti con APS, nonostante il fatto che i risultati di laboratorio possano risultare negativi dallo scarso rendimento dei test di laboratorio tra cui il metodo ELISA [44, 45]. Da qui l'importanza di avere test per la determinazione degli aPL il più possibile riproducibili, precisi, sensibili e specifici per diagnosticare questi soggetti in modo adeguato e per poter dare loro la giusta terapia.

Le metodiche ELISA sono state oggetto di numerosi tentativi di standardizzazione finalizzati a renderle più specifiche e ripetibili; nei test per la determinazione degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI molti fattori contribuiscono alla variabilità delle condizioni pre- e post-analitiche, molti fattori relativi alla metodologia del test e alla sua calibrazione [46]. Nel 2004, linee guida e proposte per la misurazione degli aCL e anti- β 2GPI davano consigli sul tipo di campioni, sui calcoli del cut-off e sull'interpretazione dei risultati [36, 38]; inoltre uscì un protocollo dettagliato sulla metodica ELISA per gli aCL [47], nel quale sono stati introdotti degli standards per il calcolo dei livelli anticorpali (unità GPL e MPL) e si sono resi disponibili sieri di riferimento con valori noti delle stesse unità. Più recentemente (2012) è stato pubblicato un *“International consensus guideline”* sui test per la determinazione degli aCL e degli anti- β 2GPI [48] in cui viene fatta luce su molti punti come le difficoltà pre-analitiche (tipo di campione e condizioni di conservazione); le difficoltà analitiche (gli isotipi degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI, gli antigeni, la quantificazione dei risultati e unità di misura, la calibrazione dei saggi, la precisione, l'uso di controlli positivi e negativi esterni, la misurazioni in doppio o in singolo, il calcolo del cut-off, l'interferenza del Fattore Reumatoide) e le difficoltà post analitiche come l'interpretazione dei risultati. Nonostante negli ultimi vent'anni siano state pubblicate linee guida e *proposal* per di standardizzazione dei test ELISA, data la grande variabilità intra ed inter laboratoriale, ancora non si è in possesso di un “gold standard”, le problematiche in questione sono il tipo e la fonte di materiale di riferimento/calibrazione, la mancanza di un appropriato e validato materiale di riferimento e unità di misura universali, in particolare per la misurazione degli anticorpi anti- β 2GPI, anche se recentemente Willis et al. hanno proposto come standards internazionali sia IgG/IgM policlonali purificate per affinità (AP) da pazienti positivi per aPL sia IgG chimeriche monoclonali (cloni di HCAL) che reagiscono con la β 2GPI umana, avendo mostrato una buona linearità, equivalenza di unità e commutabilità in confronto a calibratori di kit commerciali e a policlonali di riferimento (PolRM) [49]. Tuttavia a causa di questa

manca di standardizzazione, una larga varietà di tecniche di laboratorio per la determinazione degli anticorpi aCL e anti-β2GPI, diverse dall'ELISA, hanno preso piede negli ultimi anni, in particolare test immunoenzimatici basati sulla fluorescenza (FEIA) e sulla chemiluminescenza (CLIA) i quali usano piattaforme semi o completamente automatizzate. Dal 2008 si sono resi disponibili dei test per la ricerca degli anticorpi aCL ed anti-β2GPI con il metodo FEIA [50-54]. Sebbene alcuni studi [50, 53, 54] abbiano tentato di confrontare la performance dell'ELISA con quella del FEIA, a causa dei piccoli numeri [50] e dell'eterogeneità dei campioni [54] i risultati ottenuti sono discutibili. Da qualche anno esiste un'altra tecnologia, completamente automatizzata basata sulla chemiluminescenza, una reazione chimica in cui viene emessa luce [54-57]. In particolare, il CLIA è disponibile per la determinazione degli anticorpi aCL e anti-β2GPI a partire dal 2010 [58]. Gli studi che confrontano il metodo CLIA con quello ELISA sono stati svolti in gruppi eterogenei di pazienti e hanno prodotto risultati divergenti [50, 58-64].

Nel 2014, lo *Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)* ha stilato delle linee guida che ricalcano le precedenti raccomandazioni ma adattate a tutti i saggi su fase solida usati per la determinazione degli anticorpi antifosfolipidi [65]. Le raccomandazioni sono riportate brevemente qui di seguito:

1. Selezione dei pazienti

- La ricerca generalizzata degli aPL è sconsigliata per evitare scoperte accidentali.
- I test dovrebbero focalizzarsi su pazienti giovani (< 50 anni) con tromboembolismo venoso/arterioso da causa sconosciuta, trombosi in un sito inusuale o complicanze trombotiche/ostetriche associate a malattie autoimmuni.

2. Raccolta del sangue

- Siero o plasma citrato (0.109M sodio-citrato) povero di piastrine (< 10000 piastrine per μL).

- Le specifiche del test dovrebbero essere validate se si usano campioni diversi rispetto a quelli indicati dal produttore.
- I campioni devono essere mantenuti a 2-8 °C e testati in 2-3 giorni o a -20 °C od oltre per stoccaggi più prolungati. Evitare cicli di congelamento-scongelo.

3. Scelta dei saggi

- Condurre un metodo aCL β 2GPI – dipendente e un metodo a β 2GPI.
- β 2GPI umana dovrebbe essere usata come fonte di β 2GPI.

4. Caratteristiche della *performance*

- L'imprecisione intra test dovrebbe essere <20% per test ELISA manuali e <10% per i sistemi automatizzati.
- In ogni corsa dovrebbe essere inserito materiale per il controllo qualità interno: uno negativo e uno intorno al cut-off.
- Almeno un controllo negativo e uno positivo dovrebbe essere inserito in ogni corsa
- Una corsa dovrebbe essere scartata se uno dei controlli è fuori dal range indicato.
- Partecipare ad uno schema di controllo qualità esterno è strettamente raccomandato.
- I limiti di rilevabilità dovrebbero essere determinati in un campione negativo con la stessa matrice dei campioni dei pazienti.
- I campioni che hanno valori più alti del limite superiore di cut-off dovrebbero essere riportati come “più alti del valore massimo del range di misurazione”.
- Valori più bassi come “più bassi del valore minimo del range di misurazione”.
- Per l'interpretazione dei risultati vicino al cut-off dovrebbe essere considerata l'imprecisione del saggio.
- Dove possibile il saggio dovrebbe essere valutato per la *performance* clinica nel rilevare complicanze ostetriche e trombotiche.

5. Interferenze

- Il fattore reumatoide (FR) può portare a false elevate aCL e anti- β 2GPI IgM.

- Evitare campioni itterici, emolizzati e lipemici.
- Anticorpi eterofili, anticorpi umani anti-animali e alti livelli di immunoglobuline (monoclonali) potrebbero produrre dei falsi positivi.

6. Test in doppio vs. test in singolo

- Per ELISA manuali: testare in doppio calibratori, controlli e campioni dei pazienti.
- Per piattaforme automatizzate: valutare l'imprecisione; se è < 10% può essere preso in considerazione il test in singolo per i pazienti e controlli mentre i calibratori devono comunque essere testati in doppio.

7. Standards e calibrazione

- Dove possibile bisognerebbe definire la tracciabilità verso uno standard primario.
- Nella pratica giornaliera bisognerebbe usare calibratori secondari.
- Per il saggio ELISA, una curva di calibrazione (costituita da almeno sei punti) dovrebbe essere inclusa in ogni corsa.

8. Formulazione dei risultati

- Nessun unità internazionale disponibile.
- I risultati devono essere espressi in accordo alla calibrazione del saggio.
- I risultati bassi e alti devono essere riportati come < o > del range di misurazione.

9. Valori di cut-off

- Usare cut-off locali determinati/validati per la locale combinazione reagente/strumento.
- Calcolare il 99° percentile su almeno 120 donatori di sangue.
- Oppure validare i cut-off dei produttori su un numero limitato (almeno 20) di donatori sani locali.
- Dove possibile i laboratori dovrebbero verificare i propri cut-off nella popolazione locale attraverso un approccio clinico riguardante l'associazione con le complicanze trombotiche/ostetriche.

10. Interpretazione dei risultati e Reporting

- I risultati dovrebbero essere interpretati da un punto di vista clinico.
- Indicare se i risultati sono negativi o positivi in accordo al metodo e ai cut-off specifici per ogni laboratorio.
- Considerare le caratteristiche della *performance* dei saggi.
- Confermare il dato positivo dopo almeno 12 settimane e considerare come clinicamente rilevante solo i dati confermati.
- Eseguire tutti e tre i test di laboratorio (LA, aCL e anti- β 2GPI) nello stesso campione di sangue per aumentare l'utilità diagnostica.
- Dare interpretazione integrata di tutti e tre i test.
- Riportare i risultati analitici e un commento interpretativo.

NUOVI BIOMARKERS DI MALATTIA

Oltre i test-criterio, esistono anche i test non-criterio di cui fanno parte gli anticorpi aCL, gli anticorpi anti- β 2GPI di classe IgA, gli anticorpi antifosfatidilserina, gli anticorpi antifosfatidiletanolamina, gli anticorpi unicamente contro la protrombina (aPT-A) e gli anticorpi contro il complesso fosfatidilserina-protrombina (aPS/PT) [66]. Inoltre negli ultimi anni sta acquistando molto interesse uno specifico epitopo situato nel DI della β 2GPI, una struttura discontinua carica positivamente situata nell'N terminale della proteina, identificato come il più importante target antigenico nel legame proteina /anticorpo.

In questa tesi si focalizza l'attenzione su due potenziali biomarkers di malattia: gli anticorpi aCL, anti- β 2GPI di classe IgA e gli anticorpi anti DI della β 2GPI.

Gli anticorpi antifosfolipidi di classe IgA

Gli anticorpi antifosfolipidi di isotipo IgA non sono attualmente considerati tra i criteri di laboratorio per la classificazione di APS. La loro presenza nella sindrome da anticorpi

antifosfolipidi è tuttora materia di studio e la loro rilevanza clinica è controversa. La maggior parte degli studi riguarda pazienti con APS associata a LES e solo un basso numero di pazienti con PAPS è incluso in questi studi [67, 68]. Inoltre in associazione a questa classe di anticorpi oltre a manifestazioni trombo emboliche e/o perdite fetali intrauterine si sono trovati altri sintomi come *livedo reticularis*, ulcere della pelle, mal di testa, disfunzioni cognitive, attacchi ischemici transitori e malattie delle valvole cardiache [69-71]. I fattori principali che contribuiscono all'eterogeneità dei risultati sono le differenze sia nei disegni che nella popolazione di studio [67], differenze nei metodi di laboratorio con differenti cut-off [66] e differenze nella composizione etnica delle popolazioni di studio [72]. A causa di queste variabili, quindi, l'utilità di testare gli anticorpi di classe IgA è ancora controversa. Alcuni studi si focalizzano sull'importanza degli aPL IgA isolati per il loro valore diagnostico in quei pazienti con forte sospetto di APS ma negativi per gli aPL convenzionali [73-81].

Alcuni studi hanno rilevato gli anticorpi IgA aCL e/o anti- β 2GPI in pazienti sieronegativi con trombosi [75, 76, 79-81] e con impegno ostetrico [77, 78]. La maggior parte di questi autori suggerisce che questi anticorpi ed in particolare gli anticorpi anti- β 2GPI IgA abbiano un ruolo potenzialmente utile per classificare ulteriori pazienti come affetti da APS [75, 77-79]. Già nel 2011, un gruppo di esperti riunitosi a Galveston, ha rivelato che è un sentore comune che sia gli anticorpi aCL IgA ma soprattutto gli anti- β 2GPI IgA, possano essere considerati utili per la conferma di diagnosi di APS. [66].

Anticorpi anticardiolipina IgA.

Gli anticorpi aCL IgA sono stati ricercati prevalentemente in pazienti affetti da LES e in pochi pazienti con la PAPS. La prevalenza di questa isoforma in entrambi i gruppi è altamente variabile, passando da zero individui a circa metà della popolazione di studio. Questa discrepanza può essere dovuta alle differenti etnie delle popolazioni in esame: gli aCL IgA sembrano essere più frequenti nei pazienti Afro-Caraibici [82], giapponesi [83] e afro-americani [84], Alcuni studi hanno trovato associazione tra aCL IgA e le tipiche

manifestazioni cliniche di APS come le trombosi [74, 84-87] e le complicanze ostetriche [74, 85, 86]. Sono state trovate associazioni anche con i “non criteri” clinici di APS quali: trombocitopenia [74, 83, 86, 88], anemia emolitica [82, 88], ipertensione polmonare [88], ulcere della pelle e vasculiti [83], disfunzioni cognitive [89], livaedo reticularis (LR) e fenomeno di Raynaud [90]. La prevalenza di isolati aCL IgA è stata riportata da pochi studi variando da zero al 20% della popolazione in esame. In uno studio su una coorte di 700 individui presi dal registro APSCORE, solo 5 pazienti (meno dell’1%) avevano solo aCL IgA e quattro di loro avevano le manifestazioni cliniche di APS [66]. Una prevalenza significativa di isolati aCL IgA è stata trovata anche in pazienti affetti da varie malattie del tessuto connettivo; SSc; Morbo di Behcet; granulomatosi di Wegener; malattia di Kawasaki; purpura di Henoch-Schönlein [91-96].

Anticorpi anti- β 2 Glicoproteina I IgA.

Gli anticorpi anti- β 2GPI di classe IgA sono stati descritti come maggiormente associati alla trombosi e in particolare nei pazienti affetti da LES [84, 87, 97, 98]. In una coorte di 56 pazienti con isolate anti- β 2GPI IgA è stato trovato un aumento del rischio tromboembolico nei pazienti affetti da LES [99]. L’importanza clinica degli anti- β 2GPI IgA isolati è stata riscontrata nelle perdite fetali, uno studio su un gruppo di 36 donne con aborti spontanei da causa sconosciuta ha riscontrato, infatti, un 14% di positività per questi anticorpi [78]. Similmente in un largo gruppo di donne con aborti ricorrenti inspiegati o morti fetali è stata riscontrata la presenza dell’isotipo IgA in assenza di IgG/IgM e del LA [77].

In uno studio molto grande, finalizzato ad esaminare la prevalenza degli anti- β 2GPI IgA isolati, sono stati riscontrati 149 pazienti con positività per gli anti- β 2GPI IgA in 75 dei quali in forma isolata (50,3%) e risultati clinicamente significativi (associati alle manifestazioni cliniche di APS) in più dei 2/3 dei casi. Il valore diagnostico degli isolati anti- β 2GPI IgA è supportato anche da alcuni “case reports” di pazienti con tipiche caratteristiche di APS [75] e da un caso di APS catastrofica [76].

Molto interessante è il fatto che isolati anti- β 2GPI IgA sono stati descritti come fattore indipendente di rischio cardiovascolare (CVD): infarto acuto del miocardio, ischemia cerebrale acuta, e aterosclerosi [81, 100].

Il ruolo patogenetico degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI di classe IgA.

Per quanto riguarda gli aCL IgA, in un lavoro del 1995 gli autori hanno utilizzato anticorpi umani ottenuti da pazienti con APS iniettati poi in modelli murini di trombosi venosa. La dimensione media del trombo usando due differenti preparazioni di IgA aCL è stato trovato essere significativamente più larga rispetto al controllo IgA, suggerendo che gli aCL IgA appaiono più simili agli aCL IgG ed IgM in termini di trombogenicità [101]. Più recentemente è stato dimostrato il ruolo patogenetico degli anti- β 2GPI IgA; sono stati purificati per affinità gli anti- β 2GPI IgA da pazienti con positività esclusiva per questa isoforma e iniettati in topi inducendo trombosi della vena femorale. Le dimensioni del trombo erano significativamente maggiori e la produzione di fattore tissutale era significativamente sovra regolata rispetto a quelli dei topi inoculati con il controllo IgA [102].

Gli anticorpi anti Dominio I della β 2 Glicoproteina I

Come molti studi hanno dimostrato, gli anticorpi anti- β 2GPI risultano essere associati ad un rischio aumentato di sviluppare le manifestazioni cliniche di APS [17]. Tuttavia, non tutti i pazienti con positività per gli anticorpi anti- β 2GPI sviluppano manifestazioni cliniche aPL-correlate. Questa osservazione concorda con la crescente evidenza che gli anticorpi anti- β 2GPI siano un gruppo piuttosto eterogeneo di autoanticorpi ciascuno con un diverso potenziale patogenico. Tale eterogeneità tra gli anticorpi anti- β 2GPI potrebbe essere in parte spiegato con la prova che diversi epitopi della β 2GPI possono essere bersaglio di autoanticorpi specifici. Inoltre, un epitopo specifico nel Dominio I, una struttura discontinua carica positivamente situato nella porzione N terminale della β 2GPI, è stato identificato come il bersaglio antigenico più rilevante coinvolto nel legame β 2GPI / anticorpo anti- β 2GPI [103].

Negli ultimi anni, molti studi sull'APS hanno avuto l'obiettivo di meglio caratterizzare la funzione patogenica e il significato clinico degli anticorpi contro il DI.

Alla fine degli anni '90, molte ricerche si sono focalizzate sull'identificazione del sito di legame della glicoproteina con i suoi specifici anticorpi [104-106] e i dati ottenuti suggeriscono che ognuno dei cinque domini di cui è formata la proteina è in grado di legare l'anticorpo anti- β 2GPI. Tuttavia, evidenze concordanti hanno permesso di identificare il DI come l'epitopo immunodominante [107-110], infatti, McNeeley et al. hanno riportato che l'88% degli anticorpi anti- β 2GPI da 106 pazienti affetti da APS, mostravano una selettività tre volte più grande per la β 2GPI contenente il DI rispetto alla proteina mutata in cui mancava [108]. In particolare la regione del DI che coinvolge arginina 39-arginina 43 fu più tardi identificata come sito criptico e conformazione dipendente [109-111]. Nella conformazione circolare dove il DI è a contatto con il DV il sito criptico è nascosto, in quella ad "S" è coperto dalle catene di carboidrati (LPS) di DIII e DIV e quindi il legame proteina-anticorpo non avviene. Quando invece la proteina è nella conformazione "J" il sito criptico viene esposto diventando disponibile al legame con l'anticorpo. L'ipotesi che l'immunogenicità della β 2GPI dipenda dalla sua configurazione è dimostrato da studi in vivo nei quali topi inoculati solo con la proteina misfolded o con β 2GPI-CL sviluppavano anticorpi contro il DI e la produzione di questi anticorpi anti DI era osservata quando i topi venivano inoculati con DI ma non con DII-DV [112]. Nei ratti preparati con LPS veniva osservato un deposito di β 2GPI-aPL IgG sull'endotelio subito dopo l'infusione dimostrando che in vivo gli anticorpi anti- β 2GPI aderiscono alla parete del vaso [113], questa evidenza suggerisce che la proteina diventa immunogenica come conseguenza al cambio conformazionale.

Studi in vitro hanno dimostrato che gli anticorpi anti DI inducono un prolungamento del tempo di coagulazione [112, 114]. Prove sulla capacità trombotica di questi anticorpi sono state messe in evidenza da alcuni lavori a partire dal 2009 su modelli murini [115, 116] in particolare Pericleous et al, hanno dimostrato un grosso aumento dell'attività del TF e un

aumento significativo delle dimensioni dei trombi indotti dall' eluizione di frazioni ricche in anticorpi antiDI ottenute da pazienti affetti da APS dopo purificazione per affinità degli stessi [116]. Uno studio più recente ha dato prova della patogenicità degli anti DI trovando un incremento del tempo di coagulazione e di perdite fetali in modelli animali inoculati con anticorpi monoclonali anti DI IgG umani [117]

Molti studi clinici su pazienti con APS, hanno trovato associazione degli anticorpi anti DI con la trombosi. Molti autori hanno confermato la relazione tra anticorpi anti DI e eventi trombotici sia di natura venosa che arteriosa [114, 116, 118-121], in particolare uno studio multicentrico su 442 pazienti APS ha riportato una odds ratio (OD) di 3,5 dell'anti DI di predire un evento trombotico e anche se in minor misura, complicanze ostetriche (OD 2,4) [118]. Inoltre gli anticorpi anti DI IgG sono stati trovati essere più prevalenti e aver titoli più alti nei pazienti con positività multiple per gli aPL [122], condizione generalmente correlata al rischio maggiore di sviluppare complicanze cliniche [39, 40].

Essendo il DI un sito criptico e la sua esposizione conformazione dipendente, come precedentemente descritto, gli anticorpi anti DI sono, non sorprendentemente, difficili da rilevare. Inoltre è stato dimostrato che l'esposizione del DI è differente tra i vari kit ELISA commerciali e questo potenzialmente potrebbe influenzare i risultati dei test [123]. Negli ultimi anni alcuni studi hanno usato, per la determinazione degli anticorpi anti DI, un saggio basato sulla chemiluminescenza che usa DI ricombinante ancorato a biglie paramagnetiche [63, 120, 121].

SCOPI DELLA TESI

Il metodo più usato per la determinazione degli anticorpi anticardiolipina e anti- β 2 Glicoproteina I di classe IgG/IgM è quello ELISA. Negli ultimi anni, a causa della mancata standardizzazione di questo test, hanno preso piede vari sistemi completamente automatizzati, tra cui un saggio immunoenzimatico basato sulla fluorescenza (FEIA) e uno basato sulla chemiluminescenza (CLIA). Scopo della tesi è di valutare le performance del FEIA e del CLIA attraverso il confronto con una metodica ELISA home made in un'ampia ed omogenea coorte di pazienti affetti esclusivamente da sindrome da anticorpi antifosfolipidi primaria (PAPS). È stata inoltre indagata la loro sensibilità diagnostica attraverso la determinazione degli aPL convenzionali in un gruppo di pazienti con le caratteristiche cliniche di PAPS ma negativi per i criteri di laboratorio al test ELISA home made.

Successivamente è stata considerata la ricerca di nuovi markers antifosfolipidici attraverso l'impiego delle stesse tecniche alternative. In particolare abbiamo valutato con il metodo FEIA la rilevanza clinica degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI di classe IgA in una coorte di pazienti affetti esclusivamente da PAPS e il loro valore diagnostico attraverso l'analisi di un gruppo di soggetti FEIA negativi per gli IgG/IgM aPL convenzionali, ma con le caratteristiche cliniche di APS. Con il metodo CLIA, invece, è stato indagato il valore clinico degli anticorpi anti-DI della β 2GPI di classe IgG in una coorte di pazienti affetti da PAPS e il valore diagnostico di tali anticorpi attraverso la loro ricerca in un gruppo di soggetti CLIA negativi per gli aPL convenzionali, ma con le caratteristiche cliniche di APS.

**CONTRIBUTO ALLA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI
ANTICARDIOLIPINA E ANTI- β 2 GLICOPROTEINA I: CONFRONTO
TRA UN ELISA HOME MADE ED UN *FLUORESCENCE ENZYME*
*IMMUNOASSAY (CLINICA CHIMICA ACTA, 2015)***

PAZIENTI E METODI

Popolazione di studio

I campioni di sangue sono stati raccolti da 94 pazienti affetti da PAPS (84 femmine e 10 maschi, età media $44,3 \pm 11,7$ anni, range 20-79) la cui diagnosi è stata fatta seguendo i criteri dell'*International Consensus Statement* per la classificazione di APS [2]. Quarantatré avevano una storia di trombosi, 38 di complicanze ostetriche e 13 sia di trombosi che di complicanze ostetriche.

Al fine di valutare i risultati ottenuti dal FEIA nei pazienti ELISA negativi, abbiamo raccolto anche campioni di sangue da 65 pazienti di questo tipo (56 femmine e 9 maschi, età media $40 \pm 8,7$ anni, range 18-63) i quali presentavano le caratteristiche cliniche di APS ma non quelle di laboratorio. Trentotto avevano una storia di trombosi e 27 di complicanze ostetriche.

Inoltre, abbiamo inserito come gruppo di controllo 165 soggetti: 120 erano soggetti sani donatori di sangue omogenei per sesso ed età con la popolazione di studio [65] e 45 (41 femmine e 4 maschi, età media $46,0 \pm 14,9$ anni; range 15-76) pazienti affetti da varie malattie autoimmuni diverse da APS. In particolare, 10 pazienti affetti da LES, 10 con Sindrome di Sjögren, 7 con Polimiosite, 10 con Sclerodermia e 8 con Artrite Reumatoide. Lo Studio è stato svolto in accordo ai principi etici enunciati nella Dichiarazione di Helsinki, e tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato.

Determinazione del Lupus Anticoagulant

Per quanto riguarda la determinazione dei LA, le metodiche sono state messe a punto seguendo le linee guida internazionali dell'International Society of Thrombosis and Haemostasis [124]. Al fine di aumentare la sensibilità dell'esame, sono stati usati due diversi tests della coagulazione fosfolipide-dipendenti:

- il Tempo del Veleno di Vipera di Russel con fosfolipidi diluiti (dRVVT) che, attivando direttamente il fattore X, esplora la via comune della cascata coagulativa;
- il Tempo di Tromboplastina Parziale attivata con fosfolipidi diluiti (dAPTT) che esplora invece la via intrinseca. Per ogni test la ricerca dei LA prevede 3 steps (Figura 1):

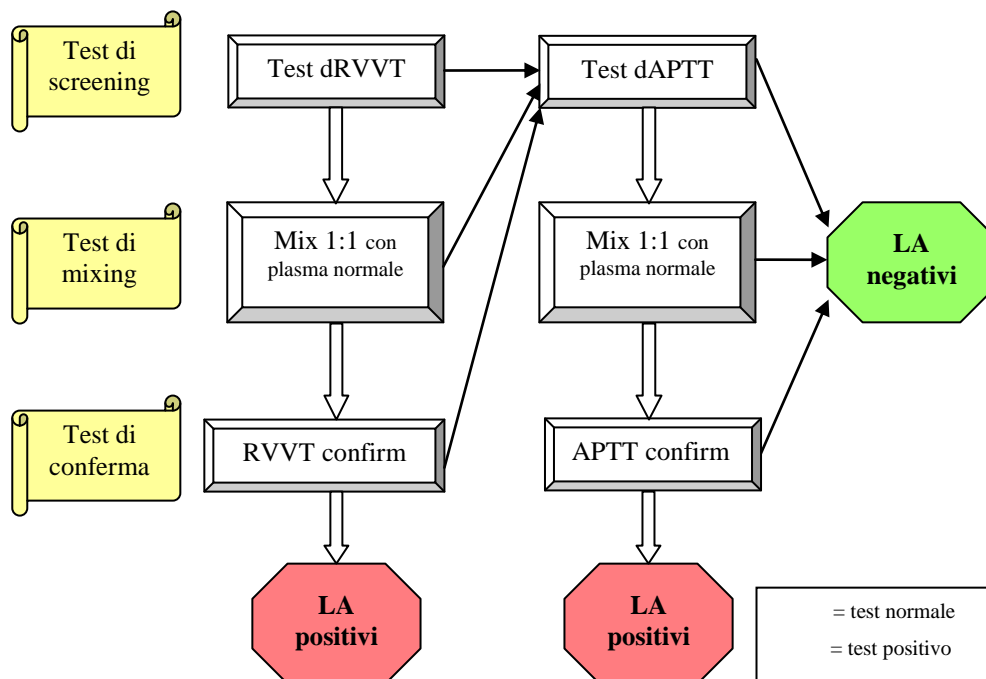


Figura 1: Steps e tests emocoagulativi per la determinazione dei LA

1. Primo step: esecuzione del test di screening (dRVVT e/o dAPTT). Il riscontro di un allungamento del tempo di coagulazione fa sospettare la positività e richiede il passaggio allo step successivo.

2. Secondo step: esecuzione del test di mixing il cui scopo è stabilire se l'allungamento del tempo di coagulazione è dovuto al deficit di uno o più fattori della coagulazione. In tal caso si ottiene la correzione del tempo di coagulazione con l'aggiunta al campione in esame di un pool di plasmi ottenuti da donatori. In caso di mancata correzione si passa al terzo step.
3. Terzo step: esecuzione del test di conferma (RVVT confirm o APTT confirm).

La conferma della positività per LA si ottiene quando il tempo di coagulazione si corregge in seguito all'aggiunta di un eccesso di fosfolipidi, i quali sono in grado di neutralizzare i LA e di annullarne l'effetto. Tutti i tempi venivano misurati in secondi da uno strumento (ACL9000, Instrumentation Laboratory). I cut-off, determinati utilizzando 30 plasmi di donatori abituali di sangue, venivano espressi in secondi come $>99^{\circ}$ percentile. Il plasma da esaminare, ottenuto da sangue venoso, viene raccolto in una provetta vacutainer (contenente citrato di sodio 0.109 M in rapporto 9:1) e successivamente centrifugato a temperatura ambiente (per 10 minuti a 3000 giri). Si raccoglie solo la metà superiore del supernatante ottenendo un plasma povero di piastrine, le quali andrebbero a neutralizzare gli eventuali LA.

Test dRVVT: è un test che attiva direttamente il Fattore X (via comune della coagulazione) in presenza di fosfolipidi a bassa concentrazione e calcio. Se il tempo ottenuto risulta superiore al cut-off il tempo di coagulazione è considerato allungato ed è necessario passare al secondo step (test di mixing 1:1). In caso contrario si esegue un secondo test di screening (aPTT).

Il tempo ottenuto con il test di mixing viene messo in rapporto al tempo ottenuto da un pool di plasmi di donatori. Una ratio $T_{mix}/T_{controllo}$ aumentata indica che l'allungamento non si è corretto. Si passa quindi al terzo step per l'esecuzione del test di conferma. In caso contrario si esegue il secondo test di screening. Il test di conferma si esegue in presenza di una elevata concentrazione di fosfolipidi ed, in questo caso, il tempo ottenuto viene messo in rapporto con il tempo del test iniziale. Se la ratio $T_{test\ dRVVT}/T_{conferma}$ risulta aumentata, il campione è considerato positivo per i LA. Se il valore risulta inferiore e quindi i LA sono negativi, si esegue il secondo test di screening.

Test dAPTT: è un test che valuta la presenza di anticorpi che interferiscono con la via intrinseca della coagulazione. Se il tempo ottenuto risulta allungato, vale a dire maggiore del cut off si esegue il test di mixing 1:1; altrimenti i LA vengono considerati negativi. Nel secondo step il plasma in esame viene mescolato con un pool di plasmi di donatori sani (1:1) per escludere che l' allungamento sia dovuto al deficit di uno dei fattori di coagulazione della via intrinseca. Il tempo ottenuto si mette in rapporto con il tempo ottenuto da un pool di donatori sani. Se la ratio T mix/T controllo risulta aumentata sarà necessario eseguire un test di conferma. Altrimenti i LA vengono considerati assenti. Il terzo step consiste nel valutare il dAPTT del plasma in esame in assenza ed in presenza di fosfolipidi esagonali. Se la differenza tra i 2 tempi di coagulazione risulta uguale o maggiore di 8 secondi, il plasma in esame è positivo per i LA.

In questo studio, il test per la determinazione del LA è stato eseguito solo per riconfermare la precedente diagnosi di laboratorio.

Il metodo ELISA home-made

Il metodo ELISA (Figura 2) impiegato per la determinazione degli aCL e degli anti-β2GPI IgG/IgM è un metodo home-made messo a punto seguendo le raccomandazione dell' *“European Forum on aPL”* [38, 47]

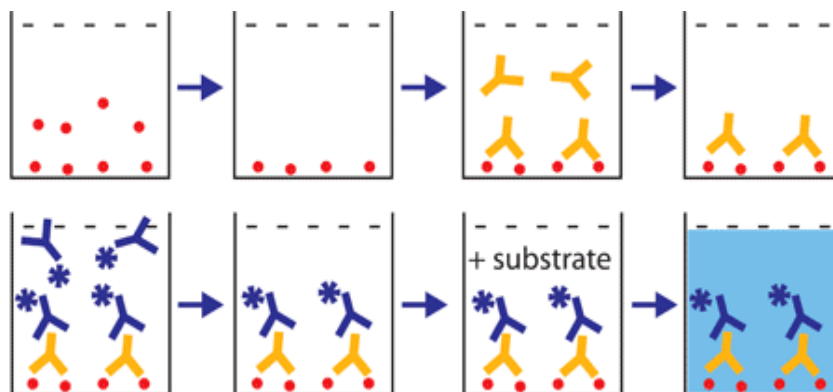


Figura 2: Schema del metodo ELISA (Tratto da: nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/)

Determinazione degli aCL IgG ed IgM

• Coattazione della cardiolipina alla piastra

25 µl di cardiolipina bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), in soluzione etanolica alla concentrazione di 50 µg/ml, vengono distribuiti nei 96 pozzetti di una micropiastra a fondo piatto (Plates F/96 Polysorp, Nunc, Denmark). Il solvente viene fatto evaporare lasciando la piastra in frigo a + 4°C senza alcuna copertura, per una notte. Il giorno dopo i pozzetti vengono lasciati asciugare all'aria per circa 10 minuti e quindi incubati a temperatura ambiente per 2 ore con 150 µl/pozzetto di PBS (KH₂PO₄ 14,525 g, Na₂HPO₄·2H₂O 76g, NaCl 48g, H₂O a 10 litri a pH=7,2), contenente il 10% di FCS (siero fetale bovino, Gibco, Paisley, Scotland) scomplementato (FCS-PBS); questo passaggio noto come “fase di bloccaggio” serve difatti a bloccare i siti aspecifici dell’antigene.

• Esecuzione del test

I sieri, lasciati preventivamente scongelare, vengono diluiti 1:50 con la soluzione 10% FCS/PBS, contemporaneamente viene preparata la curva di calibrazione con 8 diluizioni scalari al raddoppio di un siero a titolo noto contro gli standards internazionali di riferimento di Harris [125]. Scaduto il tempo di incubazione e dopo aver eseguito un lavaggio con 10%FCS/PBS (150µl/pozzetto), vengono seminati in doppio (100µl/pozzetto) i sieri, gli 8 punti della curva di calibrazione ed un controllo a concentrazione anticorpale nota. Segue un’incubazione di 1 ora a temperatura ambiente. Scaduto il tempo di incubazione vengono fatti 3 lavaggi con 10%FCS/PBS e successivamente seminati 100µl/pozzetto di antisiero anti-immunoglobuline umane IgG o IgM coniugato con fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich), diluito 1:1000 in 10%FCS/PBS; segue un’incubazione di 90 minuti a temperatura ambiente. Dopo altri 3 lavaggi in 10%FCS/PBS si distribuisce 100 µl/pozzetto di una soluzione cromogena costituita da p-nitrofenilfosfato (Sigma) in tampone magnesio-carbonato 0,05M a PH 9,8 (NaHCO₃ 2,1 g, MgCl₂·6H₂O 0,1 g, portare il pH=9,8 con aggiunta di NaOH 2N e aggiungere H₂O fino a 500 ml) alla concentrazione di 1 mg/ml. Le piastre vengono lasciate a

37° C per un tempo necessario ad ottenere dei valori di assorbanza dello standard più concentrato intorno a 1.0/ 1.1 di densità ottica (DO).

- **Calcolo dei risultati**

La lettura della DO viene eseguita con un fotometro a luce verticale modello Multiskan® FC (Thermo Scientific, Finland) alla lunghezza d'onda di 405 nm. I dati ottenuti vengono elaborati automaticamente con un programma Software per dosaggi ELISA (Skanlt® software for Multiskan® FC version 2.5, Thermo Scientific, Finland) e la curva teorica calcolata con una regressione non lineare, in base alla quale vengono determinati i valori anticorpali espressi come unità di IgG (GPL) o unità di IgM (MPL) utilizzando le referenze internazionali [125].

Determinazione degli anti-β2GPI IgG ed IgM

- **Purificazione della β2GPI**

L'antigene β2GPI è stato purificato da plasma di donatori abituali di sangue (meglio se di gruppo sanguigno AB+). La sacca (circa 250 ml) viene scongelata a freddo *overnight* e il giorno dopo il plasma scongelato viene diviso in tre aliquote alle quali viene aggiunto lo stesso volume di soluzione fisiologica di NaCl (0,15M). La precipitazione deve essere condotta in bagno di ghiaccio (0°C) per 20 minuti utilizzando acido perclorico al 60% aggiunto goccia a goccia fino ad una concentrazione finale di 0.285M. L'aggiunta lenta e sotto agitazione magnetica permette la precipitazione del 90% delle proteine contenute nel plasma umano.

Successivamente si centrifuga la soluzione a 10000 g per 15 min a 4°C. Il surnatante raccolto viene tamponato a pH 8.0 con una soluzione di NaOH 1M e dializzato in 5 litri di buffer Tris 0.02M e NaCl 0.03M over/night. Tutte le operazioni sopra descritte sono state effettuate a +4°C.

La dialisi ha permesso di purificare il campione da eventuali sostanze interferenti con la purificazione stessa. Il giorno successivo viene eseguito il primo passaggio di purificazione mediante una cromatografia di affinità con colonna Hi-Trap Heparin che lega la β 2GPI con un legame ionico; la colonna viene inserita in un Äkta Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Il principio su cui si basa questo tipo di cromatografia è l'attrazione che si instaura tra molecole cariche di segno opposto. Le separazioni a scambio ionico avvengono in colonne impaccate con una resina scambiatrice di ioni. Esistono due tipi di resine: gli scambiatori anionici e gli scambiatori cationici. Questi ultimi possiedono gruppi carichi negativamente e attraggono, quindi, molecole cariche positivamente. L'eluizione selettiva delle molecole legate alla resina si ottiene variando il pH o la forza ionica o entrambi, oppure mediante l'eluizione di affinità.

L'Äkta Purifier è uno strumento versatile, utilizzato in cromatografia per la purificazione di proteine, peptidi e altre biomolecole. È indicato soprattutto per quelle applicazioni che richiedono l'eluizione tramite gradiente. È dotato di una pompa ed un sistema di trasporto dei tamponi che creano il gradiente. Ad esso si collega la colonna da utilizzare e permette di raccogliere le frazioni desiderate (Figura 3 e Figura 4). Questo strumento è anche dotato di un sistema che registra il picco del materiale separato attraverso la lettura diretta con la lampada UV della concentrazione della sostanza eluita. La colonna è stata equilibrata con circa 300 ml di una soluzione NaCl 0,03 M. Il programma è stato impostato per la cromatografia selezionando la velocità del flusso trasportatore e il tempo per costruire il gradiente. La proteina è stata eluita utilizzando una soluzione di NaCl 0,35 M. Successivamente l'eluato viene dializzato con un tampone NaCl 0,15 M (3 cambi, l'ultimo overnight, a +4°C). Il giorno seguente viene effettuata una seconda cromatografia con la colonna di eparina utilizzando come soluzione di lavaggio NaCl 0,15 M e come soluzione di eluizione NaCl 0,35M. Le frazioni raccolte, sono state dializzate in 5 litri di buffer NaCl 0.15M overnight. La qualità e

la purezza dell'antigene sono state valutate con un elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) (Figura 5).

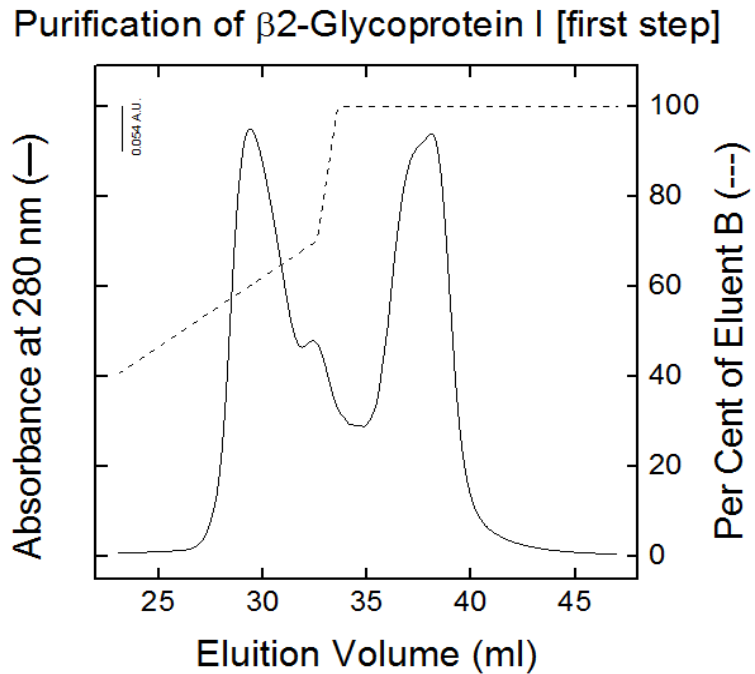


Figura 3: Purificazione della β 2GPI. Primo step, picchi di eluizione

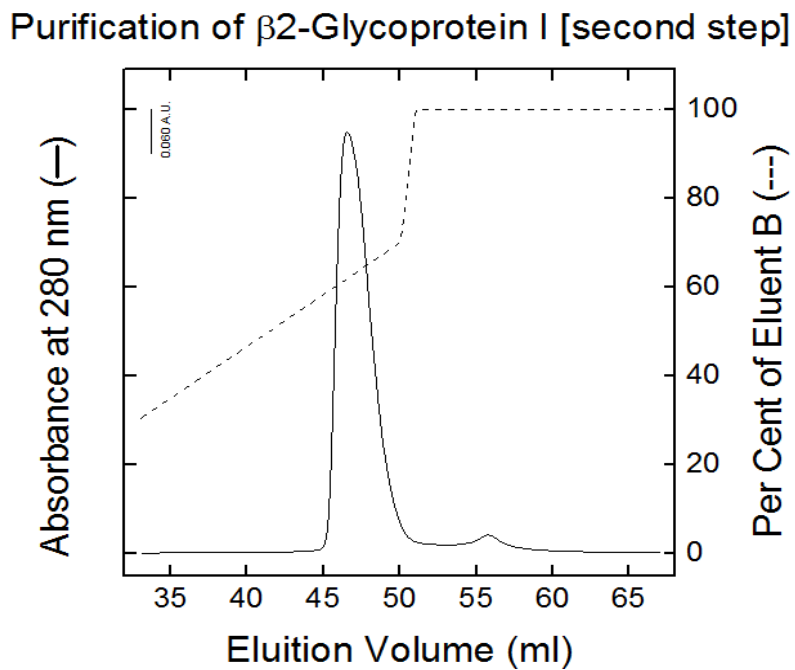


Figura 4: Purificazione della β 2GPI. Secondo step, picchi di eluizione

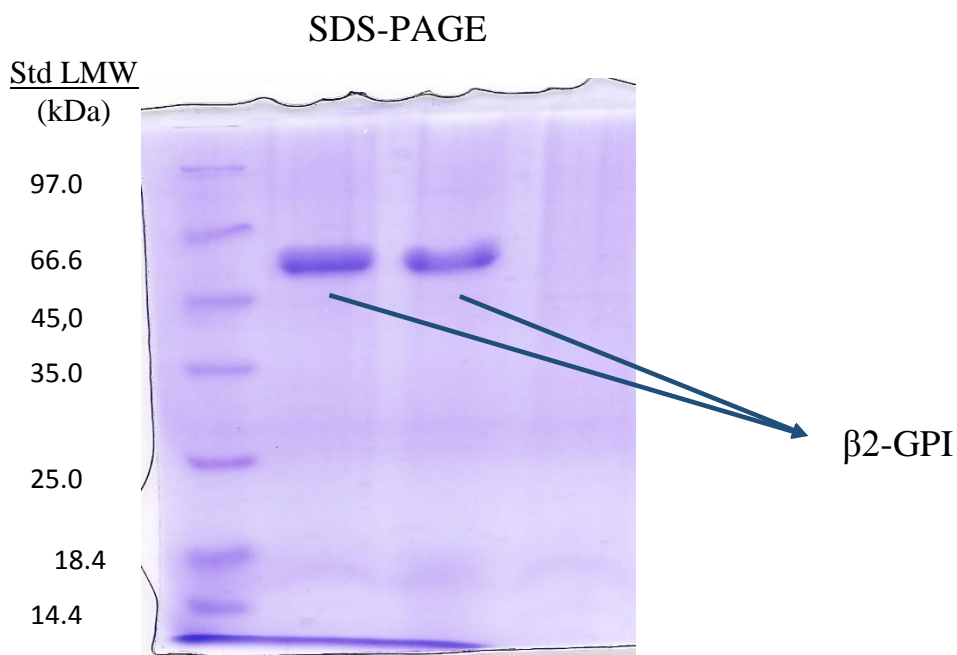


Figura 5: Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato.

- **Coattazione della β 2GPI alla piastra**

Nella prima giornata l'antigene viene seminato su due piastre, una per le IgG ed una per le IgM, (piastre Maxisorp a fondo piatto, 96 pozzetti, Nunc, Denmark). La β 2GPI purificata home-made viene diluita in una soluzione tampone di carbonato di calcio 0.05 M (pH 9.6), ottenendo una concentrazione di antigene di 10 μ g/ml. In ogni pozzetto vengono seminati 100 μ l di soluzione, corrispondenti a 1 μ g di β 2GPI. Le piastre vengono lasciate in frigo (+4°C) per tutta la notte.

- **Esecuzione del test**

Il giorno successivo vengono svuotate le piastre e si seminano 150 μ l di PBS-BSA 1% per pozzetto (PBS= phosphate buffer saline; BSA= bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, USA). Le piastre vengono incubate per un'ora, coperte, al buio, a temperatura ambiente. Nell'attesa si diluiscono in PBS-Tween 0,05% i sieri da testare e due sieri positivi di controllo (uno per IgG e uno per IgM), in rapporto 1:100 e si preparano le curve di calibrazione, eseguendo 7 diluizioni a scalare dello standard a partire da una concentrazione di 1:100.

Scaduta l'ora di incubazione, svuotate le piastre del bloccaggio, si seminano in doppio 100 µl/pozzetto i sieri diluiti e quelli delle curve (dalla soluzione più diluita alla più concentrata, lasciando il primo punto in bianco, corrispondente a concentrazione nulla), lasciando solo la soluzione tampone nella prima colonna. Vengono quindi incubate le piastre, coperte, per due ore. Intanto si diluiscono in PBS-Tween 1:1000 le immunoglobuline anti-IgG e anti-IgM, coniugate con fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich, USA). Dopo due ore di incubazione si svuotano le piastre e si effettuano 3 lavaggi con 150 µl di PBS-Tween per pozzetto; quindi si seminano 100 µl/pozzetto di immunoglobuline coniugate e si incubano le piastre per altre due ore.

Di seguito vengono effettuati tre lavaggi delle piastre con 150 µl di PBS-Tween e vengono seminati 100 µl/pozzetto di PNF (Sigma-Aldrich, USA), precedentemente diluito in tampone Mg-carbonato a pH 9.8; le piastre vengono incubate a 37° fino a reazione colorimetrica (circa 20 minuti) e comunque sino ad ottenere un'assorbanza dello standard più alto di circa 1000 OD.

- **Calcolo dei risultati**

Si esegue la lettura al fotometro a luce verticale Multiskan[®] FC (Thermo Scientific, Finland) a lunghezza d'onda di 405 nm e i risultati vengono interpretati come unità arbitrarie (U/ml) ottenute da una curva di calibrazione in cui vengono usati come riferimento gli anticorpi monoclonali di Koike [126], HCAL per gli anti-β2GPI IgG e EY2C9 per gli anti-β2GPI IgM. I dati vengono elaborati tramite un programma software (Skanlt[®] software for Multiskan[®] FC version 2.5, Thermo Scientific, Finland)

Sia per gli anticorpi aCL ed anti-β2GPI IgG/IgM i valori di cut-off per i livelli medio-alti sono stati calcolati > 99° percentile usando i sieri dei 120 donatori sani di sangue applicando la seguente formula: “ $I_{99}=(120 \text{ data} + 1) \times 99/100$ ”. I calibratori, i sieri dei pazienti e dei controlli sono stati testati in doppio. Il coefficiente di variabilità sia inter che intra test è stato

calcolato < 10% per tutti i test; in particolare i coefficienti di variabilità intra test per gli aCL e gli anti- β 2GPI IgG/IgM variavano da 4,1 a 7,0% e da 3,5 a 7,3% rispettivamente, mentre quelli inter test variavano da 8,1 a 9,2% e da 6,2 a 7,8 % rispettivamente. I sieri dei pazienti affetti da PAPS sono stati ritestati per gli aPL al fine di verificare la precedente diagnosi di laboratorio.

Il metodo FEIA

Gli anticorpi aCL e gli anticorpi anti- β 2GPI di classe IgG ed IgM sono stati determinati con il metodo FEIA (Fluorescence Enzyme ImmunoAssay) utilizzando kits commerciali EliA™ (Phadia AB, Uppsala, Sweden). Sono state seguite tutte le raccomandazioni fornite. I sieri dei campioni sono stati diluiti 1:10 per gli anticorpi aCL di isotipo IgG ed IgM, e anche per gli anticorpi anti β 2GPI di isotipo IgG , mentre per l'isotipo IgM anti- β 2GPI i sieri sono stati diluiti 1:50.

I pozzetti “EliA Cardiolipin IgG, IgM Wells” sono sensibilizzati con antigene cardiolipina di origine bovina e i pozzetti EliA β 2GPI IgG, IgM, sono sensibilizzati con antigene β 2GPI di origine umana. Se presenti nel campione in esame, gli anticorpi si legano alla fase solida (figura 6). Dopo aver eliminato, tramite lavaggio, gli anticorpi non legati, vengono aggiunti anticorpi anti-IgG/IgM umana marcati con l'enzima β -D-galattosidasi (coniugato) per formare un complesso anticorpo-coniugato (figura 7). Dopo incubazione, il coniugato non legato viene eliminato tramite lavaggio e il complesso legato viene quindi incubato con un agente di sviluppo costituito da 4-MetilUmbelliferone associato a Glutazione (figura 8). Dopo aver bloccato la reazione, si misura la fluorescenza nella miscela della reazione con uno specifico strumento (Phadia 250, figura 9). Un alto valore del segnale di fluorescenza corrisponde ad un'alta quantità di anticorpo legato all'antigene.

Le curve di calibrazione viene ottenuta utilizzando i calibratori EliA IgG/IgM dosati in doppio.

Le curve vengono memorizzate ed i successivi dosaggi saranno valutati rispetto alla curva in

memoria impiegando un solo controllo di curva EliA IgG/IgM (eseguito in doppio). I calibratori per le IgG/IgM sono riferiti, secondo principi di equivalenza, alla Preparazione Internazionale di Riferimento (IRP) 67/86 per le immunoglobuline G ed M dell'Organizzazione Mondiale di Sanità (WHO). Una nuova curva di calibrazione deve essere eseguita se:

- l'ultima calibrazione è stata eseguita oltre un mese prima, oppure
- è stato utilizzato un nuovo numero di lotto di IgG/IgM Coniugate oppure
- il controllo IgG/IgM Curve Control non rientra nei limiti specificati (previsti nel software dello strumento Phadia 250). La standardizzazione del test è regolata verso una serie di sieri definiti di riferimento [125]. I risultati sono espressi in GPL/MPL-U/ml (1 unità GPL/MPL corrisponde alla attività di legame di 1 µg/ml di anticorpi IgG/IgM/IgA anticardiolipina, ottenuto con purificazione di un siero standard tramite cromatografia per affinità). Non essendoci ancora alcun materiale internazionale di riferimento per gli anticorpi anti-β2GPI, una curva di calibrazione è stata costruita con sei campioni positivi e i risultati espressi in unità arbitrarie EliA Units/ml. Inoltre, come da raccomandazioni, viene inserito un controllo qualità in ciascuna seduta analitica. Tali controlli devono essere valutati più volte per definire i valori medi target e gli intervalli di validità. Phadia 250 consente di misurare concentrazioni specifiche di IgG/IgM in µg/l. utilizzando un fattore di conversione definito dal codice lotto specifico, i risultati poi vengono convertiti automaticamente in GPL/MPL oppure in U/ml.

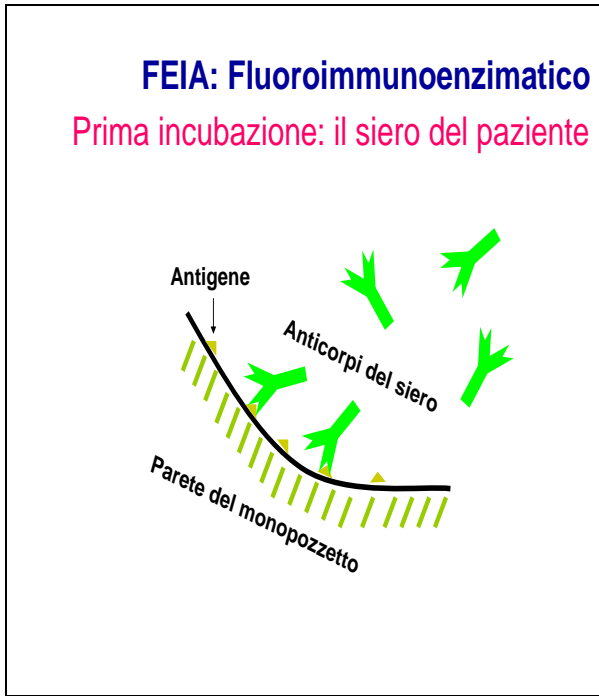


Figura 6: Metodo FEIA, primo step

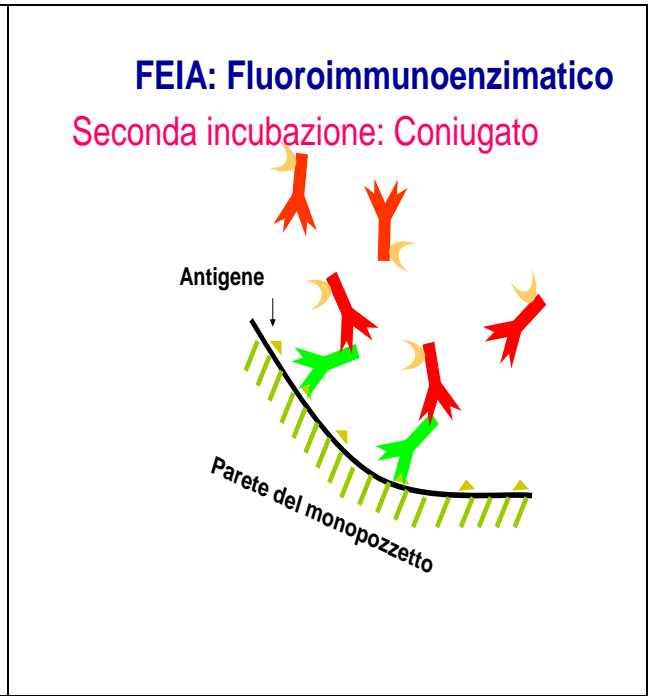


Figura 7: Metodo FEIA, secondo step

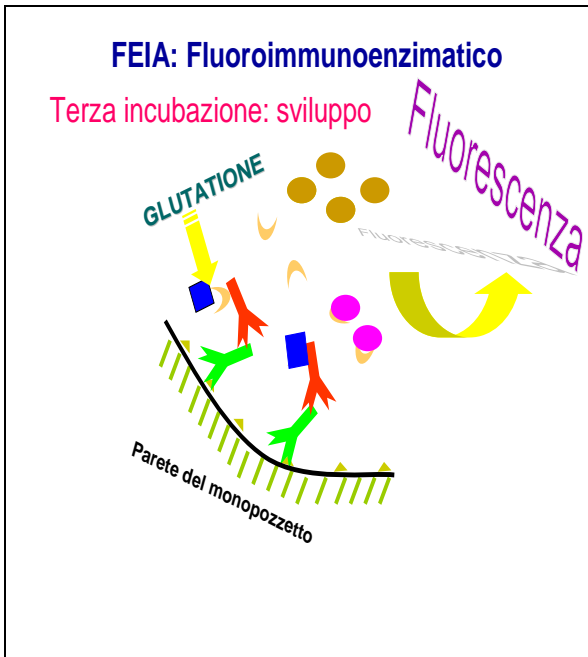


Figura 8: Metodo FEIA, terzo step



Figura 9: Strumento “Phadia 250”

Gli anticorpi aCL e anti-β2GPI IgG/IgM sono stati determinati, seguendo le raccomandazioni del produttore, con il metodo FEIA usando kit (EliA™) donati gentilmente dalla Phadia AB, (Uppsala, Sweden). I calibratori, i sieri dei pazienti e dei controlli sono stati testati in doppio. Il coefficiente di variabilità sia inter che intra test è stato calcolato < 10% per tutti i test; in particolare i coefficienti di variabilità intra test per gli aCL e gli anti-β2GPI IgG/IgM variavano da 8,2 a 9,4% e da 5,3 a 7,7% rispettivamente, mentre quelli inter test variavano da 1,4 a 3,2% e da 2,5 a 5,7% rispettivamente. I valori di cut-off per i livelli medio-alti sono stati calcolati > 99° percentile usando i sieri dei 120 donatori sani di sangue applicando la seguente formula: “ $I_{99}=(120 \text{ data} + 1) \times 99/100$ ”. I cut-off locali e quelli del produttore sono riportati in Tabella 1. In accordo con le ultime linee guida [65] abbiamo scelto di calcolare i risultati (specificità, sensibilità e kappa di Cohen) usando i cut-off locali anche se non è risultata alcuna differenza significativa per sensibilità e specificità usando entrambi i cut-off.

Tabella 1: Metodo FEIA: risultati ottenuti usando i cut-off locali e del produttore.

	Cut-off locali			Cut-off del produttore		
	Cut-off 99‰	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Cut-off	Sensibilità (%)	Specificità (%)
aCL IgG	7.8	51.1	96.4	40	37.2	99.4
aCL IgM	24	18.1	98.2	40	11.7	100
aβ2 GPI IgG	2.1	61.7	91.5	10	54.3	99.4
aβ2 GPI IgM	2.9	40.4	93.9	10	29.8	100

ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; FEIA, Fluorescence enzyme immunoassay; aCL, anticardiolipina; anti-β2GPI, anti-β2 Glicoproteina I.

Analisi statistica

Sia la sensibilità e la specificità clinica della metodica ELISA home made e del FEIA così come la prevalenza anticorpale nei pazienti ELISA negativi nei confronti del gruppo di controllo sono state confrontate con il test del chi-quadro. E' importante specificare che la sensibilità e la specificità clinica sono state calcolate considerando i pazienti affetti da PAPS come “ clinicamente positivi ” e il gruppo di controllo (donatori sani e pazienti autoimmuni) come “ clinicamente negativi ”. In particolare, la sensibilità clinica è stata calcolata nei pazienti

PAPS secondo la seguente formula: veri positivi/(veri positivi + falsi negativi), mentre, la specificità clinica è stata calcolata nei controlli, secondo la formula: veri negativi/(veri negativi + falsi positivi). La concordanza dei dati ottenuti con l'ELISA e il FEIA è stata calcolata con la Kappa di Cohen [127], mentre la correlazione dei titoli anticorpali attraverso la Rho di Spearman. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato come statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata effettuata attraverso il software SPSS versione 19.

RISULTATI

Confronto tra ELISA e FEIA nei pazienti PAPS

I risultati ottenuti in questo studio, riguardo la determinazione dei LA, degli aCL e anti- β 2GPI (ELISA) hanno confermato la precedente diagnosi di laboratorio, pertanto tutti i 94 pazienti affetti da PAPS sono stati inclusi nel lavoro.

I dati ottenuti con le metodiche FEIA ed ELISA sono mostrati nella Tabella 2. Le sensibilità dell'ELISA e del FEIA per gli aCL e anti- β 2GPI di classe IgG/IgM non hanno mostrato alcuna differenza significativa. Tuttavia, la prevalenza degli aCL IgM è risultata essere significativamente più alta usando il metodo ELISA ($p=0,02$). Le specificità, misurate nel gruppo di controllo, non sono risultate significativamente differenti con entrambe le tecniche. Come mostrato nella Tabella 2, c'era una concordanza significativa per tutti i risultati ottenuti con le due metodiche, e la kappa di Cohen variava tra 0,44 e 0,79. Nel gruppo PAPS la correlazione dei titoli anticorpali, ottenuti dalle due tecniche, era significativa e la Rho di Spearman andava da 0,60 a 0,89 (Tabella 2 e Figura 10). Considerando il gruppo di controllo, la correlazione dei titoli era significativa solo per gli aCL IgG/IgM ($p<0,001$ per entrambi gli isotipi) (Tabella 2). Abbiamo inoltre valutato la performance clinica delle metodiche ELISA e FEIA andando a calcolare le prevalenze degli aPL nei pazienti PAPS con trombosi e in quelli con complicanze ostetriche (Tabella 3).

Tabella 2: Sensibilità, specificità, Kappa di Cohen e Rho di Spearman per singolo anticorpo aCL e anti-β2GPI usando le tecniche ELISA e FEIA

	aCL IgG		aCL IgM		anti-β2GPI IgG		anti-β2GPI IgM	
	FEIA	ELISA	FEIA	ELISA	FEIA	ELISA	FEIA	ELISA
Sensibilità (%)	51.1	57.4	18.1 ^a	33.0 ^a	61.7	67	40.4	45.7
Specificità (%)	96.4	96.4	98.2	96.4	91.5	95.8	93.9	95.2
Kappa di Cohen	0.75 ^b		0.44 ^b		0.79 ^b		0.66 ^b	
Rho di Spearman (gruppoPAPS)	0.79 ^b		0.60 ^b		0.89 ^b		0.82 ^b	
Rho di Spearman (gruppo di controllo)	0.27 ^b		0.31 ^b		n.s.		n.s.	

ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; FEIA, Fluorescence enzyme immunoassay

aCL, anticorpi anticardiolipin ; anti-β2GPI, anticorpi anti-β2 Glycoproteina I

^a p-value=0.02.

^b p-value<0.001.

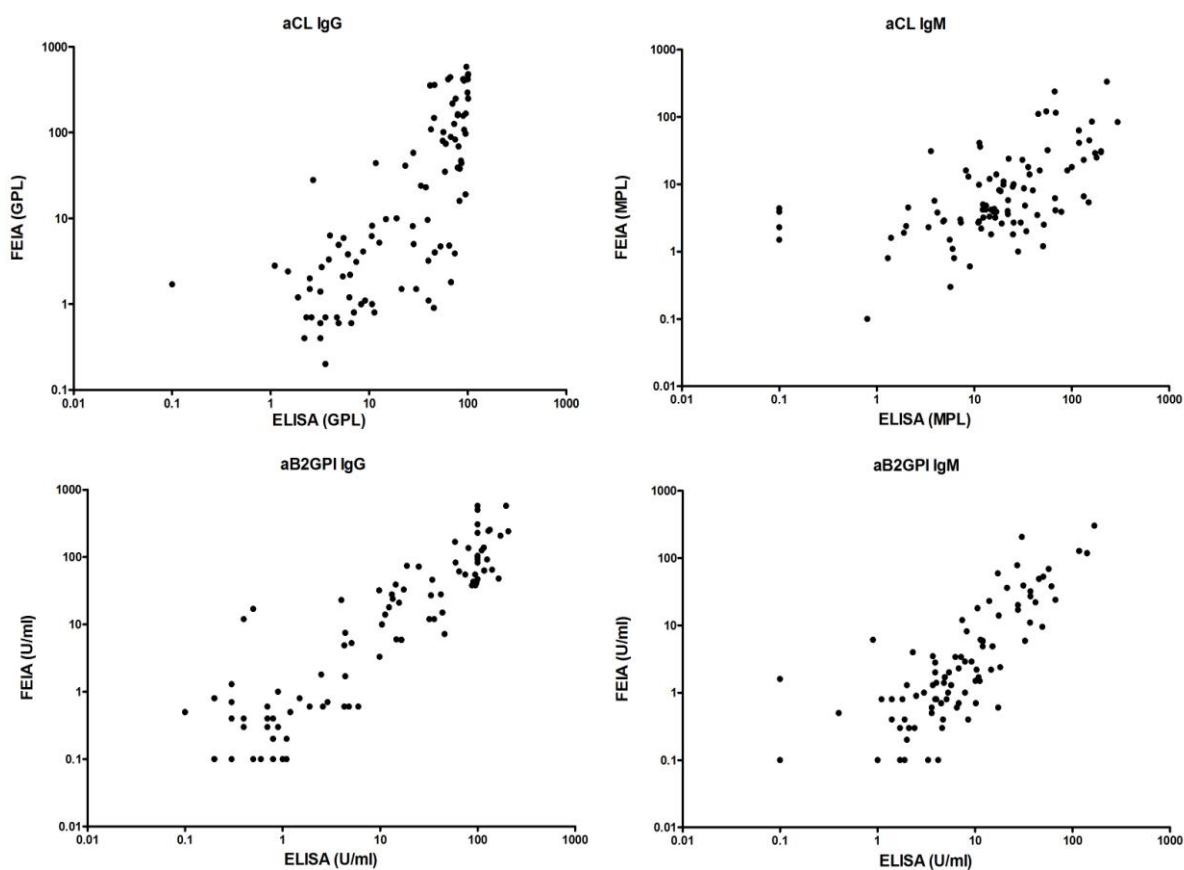
Tabella 3: Confronto fra le prevalenze degli aPL nei pazienti affetti da PAPS con trombosi e con impegno ostetrico usando il metodo ELISA e quello FEIA.

	Trombosi		Impegno ostetrico		p-value
	N°	%	N°	%	
ELISA					
aCL IgG	43	76.8	11	28.9	<0.001
aCL IgM	19	33.9	12	31.6	n.s.
anti-β2 GPI IgG	44	78.6	19	50	0.007
anti-β2 GPI IgM	26	46.4	17	44.7	n.s.
FEIA					
aCL IgG	39	69.6	9	23.7	<0.001
aCL IgM	11	19.6	6	15.8	n.s.
anti-β2 GPI IgG	44	78.6	14	36.8	<0.001
anti-β2 GPI IgM	23	41.1	15	39.5	n.s.

ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; FEIA, Fluorescence enzyme Immunoassay;

aCL, anticorpi anticardiolipin; anti-β2GPI, anticorpi anti-β2 Glycoproteina I .

Figura 10: Rappresentazione grafica dei titoli anticorpali rilevati con la tecnica ELISA e con il FEIA



Il FEIA nei pazienti ELISA negativi

La tecnica FEIA ha individuato due positività per aCL IgG nei pazienti ELISA negativi e due nei controlli (3,1% vs 1,3%), per aCL IgM una positività nei pazienti e tre nei controlli (1,5% vs 2,0%), per anti- β 2GPI IgG 4 nei pazienti e 10 nei controlli (6,2% vs 6,8%) e per anti- β 2GPI IgM 4 nei pazienti e 6 nei controlli (6,2% vs 4,1%). La prevalenza di questi anticorpi non era statisticamente differente rispetto a quella trovata nei controlli; non era statisticamente differente nemmeno la prevalenza nei pazienti con trombosi e in quelli con impegno ostetrico.

DISCUSSIONE

Questo studio rappresenta un contributo alla determinazione degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI attraverso il confronto di un ELISA home made con il FEIA. La metodica ELISA è correntemente il test più diffuso per la determinazione degli aPL, ma, se le nuove tecnologie,

in particolare le piattaforme automatizzate, seguissero le ultime raccomandazioni della SSC [65], potrebbero essere altrettanto performanti. Lo studio è stato svolto in una larga e omogenea coorte di pazienti affetti esclusivamente da APS senza alcun segno o sintomo di altra malattia autoimmune. Inoltre, per la prima volta, è stato valutato con il FEIA un gruppo selezionato di ELISA negativi, vale a dire pazienti con le tipiche manifestazioni cliniche di APS ma negativi per i criteri di laboratorio. Poiché la tecnica ELISA è il test più comunemente usato per la rilevazione degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI [65], abbiamo impiegato questa tecnica nei pazienti con caratteristiche cliniche di PAPS per la diagnosi di laboratorio. Pertanto, nel presente studio abbiamo confrontato la sensibilità e la specificità di ciascun aPL rilevato dall'ELISA con la sensibilità e specificità di ciascun aPL rilevato dal FEIA nei pazienti con PAPS. La sensibilità è stata calcolata nel gruppo di pazienti affetti da PAPS mentre la specificità nel gruppo di controllo. Sicuramente, esiste un bias di selezione a favore dell'ELISA home-made, dal momento che la tecnica ELISA è stata considerata come il test di riferimento per stabilire la diagnosi di laboratorio di PAPS.

Le sensibilità dell'ELISA e del FEIA nel rilevare gli anticorpi aCL e anti- β 2GPI IgG / IgM non erano significativamente differenti. Mentre la prevalenza degli aCL IgM nei pazienti PAPS è risultata significativa solo con la tecnica ELISA, tuttavia, l'importanza di questo risultato può essere discutibile in quanto la percentuale di aCL IgM era comunque bassa e il significato clinico di tale anticorpo è attualmente oggetto di dibattito [128].

Le specificità dei due metodi per l'aPL considerato non erano significativamente differenti. C'era, inoltre, un alto livello di concordanza tra i risultati ottenuti con l'ELISA e il FEIA e una correlazione significativa tra i titoli medi di aCL IgG / IgM sia nel gruppo dei pazienti PAPS che nel gruppo di controllo, mentre la correlazione tra i livelli anticorpali degli anti- β 2GPI IgG / IgM è risultato significativo solo nel gruppo PAPS. Questi risultati sono in accordo con quelli di Forastiero et al. [50], anche se la popolazione di studio comprendeva solo pochi pazienti affetti da APS uniti ai solo portatori di aPL. La concordanza dei risultati ottenuti con

l'ELISA e con il FEIA in pazienti con APS è in linea con quella trovata da Villalta et al. [53]. La concordanza dei risultati in ELISA e quelli in FEIA è stata confermata anche dai risultati ottenuti dall'analisi dei pazienti ELISA negativi dove la prevalenza degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI IgG / IgM, ottenuti con il metodo FEIA, non è risultata significativa. Tuttavia, è stato introdotto un bias di selezione, poiché i pazienti aPL negativi sono stati stabiliti secondo il solo metodo ELISA, che è il test più comunemente usato per la rilevazione degli aPL. Così, una frequenza degli anticorpi anti- β 2GPI IgG / IgM maggiore del 5% potrebbe avere un interesse clinico nell'identificare potenziali pazienti PAPS.

Quando è stata valutata la performance clinica, una prevalenza significativamente più alta di anticorpi aCL IgG e anti- β 2GPI IgG è stata trovata nel subset trombotico piuttosto che in quello ostetrico, utilizzando sia l'ELISA che il FEIA, rivelando così sia l'utilità clinica di entrambi i test che un ulteriore punto di concordanza tra la tecnica ELISA e quella FEIA. Questi risultati suggeriscono che la performance del metodo FEIA era paragonabile a quella del metodo ELISA home made. Utilizzando il metodo FEIA i valori di cut-off > 99° percentile e quelli suggeriti dal produttore erano molto diversi. Tuttavia, non vi era alcuna differenza significativa nella sensibilità e specificità confrontando i risultati ottenuti con entrambi i cut-off. Anche i coefficienti di variabilità intra e inter test erano simili e <10% per entrambe le tecniche. Il FEIA, come gli altri sistemi completamente automatizzati, può essere considerato come un test utile per i laboratori con un gran numero di campioni da analizzare. Inoltre, riduce l'impegno dell'operatore, gli errori di pipettamento e le differenze di protocolli. In conclusione, se confermati da studi su larga scala su pazienti PAPS, questi risultati potrebbero supportare l'uso routinario del FEIA nel rilevamento degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI.

**LA PERFORMANCE CLINICA DI UN *CHEMILUMINESCENT*
IMMUNOASSAY NELLA DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI
ANTICARDIOLIPINA E ANTI- β 2 GLICOPROTEINA I. CONFRONTO
CON UN ELISA HOME MADE. (Clin Chem Lab Med, 2015)**

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Sono stati reclutati 104 pazienti affetti da PAPS (89 femmine e 15 maschi, età media $45,0 \pm 11,3$ anni, range 20-71) conformi ai criteri di classificazione di APS del “*International Consensus Statement*” [2] Nessuno dei pazienti ha mostrato caratteristiche cliniche o di laboratorio di altre malattie autoimmuni sistemiche. Trentasei di questi avevano storie di complicanze ostetriche isolate (uno o più morti fetali in corrispondenza o dopo la 10^o settimana di gestazione e / o uno o più nascite premature prima della 34a settimana a causa di una grave preeclampsia / eclampsia o chiari sintomi di insufficienza placentare, e / o tre o più aborti consecutivi di origine sconosciuta prima della 10a settimana di gestazione). Sessantotto avevano una storia di trombosi (venosa, arteriosa o del microcircolo); 19 di questi (27,9%) anche con complicanze ostetriche. Inoltre sono stati reclutati 88 pazienti sieronegativi (81 femmine e 7 maschi, età media di $39,3 \pm 8,5$ anni, range 19-70), i quali presentavano i criteri clinici, ma non quelli di laboratorio per la classificazione di APS . Cinquantatré di questi con storia di complicanze ostetriche e 35 con storia di trombosi. Il gruppo di controllo era composto da 150 soggetti: 100 di questi erano donatori sani di sangue simili per età e sesso al gruppo di studio e 50 (45 femmine e 5 maschi, età $46,0 \pm 14,9$ anni significa, range 15-76) erano pazienti affetti da varie malattie reumatologiche (11 lupus eritematoso sistemico, 10 sindrome di Sjögren, 7 Polimiositi, 10 sclerodermie, 6 artrite reumatoide e 6 spondiloartriti). Sono stati inclusi nella popolazione di controllo questi pazienti con varie patologie immunitarie poichè gli aPL possono essere presenti come un epifenomeno. Lo studio è stato

condotto in conformità con i principi etici delineati nella Dichiarazione di Helsinki e il consenso informato è stato dato a tutti i partecipanti.

Il metodo CLIA

Per la determinazione degli anticorpi aCL e anti- β 2GPI di classe IgG / IgM è stato utilizzato un test immunologico basato sulla chemiluminescenza completamente automatizzato (HemosIL AcuStar®, Instrumentation Laboratory, IL, Bedford, MA, USA). Tutte le istruzioni del produttore sono state scrupolosamente seguite. Il kit HemosIL AcuStar è un test immunologico a due fasi che utilizza particelle magnetiche come fase solida. Durante la prima fase, gli anticorpi aPL se presenti nel siero vengono catturati dalle particelle paramagnetiche rivestite con cardiolipina complessata con β 2GPI umana (per il test aCL) o β 2GPI umana. Dopo incubazione, separazione magnetica e di lavaggio viene aggiunto un tracciante costituito da un anticorpo anti IgG/IgM umano marcato con isoluminolo che si lega agli anticorpi aCL/anti- β 2GPI catturati dalle particelle magnetiche. Dopo una seconda fase di incubazione, separazione magnetica e lavaggio, sono aggiunti un reagente catalizzatore e H₂O₂ (reagenti trigger) che avviano la reazione di luminescenza (Figure 11 e 12)

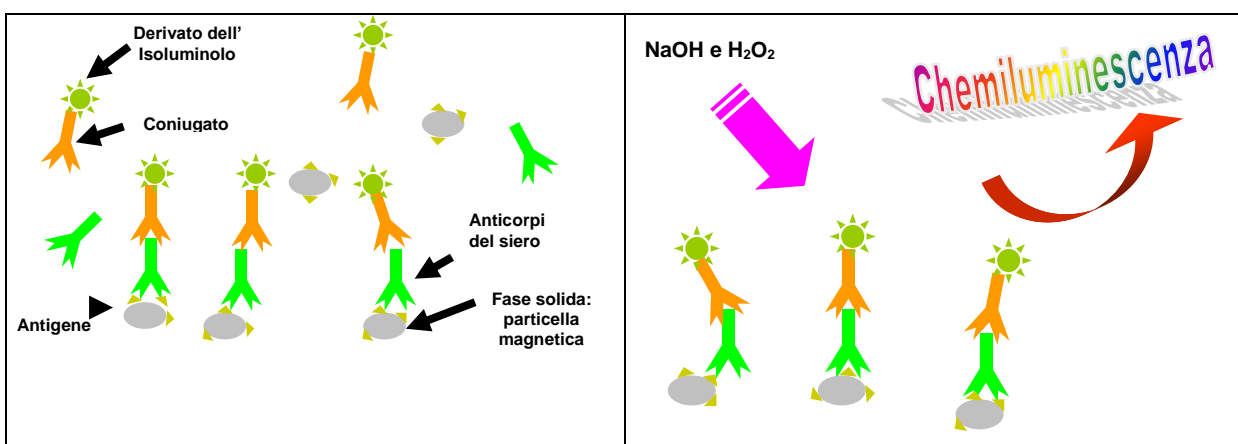


Figura 11: Chemiluminescenza prima fase

Figura 12: Chemiluminescenza seconda fase

La concentrazione di aCL e/o anti- β 2GPI IgG/IgM è direttamente proporzionale alla emissione di luce (RLUs - relative light units) ed è calcolata dallo strumento "ACL Acustar" (Figura 13) e convertita in U/ml in base ad una curva di calibrazione lotto dipendente, ottenuta usando un pool di campioni positivi calibrati sugli anticorpi monoclonali di Koike (HCAL per le IgG and EY2C9 per le IgM aPL) [126].



Figura 13: Strumento "ACL Acustar"

Il coefficiente di variazione intra e inter-assay era $<10\%$. I valori di cut-off per aCL IgG / IgM e anti- β 2GPI IgG / IgM sono stati calcolati come $> 99^{\circ}$ percentile utilizzando i sieri dei 100 donatori di sangue sani. I valori di cut-off per gli anticorpi aCL IgG / IgM erano 16,2 (95% intervallo di confidenza (CI) 15,6-16,9) e 23,6 U / ml (95% CI 22,5-24,6), rispettivamente, e quelli per anti- β 2GPI IgG / IgM erano 35,3 (95% CI 33,8-36,9) e 14,3 U / ml (95% CI 13,7-14,9), rispettivamente.

Il metodo ELISA home made

La metodica ELISA home made, utilizzato per rilevare gli anticorpi aCL IgG / IgM e anti- β 2GPI IgG / IgM , è stata messa a punto seguendo le raccomandazioni del "European Forum on aPL" [38, 47], come descritti precedentemente. I valori di cut-off per i livelli medio-alti di aCL IgG / IgM (calcolati come $>$ il 99° percentile del siero di 100 donatori di sangue sani partecipanti allo studio) erano 22,2 GPL (95% CI 21,5-22,9) e 22,9 MPL (95% CI 21,9-24,0),

rispettivamente, e di anti-β2GPI IgG / IgM erano 1,9 U / ml (95% CI 1,8-2,0) e 5,7 U / ml (95% CI 5,4-6,0), rispettivamente.

Determinazione del LA

Il LA è stato determinato, seguendo le linee guida aggiornate [124] come descritto precedentemente.

Analisi statistica

Il test del chi-quadro è stato eseguito per confrontare: la sensibilità e la specificità dell'ELISA home made e del CLIA e la prevalenza degli anticorpi nei soggetti sieronegativi e nel gruppo di controllo. E' stato calcolato il coefficiente Kappa di Cohen per valutare la concordanza delle due tecniche [127]. Il coefficiente di correlazione di Spearman è stato usato per correlare i livelli anticorpali determinati con i due metodi. Un p-value di $\leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando la versione software SPSS 19.0.

RISULTATI

Confronto tra i risultati dell'ELISA e del CLIA

La popolazione in studio è stato classificata in accordo con i risultati dell' ELISA home made; gli stessi campioni di siero sono stati poi testati per gli anticorpi aCL IgG / IgM e anti-β2GPI IgG / IgM utilizzando il CLIA. Il confronto dei due metodi è stato eseguito tra i pazienti PAPS e il gruppo di controllo. I risultati ottenuti mediante l'ELISA e il CLIA sono riportati in Tabella 4. La sensibilità dell'ELISA è risultata essere significativamente superiore rispetto a quella del CLIA per aCL IgM ($p < 0,001$), anti-β2GPI IgG ($p = 0,01$), e anti-β2GPI ($p < 0,001$). IgM, come mostrato in Tabella 5. Sono state trovate delle differenze significative tra i due metodi per quanto riguarda la specificità che è risultata essere più alta per aCL IgM e anti-

β 2GPI IgM ($p = 0,03$ e $p = 0,002$, rispettivamente) determinati con il metodo CLIA (Tabella 5). La concordanza tra le due tecniche è stata valutata nel gruppo di pazienti PAPS e in quello di controllo confrontando ciascun risultato ottenuto in ELISA con quello corrispondente in CLIA (Tabella 5). La kappa di Cohen variava tra 0,53 e 0,83, rivelando una concordanza significativa tra le due tecniche ($p < 0,001$ per tutti gli aPL). Inoltre, è stata calcolata nei pazienti PAPS la correlazione tra titoli anticorpali rilevati dall'ELISA e quelli rilevati dal CLIA (Tabella 5 e Figura 14). Il coefficiente rho di Spearman varia tra 0,78 e 0,89, mostrando una correlazione significativa tra i risultati del test ($p < 0,001$). Sono stati considerati separatamente i pazienti PAPS con trombosi e quelli con impegno ostetrico. I risultati ottenuti utilizzando entrambe le metodiche sono descritti e confrontati nella Tabella 6.

CLIA nei sieronegativi

Come indicato nella Tabella 4, gli anticorpi aCL IgG / IgM e anti- β 2GPI IgG / IgM sono stati determinati con il CLIA nei pazienti ELISA negativi. I risultati ottenuti negli 88 pazienti ELISA negativi sono stati confrontati con quelli ottenuti nei 124 controlli ELISA negativi. Quando la sensibilità del CLIA è stata valutata nei pazienti ELISA negativi con tipiche manifestazioni cliniche di APS, gli anticorpi aCL IgG e anti- β 2GPI IgG mostravano una prevalenza significativamente superiore rispetto a quella trovata nei controlli (Figura 15). La prevalenza degli anticorpi aCL IgG / IgM e anti- β 2GPI IgG / IgM nei pazienti sieronegativi divisi per subsets clinici (trombosi e complicanze ostetriche) non ha mostrato alcuna differenza significativa.

Tabella 4: Risultati ottenuti da controlli, pazienti PAPS e sieronegativi usando sia il metodo ELISA che quello CLIA

		Controlli		PAPS		pazienti sieronegativi	
		n.	%	n.	%	n.	%
ELISA							
aCL IgG	Neg	145	96.7	39	37.5	88	100.0
	Pos	5	3.3	65	62.5	0	0
aCL IgM	Neg	141	94.0	52	50.0	88	100.0
	Pos	9	6.0	52	50.0	0	0
anti-β2GPI IgG	Neg	141	94.0	30	28.8	88	100.0
	Pos	9	6.0	74	71.2	0	0
anti-β2GPI IgM	Neg	136	90.7	52	50.0	88	100.0
	Pos	14	9.3	52	50.0	0	0
CLIA							
aCL IgG	Neg	145	96.7	44	42.3	76	86.4
	Pos	5	3.3	60	57.7	12	13.6
aCL IgM	Neg	147	98.0	74	71.2	87	98.9
	Pos	3	2.0	30	28.8	1	1.1
anti-β2GPI IgG	Neg	145	96.7	44	42.3	83	94.3
	Pos	5	3.3	60	57.7	5	5.7
anti-β2GPI IgM	Neg	148	98.7	74	71.2	88	100.0
	Pos	2	1.3	30	28.8	0	0.0

PAPS, primary antiphospholipid syndrome; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; CLIA, Chemiluminescence immunoassay; aCL, anticardiolipina; anti-β2GPI, anti-β2 Glicoproteina I

Tabella 5: Parametri del confronto analitico tra ELISA e CLIA

	aCL IgG		aCL IgM		anti-β2GPI IgG		anti-β2GPI IgM	
	ELISA	CLIA	ELISA	CLIA	ELISA	CLIA	ELISA	CLIA
Sensibilità(%)	62.5	57.7	50.0 ^a	28.8 ^a	71.2 ^b	57.7 ^b	50.0 ^a	28.8 ^a
Specificità (%)	96.7	96.7	94.0 ^c	98.0 ^c	94.0	96.7	90.7 ^d	98.7 ^d
kappa	0.83 ^a		0.59 ^a		0.79 ^a		0.53 ^a	
Rho di Spearman's	0.87 ^a		0.80 ^a		0.89 ^a		0.78 ^a	

ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; CLIA, Chemiluminescence Assay; aCL, anticorpi anti-cardiolipina; anti-β2GPI, anticorpi anti-β2 Glicoproteina I; ^a p-value<0.001; ^b p-value=0.01;

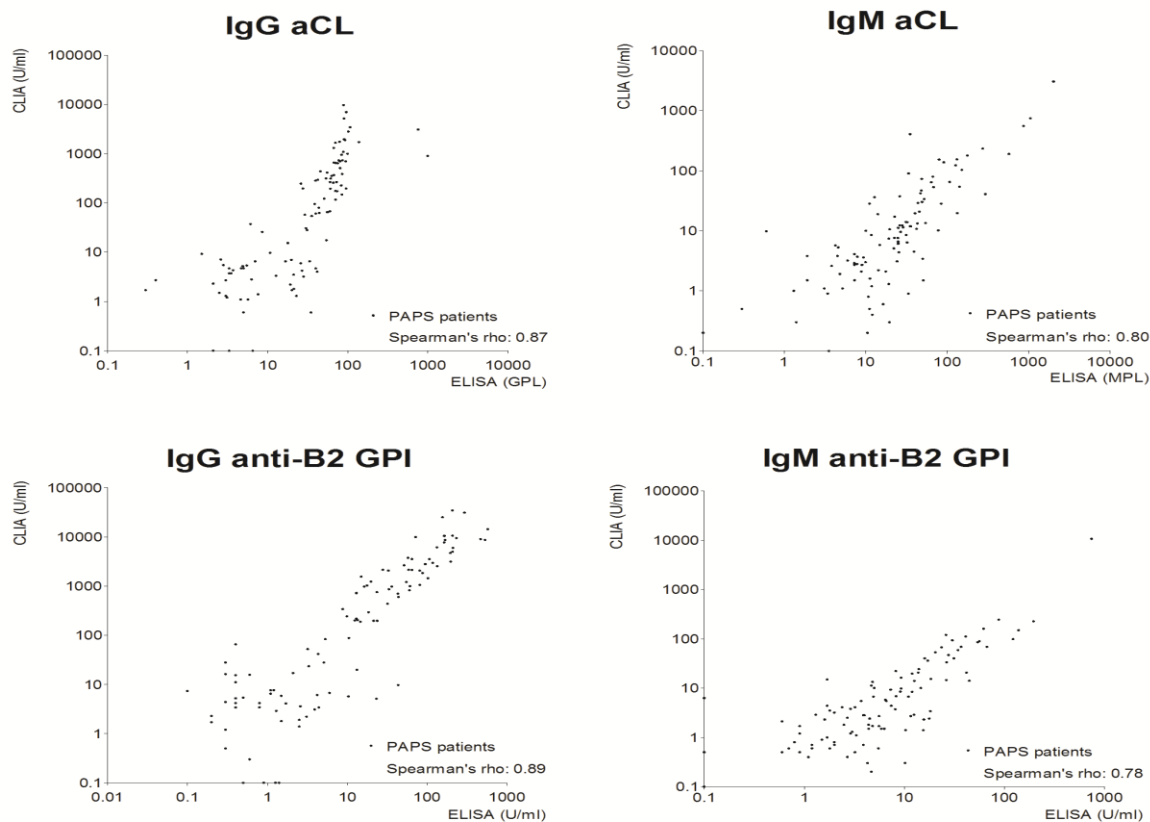
^c p-value=0.03; ^d p-value=0.002.

Tabella 6: Risultati dai pazienti PAPS con trombosi e complicanze ostetriche usando ELISA e CLIA

	Trombosi		Complicanze ostetriche		p-value
	n.	%	n.	%	
ELISA					
aCL IgG	53	77.9	12	33.3	<0.001
aCL IgM	33	48.5	19	52.8	0.837
anti-β2 GPI IgG	59	86.8	15	41.7	<0.001
anti-β2 GPI IgM	33	48.5	19	52.8	0.837
CLIA					
aCL IgG	53	77.9	7	19.4	<0.001
aCL IgM	23	33.8	7	19.4	0.172
anti-β2 GPI IgG	53	77.9	7	19.4	<0.001
anti-β2 GPI IgM	23	33.8	7	19.4	0.172

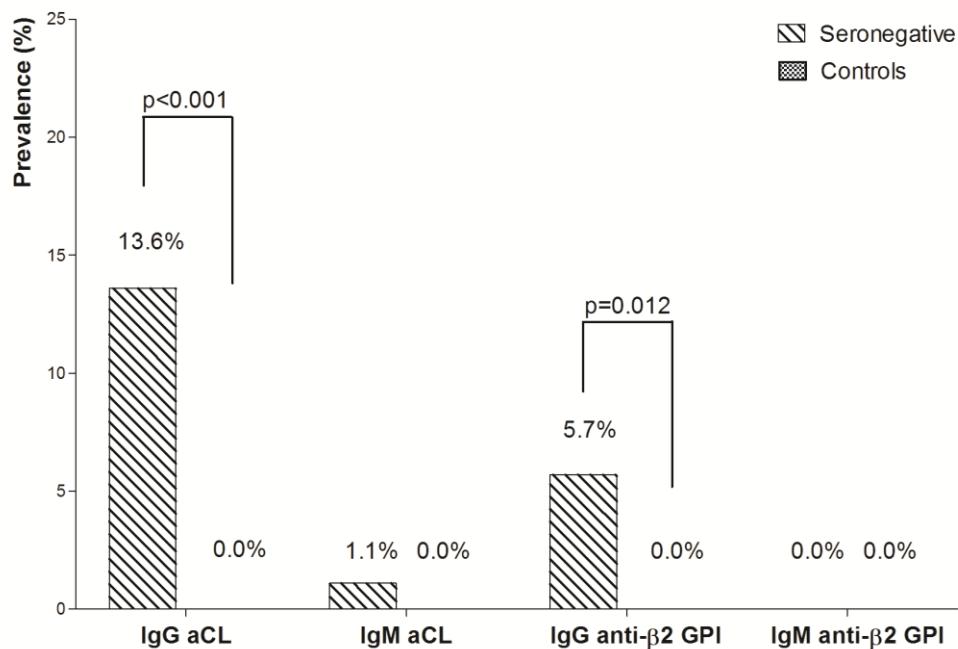
ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; CLIA, Chemiluminescence Assay; aCL, anticardiolipina; anti-β2GPI, anti-β2 Glicoproteina I

Figura 14: Rappresentazione grafica dei titoli anticorpali rilevati dall'ELISA e dal CLIA.



ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; CLIA: Chemiluminescence Assay; aCL: anticardiolipina; anti-β2GPI: anti-β2 Glicoproteina I

Figura 15. La prevalenza degli anticorpi aCL IgG / IgM e anti-β2GPI IgG / IgM rilevata dal CLIA nei pazienti ELISA negativi.



ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; CLIA, Chemiluminescence Assay; aCL, anticardiolipina; anti-β2GPI, anti-β2 Glicoproteina I.

DISCUSSIONE

Il CLIA è una tecnica completamente automatizzata, che impiega circa 30 minuti per completare un test, consente di risparmiare tempo e riduce l'intervento dell'operatore. Inoltre l'automazione può anche ridurre la variabilità intra e inter-laboratorio e migliorare la riproducibilità dei risultati [54]. Da quando il CLIA è diventato disponibile, alcuni studi hanno confrontato questa nuova tecnologia con la metodica ELISA, che è il test più comunemente utilizzato per la determinazione degli anticorpi aCL e anti-β2GPI [50, 58-61, 63, 64]. Questi studi sono stati svolti utilizzando diversi strumenti che usano il CLIA e varie tecniche ELISA (metodi home made e diversi kit commerciali). Di conseguenza, sono stati riportati risultati differenti. Uno studio recentemente pubblicato si focalizza sull'affinamento dei valori di cut-off per gli anticorpi aCL e anti-β2GPI IgG / IgM ottenuti con lo stesso strumento utilizzato in

questo studio. Il cut-off calcolato sui 626 individui sani erano, inoltre, simili ai nostri per tutti gli aPL testati, tranne per gli anticorpi IgG anti- β 2GPI che era inferiore (17,4 vs 35,3 Uml UML) [129]. Questo studio ha confrontato le performance dell'HemosIL AcuStar® CLIA con quella di un ELISA home made messa a punto seguendo le raccomandazioni internazionali [38, 47]. La popolazione dello studio comprendeva un'ampia coorte di pazienti PAPS selezionati in modo da escludere gli effetti di altre malattie autoimmuni sottostanti generalmente associate a APS. I risultati dello studio hanno mostrato che il CLIA aveva una sensibilità significativamente più bassa per aCL IgM e anti- β 2GPI IgG / IgM, ma una specificità significativamente più alta per aCL IgM e anti- β 2GPI IgM rispetto all' ELISA home made. Mentre i nostri risultati concordano con quelli ottenuti da altri studi che hanno utilizzato lo stesso strumento CLIA [60, 64], non concordano con quelli descritti da De Moerloose et al. [58] i quali hanno trovato che il HemosIL AcuStar® CLIA aveva una sensibilità superiore rispetto ad alcuni kit ELISA.

Questo studio, tuttavia, non fa un confronto statistico. In accordo con altri autori [58, 60, 63, 64], la nostra indagine ha dimostrato una concordanza significativa e correlazione dei titoli anticorpali tra i due metodi. In particolare, i valori dei coefficienti kappa e rho di Spearman per gli anticorpi aCL IgG e anti- β 2GPI IgG sono risultati superiori a quelli degli stessi anticorpi di isotipo "M" (Tabella 5).

La concordanza tra i due metodi è superiore per gli anticorpi di isotipo IgG, che è considerato, infatti, più clinicamente rilevante per APS [128, 130].

La novità di questo studio è la significativa prevalenza degli anticorpi aCL IgG e anti- β 2GPI IgG insieme con la determinazione degli anticorpi aCL IgM nei pazienti ELISA-negativi con le tipiche manifestazioni cliniche di APS. Questi risultati sembrerebbero conferire un significato clinico al rilevamento degli aPL con HemosIL AcuStar CLIA. Sarebbe, infatti, possibile classificare 17 degli 88 soggetti sieronegativi come pazienti APS e trattarli di conseguenza. Poiché l'HemosIL AcuStar CLIA ha mostrato un'alta specificità per l'APS,

potremmo supporre che questi risultati abbiano un vero valore clinico. Tecnicamente, la conformazione del sito di legame antigene-anticorpo nel CLIA è diverso da quello nell'ELISA; nel primo caso, ci sono microsfere paramagnetiche, mentre in quest'ultima, vi è la superficie piatta dei micropozzetti. Si può ipotizzare che gli antigeni coattati espongono epitopi diversi per il legame con gli anticorpi aPL e l'HemosIL AcuStar CLIA è in grado di rilevare alcuni anticorpi aCL e anti- β 2GPI non individuati dalla tecnica ELISA. Quando i risultati ottenuti dai pazienti PAPS con trombosi sono stati confrontati con quelli delle donne con complicanze ostetriche, è stata trovata una prevalenza significativamente più alta degli anticorpi aCL IgG e anti- β 2GPI IgG sia usando il metodo ELISA che quello CLIA. Nessuna significativa prevalenza anticorpale è stata invece trovata nei pazienti trombotici sieronegativi, probabilmente a causa del basso numero di casi esaminati. Numerosi soggetti con fattori di rischio acquisiti o congeniti per trombosi sono stati, infatti, esclusi durante il processo di reclutamento.

In conclusione, nonostante una sensibilità inferiore, il metodo HemosIL AcuStar CLIA ha mostrato una specificità più alta e un buon livello di concordanza e correlazione dei titoli medi con il metodo ELISA home-made. Sorprendentemente, gli anticorpi aCL IgG e anti- β 2GPI IgG rilevati attraverso questo metodo completamente automatizzato sono risultati essere significativi nei pazienti sieronegativi con tipiche manifestazioni cliniche di APS. Se i dati saranno confermati da ulteriori studi, il CLIA potrebbe essere considerato un valido metodo per valutare i pazienti con manifestazioni cliniche di APS, ma negativi ai test per aPL convenzionali utilizzando un ELISA home-made.

LA POSITIVITA' DEGLI ANTICORPI ANTICARDIOLIPINA E ANTI- β 2 GLICOPROTEINA I DI CLASSE IGA, DETERMINATI CON IL *FLUORESCENCE ENZYME IMMUNOASSAY*, NELLA SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI PRIMARIA.

(Clin Chem Lab Med, 2014)

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

I campioni di sangue sono stati prelevati da 84 pazienti affetti da PAPS (75 femmine e 9 maschi; età media: $44 \pm 11,7$ anni, range 18-79), conformi ai requisiti suggeriti da *International Consensus Statement* per la classificazione di APS [2]. Trenta di questi pazienti avevano solo impegno ostetrico (uno o più morti fetali verificatesi in corrispondenza o dopo la 10a settimana di gestazione e / o uno o più nascite premature che si verificano prima della 34a settimana a causa di grave preeclampsia / eclampsia o chiari sintomi di insufficienza placentare, e / o tre o più aborti di origine sconosciuta che si verificano prima della 10a settimana di gestazione). Cinquantaquattro, invece, avevano una storia di trombosi (venose, arteriose o del microcircolo), in alcuni casi associata all'impegno ostetrico. Trentasei degli 84 pazienti prendevano anticoagulanti orali (OA); 18 farmaci anti-piastrinici; otto entrambe le terapie; cinque aspirina a basse dosi più eparina a basso peso molecolare (EBPM) e 17 non seguivano nessuna terapia. Nella popolazione di studio c'erano 25 singole positività, 21 duplici e 38 triplici; per singola positività aPL si intende la presenza nel siero del paziente del LA o degli anticorpi aCL IgG / IgM o anti- β 2GPI IgG / IgM; per duplice positività la presenza contemporanea di aCL IgG / IgM e anti- β 2GPI IgG / IgM o aCL IgG / IgM e LA o anti- β 2GPI IgG / IgM e LA, la triplice positività prevede la presenza contemporanea di tutti gli aPL. I campioni di sangue sono stati raccolti anche da 66 pazienti sieronegativi (57 femmine e 9 maschi; età media $40 \pm 8,8$ anni, range 18-58 anni), che rispondevano ai criteri

clinici di APS ma non a quelli di laboratorio. Trentaquattro di questi avevano una storia di trombosi (25 di trombosi venosa e 9 arteriosa) e 32 storia di complicanze ostetriche (14 casi di morte fetale, 2 di parto prematuro e 16 di aborti precoci). Tutti questi pazienti sono risultati negativi per la trombofilia congenita (fattore V Leiden, variante G20210A della protrombina, antitrombina, carenze di proteina C e proteina S e l'aumento della resistenza della proteina C attiva). Tra i pazienti trombotici 14 prendevano OA, otto farmaci anti-piastrinici, due EBPM e 10 non assumevano niente. Le pazienti con complicanze ostetriche non erano sottoposte a nessuna terapia. A scopo di confronto sono stati valutati 78 donatori di sangue sani omogenei per età e sesso ai pazienti. Lo studio è stato condotto in conformità con i principi etici delineati nella Dichiarazione di Helsinki e tutti i partecipanti hanno dato il consenso informato.

Test di laboratorio

Gli anticorpi aCL IgA / IgG / IgM e anti- β 2GPI IgA / IgG / IgM sono stati determinati con il *fluorescence enzyme immunoassay* (FEIA) utilizzando kit EliA™ gentilmente fornite da Phadia AB (Uppsala, Svezia). Le raccomandazioni del produttore sono state seguite scrupolosamente.

I valori di cut-off per i livelli medio-alti sono stati calcolati come > 99 ° percentile utilizzando siero di 78 donatori di sangue sani. Il LA è stato determinato seguendo le linee guida aggiornate [124] come test di screening si utilizza il tempo di veleno di vipera Russell diluito ed il tempo di protrombina parziale diluita secondo le metodiche già descritte precedentemente.

Analisi statistica

Il test χ^2 e il test esatto di Fisher sono stati effettuati per confrontare i valori nei vari gruppi. I livelli anticorpali medi degli aCL IgA e anti- β 2GPI IgA sono stati valutati usando i test di

Mann-Whitney e Kruskal Wallis. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando SPSS versione 19.

RISULTATI

Gli anticorpi aCL IgA e anti- β 2GPI IgA nel gruppo di pazienti PAPS

La prevalenza delle caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti e dei controlli è descritta nella Tabella 7. Gli anticorpi aCL IgA sono stati identificati in 16 pazienti affetti da PAPS (19%) e gli anti- β 2GPI IgA in 42 (50%); la prevalenza di entrambi gli anticorpi è risultata statisticamente significativa ($p = 0,001$, $p < 0,001$, rispettivamente). Quando è stata analizzata la frequenza degli anticorpi nei subsets clinici del gruppo PAPS, gli anticorpi anti- β 2GPI IgA solo risultati significativamente più frequenti nei pazienti con trombosi rispetto a quelli con l'impegno ostetrico isolato (59,3% vs 33,3%, $p = 0,04$ Figura 16). Inoltre, come indicato in Figura 17, i valori medi sia degli anticorpi aCL IgA che degli anti β 2GPI IgA erano significativamente più alti nella trombosi rispetto ai pazienti con complicanze ostetriche ($p = 0,034$, $p = 0,008$, rispettivamente). Quando gli anticorpi aCL e anti β 2GPI di isotipo IgA sono stati confrontati con gli anticorpi aPL convenzionali (aCL IgG / IgM, anti- β 2GPI IgG / IgM e LA), è stata trovata una associazione significativa tra aCL IgA e aCL IgG (87,5% , $p = 0,01$), mentre gli anticorpi anti- β 2GPI IgA erano associati con gli anti- β 2GPI IgG (97,6%, $p < 0,001$) e LA (76,2%, $p < 0,001$). Il rapporto tra il profilo di rischio degli aPL convenzionali e la prevalenza anticorpale degli aCL IgA e anti- β 2GPI IgA e i loro titoli medi è rappresentato nelle figure 18 e 19, rispettivamente. Solo la prevalenza degli anti- β 2GPI IgA ha mostrato un aumento significativo passando dalla singola alla triplice positività antifosfolipidica convenzionale, mentre i titoli medi sia degli anticorpi aCL IgA che degli anti- β 2GPI IgA hanno mostrato una crescita significativa in associazione alla forza del profilo di rischio.

Tabella 7: Prevalenza (%) delle caratteristiche cliniche e di laboratorio nei pazienti affetti da PAPS e nei controlli sani.

	Trombosi ± complicanze ostetriche	Complicanze ostetriche isolate	aCL			anti-β2GPI			LA
			IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	
Pazienti PAPS (n=84)	64.3	35.7	19.0	57.1	21.4	50.0	73.8	47.6	53.6
Pazienti sironegativi (n=66)	51.5	48.5	4.5	-	-	10.6	-	-	-
Controlli sani (n=78)	-	-	2.6	1.3	2.6	1.3	1.3	1.3	-

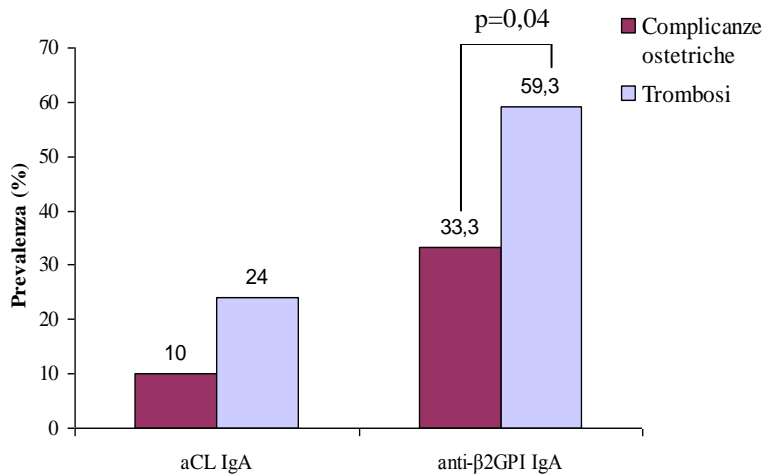


Figura 16: Prevalenza degli anticorpi aCL IgA e anti-β2GPI IgA nei subsets clinici.

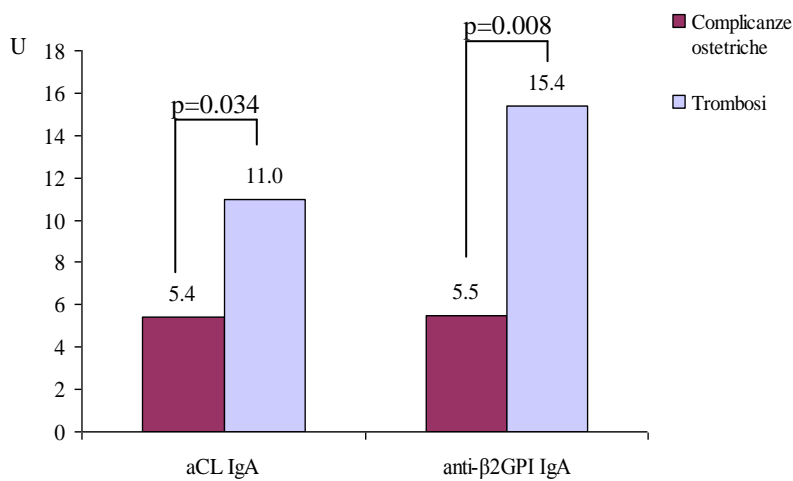


Figura 17: Relazione tra i titoli medi degli anticorpi aCL IgA e anti-β2GPI IgA e i subsets clinici.

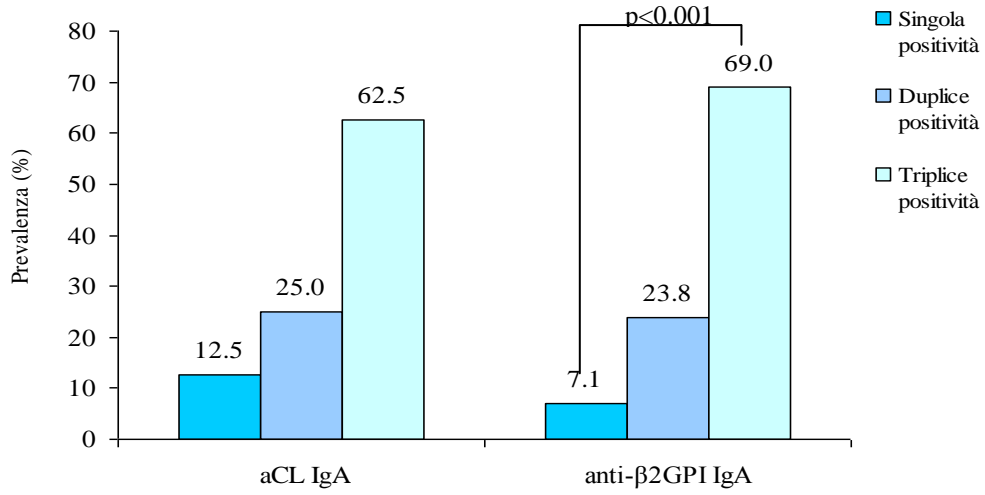


Figura 18: Prevalenza degli anticorpi aCL IgA e anti-β2GPI IgA nei profili di rischio.

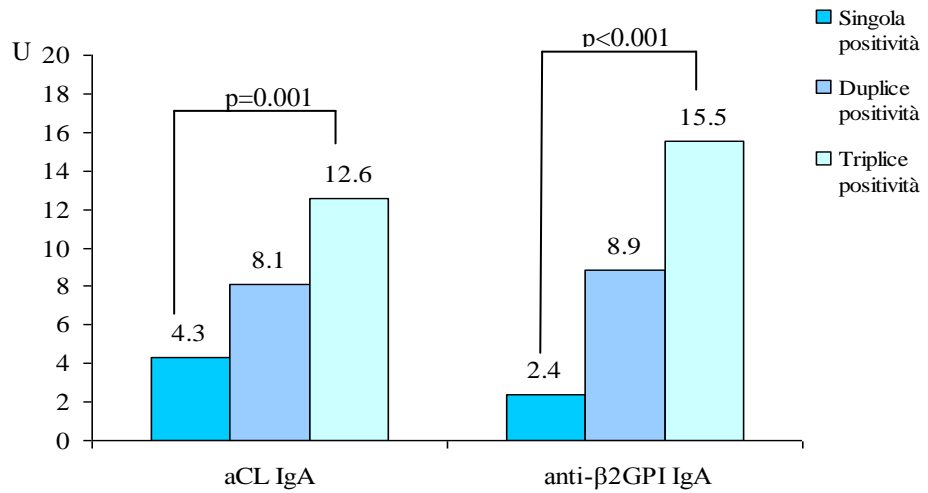


Figura 19: Relazione tra i titoli medi degli anticorpi aCL IgA e anti-β2GPI IgA e i profili di rischio.

Gli anticorpi aCL IgA e anti- β 2GPI IgA nei pazienti FEIA negativi

Gli anticorpi IgA aCL erano presenti in tre pazienti sieronegativi (4,5%) e la sua prevalenza non è risultata significativa a differenza degli anticorpi anti- β 2GPI IgA che, rilevati in sette pazienti sieronegativi (10,6%, $p = 0,04$), sono risultati essere significativi: quattro di questi pazienti avevano una storia di trombosi (11,8%) e tre avevano complicanze ostetriche da sole (9,4%). Quattro di questi pazienti sono stati ripetuti al test FEIA 12 settimane più tardi. Questi sieri hanno confermato la positività per gli anti- β 2GPI IgA.

DISCUSSIONE

Questo studio valuta la rilevanza clinica degli anticorpi anti- β 2GPI IgA e aCL IgA in un'ampia coorte di pazienti affetti da PAPS. Fino ad oggi la maggior parte degli studi che si sono concentrati sugli anticorpi aPL IgA, hanno studiato gruppi eterogenei con pochi pazienti PAPS inclusi. Il metodo di laboratorio da noi utilizzato è il FEIA, che è considerata una tecnica sensibile e specifica per il rilevamento degli aPL [53]. A causa dell'elevata specificità del metodo FEIA, la diluizione dei campioni di siero è stata inferiore a quella suggerita per i test per la determinazione degli aPL con la metodica ELISA [50]. Dallo studio è emersa una frequenza significativa sia per gli anticorpi aCL IgA che per gli anticorpi anti- β 2GPI IgA nel gruppo dei pazienti PAPS e la loro prevalenza è risultata simile a quella degli aCL IgM e anti- β 2GPI IgM rispettivamente. L'isotipo IgA ha, inoltre, una maggiore prevalenza rispetto alle IgM nel gruppo PAPS con impegno trombotico (Tabella 7) e la media dei livelli anticorpali si è vista essere superiore a quella del gruppo con impegno ostetrico. La prevalenza degli anticorpi anti- β 2GPI di classe IgA era significativamente più alta nel gruppo con impegno trombotico rispetto al gruppo con impegno ostetrico. La prevalenza e il valore del titolo medio degli anticorpi anti- β 2GPI IgA aumentato in modo significativo dal gruppo con singola positività al gruppo con la triplice. Questi risultati dimostrano la rilevanza clinica degli

anticorpi anti- β 2GPI IgA che sono, di fatto, associati alla trombosi, la manifestazione clinica più grave della PAPS, e ad un profilo di triplice positività antifosfolipidica che è legata al più alto rischio clinico. Se questi risultati saranno confermati da altri studi, gli anticorpi anti- β 2GPI IgA potrebbero ipoteticamente essere inclusi nei criteri di laboratorio per la classificazione di APS. Secondo alcuni studi [73, 74] gli anticorpi aCL IgA sono significativamente prevalenti nei pazienti affetti da PAPS, ma i nostri risultati hanno indicato che essi hanno una minore prevalenza nel gruppo PAPS rispetto agli anticorpi anti- β 2GPI IgA. Le indagini dovrebbero essere estese su larga scala al fine di valutare il reale valore clinico di questi anticorpi nella PAPS. In accordo con gli studi che hanno trovato gli anticorpi anti- β 2GPI IgA nei pazienti sieronegativi con trombosi [75, 76, 79, 80, 81] o con impegno ostetrico [77, 78], i livelli significativi trovati e confermati nei nostri pazienti sieronegativi ma che mostrano le manifestazioni cliniche della malattia, indicano che questi anticorpi potrebbero essere considerati un potenziale strumento diagnostico per la PAPS. Inoltre questi studi hanno ipotizzato che gli anticorpi anti- β 2GPI IgA sarebbero fattori di rischio indipendenti per l'ischemia cerebrale, l'infarto miocardico acuto, così come per l'ictus [80, 81]. Proprio come le raccomandazioni della task force sui test aPL "non-criterio" delineati al 13 ° Congresso Internazionale sugli aPL [66], i risultati del nostro studio supportano la proposta che i pazienti con segni/sintomi clinici di APS, ma che non soddisfano i criteri di laboratorio per gli anticorpi antifosfolipidi convenzionali dovrebbero essere sottoposti a test per la determinazione almeno degli anticorpi anti- β 2GPI di classe IgA.

**DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI-DOMINIO I DELLA
β2 GLICOPROTEINA I, RILEVATI CON IL *CHEMILUMINESCENT*
IMMUNOASSAY, NELLA SINDROME DA ANTICORPI
ANTIFOSFOLIPIDI PRIMARIA (Clinica Chimica Acta, 2015)**

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

I campioni di sangue sono stati raccolti da 88 pazienti PAPS (78 femmine e 10 maschi, età media $44,1 \pm 10,7$ anni, range 20-70), conformi ai requisiti suggeriti da *International Consensus Statement* per la classificazione di APS [2]. Nessuno dei pazienti ha mostrato caratteristiche cliniche o di laboratorio di altre malattie autoimmuni sistemiche. Trentaquattro avevano complicanze ostetriche, 39 una storia di trombosi (venosa, arteriosa o del microcircolo) e 15 con storie sia di trombosi che di complicanze ostetriche (gruppo misto). I campioni di sangue sono stati raccolti da 63 pazienti sieronegativi (58 femmine e 5 maschi; età media $41,0 \pm 9,2$ anni, range 19-63) i quali hanno i criteri clinici per APS ma risultano negativi per quelli di laboratorio utilizzando il metodo CLIA. Trentotto di questi avevano complicanze ostetriche e 25 una storia di trombosi. Inoltre è stato valutato un gruppo di controllo di 166 individui: 120 erano donatori di sangue concordanti per età e sesso ai pazienti e 46 (42 femmine e 4 maschi; età media $46,1 \pm 15,3$ anni, range 15-76) erano pazienti affetti da varie patologie reumatiche (11 lupus eritematoso sistemico, 10 sindrome di Sjögren, 7 polimiositi, 10 sclerosi sistemica, 6 artrite reumatoide e 2 spondiloartrite). Lo studio è stato condotto secondo i principi etici delineati nella Dichiarazione di Helsinki e tutti i partecipanti hanno dato il consenso informato.

Determinazione degli aPL

Tutti i sieri sono stati testati per aCL IgG, IgM; anti-β2GPI IgG, IgM e anti DI con il metodo CLIA. Per l'anti-DI le RLUs sono convertite in Unità Chemiluminescenti (UC) usando una curva di riferimento costruita dai produttori del kit.

Il LA sono stati determinati attraverso un metodo emocoagulativo come precedentemente descritto.

Analisi statistica

Il test chi-quadrato è stato utilizzato per confrontare la sensibilità e specificità degli anticorpi anti-DI IgG con quelle degli anticorpi aCL IgG e anti-β2GPI IgG e per confrontare la prevalenza anticorpale nei diversi gruppi di studio. Il coefficiente Kappa di Cohen è stato calcolato per stimare la concordanza dei risultati degli anticorpi anti-DI IgG, aCL IgG e anti-β2GPI IgG. Il coefficiente Rho di Spearman è stato utilizzato per correlare i livelli degli anticorpi anti- DI IgG con quelli degli aCL IgG e anti-β2GPI IgG. Il test di Fisher è stato eseguito per valutare l'associazione degli anti-DI IgG con gli anticorpi aCL IgG e anti-β2GPI IgG e con i sottogruppi clinici dei pazienti PAPS. La media dei livelli di anti-DI IgG nei vari sottogruppi clinici e nei diversi profili anticorpali dei pazienti PAPS sono stati confrontati con i test Mann-Whitney U e Kruskal-Wallis. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software SPSS versione 19.

RISULTATI

Come indicato nella Tabella 8, la sensibilità degli anticorpi anti-DI IgG era paragonabile a quella degli anticorpi aCL IgG e anti-β2GPI IgG. Non si sono trovate differenze significative nella specificità degli anticorpi anti-DI IgG e di aCL IgG e anti-β2GPI IgG. La concordanza è stata valutata confrontando i risultati degli anticorpi anti-DI IgG con quelli degli aCL IgG e

anti-β2GPI IgG (Tabella 9). La Kappa di Cohen e il test esatto di Fisher hanno rivelato rispettivamente, una forte concordanza ($p < 0,001$) e un'associazione tra gli anticorpi anti-DI IgG e gli anticorpi aCL IgG anti-β2GPI IgG ($p < 0,001$, Tabella 9). La correlazione tra i titoli medi degli anticorpi anti-DI IgG e quelli degli anticorpi aCL IgG e così come con i titoli medi degli anti-β2GPI IgG (Tabella 9 e Figura 20) è stata altrettanto significativa ($p < 0,001$). Gli anticorpi anti-DI IgG sono risultati significativamente meno frequenti nel gruppo dei pazienti affetti da PAPS con complicanze ostetriche (17,7%) rispetto al gruppo con storie di trombosi (80,0%) o al gruppo misto (76,9%) ($p < 0,001$). I titoli medi anticorpali degli anti-DI IgG erano significativamente minori nel gruppo di pazienti PAPS con impegno ostetrico (34,0 CU) piuttosto che nel trombotico (882,5 UC) o misto (671,5 UC) ($p < 0,001$, Fig. 21). La prevalenza degli anticorpi anti-DI IgG nei pazienti PAPS con trombosi arteriosa non era significativamente differente da quella che si trova nei pazienti con trombosi venosa (81,8% vs 76,2%, $p = 0,73$). I livelli medi anticorpali di anti-DI IgG nei pazienti con trombosi arteriosa non erano significativamente diversi da quelli nei pazienti con trombosi venosa (1076,9 CU vs 426,4 CU, $p = 0,49$). La prevalenza degli anticorpi anti-DI IgG era significativamente differente nei tre profili anticorpali per gli aPL convenzionali (4,8% nella singola positività, il 45,5% nella duplice positività e 94,1% nel gruppo della triplice positività, $p < 0,001$). I titoli medi degli anti-DI IgG erano significativamente aumentati passando dalla singola alle triplice positività (4,1 CU nella singola, 182,8 CU nella doppia e 1.162,5 nella triplice positività, $p < 0,001$, Fig. 22). Infine, la prevalenza degli anticorpi anti-IgG DI nei pazienti CLIA negativi con le caratteristiche cliniche di APS non risultava significativa rispetto a quella trovata nei controlli (1,6% vs 0,6%, $p = 0,44$). La prevalenza degli anti-DI IgG e i loro titoli medi non differivano significativamente tra i pazienti CLIA negativi con trombosi e quelli con impegno ostetrico ($p = 0,83$ e $p = 0,38$, rispettivamente).

Tabella 8: Confronto tra sensibilità e specificità degli anticorpi anti-DI IgG e aCL IgG e anti-β2GPI IgG

	anti-DI IgG	aCL IgG	anti-β2GPI IgG
Sensibilità (%)	54.5	58.0	56.8
Specificità (%)	97.6	96.4	96.4

anti-DI: anti Dominio I; aCL: anticardiolipina; anti-β2GPI: anti-β2 Glicoproteina I.

Tabella 9: Concordanza, associazione e correlazione dei titoli tra anti-DI IgG, aCL IgG e anti-β2GPI IgG

	anti-DI IgG vs aCL IgG	anti-DI IgG vs anti-β2GPI IgG
Kappa di Cohen	0,89*	0,91*
Test di Fisher (p-value)	<0,001	<0,001
Rho di Spearman	0,89*	0,86*

Anti-DI: anti Dominio I; aCL: anticardiolipina; anti-β2GPI: anti-β2 Glicoproteina I. *: p-value<0,001.

Figura 20: Correlazione dei titoli anticorpali tra anti-DI IgG, aCL IgG e anti-β2GPI IgG

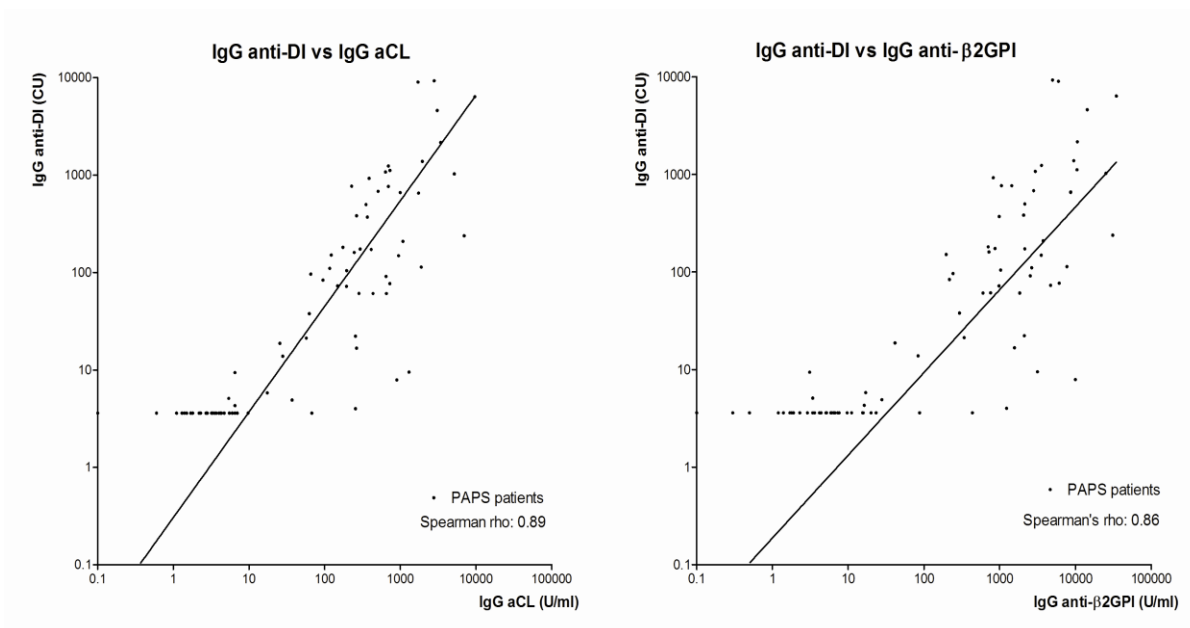


Figura 21: Confronto tra i titoli anticorpali medi degli anti-DI IgG nei diversi subset clinici della PAPS

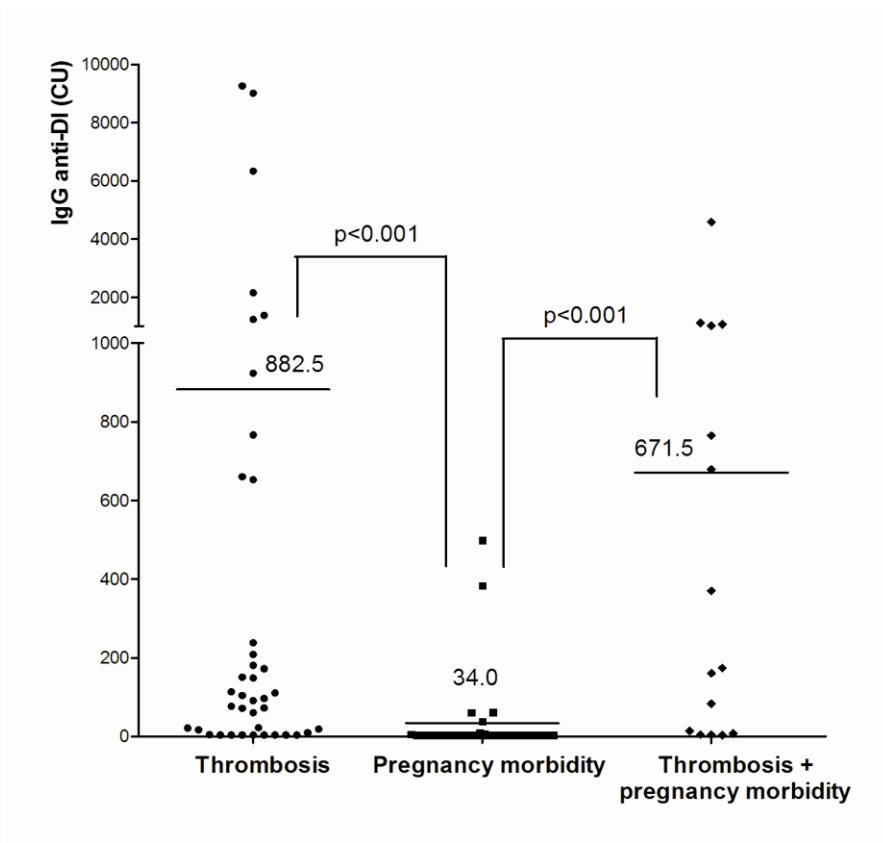
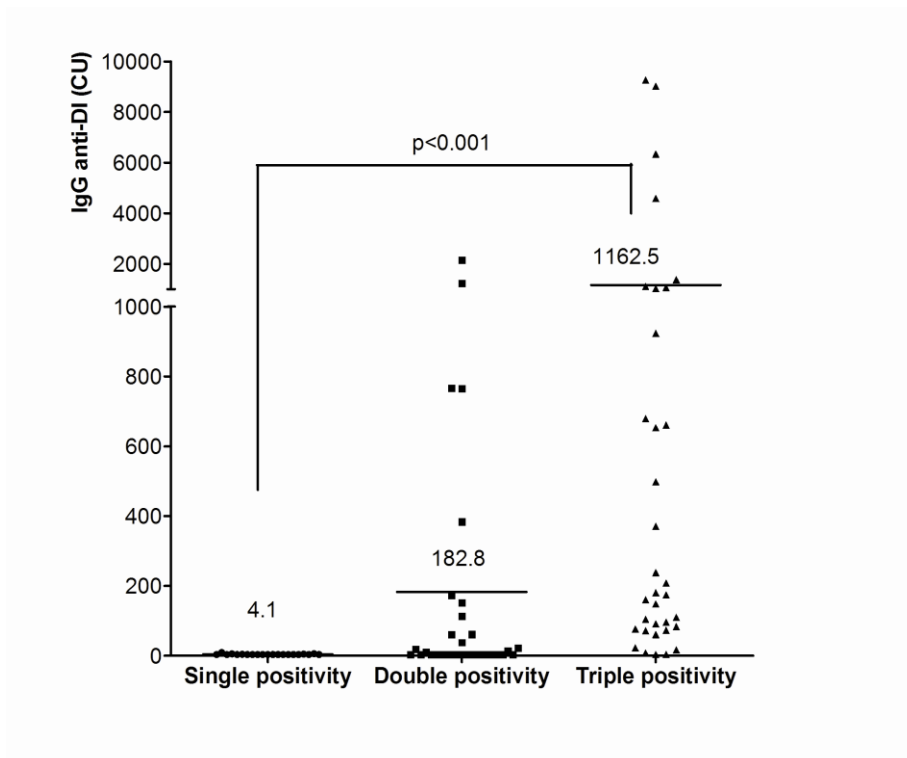


Figura 22: Confronto tra i titoli medi degli anticorpi anti-DI IgG nei diversi profili anticorpali (aPL convenzionali)



DISCUSSIONE

Questo studio riguarda l'individuazione di anticorpi anti-DI mediante la metodica CLIA, una nuova tecnica completamente automatizzata che usa una reazione chimica ad emissione di luce per la rilevazione di anticorpi. Inoltre è stato valutato il rapporto tra gli anticorpi anti-DI IgG e aCL IgG e anti-β2GPI IgG e il loro significato clinico nei pazienti affetti da PAPS. La popolazione di studio comprendeva anche una grande coorte selezionata di pazienti affetti esclusivamente da sindrome primaria al fine di escludere interferenze provocate da altre malattie autoimmuni sistemiche comunemente associate all'APS. Gli anticorpi anti-DI IgG hanno mostrato una sensibilità, specificità, una concordanza dei risultati e una correlazione di titoli medi paragonabile con gli anticorpi aCL IgG e anti-β2GPI IgG, attualmente considerati i criteri di laboratorio per la classificazione APS [2]. La concordanza trovata tra gli anticorpi anti-DI IgG e gli anti-β2GPI IgG conferma i dati trovati da Mondejar et al. [63] i quali trovano un kappa = 0,68 e una concordanza globale del 91% usando la tecnica CLIA. I nostri risultati non concordano con quelli di de Laat et al. [118] i quali hanno riportato che solo il 55% dei pazienti con anticorpi anti-β2GPI erano positivi per gli anticorpi anti-DI IgG utilizzando il metodo ELISA. Questa divergenza potrebbe essere spiegata dalla diversa conformazione del sito di legame dell'antigene nei due metodi. Vi sono, infatti, nel metodo CLIA microsfere paramagnetiche sulle quali viene attaccato l'antigene, mentre nella tecnica ELISA l'antigene si trova adeso alla superficie piana delle piastre idrofobiche. È possibile quindi che la metodica CLIA sia in grado di rilevare quantità di anticorpi anti-DI IgG maggiori rispetto alla metodica ELISA. Inoltre, è stato dimostrato che il saggio AcuStar® rileva gli anticorpi anti-β2GPI indipendentemente dalla conformazione dell'antigene β2GPI e non principalmente la conformazione aperta [131]. Probabilmente, questo cambio di conformazione influisce notevolmente sulla variabilità inter-test anche per quanto riguarda il rilevamento degli anticorpi anti-DI.

Gli anticorpi anti-DI sono stati trovati associati alle manifestazioni trombotiche di APS e, in misura minore, alle complicanze ostetriche con l'utilizzo della tecnica ELISA [118]. Alcuni autori hanno recentemente riportato che gli anticorpi anti-DI, rilevati utilizzando il CLIA, sono associati ad entrambe le manifestazioni cliniche [63] o alla sola trombosi sia venosa che arteriosa [114, 116, 118-121] in pazienti con APS. Poiché questo studio ha rilevato una prevalenza significativamente minore degli anticorpi anti-DI nei pazienti con APS con impegno ostetrico isolato piuttosto che in quelli con trombosi o trombosi associata a complicanze ostetriche, questi anticorpi potrebbero essere considerati strumenti utili nella valutazione del rischio clinico nei pazienti affetti da PAPS. I pazienti con più positività antifosfolipidica hanno generalmente un rischio maggiore di sviluppare ricorrenti complicanze cliniche legate all'APS [132-135]. Questi pazienti tendono inoltre ad avere titoli medi più elevati e una maggiore prevalenza degli anticorpi anti-DI, sempre utilizzando la metodica ELISA [122]. Nel nostro studio, gli anticorpi anti-DI IgG rilevate dal CLIA avevano una prevalenza significativamente più alta e titoli medi significativamente più elevati nei pazienti affetti da PAPS con la triplice positività per gli aPL convenzionali rispetto a quelli con singola o duplice positività. Ciò conferma che gli anticorpi anti-dominio I possono essere in grado di valutare il rischio nei pazienti con APS. Abbiamo indagato, inoltre, la presenza degli anticorpi anti-DI IgG in un gruppo di pazienti sieronegativi con le caratteristiche cliniche di APS e abbiamo visto che la prevalenza non era significativa rispetto a quella del gruppo di controllo. Questo risultato è in accordo con l'osservazione che gli anticorpi anti-DI IgG costituiscono un sottogruppo degli anticorpi anti- β 2GPI IgG [103, 107-110]: se i campioni sono negativi per gli anticorpi anti- β 2GPI IgG, anche gli anticorpi anti-DI IgG devono essere negativi e quindi non forniscono alcuna sensibilità diagnostica aggiuntiva per la classificazione di APS.

Quest'ultimo dato insieme alla buona correlazione tra gli anticorpi anti-DI e anti- β 2GPI potrebbe sollevare un dubbio sull'importanza clinica degli anticorpi anti-DI rilevati dal CLIA.

La loro determinazione difatti, potrebbe essere vista solo come un aumento del carico di lavoro e dei costi. Tuttavia, questo studio fornisce ulteriori prove che gli anticorpi anti-DI potrebbero essere considerati biomarker promettenti per la valutazione del rischio in particolare, per i pazienti con storie di trombosi vascolari e/o triplice positività per gli aPL convenzionali. Pertanto, essi possono rappresentare un ulteriore strumento utile per decisioni cliniche e terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Harris EN, Baguley E, Asherson RA, Hughes GRV. Clinical and serological features of the antiphospholipid syndrome (APS). *Br J Rheumatol* 1987; 26: 19.
- [2] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi M, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb and Haem* 2006; 4: 295-306.
- [3] Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1941; 48:484-486.
- [4] Moore JE and Mohr C F. Biologically false positive serologic tests for syphilis: type, incidence, and cause. *JAMA* 1952. 1952: 467-473.
- [5] Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; ii:1211-4.
- [6] Tincani A, Balestrieri G, Saptola L, Cinquini M, Meroni PL, Roubey RA. Anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I immunoassays in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 396-402.
- [7] Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990;335:1544-7.
- [8] McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120-4.

- [9] Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid-beta2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992;1:75-81.
- [10] Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*. 1990; 336:177-178.
- [11] Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG 's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66:629-32.
- [12] Arvieux J, Damige L, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost*. 1995;74: 1120-1125.
- [13] Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. 1997; 77:486-491.
- [14] Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Gotoh M, Tsukamoto M. Anti-annexin V in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. *Am J Haemat* 47:ol. 1994; 56-58.
- [15] Oosting JD, Derksen RHW, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipid with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993;81:2618-25.
- [16] Vaarala O, Alfthan G, Jauhainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1993; 341: 923-925.

- [17] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome : under standing the antibodies. *Nat Rev Rheum.* 2011;7:330-9
- [18] Ioannou Y, Rahman A. Domain I of β 2-glycoprotein I: its role as an epitope and the potential to be developed as a specific target for the treatment of the antiphospholipid syndrome . *Lupus* 2010;19:400-5
- [19] Agar C, van Os GM, Morgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2010;116:1336–43.
- [20] Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipid based on its crystal structure. *EMBO J.* 1999;18:5166–74.
- [21] Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, et al. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J.* 1999;18:6228–39.
- [22] Hammel M, Kriechbaum M, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Solution structure of human and bovine beta(2)-glycoprotein I revealed by small-angle x-ray scattering. *J Mol Biol.* 2002;321:85–97.
- [23] Conley CL and Hartmann RC. A haemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-622.
- [24] De Groot PG, Derksen RHW. Specificity and clinical relevance of lupus anticoagulant. *Vessel* 1995;1:22-6.

- [25] Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticoagulant activity of β 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992; 68:297-300.
- [26] Viard J-P, Amoura Z, Bach J-F. Association of anti- β 2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992; 93:181-6.
- [27] de Groot PG1, Oosting JD, Derksen RH. Antiphospholipid antibodies: specificity and pathophysiology. *Baillieres Clin Haematol*. 1993 6:691-709.
- [28] Galli M1, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and diluite Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and beta2 glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies *Blood* 1995; 86:617-23.
- [29] Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement 54 on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of aninternational workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.
- [30] Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT et al. Antiphospholipid syndrome. Clinical and immunological manifestation and patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1019-27.
- [31] Asherson RA, Cervera R, De Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome:international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12:530-4.
- [32] Danza A, Ruiz-Irastorza G, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2012; 26: 65–76.

- [33] Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
- [34] Wisloff F, Jacobsen EM, Liestol S. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2002; 108: 263-71.
- [35] Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations-a cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 575-83.
- [36] Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ, et al. Consensus guidelines on anti-cardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36: 63-8.
- [37] Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus* 2002; 11: 269-75.
- [38] Reber G, Tincani A, Sanmarco M, De Moerloose P, Boffa MC. Proposals for the measurement of anti-beta2glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *JThromb Haemost* 2004;2:1860-2.
- [39] Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Illiceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005;93:1147-52.
- [40] Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T, Cavazzana A, Grava C, Noventa F, et al. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost* 2006;96:337-341.
- [41] Neville C, Rauch J, Kassis J, Chang ER, Joseph L, Le Comte M, et al. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003;90:108-15.

- [42] Danowski A, Kickler TS, Petri M. Anti- β 2-Glycoprotein I: prevalence, clinical correlation and importance of persistent positivity in patients with Antiphospholipid Syndrome and Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2006; 33: 1775-9.
- [43] Giannakopoulos B, Krilis SA. How I treat the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009;114:2020–30.
- [44] Conti F, Capozzi A, Truglia S, Lococo E, Longo A, Misasi R, et al. The mosaic of “seronegative ” antiphospholipid syndrome. *J Immunol Res* 2014;2014:1 – 7.
- [45] Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1127.
- [46] Devreese K, Hoylaerts MF. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *Eur J Haematol* 2009; 83: 1–16.
- [47] Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P, et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004;114:553 – 8.
- [48] Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC, et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2012;64:1– 10.
- [49] Willis R, Grossi C, Orietta Borghi M, Martos-Sevilla G, Zegers I, Sheldon J, Meroni PL. International standards for IgG and IgM anti- β 2glycoprotein antibody measurement. *Lupus* 2014;23:1317-9
- [50] Forastiero R, Papalardo E, Watkins M, Nguyenc H, Quirbach C, Jaskal K, et al. Evaluation of different immunoassays for the detection of antiphospholipid antibodies:

Report of a Wet Workshop During the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2014;428:99–105.

- [51] Montaruli B, De Luna E, Mengozzi G, Molinari F, Napolitano E, Napoli P, et al. Anti-cardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibodies: normal reference ranges in north western Italy. *Lupus* 2012;21:799–801.
- [52] Damoiseaux J, Peeters L, Hupperts R, Boreas A, ten Cate H, Cohen Tervaert JW. Prevalence of anticardiolipin antibodies in patient cohort with distinct clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:146–51.
- [53] Villalta D, Alessio MG, Tampoi M, Da Re A, Stella S, Da Re M, et al. Accuracy of the first fully automated method for anti-cardiolipin anti-beta2 glycoprotein I antibody detection for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:21–7.
- [54] Andreoli L, Rizzini S, Allegri F, Meroni P, Tincani A. Are the current attempts at standardization of antiphospholipid antibodies still useful? Emerging technologies signal a shift in direction. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:356–60.
- [55] Zhao L, Sun L, Chu X. Chemiluminescence immunoassay. *Trends Analyt Chem* 2009;28:404–14.
- [56] Roda A, Guardigli M. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Anal Bioanal Chem* 2012;402:69–76.
- [57] Baeyens WR, Schulman SG, Calokerinos AC, Zhao Y, García Campaña AM, Nakashima K, et al. Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays. *J Pharm Biomed Anal* 1998;17:941–53.

- [58] De Moerloose P, Reber G, Musial J, Arnout J. Analytical and clinical performance of a new, automated assay panel for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2010;8:1540 – 6.
- [59] Persijn L, Decavele AS, Schouwers S, Devreese K. Evaluation of a new set of automated chemiluminescence assays for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2011;128:565 – 9.
- [60] Van Hoecke F, Persijn L, Decavele AS, Devreese K. Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int J Lab Hematol* 2012;34:630 – 40.
- [61] Capozzi A, Lococo E, Grasso M, Longo A, Garofalo T, Misasi R, et al. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay. *J Immunol Methods* 2012;379:48 – 52.
- [62] Zhang S, Wu Z, Li P, Bai Y, Zhang F, Li Y. Evaluation of the clinical performance of a novel Chemiluminescent Immunoassay for detection of Anticardiolipin and Anti-beta2 Glycoprotein I Antibodies in the Diagnosis of Antophospholipid Syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e2059.
- [63] Mondejar R, González-Rodríguez C, Toyos-Sáenz de Miera FJ, Melguizo-Madrid E, Zohoury N, Mahler M. Role of antiphospholipid score and anti-β2-glycoprotein I Domain I autoantibodies in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta* 2014;431:174 – 8.
- [64] Chung Y, Kim JE, Lim HS, Kim HK. Clinical performance of anticardiolipin and anti β 2 glycoprotein I antibodies using a new automated chemiluminescent assay: superior

- thrombotic prediction of combined results measured by two different methods. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25:10 – 5.
- [65] Devreese KMJ, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL, for the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for Antiphospholipid antibodies with Solid Phase Assay: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014;12:792–5.
- [66] Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de Laat B, Forastiero R, et al. “Non-criteria” aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011;20:191-205.
- [67] Meijide H, Sciascia S, Sanna G, Khamashta MA, Bertolaccini ML. The clinical relevance of IgA anticardiolipin and IgA anti- β 2 glycoprotein I antiphospholipid antibodies. A systemic review. *Autoimmun Rev* 2012;12:421-5.
- [68] Andreoli L, Fredi M, Nalli C, Piantoni S, Reggia R, Dall'Ara F, et al. Clinical significance of IgA anti-Cardiolipin and IgA anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:343-351
- [69] Sherer Y, Hassin S, Shoenfeld Y, Levy Y, Livneh A, Ohry A, et al. Transverse myelitis in patients with antiphospholipid antibodies — the importance of early diagnosis and treatment. *Clin Rheumatol* 2002;21:207-10.
- [70] Toubi E, Krause I, Fraser A, Lev S, Stojanovich L, Rovinsky J, et al. Livedo reticularis is a marker for predicting multi-system thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:499-504.
- [71] Gleason CB, Stoddard MF, Wagner SG, Longaker RA, Pierangeli S, Harris EN. A comparison of cardiac valvular involvement in the primary antiphospholipid syndrome

versus anticardiolipin-negative systemic lupus erythematosus. *Am Heart J* 1993;125:1123-9.

- [72] Uthman I, Khamashta M. Ethnic and geographical variation in antiphospholipid (Hughes) syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1671–6.
- [73] Carmo-Pereira S, Bertolaccini ML, Escudero-Contresas A, Khamashta MA, Hughes GRV. Value of IgA anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibody testing in patients with pregnancy morbidity. *Ann Rheum Dis* 2003;62:540-43.
- [74] Samarkos M, Davies KA, Gordon C, Loizou S. Clinical significance of IgA anticardiolipin and anti-beta2-GPI antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Clin Rheumatol* 2006;25:199-204.
- [75] Kumar S, Papalardo E, Sunkureddi P, Najam S, Gonzáles EB, Pierangeli SS. Isolated elevation of IgA anti- β 2 glycoprotein I antibodies with manifestations of antiphospholipid syndrome: a case series of five patients. *Lupus* 2009;18:1011-14.
- [76] Abinader H, Hanly AJ, Lozada CJ. Catastrophic antiphospholipid syndrome associated with anti-beta-2-glycoprotein I IgA. *Rheumatology(Oxford)* 1999;38:84-5.
- [77] Lee RM, Branch DW, Silver RM. Immunoglobulin A anti- β 2glycoprotein antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:748-753.
- [78] Yamada H, Tsutsumi A, Ichikawa K, Kato EH, KoikeT, Fujimoto S. IgA-class anti- β 2glycoprotein I in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Arthritis Rheum* 1999;42:2727-2730.
- [79] Murthy V, Willis R, Romany-Penabad Z, Ruiz-Limon P, Martinez-Martinez LA, Jatwani S, et al. Value of isolated IgA anti- β 2GPI in the diagnosis of the antiphospholipid

- syndrome. *Arthritis Rheum* 2013. Epub ahead of print 27 Aug 2013. DOI: 10.1002/art.38131
- [80] Ranzolin A, Bohn JM, Norman GL, Manenti E, Bodanese LC, von Mühlen CA, et al. Anti- β 2glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2004;83:141- 144
- [81] Kahles T, Humpich M, Steinmetz H, Sitzer M, Lindhoff-Last E. Phosphatidylserine IgG and- β 2glycoprotein I IgA antibodies may be a risk factor for ischemic stroke. *Rheumatology* 2005;44:1161-5.
- [82] Molina JF, Gutierrez-Ureña S, Molina J, Uribe O, Richards S, De Ceulaer C, et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1997;24:291–6.
- [83] Tajima C, Suzuki Y, Mizushima Y, Ichikawa Y. Clinical significance of immunoglobulin A antiphospholipid antibodies: possible association with skin manifestations and small vessel vasculitis. *J Rheumatol.* 1998;25:1730–6.
- [84] Cucurull E, Gharavi AE, Diri E, Mendez E, Kapoor D, Espinoza LR. IgA anticardiolipin and antibeta2-glycoprotein I are the most prevalent isotypes in African American patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci.* 1999;318:55–60
- [85] Kalunian KC, Peter JB, Middlekauff HR, Sayre J, Ando DG, Mangotich M, et al. Clinical significance of a single test for anti-cardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1988;85:602–8.
- [86] Lopez LR, Santos M, Espinoza LR, La Rosa FG. Clinical significance of Immunoglobulin A versus Immunoglobulin G and M Anticardiolipin antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: correlation with thrombosis, thrombocytopenia and recurrent abortion. *Coag Transf Med.* 1991;98:449–54
- [87] Shen YM, Lee R, Frenkel E, Sarode R. IgA antiphospholipid antibodies are an independent risk factor for thromboses. *Lupus.* 2008;17:996–1003.

- [88] Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)*. 1989;68:353–65.
- [89] Hanly JG, Hong C, Smith S, Fisk JD. A prospective analysis of cognitive dysfunction and anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1999;42:728–34.
- [90] Sebastiani GD, Galeazzi M, Tincani A, Piette JC, Font J, Allegri F, et al. Anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. Prevalence and clinical associations. European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. *Scand J Rheumatol*. 1999;28:344–51.
- [91] Merkel PA, Chang YC, Pierangeli S, Convery K, Harris EN, Polisson RP. The Prevalence and Clinical Associations of Anticardiolipin Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Diseases. *Am J Med*. 1996;101:576–83.
- [92] Picillo U, Migliaresi S, Marcialis MR, Ferruzzi AM, Tirri G. Clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity*. 1995;20:1–7.
- [93] Tokay S, Direskeneli H, Yurdakul S, Akoglu T. Anticardiolipin antibodies in Behçet's disease: a reassessment. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40:192–5.
- [94] Lamprecht P, deGroot K, Schnabel A, Csernok E, Liedvogel B, Gross WL. Anticardiolipin antibodies and antibodies to beta(2)-glycoprotein I in patients with Wegener's granulomatosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39:568–70.
- [95] Gupta M, Johann-Liang R, Bussel JB, Gersony WM, Lehman TJ. Elevated IgA and IgM anticardiolipin antibodies in acute Kawasaki disease. *Cardiology* 2002;97:180–2.
- [96] Yang YH, Huang MT, Lin SC, Lin YT, Tsai MJ, Chiang BL. Increased transforming growth factor-beta (TGF-beta)-secreting T cells and IgA anticardiolipin antibody levels

- during acute stage of childhood Henoch-Schönlein purpura. *Clin Exp Immunol.* 2000;122:285–90.
- [97] Mehrani T, Petri M. Association of IgA Anti- β 2 glycoprotein I with clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2011;38:64–8.
- [98] Lee SS, Cho ML, Joo YS, Kim WU, Hong YS, Min JK, et al. Isotypes of anti-beta2-glycoproteinI antibodies: association with thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus.*J Rheumatol.*2001;28:520–4.
- [99] Sweiss NJ, Bo R, Kapadia R, Manst D, Mahmood F, Adhikari T, et al. IgA anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies are associated with an increased risk of thromboembolic events in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2010;5:e12280.
- [100] Staub HL, Franck M, Ranzolin A., Norman GL, Iverson GM, von Mühlen CA. IgA antibodies to beta2- glycoprotein I and atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2006:104–6.
- [101] Pierangeli SS, Liu XW, Barker JH, Anderson G, Harris EN. Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 1995;74:1361–7.
- [102] Ruiz-Limon P, Romay-Penabad Z, Carrera Marin AL, Papalardo E, Pierangeli SS. IgA anti- β 2glycoprotein I antibodies are pathogenetic in a mouse model of APS. *Arthritis Rheum.* 2012;64:S742 [abstract 1731].
- [103] de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep.* 2011;13:70–6.
- [104] George J, Gilburd B, Hojnik M, Levy Y, Langevitz P, Matsuura E, et al. Target recognition of β 2-glycoprotein I (β 2GPI)-dependent anticardiolipin antibodies: evidence for involvement of the fourth domain of β 2GPI in antibody binding. *J Immunol.* 1998;160:3917–23.
- [105] Koike T, Ichikawa K, Kasahara H, Atsumi T, Tsutsumi A, Matsuura E. Epitopes on β 2-glycoprotein I recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus.* 1998;7:14–7.

- [106] Yang CD, Chen SL, Shen N, Qi M, Xu F. Detection of antirecombinant β 2 glycoprotein I fifth domain antibodies in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 1998;18:5–10.
- [107] Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM. Anti- β 2 glycoprotein I (β 2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of β 2GPI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:15542–6.
- [108] McNeely PA, Dlott JS, Furie RA, Jack RM, Ortel TL, Triplett DA, et al. β 2-glycoprotein I dependent anticardiolipin antibodies preferentially bind the amino terminal domain of β 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost.* 2001;86:590–5.
- [109] Iverson GM, Reddel S, Victoris EJ, Cockerill KA, Wang YX, Marti-Renom MA, et al. Use of single point mutations in domain I of β 2-glycoprotein I to determine fine antibody specificity of antiphospholipid autoantibodies. *J Immunol.* 2002;169:7097–103.
- [110] Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum.* 2007;56:280–90.
- [111] de Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta2 glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta-2 glycoprotein I only after a conformational change. *Blood.* 2006;107:1916–24.
- [112] De Laat B, van Berkel M, Urbanus RT, Siregar B, de Groot PG, Gebbink MF, et al. Immune responses against domain I of β 2-glycoprotein I are driven by conformational changes. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3960–8.
- [113] Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005;106:2340–6.

- [114] de Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*. 2005;105:1540–5.
- [115] Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, Giles I, Papalardo E, Vargas G, et al. In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of β 2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost*. 2009;7:833–42.
- [116] Pericleous C, Ruiz-Limon P, Romay-Penabad Z, Marín AC1, Garza-Garcia A1, Murfitt L, et al. Affinity purified antibodies directed to domain I of β 2GPI are pathogenic in a mouse model of thrombosis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:S740.
- [117] Agostinis C, Durigutto P, Sblattero D, Borghi MO, Grossi C, Bulla R, et al. A human recombinant antibody to beta2-glycoprotein I prevents thrombus formation and fetal loss in animal models of anti-phospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 2013;65:S245.
- [118] de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE, et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1767–73.
- [119] Zuily S, De Laat B, Regnault V, Kaminsky P, Kelchtermans H, Albesa R, et al. Autoantibodies against domain I of beta2-glycoprotein indicate an increased risk for thrombosis in antiphospholipid patients. A prospective cohort study. *Arthritis Rheum*. 2013;65:S1130.
- [120] Agmon-Levin N, Seguro L, Rosario C, Mahler M, Gatto M, Tomer N, et al. Anti- β 2GPI-DI antibodies are a marker of APS severity. *Arthritis Rheum*. 2013;65:S1.
- [121] Pengo V, Ruffatti A, Tonello M, Cuffaro S, Banzato A, Bison E, et al. Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of β 2-glycoprotein 1 correctly classify patients at risk. *J Thromb Haemost*. 2015;13:782-7

- [122] Banzato A, Pozzi N, Frasson R, De Filippis V, Ruffatti A, Bison E, et al. Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb Res.* 2011;128:583–6.
- [123] Pelkmans L, Kelchtermans H, de Groot PG, Zuily S, Regnault V, Wahl D, et al. Variability in exposure of epitope G40-R43 of domain I in commercial anti-beta2glycoprotein I IgG ELIS As.PLoSOne2013;8:1–9.
- [124] Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2009;7:1737–40.
- [125] Pierangeli SS, Harris EN. Clinical laboratory testing for the antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta* 2005;357:17–33.
- [126] Ichikawa K, Tsutsumi A, Atsumi T, Matsuura E, Kobayashi S, Hughes GR, et al. A chimeric antibody with the human gamma1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG beta2- glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum* 1999;42:2461–70.
- [127] Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005;37:360–3.
- [128] Galli M, Reber G, de Moerloose P, de Groot PG. Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008;6:399–401.
- [129] Fontana P, Poncet A, Lindhoff-Last E, de Moerloose P, Devreese KM. Refinement of the cutoff values of the HemosIL AcuStar assay for the detection of anticardiolipin and anti-beta2- glycoprotein-1 antibodies. *J Thromb Haemost* 2014;12:2034 – 7.

- [130] Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003;102:2717–23.
- [131] Devreese K, Kelchtermans H, de Laat BJ. Differences in sensitivity of two automated panels for anticardiolipin and anti-beta2glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome due to the exposure of the domain I epitope of beta2glycoprotein I on the solid phase [abstract]. *Thromb Haemost* 2014;12:55.
- [132] Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum* 2012;64:504–12.
- [133] Pengo V, Banzato A, Bison E, Bracco A, Denas G, Ruffatti A. What have we learned about antiphospholipid syndrome from patients and antiphospholipid carrier cohorts? *Semin Thromb Hemost* 2012;38:322–7.
- [134] Ruffatti A, Tonello M, Visentin MS, Bontadi A, Hoxha A, De Carolis S, et al. Risk factors for pregnancy failure in patients with anti-phospholipid syndrome treated with conventional therapies: a multicentre, case–control study. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:1684–9.
- [135] Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood* 2011;118:4714–8.

