

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Medicina – DIMED**

---

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

**L'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO IN RAPPORTO AL RISCHIO NELLA  
SINDROME DA ANTIFOSFOLIPIDI IN CORSO DI GRAVIDANZA.  
STUDIO RETROSPETTIVO MULTICENTRICO EUROPEO**

*Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene*

*Coordinatore d'Indirizzo : Ch.mo Prof. Leonardo Punzi*

*Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Amelia Ruffatti*

*Dottoranda: Dott.ssa Elisa Salvan*



*Non esistono condizioni ideali in cui scrivere, studiare, lavorare o riflettere, ma è solo la volontà, la passione e la testardaggine a spingere un uomo a perseguire il proprio progetto (Konrad Lorenz).*



# INDICE

Riassunto.....	5
Summary.....	7
1) Introduzione.....	9
1.1 Gli anticorpi antifosfolipidi.....	9
1.2 La Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS).....	12
1.3 La Sindrome Ostetrica.....	16
1.3.1 Cenni epidemiologici.....	16
1.3.2 Patogenesi.....	17
1.3.3 Il trattamento .....	18
1.3.4 Fattori di rischio di perdita gravidica .....	20
2) Scopi della tesi .....	23
3) Materiali e metodi.....	24
3.1 La popolazione dello studio.....	24
3.2 I dati rilevati.....	25
3.3 Gli outcomes esaminati .....	27
3.4 Determinazione degli anticorpi antifosfolipidi.....	27
3.5 Metodi statistici.....	34
4) Risultati.....	35
4.1 Caratteristiche cliniche e di laboratorio delle pazienti.....	35
4.2 Gli outcomes delle gravidanze in relazione al trattamento: l'analisi univariata	39
4.3 I profili di rischio: l'analisi stratificata.....	40
5) Discussione.....	45
6) Bibliografia.....	53
Ringraziamenti.....	61



## RIASSUNTO

**Background.** Il trattamento ottimale della Sindrome da Antifosfolipidi (APS) ostetrica è attualmente sconosciuto. La terapia con aspirina a basso dosaggio (LDA) da sola o associata all'eparina rappresenta il trattamento convenzionale per l'APS ostetrica. Nonostante questo trattamento, circa il 20% delle gravidanze hanno esito sfavorevole. Recentemente abbiamo individuato alcuni fattori di rischio aggiuntivi di perdita gravidica in corso di gravidanza trattata con terapie convenzionali.

**Scopo della Tesi.** Confrontare gli outcomes di gravidanza ottenuti a seguito dei diversi trattamenti e definire dei precisi profili di rischio al fine di analizzare l'efficacia della terapia sulla base della stratificazione del rischio.

**Materiali e Metodi.** E' stato condotto uno studio europeo di tipo retrospettivo e multicentrico. Sono stati raccolti i dati basali e quelli in corso di gravidanza di donne affette da APS, diagnosticata sulla base dei Criteri di Sydney, che presentavano almeno uno dei seguenti tre fattori di rischio aggiuntivi: associazione con il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), triplice positività per Antifosfolipidi (aPL) e pregressa trombosi. Sono state prese in considerazione le pazienti trattate con le seguenti terapie: LDA, eparina a dose profilattica  $\pm$  LDA, eparina a dose terapeutica  $\pm$  LDA, protocolli di II livello (plasmaferesi/immunoassorbimento e/o immunoglobuline endovena) e nessuna terapia. Le determinazioni degli anticardiolipina e anti-Beta2 Glicoproteina I sono state eseguite presso i singoli Centri con il metodo ELISA seguendo procedure diverse sia "home-made" che commerciali, mentre il Lupus Anticoagulant è stato testato con una serie di metodi emocoagulativi in accordo con la corrente letteratura. I metodi statistici utilizzati sono stati l'analisi univariata e la regressione logistica.

**Risultati.** Il numero di gravidanze considerate nello studio è stato complessivamente 202, relative a 158 pazienti. L'età media delle donne al momento della gravidanza era 32,5 anni  $\pm$  4,6 DS (range: 20-44) con una durata media di malattia di 5,2 anni  $\pm$  4,5 (range: 0-22). L'esito

favorevole è stato osservato in 149 gravidanze (73,8%), che si sono concluse con la nascita di 150 neonati (un parto gemellare), di cui 78 (52%) maschi e 72 femmine (48%), nati mediamente alla 36,2<sup>a</sup> SG  $\pm$  3 DS, con un Apgar medio a 5 minuti di  $9,1 \pm 1,3$  DS e un peso in percentili di  $55,8 \pm 24,9$  DS. Ci sono state 53 perdite (26,2%). In assenza della considerazione del rischio non si sono osservate differenze significative nelle prevalenze dei nati vivi tra le donne che assumevano le diverse tipologie di trattamento prese in considerazione. L'outcome primario è stato analizzato in relazione ai 7 profili di rischio definiti sulla base delle combinazioni di: pregressa trombosi, LES e triplice positività aPL. Accorpendo i trattamenti convenzionali, l'unico profilo su cui è stata rilevata una differenza statisticamente significativa è stato quello caratterizzato dai fattori "triplice positività aPL + pregressa trombosi", dove si è osservata una prevalenza di bambini nati vivi pari al 92,9% nei trattamenti di II livello versus il 58,3% nei trattamenti convenzionali (Fisher test, p-value < 0,05 e OR 9,3; 95% CI:1,3 - 65,6). Questi risultati sono stati confermati dall'analisi di regressione logistica che ha fornito una stima dell'odds ratio aggiustata per le variabili confondenti (OR 9,6; 95% CI: 1,1-84,3).

**Discussione.** Da questo studio è emerso un sottogruppo di donne caratterizzato dalla presenza di "triplice positività aPL + pregressa trombosi", dove la terapia di II livello è risultata più efficace per numero di nati vivi rispetto al trattamento convenzionale. In particolare si è messa in evidenza l'importanza dell'uso del trattamento di II livello nell'APS ostetrica. Possiamo concludere che la terapia dell'APS ostetrica andrebbe differenziata sulla base del rischio. In particolare, nelle donne con "triplice positività aPL + pregressa trombosi" il trattamento di elezione potrebbe essere quello di II livello associato alla terapia convenzionale.



## SUMMARY

**Background.** The optimal treatment for obstetric Antiphospholipid Syndrome (APS) has yet to be established. Therapy based on Low Dose Aspirin (LDA) alone or in combination with heparin is considered conventional treatment for the disorder, although approximately 20% of pregnancies thus treated have nevertheless negative outcomes. Additional risk factors for pregnancy loss were recently identified during a multicentre study conducted by us on APS pregnant women treated with conventional treatment.

**Objectives.** To compare pregnancy outcomes in APS patients following different treatment strategies and to define risk profiles depending on additional risk factors in order to utilize risk stratification methods to identify subsets of patients who would most likely benefit from one strategy or another.

**Materials and Methods.** An European, multicentre, retrospective, follow-up study was conducted. Basal and pregnancy data were collected from pregnant APS patients, diagnosed on the basis of the Sidney Criteria. The recruitment criteria for our study were at least one of the following additional risk factors for pregnancy loss: Systemic lupus erythematosus, triple positivity for antiphospholipid antibodies (aPL), previous thrombosis. Patients being treated with the following therapies were considered: LDA, prophylactic dose heparin  $\pm$  LDA, therapeutic dose heparin  $\pm$  LDA, second-line treatment protocols (plasmapheresis/immunoabsorption and/or intravenous immunoglobulins). Anticardiolipin and anti-beta2glycoprotein I antibodies of IgG and IgM isotypes were determined by an ELISA method utilizing different home-made or commercial procedures. Lupus Anticoagulants were assessed by a series of coagulation tests using platelet-poor plasma samples and following internationally accepted guidelines. Univariate and logistic regression analyses were carried out.

**Results.** Two hundred two pregnancies in 158 APS patients were assessed. The women's mean age when the pregnancy began was 32.5 years  $\pm$  4.6 SD (range 20-44) and the mean disease

duration was  $5.2 \text{ years} \pm 4.5 \text{ SD}$  (range: 0-22). Pregnancy outcome was positive in 149 cases (73.8%), which produced 150 (there was a twin delivery) viable infants (78 males = 52% and 72 females = 48%), born at  $36.2 \pm 3 \text{ SD}$  mean gestational weeks. The infants' mean Apgar score at 5 minutes was  $9.1 \pm 1.3 \text{ SD}$  and their percentile weight was  $55.8 \pm 24.9 \text{ SD}$ . There were 53 (26.2%) pregnancy losses. When pregnancy outcome was assessed without taking additional risk factors into consideration, there were no significant differences in the live birth rate in the women treated with different therapies. Pregnancy outcome was then assessed in relation to the risk profiles defined on the basis of the three additional risk factors considered. The only risk profile which led to significant differences in outcomes depending on the treatment utilized was the "triple positivity aPL and previous thrombosis" subset: the live birth rate in that subset was 92.9% in the patients treated with second line therapy compared to 58.3% in those treated with conventional therapy (Fisher test, p-value < 0.05; OR=9.3, CI 95%: 1.3–65.6). Those results were confirmed when a logistic regression analysis adjusted for confounding variables was conducted (OR=9.6; 95% CI: 1.1-84.3).

**Discussion.** This study identified a subset of APS women with "triple aPL positivity + previous thrombosis", in whom the second line treatment seemed to be more effective than the conventional treatments. It can be concluded that treatment of obstetric APS should be differentiated on the basis of the additional risk factors outlined here. In particular, the best treatment for patients with "triple aPL positivity + previous thrombosis" seems to be second line treatment in addition to the conventional therapy.

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 Gli anticorpi antifosfolipidi**

Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi (o anche immunoglobuline) diretti contro combinazioni di fosfolipidi, proteine ad alta affinità per i fosfolipidi o complessi fosfolipidi-proteine.

La presenza di tali anticorpi in associazione a un quadro clinico caratterizzato da eventi trombotici e/o ben definite complicanze ostetriche configura la Sindrome da aPL (APS) malattia sistemica autoimmune che venne descritta per la prima volta nel 1983 da Graham Hughes (1). Gli aPL vennero riscontrati per la prima volta negli anni '40, sotto forma di falsa positività per la VDRL, test utilizzato per la diagnosi della sifilide e che ricerca anticorpi diretti contro fosfolipidi del treponema che compaiono durante l'infezione luetica (2). Ci si accorse infatti che alcune persone, che presentavano un test positivo in assenza di infezione, nel corso del tempo svilupparono malattie autoimmuni o altri autoanticorpi.

Più o meno nello stesso periodo, in pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES), fu riscontrata un'anomalia della coagulazione ovvero un prolungamento dei test coagulativi fosfolipidi dipendenti. In seguito, fu dimostrato che tale alterazione si associava frequentemente a VDRL falsamente positiva (3).

Nel 1972 questo test venne chiamato Lupus Anticoagulant (LA) (4). In realtà, nonostante l'attività anticoagulante in vitro, in vivo il LA era stato descritto in pazienti affetti da LES che presentavano trombosi ripetute e in donne con aborti ricorrenti e gestosi in assenza di cause apparenti.

Nei primi anni '80, grazie al dott. Graham Hughes, la positività per il LA venne associata ad una determinata categoria di pazienti: giovani con ictus, aborti o gravidanze difficili, qualche volta disastrose (1). Tuttavia è dal 1983 grazie alla realizzazione, da parte di Harris e

Gharavi, di un metodo radioimmunologico per la determinazione degli anticorpi anticardiolipina (aCL) (5), che la ricerca degli aPL si è ampiamente diffusa ed il loro significato clinico è divenuto evidente. Essi sono stati messi in relazione con una precisa sindrome clinica comprendente le trombosi arteriose e/o venose, gli aborti ricorrenti e la piastrinopenia. Al metodo radioimmunologico seguirono ben presto le metodiche immunoenzimatiche (ELISA), attualmente in uso (6).

Nel 1984 venne organizzato a Londra il primo workshop internazionale sugli aPL (7). Dal 1987 il termine “Sindrome da Antifosfolipidi” fu usato in diversi studi per descrivere una patologia dove la positività ripetuta per il LA e gli aCL si associava a precise manifestazioni cliniche (8,9,10,11).

Gli anticorpi anti-beta2glicoproteina I ( $\beta_2$ GPI) furono scoperti agli inizi degli anni '90 grazie a due gruppi che 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 (12,13). Il più noto tra i cofattori è appunto la  $\beta_2$ GPI.

In occasione del 8° Simposio Internazionale sugli Antifosfolipidi, tenutosi a Sapporo, nel 1999, vennero stabiliti per la prima volta i criteri preliminari per la classificazione della APS, noti come Criteri di Sapporo (14). Tali criteri sono stati rivisti nel Consensus che ha preceduto l'XI Congresso Internazionale sugli Antifosfolipidi, tenutosi a Sydney nel 2004 (15). Sulla base del Consensus di Sydney gli aPL compresi attualmente nei criteri diagnostici e ricercati nella pratica clinica sono i seguenti: sono gli anticorpi anticardiolipina (aCL), gli anticorpi anticoagulanti lupici o lupus anticoagulants (LA) e gli anticorpi anti- $\beta_2$ -glicoproteina I (anti- $\beta_2$ -GPI) (15).

Gli aCL sono diretti contro complessi fosfolipide-proteina (principalmente fosfolipide- $\beta_2$ GPI) o contro fosfolipidi di carica elettrica negativa. Sono stati così chiamati per ragioni

storiche, perché inizialmente la cardiolipina veniva utilizzata come antigene per la loro determinazione. In realtà potrebbero essere diretti anche contro altri fosfolipidi anionici.

I LA sono anticorpi anti- $\beta_2$ GPI, anti-protrombina o altri antifosfolipidi anionici, che allungano il tempo di coagulazione in vitro nei test emocoagulativi fosfolipide-dipendenti: aPTT, dRVVT e KCT. Agiscono legandosi ad una superficie fosfolipidica anionica e inibendo l'attivazione della protrombina in trombina, con conseguente ritardo nella formazione del coagulo.

Gli  $\alpha\beta_2$ GPI rappresentano i principali anticorpi anti-cofattore. Appartengono alla categoria dei cofattori oltre alla  $\beta_2$ GPI, anche la protrombina, l'annessina V, la proteina C attivata, la proteina S, le LDL ossidate (14). La  $\beta_2$ GPI in vitro impedisce l'attivazione della protrombina, comportandosi come un inibitore della coagulazione. 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. In circolo risulta in parte legata alle lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL) e probabilmente neutralizza gli effetti pro infiammatori e ne promuove la clearance legandosi al complesso  $\beta_2$ GPI/oxLDL; in questo modo gli  $\alpha\beta_2$ GPI favorirebbero i processi aterosclerotici.

Sia gli aCL che gli  $\alpha\beta_2$ GPI si ricercano di isotipo principalmente IgG e IgM.

La positività per il LA viene in generale considerata più specifica per la APS, mentre gli aCL sono ritenuti essere gli anticorpi più sensibili (16). Nonostante la possibile concordanza fra i LA, gli aCL e gli  $\alpha\beta_2$ GPI (17,18), questi anticorpi non sono considerati identici. Infatti alcuni aCL (19) e alcuni  $\alpha\beta_2$ GPI (14) non hanno attività anticoagulante lupica, mentre il LA può reagire con proteine diverse dalla  $\beta_2$ GPI o con fosfolipidi diversi dalla cardiolipina (20,21).

Il LA è maggiormente correlato con lo sviluppo di trombosi (22) e di complicanze ostetriche (23) rispetto agli aCL, mentre la presenza di LA  $\beta_2$ GPI-dipendenti si associa maggiormente alle trombosi rispetto agli  $\alpha\beta_2$ GPI riscontrati con un test indipendente (24). Gli  $\alpha\beta_2$ GPI sono considerati fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di trombosi (25) e di

complicanze ostetriche (26). In generale, si ritiene che l'isotipo IgG sia maggiormente predittivo di eventi clinici tipici della APS, rispetto all'isotipo IgM, perché meno associato ad altri eventi, ad esempio alle infezioni (27,28).

Infine altri autoanticorpi riscontrabili con una certa frequenza in pazienti con APS, non sufficientemente specifici da essere compresi nei criteri diagnostici, sono gli aCL e  $\alpha_2$ GPI di classe IgA, gli antifosfatidilserina, gli antiprotrombina sia diretti contro l'antigene puro, che contro il complesso fosfatidilserina-protrombina, e gli antifosfoetanolamina (15).

## ***1.2 La Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS)***

L'APS è una malattia autoimmune sistemica caratterizzata da un quadro clinico tipico, comprendente episodi di trombosi vascolare e/o una ben definita tipologia di impegno ostetrico, causati dalla presenza nel siero degli aPL. L'APS può verificarsi in forma isolata (APS primaria) o in associazione ad una malattia autoimmune (APS secondaria), principalmente il LES.

Il termine Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS) fu coniato negli anni ottanta (29), ma solo nel 1999 (14) 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 (15).

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 (Tabella 1). Dal Consensus sono emerse alcune raccomandazioni rilevanti, fra cui: la restrizione del tempo intercorrente fra l'evento clinico e la conferma della positività di laboratorio (non meno di 12 settimane e non più di 5 anni), il consiglio di stratificare i pazienti in base alla presenza o assenza di altri fattori di rischio di

trombosi sia arteriosa che venosa e l'invito a suddividere i pazienti in base al profilo anticorpale nelle seguenti categorie:

I): positività di due o più aPL di qualsiasi tipo

II): positività per un solo tipo di aPL, in particolare

IIa: solo LA positivo

IIb: solo aCL positivo

IIc: solo anti-β2-GPI positivo

*Tabella 1 - Criteri diagnostici internazionali per la classificazione dell'APS*

### **CRITERI CLINICI**

- Trombosi: uno o più episodi di trombosi venosa, arteriosa e/o del microcircolo in qualsiasi organo o tessuto. La trombosi deve essere confermata da criteri obiettivamente validati come appropriate indagini strumentali o esami istopatologici. Nel caso di conferma istologica, la trombosi non deve essere accompagnata da segni evidenti di infiammazione della parete vasale

- Impegno ostetrico

1. una o più morti di feto morfologicamente normale da causa sconosciuta in età gestazionale ≥ 10° settimana gestazionale. La normale morfologia fetale deve essere documentata dall'ecografia o dall'esame diretto del feto  
e/o
2. una o più nascite premature, prima della 34° settimana gestazionale, di neonato/i morfologicamente normale/i causate da eclampsia, grave pre-eclampsia o insufficienza placentare  
e/o
3. tre o più aborti spontanei consecutivi da causa sconosciuta prima della 10° settimana gestazionale, escludendo cause materne anatomiche o ormonali e patologie cromosomiche sia materne che paterne.

### **CRITERI DI LABORATORIO**

Positività di uno o più dei seguenti anticorpi, in due o più determinazioni, a distanza di almeno 12 settimane l'una dall'altra:

1. presenza nel plasma dei Lupus Anticoagulants. Essi devono essere determinati secondo le linee guida della Società Internazionale di Trombosi ed Emostasi (30-31);
2. presenza nel siero di anticorpi anticardiolipina diretti contro il complesso cardiolipina-β2glicoproteina I. Essi possono essere di classe immunoglobulinica G e/o M, a medio o ad alto titolo (>40 GPL o MPL oppure >99° percentile), e devono risultare positivi in due o più determinazioni, distanziate di almeno 12 settimane l'una dall'altra, con un test ELISA eseguito in accordo ai Consensus internazionali (27,32,33);
3. presenza nel siero di anti-β2glicoproteina I di classe immunoglobulinica G e/o M, a medio o ad alto titolo (>99° percentile), e positivi in due o più determinazioni eseguite ad almeno 12 settimane di distanza l'una dall'altra con un test ELISA, in accordo alle Raccomandazioni internazionali (34).

La positività plurima si associa a maggiore severità delle manifestazioni trombotiche e ad una maggiore frequenza di perdite fetali (15, 35).

Nell'ambito delle manifestazioni cliniche dell'APS possiamo distinguere tra:

- Sindrome vascolare: caratterizzata esclusivamente da eventi vascolari
- Sindrome ostetrica: caratterizzata esclusivamente da manifestazioni ostetriche
- APS catastrofica: la forma più severa di APS con impegno multi organo

Più impegni clinici possono coesistere, ad esempio una paziente può presentare sia un interessamento vascolare che ostetrico.

### **La sindrome vascolare**

La sindrome vascolare comprende la trombosi, che può coinvolgere qualsiasi vaso (arterioso, venoso o del microcircolo) in qualsiasi distretto corporeo. La trombosi interessa, in ordine di frequenza, i vasi degli arti inferiori e superiori, del sistema nervoso centrale, della cute, dei polmoni, del cuore, del rene, dell'occhio e dell'apparato digerente (36).

La trombosi venosa, in particolare a carico dei vasi profondi del polpaccio, è la più comune manifestazione della sindrome ed è frequentemente complicata da embolia polmonare, fino al 50% dei casi. La trombosi arteriosa rappresenta un evento meno frequente e la gravità clinica è associata alla sede, all'estensione dell'occlusione e alla rapidità con cui si instaura. La sede più comune di trombosi arteriosa è il distretto cerebrovascolare, con la possibile insorgenza di attacchi ischemici transitori o ictus ischemici.

La trombosi nell'APS si considera generalmente una trombosi "fredda" perché non è presente infiammazione della parete vasale all'esame istologico (15).

### **La sindrome ostetrica**

Relativamente alla Sindrome Ostetrica si parlerà più ampiamente in seguito, essa comprende i tre sottogruppi di impegno ostetrico descritti nella Tabella 1.



### La sindrome catastrofica

La sindrome catastrofica ha una prevalenza dell'1% nell'APS e si caratterizza per l'interessamento clinico di tre o più organi in un periodo di giorni (meno di una settimana), con evidenza istopatologica di occlusioni multiple dei piccoli vasi (microangiopatia trombotica). Essa si associa ad una prognosi severa con una mortalità intorno al 50% dei casi (37):

Nell'ambito dello spettro clinico degli aPL è anche possibile osservare: pazienti con positività degli aPL e manifestazioni non trombotiche e soggetti con positività per aPL, asintomatici (aPL carriers).

Inoltre ci sono numerose manifestazioni cliniche frequentemente descritte nell'APS che non vengono incluse nei criteri diagnostici, ma sono state definite nel Consensus di Sydney. Esse sono considerate indubbiamente frequenti ma non specifiche per l'APS (15). Fra queste vanno ricordate la malattia cardiaca valvolare, la livedo reticularis, la piastrinopenia, la nefropatia non trombotica e le manifestazioni neurologiche diverse dal TIA e dallo stroke (Tabella 2).

*Tabella 2 - Manifestazioni cliniche dell'APS non incluse nei criteri di Sydney*

#### **MANIFESTAZIONI CLINICHE NON INCLUSE NEI CRITERI**

<u>Piastrinopenia</u>	Conta piastrinica inferiore a 100.000/ $\mu$ l, confermata a distanza di almeno 12 settimane.
<u>Malattia cardiaca valvolare</u>	Riscontro ecocardiografico di lesione, e/o rigurgito e/o stenosi della valvola mitrale e/o aortica.
<u>Livedo reticularis</u>	Presenza di disegno cutaneo persistente e non reversibile col calore, violaceo, rosso o blu, reticolare o uniforme, su tronco, braccia o gambe.
<u>Nefropatia</u>	Microangiopatia trombotica che coinvolge sia le arteriole che i capillari glomerulari e/o una o più caratteristiche istologiche specifiche <sup>o</sup> .
<u>Manifestazioni neurologiche</u>	Comprendono demenza, disturbi cognitivi, emicrania, mielopatia trasversa ed epilessia.

<sup>o</sup>*Caratteristiche istologiche: fibrosi intinale ed iperplasia con o senza ricanalizzazione, occlusione fibrocellulare o fibrosi di arterie o arteriole, atrofia corticale focale, depositi eosinofili in aree di atrofia tubulare (37)*

La piastrinopenia risulta molto comune nella sindrome, con una prevalenza del 21,7%, di poco inferiore a quella della trombosi venosa profonda (21,9%) (38).

### ***1.3 La Sindrome Ostetrica***

La Sindrome Ostetrica da Anticorpi Antifosfolipidi (OAPS), è diagnosticata secondo i criteri che sono stati riportati nella Tabella 1 (15).

Nella letteratura sono inoltre 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, si segnala anche la preeclampsia, la sindrome HELLP (haemolysis, liver enzymes, low platelets) e la sindrome sierositica post-partum (pleurite, pericardite) (39).

Le complicanze fetali comprendono: il ritardo di crescita intrauterino (IUGR), l'oligoidramnios e il distacco intempestivo di placenta (39).

#### ***1.3.1 Cenni epidemiologici***

Gli aPL sono presenti nel 1-5% della popolazione di donne sane. La prevalenza di aPL aumenta al 15% nelle donne con perdite nel primo trimestre (39). Circa il 40% delle donne con il LES ha gli aPL (39).

Sporadici aborti spontanei si verificano in più del 15% di tutte le gravidanze accertate e gli aborti ricorrenti si sono verificati, circa, nell'1% delle donne in età fertile (40). Essi possono essere causati da anomalie cromosomiche, anatomiche, ormonali (progesterone, estrogeni, diabete o patologie della tiroide), della coagulazione o delle piastrine (41). Prendendo in considerazione tutte le possibili cause, l'APS può essere responsabile del 10-15% degli aborti ricorrenti (42). Questi risultati sono in linea con quanto ha dimostrato Rai et al. (43), ovvero che circa il 10% di 500 donne con 3 o più aborti hanno persistentemente il LA. Queste frequenze potrebbero essere distorte poiché gli studi furono condotti prima che i criteri di classificazione fossero aggiornati.

La morte fetale si verifica in più del 5% delle gravidanze in generale, essendo meno probabile con il progredire della gravidanza (39). Il contributo totale dell'APS nella perdita fetale è ancora poco chiaro.

Pre-eclamsia e altri disordini connessi all'ipertensione affliggono il 2-8% di tutte le gravidanze e rappresentano una delle maggiori causa di mortalità materna mondiale (44). Circa un terzo delle donne con la Sindrome non trattate possono sviluppare pre-eclamsia durante la gravidanza e più del 10% di queste donne può partorire bambini piccoli per la loro età gestazionale (45).

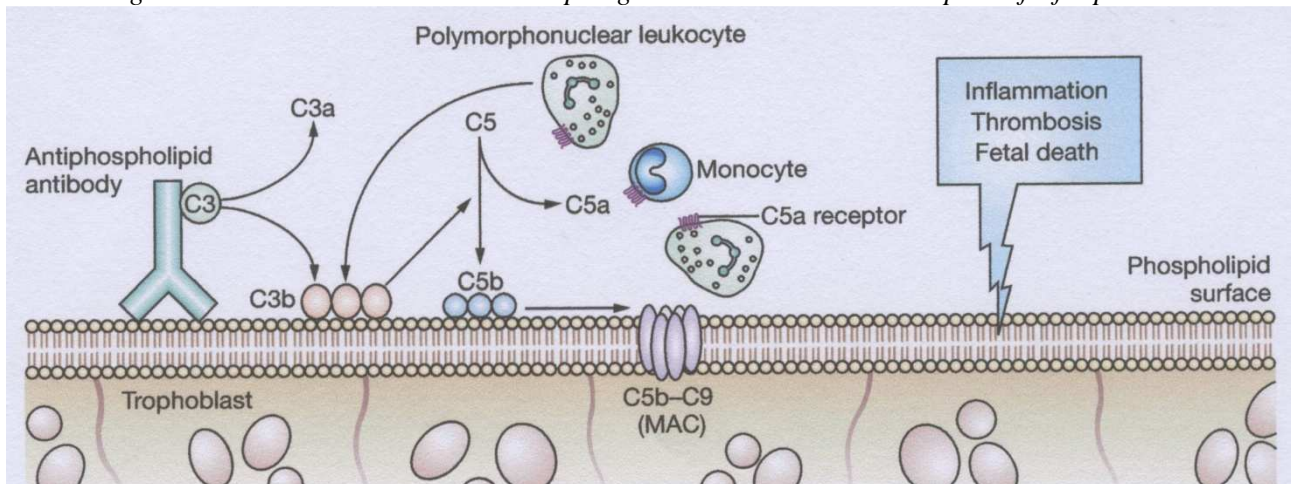
### *1.3.2 Patogenesi*

Le complicanze ostetriche non sono spiegate dalla sola trombofilia causata dagli aPL, come testimonia il fatto che la prevenzione della trombosi non sempre riesce ad evitare l'interruzione della gravidanza. Infatti, il meccanismo patogenetico del danno mediato dagli aPL si basa su alcune principali ipotesi:

- Il legame degli aPL al trofoblasto endovascolare con successiva vasculopatia deciduale e infarto placentare (46).
- L'adesione degli aPL al trofoblasto con conseguente difetto di placentazione (47). Attraverso il legame con i fosfolipidi di membrana esposti sulla superficie delle cellule del trofoblasto, gli aPL interferirebbero con la differenziazione e la fusione intercellulare e impedirebbero un normale attecchimento e un'adeguata produzione di gonadotropina corionica.
- L'attivazione del complemento sembra essere coinvolta nella perdita fetale mediata dagli aPL (48,49). Nella Figura 1 è illustrato il possibile meccanismo patogenetico del danno da aPL mediato dal complemento. Gli aPL interagiscono con le cellule trofoblastiche della placenta dove provocano attivazione del complemento attraverso la via classica; il C5 attivato attrae e attiva neutrofili e monociti e stimola il rilascio di

mediatori dell'inflammatione. L'attivazione del complemento è amplificata dalla via alternativa con ulteriore incremento di cellule dell'inflammatione e conseguente danno fetale.

Figura 1 - Possibile meccanismo nella patogenesi del danno da anticorpi antifosfolipidi.



MAC= complesso attacco membrana

### 1.3.3 Il trattamento

Nelle donne affette da APS il trattamento standard, in gravidanza, prevede aspirina a basse dosi (LDA, 100 mg/die) associata ad eparina.

Essa è divenuta la terapia convenzionale sulla base dei risultati di tre trials clinici (50,51,52) che hanno dimostrato la superiorità del trattamento combinato rispetto alla sola LDA. Tuttavia altri studi non hanno invece rilevato alcuna differenza tra i due tipi di terapia (53,54).

Diversi limiti metodologici, sono presenti nei suddetti studi (39):

- gli studi includono donne che hanno avuto due o più perdite precoci consecutive, che vengono classificate come “perdite gravidiche ricorrenti”, ma ciò non soddisfa in pieno i criteri di classificazione dell'APS, che prevedono almeno tre perdite precoci;
- alcuni studi includono donne con aPL ma che non hanno i criteri clinici;
- le donne con APS e perdita fetale, grave pre-eclamsia o insufficienza placentare sono rappresentate meno;

- la maggior parte degli studi si è concentrata sull' APS primaria e non sull'APS associata con altre malattie sistemiche autoimmuni.

Pertanto un corretto bilanciamento tra i rischi potenziali e i benefici che si prospettano in ciascun scenario clinico è necessario per estrapolare i risultati nella pratica clinica.

Una revisione sistematica basata su database Cochrane di Empson et al. (55) include clinical trials randomizzati e quasi randomizzati di donne in gravidanza con storia di perdita gravidica e con aPL. La revisione dimostrò che l'eparina non frazionata più l'aspirina riducono significativamente la perdita gravidica rispetto all'aspirina da sola (RR 0,46; 95% CI: 0,29 - 0,71).

Una recente metanalisi, che mette a confronto i cinque trials clinici riguardanti il trattamento della gravidanza nell'APS, conclude che l'associazione tra eparina e LDA si associa ad un maggior numero di nati vivi rispetto alla sola LDA (56).

Nelle pazienti con storia di precedente interessamento vascolare viene generalmente somministrata eparina a basso peso molecolare (LMWH) a dose terapeutica (ogni 12 ore), mentre nelle pazienti con APS ad esclusivo coinvolgimento ostetrico si utilizza la dose profilattica (ogni 24 ore), in entrambi i casi comunque viene associato LDA (57).

Tuttavia, nonostante la prognosi della gravidanza nelle pazienti affette da APS sia notevolmente migliorata negli ultimi vent'anni, portando così all'80% il tasso di successo delle gravidanze nelle donne trattate convenzionalmente, rimane una quota consistente di pazienti affette da APS che non riescono ad avere un esito favorevole (58). Per questo motivo sono stati impiegati, nel corso degli ultimi anni, dei trattamenti che possiamo definire "di II livello" che comprendono: la somministrazione di boli di immunoglobuline per via endovenosa, la plasmferesi e l'immunoassorbimento su colonna. A causa soprattutto del basso numero di casi trattati l'efficacia e la sicurezza di questi protocolli non è stata finora adeguatamente definita.

L'utilizzo di boli immunoglobuline per via endovenosa (IVIG) nella profilassi dell'APS ostetrica è stato descritto per la prima volta nel 1993, in associazione alla plasmferesi (59).

Successivi studi non hanno mostrato la superiorità del trattamento con eparina, aspirina e immunoglobuline rispetto al trattamento standard (60,61). In tali studi le immunoglobuline venivano somministrate in alternativa (60 Triolo) o in aggiunta (61 Branch) alla terapia standard.

La plasmaferesi è una tecnica di filtrazione extracorporea del sangue che permette di abbassare i livelli anticorpali in diverse situazioni cliniche (62). È utilizzata con beneficio nei pazienti con APS catastrofica, per la quale è stata inserita tra le indicazioni al trattamento nelle ultime Linee Guida della Società Americana di Aferesi (63). Il suo utilizzo nelle pazienti con APS in corso di gravidanza è stato descritto per la prima volta nel 1987 (64) ed è stato utilizzato più recentemente con beneficio in gravidanze di donne affette da APS ad alto rischio di complicanze (65-67).

L'immunoassorbimento permette la rimozione di specifiche sostanze presenti nel plasma mediante l'assorbimento su colonne composte di materiali in grado di legarle selettivamente, lasciando pertanto invariate altre componenti plasmatiche. Esso permette, tra l'altro, di filtrare selettivamente gli anticorpi di classe IgG. Le poche segnalazioni sull'utilizzo dell'immunoassorbimento presenti in letteratura fanno riferimento principalmente al trattamento di pazienti con APS associata a LES, nei quali la gravità della patologia rendeva necessaria una rapida rimozione anticorpale (68-72). Vi sono comunque segnalazioni sull'utilità clinica dell'immunoassorbimento nel trattamento di gravidanze con APS primaria ad alto rischio di morbidità ostetrica (73).

#### ***1.3.4 Fattori di rischio di perdita gravidica***

In letteratura sono stati indagati i fattori predittivi di outcome gravidico nelle pazienti affette da APS. Lima et al. nel 1996 hanno riportato che la storia di precedenti perdite gravidiche e la trombocitopenia erano entrambi fattori predittivi di outcome sfavorevole (74). Altri studi eseguiti più o meno contemporaneamente hanno dimostrato che la positività per il LA e l'anamnesi ostetrica positiva per più di tre precedenti aborti (75), nonché il riscontro di elevati

valori di alfafetoproteina nel siero della madre (76) e il riscontro di un'anormale velocimetria dell'arteria ombelicale al Doppler (77) si associavano a perdita fetale.

La positività per aCL, la storia di una precedente morte fetale e l'utilizzo di alte dosi di cortisonici sono stati descritti associati a basso peso alla nascita (75), mentre il contemporaneo riscontro di positività per aCL, LA e di falsa positività per VDRL si associava a nascita prematura e basso peso alla nascita (78). L'assunzione dell'aspirina preconcezionale invece poteva essere considerato un fattore prognostico favorevole (71).

Recentemente Danowski et al. (79) hanno dimostrato che l'insuccesso della gravidanza è più frequente in pazienti affette anche da LES rispetto a quelle con la sola APS. In una review del 2010 la persistenza di notches dell'arteria uterina e di bassi livelli di C3 e C4 sono stati riportati come fattori di rischio indipendenti per nascita prematura e basso peso alla nascita, mentre una falsa positività IgM TORCH (toxoplasma, varicella, citomegalovirus ed herpes virus) era predittiva per basso peso alla nascita (80).

Nella nostra esperienza abbiamo osservato che sulla base delle caratteristiche cliniche ed anticorpali si possono identificare diversi subsets di pazienti con APS ostetric. (35,81). In particolare donne con precedente storia di tromboembolismo e/o con triplice positività per aPL (LA + aCL + a $\beta$ 2GPI) hanno un rischio più elevato di insuccesso gravidico, mentre quelle con singola (LA o aCL o a $\beta$ 2GPI) o doppia (aCL+ a $\beta$ 2GPI) positività anticorpale e senza storia di trombosi presentano minor rischio di complicanze in corso di gravidanza trattata convenzionalmente (81).

Successivamente uno studio multicentrico internazionale, caso-controllo (82), ha individuato i fattori di rischio del fallimento delle gravidanze, in donne affette da Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS), trattate con protocollo convenzionale (basse dosi di aspirina e/o eparina). Lo studio si è focalizzato su 57 gravidanze fallite e 57 gravidanze di successo, e ha individuato come fattori di rischio indipendenti associati al fallimento della gravidanza: la presenza di Lupus Eritematoso Sistemico (LES) o di altre malattie autoimmuni (OR 6,0; 95% CI

1,7- 20,8;  $p= 0,01$ ), la presenza di trombosi nella storia clinica (OR 12,1; 95% CI 1,3-115,3;  $p = 0,03$ ); e la triplice positività per anticorpi antifosfolipidi (aCL IgG/IgM più gli a $\beta$ 2GPI IgG/IgM più il LA - OR 4,1; 95% CI 1,0 – 16,7;  $p = 0,05$ ). Le pazienti con diagnosi di APS con uno solo dei fattori di rischio sopra citati hanno avuto, in generale, gravidanze di successo.

In conclusione, sembra quindi che il rischio di fallimento della gravidanza in donne affette da APS, possa essere stratificato in base alla presenza di specifiche caratteristiche cliniche e di laboratorio.



## ***2. SCOPI DELLA TESI***

Ci siamo proposti di raccogliere, attraverso uno studio multicentrico, un'ampia casistica di donne affette da APS e con i seguenti fattori di rischio aggiuntivi per perdita gravidica: triplice positività aPL e/o LES e/o pregressa trombosi.

L'obiettivo preliminare è di confrontare l'outcome primario (nati vivi) e gli outcomes secondari di gravidanza (complicanze materno-fetali e caratteristiche neonatali) ottenuti a seguito dei diversi trattamenti convenzionali e di II livello e successivamente di definire dei precisi profili di rischio per analizzare l'efficacia della terapia sulla base della stratificazione del rischio.

L'obiettivo finale è quello di valutare la possibile differenziazione del trattamento dell'APS ostetrica in funzione del rischio e di migliorare quindi il counselling pregravidico nelle donne con APS che hanno deciso di programmare una gravidanza.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 La popolazione dello studio**

Lo studio è europeo di tipo retrospettivo e multicentrico, realizzato sulla casistica di 15 centri reumatologici, immunologici o ostetrici, afferenti all'European Forum on Anti-phospholipid Antibodies. I centri partecipanti erano: Barcellona, Bergamo, Brescia, Milano1, Milano2, Padova, Parigi, Pavia, Pisa, Roma, Siena, Stoccolma, Torino, Udine e Verona.

Sono stati raccolti i dati basali e quelli in corso di gravidanze di donne affette da APS, diagnosticata sulla base dei Criteri di Sidney (15), che presentavano almeno uno dei seguenti tre fattori di rischio aggiuntivi, risultati variabili indipendenti per la determinazione dell'insuccesso gravidico (82):

- Associazione con il LES o altre malattie autoimmuni
- Triplice positività per aPL
- Pregressa trombosi e impegno ostetrico tipico dell'APS

In considerazione della scarsa prevalenza, nello studio precedente, delle altre malattie autoimmuni, in questo studio è stato deciso di considerare solo il LES, come malattia autoimmune associata. Inoltre, poiché la trombosi in assenza di complicanze ostetriche era presente in donne prive di qualsiasi tipo di storia ostetrica, si è deciso di considerare la sola trombosi come fattore di inclusione.

Pertanto, al fine di ottenere da questo studio informazioni chiare e semplici, i requisiti di arruolamento, sono stati:

- Associazione con il LES
- Triplice positività per aPL
- Pregressa trombosi

Di seguito, i criteri di esclusione dallo studio sono stati:

- Età  $\geq$  45 anni

- Insufficienza d'organo (cuore, rene, fegato)
- Ipertensione polmonare
- Altre cause note di perdita gravidica (anatomiche, genetiche, ormonali, infettive, psicologiche, etc.)

Sono state prese in considerazione le pazienti trattate con le seguenti terapie:

- LDA
- Eparina non frazionata o a basso peso molecolare a dose profilattica  $\pm$  LDA
- Eparina non frazionata o a basso peso molecolare a dose terapeutica  $\pm$  LDA
- Protocolli di II livello (plasmaferesi/immunoassorbimento e/o immunoglobuline endovena)
- Nessuna terapia

### ***3.2 I dati rilevati***

La griglia di rilevazione dei dati era suddivisa in due parti: la prima contenente i dati basali e la seconda comprendente i dati relativi al corso della gravidanza e ai suoi outcomes.

Nella parte relativa ai dati basali, sono state rilevate le seguenti informazioni:

- Data di nascita della paziente
- Età alla diagnosi di APS
- Paese di origine
- Criterio di reclutamento, ovvero fattore/i di rischio aggiuntivi
- Presenza e tipo di impegno ostetrico precedente: perdita tardiva ( $\geq 10^{\circ}$  settimana gestazionale), nascita di neonato prematuro ( $< 34^{\circ}$  settimana gestazionale), perdite precoci ( $< 10^{\circ}$  settimana gestazionale)
- Presenza di fattori trombofilici congeniti (deficit della proteina C, proteina S e di antitrombina III; mutazione del fattore V di Leiden, della variante G20210A della

protrombina; resistenza alla proteina C attivata) ed acquisiti (obesità, ipertensione, ipercolesterolemia, diabete mellito, fumo)

- Profilo anticorpale degli aPL
- Eventuale presenza di altri anticorpi (antinucleo, anti-DNA nativo, anti-antigeni nucleari estraibili)
- Presenza di bassi valori delle frazioni complementari C3 e C4 (<50 mg/dL e <14mg/dL, rispettivamente)

Nella parte relativa ai dati in corso di gravidanza, sono stati rilevati:

- Anno della gravidanza
- Terapia assunta durante la gravidanza
- Dose di eparina, se fissa o variabile per peso corporeo ed età gestazionale
- Inizio della terapia, se prima della gravidanza o dopo, precisando la settimana gestazionale
- Bassi livelli delle frazioni complementari C3 e C4 durante la gravidanza
- Presenza di una o più complicanze materno-fetali (trombosi, preeclampsia/eclampsia, sindrome HELLP, piastrinopenia, ipertensione, aumento delle resistenze nelle arterie uterine o nelle arterie ombelicali rilevabile al Doppler, cardiocografia alterata, oligoidramnios e IUGR)
- Esito della gravidanza: feto nato vivo o morto
- Settimana gestazionale del parto (s.g.)
- Caratteristiche del neonato: Apgar a 5 minuti, e peso in percentile (83)
- Sesso del neonato

### 3.3 *Gli outcomes esaminati*

L'outcome primario dello studio è stato definito come la nascita di un bambino vivo e sopravvissuto almeno per 27 giorni (periodo perinatale).

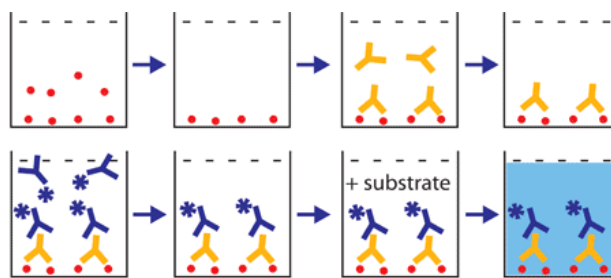
Gli outcomes secondari, analizzati sui bambini nati vivi, sono i seguenti:

- Complicanze materno-fetali
- Settimana gestazionale al parto (SG)
- Peso del neonato in percentili (83)
- Apgar Score a 5 minuti

### 3.4 *Determinazione degli anticorpi antifosfolipidi*

Gli aCL e gli a $\beta_2$ GPI di isotipo IgG e IgM sono stati determinati da sei Centri utilizzando un metodo immunoenzimatico (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) *home-made* (Figura 2) eseguito in accordo alle raccomandazioni dell'European Forum on aPL (34,84).

Figura 2 - Schema del metodo ELISA



(Tratto da: [nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/](http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/))

I valori degli aCL venivano espressi come unità di IgG (GPL) o unità di IgM (MPL) utilizzando le referenze internazionali (27,32,33). I valori degli a $\beta_2$ GPI erano calcolati come unità arbitrarie utilizzando una curva ottenuta da un pool di campioni calibrati con gli anticorpi monoclonali di Koike in grado di legare la  $\beta_2$ GPI (HCAL per le IgG e EY2C9 per le IgM) (34).

In accordo coi criteri classificativi di Sydney (15), il cut off per i titoli medio/alti sia degli aCL che degli a $\beta$ <sub>2</sub>GPI veniva calcolato utilizzando il 99° percentile ottenuto testando 80 donne sane omogenee per età con pazienti e controlli.

Descriviamo di seguito la metodica “home made” eseguita presso il nostro Laboratorio per determinazione degli aCL e degli a  $\beta$ 2GPI.

#### Protocollo per la determinazione degli aCL

Venivano seminati 25  $\mu$ l/pozzetto di una soluzione di cardiolipina bovina (Sigma Chemicals, St Louis, MO), in etanolo assoluto alla concentrazione finale di 50  $\mu$ g/ml, nei pozzetti di micropiastre da 96 pozzetti (Plates F/96 Polysorp, Nunc, Denmark). La cardiolipina veniva fatta aderire ai pozzetti lasciando le piastre a +4° C per tutta la notte. La mattina seguente i pozzetti venivano lasciati asciugare all'aria per circa 10 minuti e quindi incubati a temperatura ambiente per 2 ore con una soluzione al 10% di FCS (siero fetale bovino, Gibco, Paisley, Scotland) in PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14,525 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 76g, NaCl 48g, H<sub>2</sub>O a 10 litri a pH=7,2), 150  $\mu$ l/pozzetto, per bloccare eventuali legami aspecifici. Nel frattempo i sieri, lasciati preventivamente scongelare, venivano diluiti 1:50 con la soluzione 10% FCS/PBS e contemporaneamente veniva preparata anche la curva di calibrazione che consisteva nel preparare 5 diluizioni scalari al raddoppio di un siero opportunamente scelto, utilizzando i sieri di riferimento di Harris. Scaduto il tempo di incubazione veniva effettuato un lavaggio con 10%FCS/PBS (150  $\mu$ l/pozzetto) e venivano seminati in doppio (100  $\mu$ l/pozzetto) i sieri, la curva di calibrazione ed un controllo a concentrazione autoanticorpale nota ed espressa in unità GPL, MPL. Seguiva un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con 10%FCS/PBS si mettevano 100  $\mu$ l/pozzetto di antisiero anti-immunoglobuline umane IgG o IgM coniugato con fosfatasi alcalina (Sigma), diluito 1:5000 in 10%FCS/PBS; seguiva un'incubazione di 90 minuti a temperatura ambiente. Dopo altri 3 lavaggi in 10%FCS/PBS si distribuivano 100  $\mu$ l/pozzetto di una soluzione cromogena costituita da p-nitrofenilfosfato

(Sigma) in tampone magnesio-carbonato 0,05M (NaHCO<sub>3</sub> 2,1 g, MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O 0,1 g, portare il pH=9,8 con aggiunta di NaOH 2N e aggiungere H<sub>2</sub>O fino a 500 ml) alla concentrazione di 1 mg/ml. Le piastre venivano lasciate a 37° C per un periodo medio di 20 minuti e comunque necessario ad ottenere dei valori di assorbanza dello standard più alto intorno a 1000 di densità ottica (DO). La lettura della DO veniva eseguita con un fotometro a luce verticale modello Titertek Multiscan Plus (Flow Laboratories USA) alla lunghezza d'onda di 405 nm. I dati ottenuti si elaboravano con un programma Software per dosaggi ELISA (Melisa Microplate Manager, Walker Laboratories, UK). Veniva costruita una curva di calibrazione con 5 sieri di riferimento internazionali ed i risultati venivano espressi in unità GPL (G phospholipid), MPL (M phospholipid).

Il cut off di positività veniva calcolato come media + 2,5 DS, testando il siero di 100 soggetti sani, 80 donne e 20 uomini, abituali donatori di sangue. Il cut off per i livelli medi veniva fissato a 40 GPL/MPL e per i livelli alti a 80 GPL/MPL.

#### Protocollo per la determinazione degli anticorpi aβ2GPI

Nella prima giornata l'antigene veniva seminato su due piastre, una per le IgG ed una per le IgM, (piastre Maxisorp a fondo piatto, 96 pozzetti, Nunc, Denmark). La β2GPI purificata home-made veniva diluita in una soluzione tampone di carbonato di calcio 0.05 M (pH 9.6), ottenendo una concentrazione di antigene di 10 µg/ml. In ogni pozzetto venivano seminati 100 µl di soluzione, corrispondenti a 1µg di β2GPI. Le piastre venivano lasciate in frigo (+4°C) per tutta la notte.

Il giorno successivo venivano svuotate le piastre e si seminavano 150 µl di PBS-BSA 1% per pozzetto (PBS= phosphate buffer saline; BSA= bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, USA). Venivano incubate le piastre per un'ora, coperte, al buio, a temperatura ambiente.

Intanto si diluivano in PBS-Tween 0,05% i sieri da testare e due sieri di controllo (uno per IgG e uno per IgM), in rapporto 1:100 e si preparavano le curve di calibrazione, eseguendo 7 diluizioni a scalare dello standard a partire da una concentrazione di 1:200.

Scaduta l'ora di incubazione, svuotate le piastre del bloccaggio, si seminavano 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. Venivano quindi incubate le piastre, coperte, per due ore. Intanto si diluivano 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 svuotavano le piastre e si effettuavano 3 lavaggi con 150 µl di PBS-Tween per pozzetto; quindi si seminavano 100 µl/pozzetto di immunoglobuline coniugate e si incubavano le piastre per altre due ore.

Di seguito venivano effettuati tre lavaggi delle piastre con 150 µl di PBS-Tween e venivano seminati 100 µl/pozzetto di PNF (Sigma-Aldrich, USA), precedentemente diluito in tampone Mg-carbonato a pH 9.8; venivano incubate le piastre a 37° fino a reazione colorimetrica (circa 10 minuti) e comunque sino ad ottenere un'assorbanza dello standard più alto di circa 1000 OD. Si eseguiva la lettura al fotometro a luce verticale<sup>33</sup> (Flow Laboratories, USA) a lunghezza d'onda di 405 nm e si interpretavano i risultati come unità arbitrarie ottenute da una curva di calibrazione in cui venivano usati come riferimento gli anticorpi monoclonali di Koike (34), (HCAL per gli anti-β2GPI IgG e EY2C9 per gli anti-β2GPI IgM). I dati venivano elaborati tramite un programma software (Melisa Microplate manager, Walker Laboratories, UK), secondo i cut-off vigenti, calcolati con lo stesso procedimento usato per gli aCL.

Gli altri 9 Centri hanno usato per la determinazione kits commerciali seguendo nella definizione dei risultati le istruzioni indicate dalla Ditta fornitrice



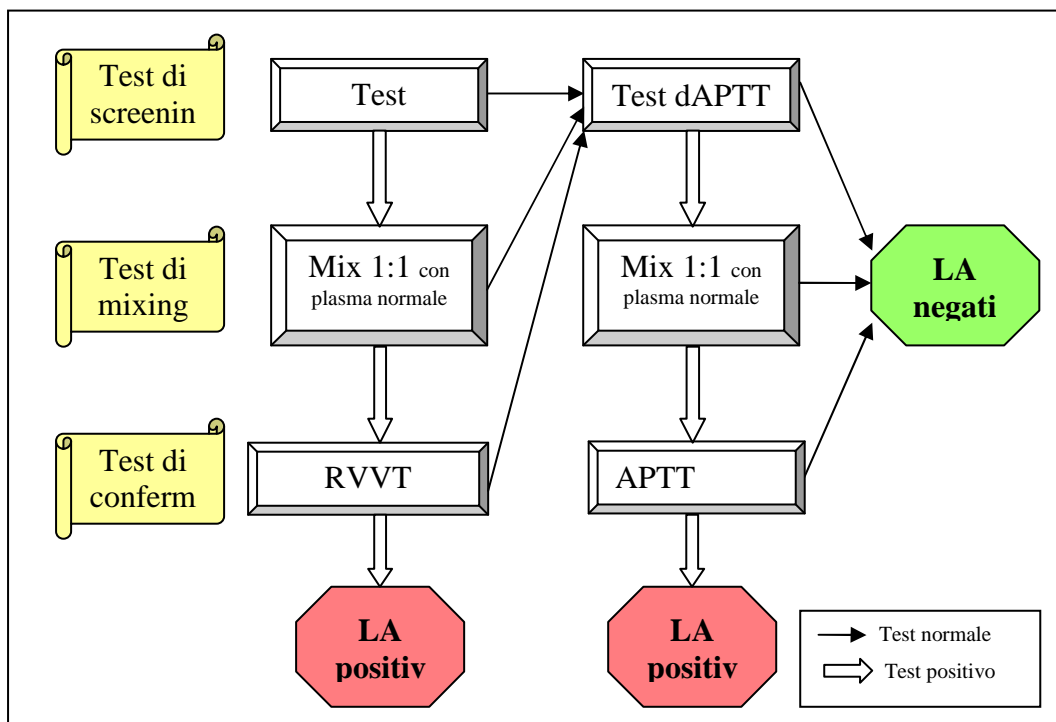
### Determinazione dei Lupus Anticoagulants

Per quanto riguarda la determinazione dei LA, da tutti i Centri partecipanti sono stati seguiti i criteri dell'International Society of Thrombosis and Haemostasis (31). Al fine di aumentare la sensibilità dell'esame, sono stati usati due diversi tests della coagulazione fosfolipide-dipendenti (15,31,84) e più precisamente:

- 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 3):

Figura 3 - 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 (ACL7000, Instrument Laboratory). I cut-off, determinati utilizzando 20 plasmi di donatori abituali di sangue, venivano espressi in secondi come media più 2,5 Deviazione Standard ( $m + 2,5 DS$ ).

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.

#### Definizione di singola, doppia e triplice positività per anticorpi antifosfolipidi

Singola positività: LA o IgG/IgM aCL o IgG/IgM a $\beta_2$ GPI

Doppia positività: IgG/IgM aCL + IgG/IgM a $\beta_2$ GPI o IgG/IgM aCL + LA o IgG/IgM a $\beta_2$ GPI + LA

Tripla positività: IgG/IgM aCL + IgG/IgM a $\beta_2$ GPI + LA

#### Determinazione degli altri autoanticorpi

Gli anticorpi antinucleo, anti-DNA nativo e anti-antigeni nucleari estraibili sono stati determinati con i metodi comunemente usati nella routine di ciascun Centro.

### ***3.5 Metodi statistici***

L'associazione tra i trattamenti e gli outcomes gravidici di tipo categoriale è stata valutata con il test del Chi Quadrato di Pearson o con il test esatto di Fisher a seconda delle frequenze disponibili nei casi analizzati. L'associazione dell' outcome primario con la tipologia di trattamento è stata valutata anche tramite il calcolo dell' odds ratio (OR) e del relativo intervallo di confidenza al 95%.

Per analizzare gli effetti delle terapie sugli outcomes secondari di tipo continuo, quali settimana gestazionale e Apgar, sono stati utilizzati i metodi di Kruskal Wallis e Mann Whitney a seconda del numero di trattamenti messi a confronto.

In tutti i casi sono stati condotti anche test multipli post-hoc per valutare l'effettiva differenza tra i singoli trattamenti.

Per valutare l'effetto del trattamento in funzione del rischio, sono state condotte analisi stratificate in modo da rendere omogenei i gruppi analizzati per il rischio.

Infine è stata condotta una regressione logistica per ottenere una stima aggiustata dell'OR dei trattamenti, per possibili variabili confondenti.

Le analisi statistiche sono state elaborate utilizzando i software SPSS versione 19.0 e STATA versione 10.0.

E' stato considerato significativo il valore di  $p < 0,05$ .

## **4. RISULTATI**

### ***4.1 Caratteristiche cliniche e di laboratorio delle pazienti***

Sono stati inizialmente raccolti i dati di 232 gravidanze, di queste 25 sono state eliminate per le seguenti motivazioni:

- 17 per inizio della terapia tardivo (dopo la 12<sup>a</sup> SG)
- 8 per presenza di malattie non compatibili con la diagnosi di LES

Inoltre, 5 gravidanze in trattamento con soli steroidi, non sono state considerate per scarsa numerosità. Pertanto il numero di gravidanze considerate nello studio è stato complessivamente pari a 202, relative a 158 pazienti.

L'età media al momento della gravidanza era 32,5 anni  $\pm$  4,6 DS (range: 20-44) con una durata media di malattia di 5,2 anni  $\pm$  4,5 (range: 0-22).

Le donne presentavano i seguenti criteri di reclutamento:

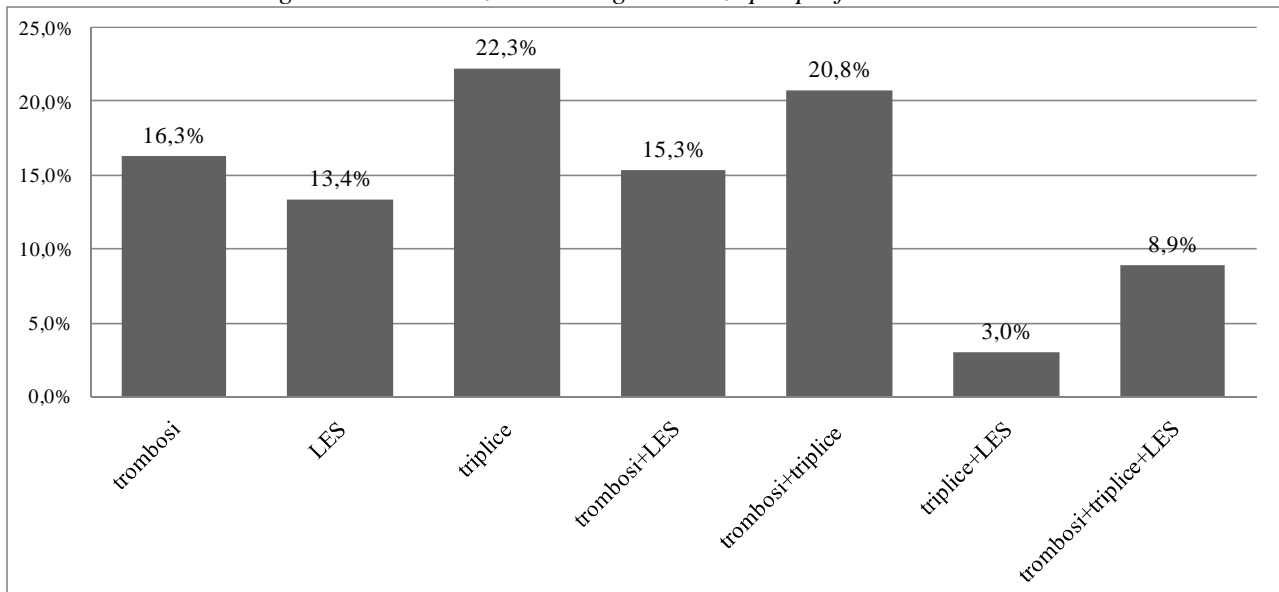
- 124 trombosi (61,4%) così distribuite: venosa in 75 casi (60,5%), arteriosa in 35 (28,2%), arteriosa + venosa in 7 (5,6%), del microcircolo in 2 (1,6%) e 5 non precisate (4%)
- 82 LES (40,6%)
- 111 triplice positività aPL (54,9%)

Tali fattori presenti singolarmente o in forma associata, hanno delineato 7 profili di rischio come indicato di seguito e illustrato con i valori percentuali nella Figura 4:

- 33 solo pregressa trombosi
- 27 solo LES
- 45 solo triplice positività aPL
- 31 pregressa trombosi + LES
- 42 pregressa trombosi + triplice positività aPL
- 6 triplice positività aPL + LES

- 18 pregressa trombosi + triplice positività aPL + LES

Figura 4 - Distribuzione delle gravidanze per profilo di rischio



Trombosi=pregressa trombosi; LES=Lupus Eritematoso Sistemico; Triplice=triplice positività aPL

Fattori di rischio congeniti per trombosi erano presenti in 22 casi (10,9%):

- 5 con mutazione G20210A della protrombina
- 2 con deficit della proteina C
- 2 con deficit delle proteine C ed S
- 2 con mutazione del Fattore V di Leiden
- 2 con mutazione del Fattore V di Leiden e aumento della resistenza alla proteina C attivata
- 1 con deficit delle proteine C ed S e aumento della resistenza alla proteina C attivata
- 8 con altre tipologie non precisate

Fattori di rischio acquisiti per trombosi erano presenti in 49 casi (24,3%):

- 19 ipertensione (>140 mmHg sistolica e >90 diastolica) o uso di farmaci antipertensivi
- 11 fumo
- 9 obesità (BMI  $\geq$  30)
- 3 obesità + fumo

- 3 ipertensione + fumo
- 1 ipertensione + ipercolesterolemia
- 3 con altre tipologie non precisate

I fattori di rischio, congeniti e acquisiti, presentavano entrambi 40 dati mancanti (19,8%).

Gli aCL IgG erano positivi in 202 casi (100%), gli aCL IgM in 45 (22,3%), gli a $\beta$ 2GPI IgG in 124 (61,4%), gli a $\beta$ 2GPI IgM in 48 (23,8%) e il LA in 165 (81,7%). La singola positività aPL era presente in 53 casi (26,2%), la duplice in 38 (18,8%) e la triplice in 111 (54,9%). Altri anticorpi antinucleo specifici erano presenti in 131 casi (64,9%) e in 20 erano dati mancanti (9,9%).

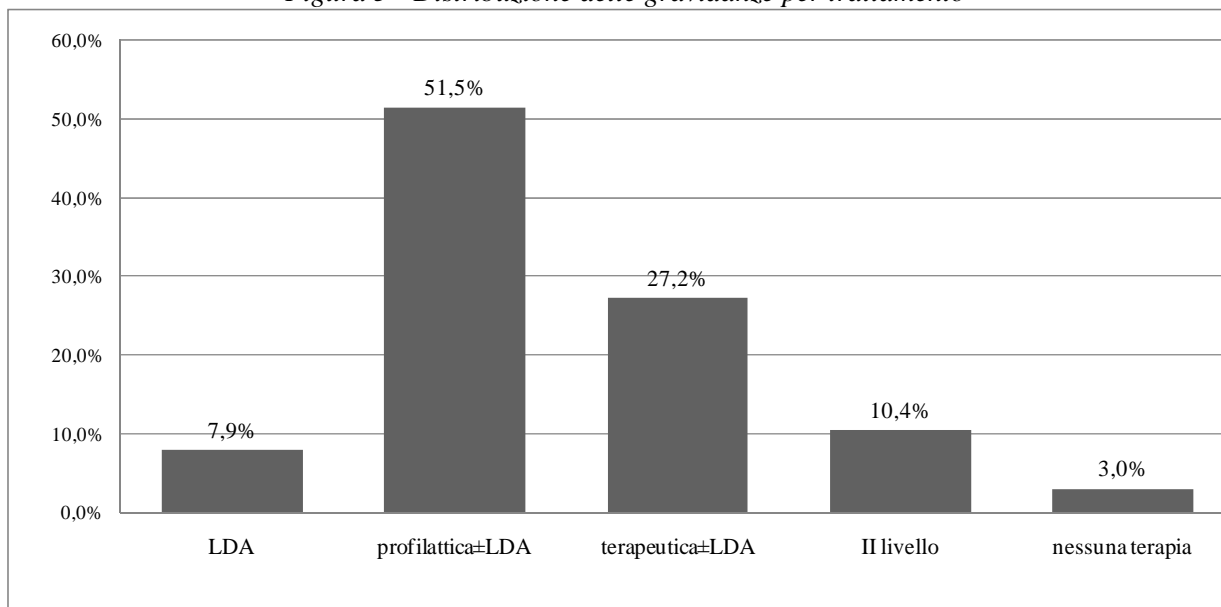
In 59 casi (29,2%) era presente un calo basale del C3 e/o C4 e in 46 (22,8%) in corso di gravidanza; i dati mancanti erano rispettivamente 83 (41,1%) e 76 (37,6%).

Storia di impegno ostetrico tipico dell'APS è stata registrata in 130 casi (64,4%), così distribuiti: in 87 (66,9%) era presente almeno una perdita fetale  $\geq 10^\circ$  SG, in 20 (15,4%) una o più nascite premature prima della  $34^\circ$  SG, in 14 (10,8%) tre o più aborti spontanei consecutivi e in 9 (6,9%) associazioni di varie tipologie di impegno ostetrico.

I trattamenti durante la gravidanza erano come indicato di seguito e illustrato con i valori percentuali nella Figura 5:

- 16 LDA
- 104 eparina a dose profilattica  $\pm$  LDA
- 55 eparina a dose terapeutica  $\pm$  LDA
- 21 terapia di II livello, associata alla terapia convenzionale in 20 casi di cui 7 trattati con IVIG, 4 con plasmateresi, 7 con IVIG più plasmateresi e 2 con IVIG e immunoassorbimento. Un caso è stato trattato con IVIG senza terapia convenzionale associata.
- 6 nessun trattamento

Figura 5 - Distribuzione delle gravidanze per trattamento



LDA=Low dose Aspirin; Profilattica=eparina profilattica; Terapeutica=eparina terapeutica

Nelle 196 gravidanze trattate, la terapia era stata cominciata prima dell'inizio della gravidanza in 71 casi (35,1%), dopo in 124 (61,4%) e in 7 casi (3,5%) il dato non era disponibile. In quasi la totalità dei casi, il trattamento prima della gravidanza, era parziale e limitato alla assunzione della sola LDA.

L'esito favorevole è stato osservato in 149 gravidanze (73,8%), che si sono concluse con la nascita di 150 neonati (un parto gemellare), di cui 78 (52%) maschi e 72 femmine (48%), nati mediamente alla 36,2<sup>a</sup> SG  $\pm$  3 DS, con un Apgar medio a 5 minuti di 9,1  $\pm$  1,3 DS e un peso in percentili di 55,8  $\pm$  24,9 DS.

Ci sono state 53 perdite (26,2%), di queste: 15 embrionali avvenute prima della 10<sup>a</sup> SG (28,3%), 31 fetali dalla 10<sup>a</sup> SG in poi (58,5%) e 7 nel periodo perinatale (13,2%).

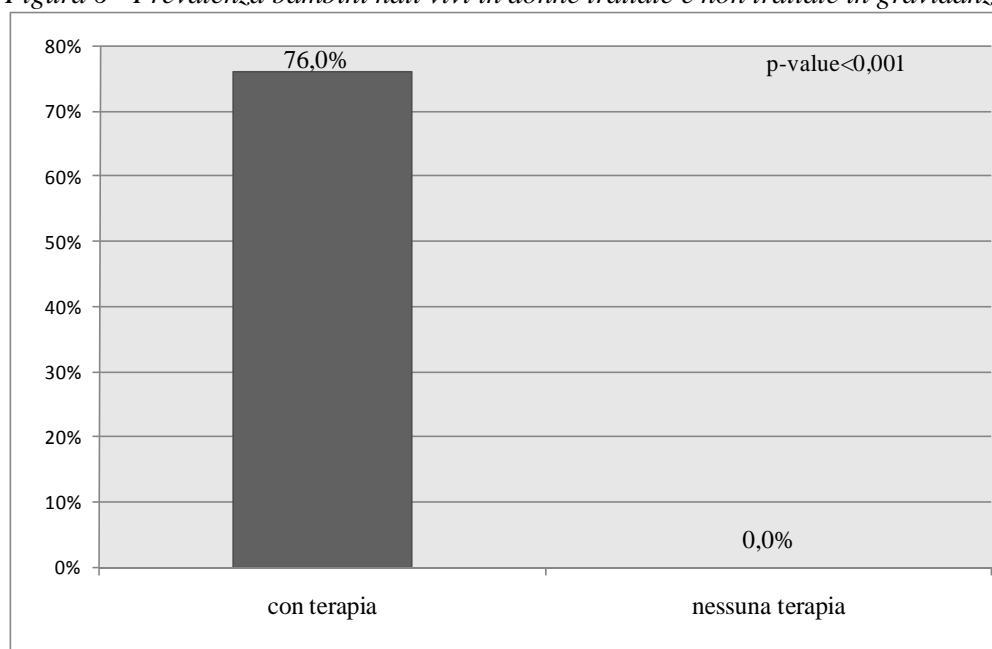
Sono state riportate complicanze materno-fetali in 50 casi (24,8%): 15 preeclampsia-eclampsia, 17 IUGR, 9 ipertensione arteriosa, 7 sindromi di HELLP, 5 oligoidramnios, 5 trombocitopenia (< 100.000 x mm<sup>3</sup>), 4 trombosi venose profonde (una in gravidanza e l'altra in puerperio), 3 anomalie del flusso nelle arterie uterine al Doppler, 1 microangiopatia trombotica e 1 diplopia e amaurosi. In 17 casi era presente l'associazione di due complicanze.



## 4.2 Gli outcomes delle gravidanze in relazione al trattamento: l'analisi univariata

L'analisi della prevalenza dei bambini nati vivi (outcome primario) nelle donne trattate e in quelle non trattate, ha mostrato una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), come si può osservare nella Figura 6. Pertanto il gruppo di gravidanze non trattate non verrà più analizzato in questo studio.

Figura 6 - Prevalenza bambini nati vivi in donne trattate e non trattate in gravidanza



Invece, non si sono osservate differenze statisticamente significative nelle prevalenze dei nati vivi tra le donne che assumevano le diverse tipologie di trattamento prese in considerazione dallo studio (Tabella 3).

Per quanto riguarda la valutazione degli outcomes secondari nelle gravidanze sottoposte ai diversi tipi di trattamento, come si può osservare nella Tabella 3, è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra le SG al momento del parto. In particolare il trattamento di II livello ha, mediamente, 3 settimane di anticipo rispetto agli altri trattamenti.

Tabella 3 - Confronto degli outcomes per tipologia di trattamento

		Tipologia di trattamento								p-value
		LDA		Eparina profilattica ± LDA		Eparina terapeutica ± LDA		II livello		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
<b>Nati vivi</b>	No	5	31,3%	23	22,1%	16	29,1%	3	14,3%	NS^
	Si	11	68,8%	81	77,9%	39	70,9%	18	85,7%	
<b>Complicanze materno-fetali</b>	No	8	72,7%	53	67,1%	28	71,8%	8	44,4%	NS^
	Si	3	27,3%	26	32,9%	11	28,2%	10	55,6%	
<b>Percentile di peso&lt;10^</b>	No	11	100,0%	77	95,1%	38	97,4%	18	100,0%	NS^
	Si	0	0,0%	4	4,9%	1	2,6%	0	0,0%	
		<b>(media ± SD)</b>		<b>(media ± SD)</b>		<b>(media ± SD)</b>		<b>(media ± SD)</b>		
<b>Settimana gestazionale</b>		36,09±3,6		36,86±2,5		36,15±2,6		33,33±3,5		p<0,05
<b>Apgar a 5 minuti</b>		8,18±2,4		9,41±0,7		8,93±1,7		8,83±0,9		NS^

LDA=Low dose Aspirin; ^NS=non significativo

Non sono emerse differenze statisticamente significative tra i trattamenti per quanto riguarda le complicanze materno-fetali, il percentile di peso alla nascita e l'Apgar a 5 minuti.

### 4.3 I profili di rischio: l'analisi stratificata

L'outcome primario è stato analizzato in relazione ai 7 profili di rischio definiti sulla base delle diverse combinazioni di progressa trombosi, LES e triplice positività aPL.

Le gravidanze sono classificate in base all'outcome primario, al trattamento e al profilo di rischio (Tabella 4). A causa della scarsa numerosità, non tutti i trattamenti sono confrontabili nelle varie tipologie di profili di rischio, pertanto, al fine di consentire una valutazione statistica più consistente, sono stati accorpati tutti i trattamenti convenzionali ovvero l'LDA, l'eparina profilattica ± LDA e l'eparina terapeutica ± LDA, in accordo con i risultati di un nostro precedente studio multicentrico (76).

Tabella 4 - Analisi stratificata dell'efficacia dei trattamenti

	LDA		Eparina profilattica ± LDA		Eparina terapeutica ± LDA		II livello	
	nati vivi	non nati vivi	nati vivi	non nati vivi	nati vivi	non nati vivi	nati vivi	non nati vivi
Trombosi	1	0	14	3	10	4	0	0
LES	5	1	13	3	4	1	0	0
Triplice	1	0	31	9	2	0	2	0
Trombosi+LES	2	0	12	3	7	5	1	0
Trombosi+triplice	1	2	2	2	11	6	13	1
Triplice+LES	0	0	4	1	0	0	0	1
Trombosi+triplice+LES	1	2	5	2	5	0	2	1

LDA=Low dose Aspirin; Trombosi=pregressa trombosi; LES=Lupus Eritematoso Sistemico; Triplice=triplice positività aPL

Accorpendo i trattamenti convenzionali (Tabella 5), l'unico profilo su cui è stata rilevata una differenza statisticamente significativa è quello dato dai fattori "triplice positività aPL + pregressa trombosi", dove si osserva una prevalenza di bambini nati vivi pari al 92,9% nei trattamenti di II livello, contro il 58,3% dei trattamenti convenzionali (Fisher test, p-value < 0,05 e OR 9,3; CI:1,3 - 65,6).

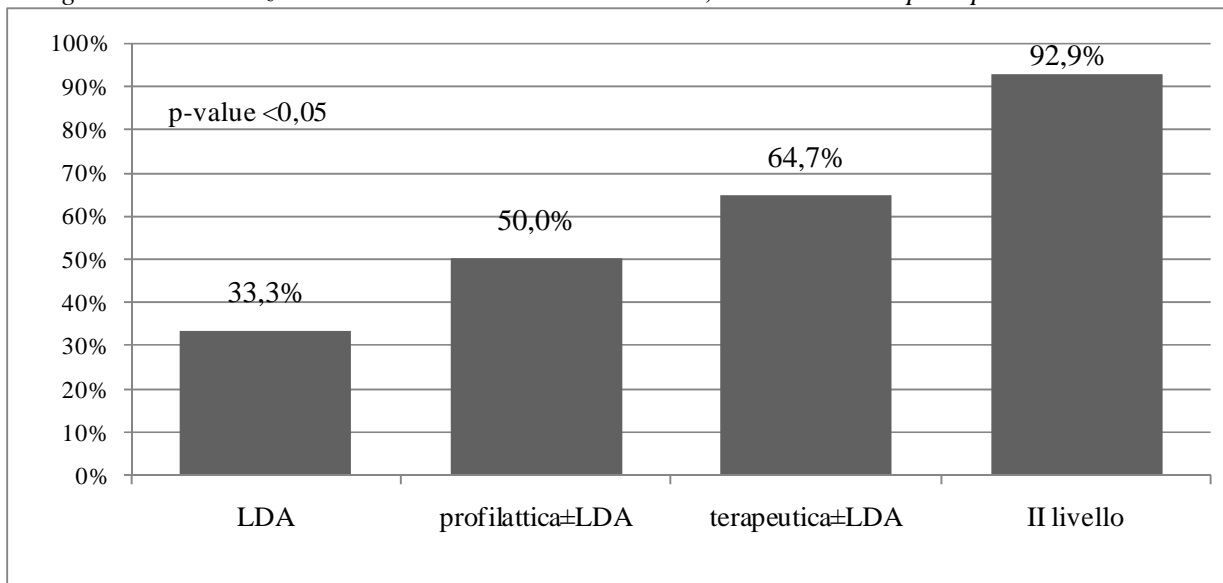
Tabella 5 - Prevalenza di bambini nati vivi per profilo di rischio e tipologia di trattamento

	Convenzionale (N.175)			II livello (N.21)			p-value
	Nati vivi	N	%	Nati vivi	N	%	
Trombosi	25	32	78,1%	0	0	-	-
LES	22	27	81,5%	0	1	0,0%	NS^
Triplice	34	43	79,1%	2	2	100,0%	NS^
Trombosi+LES	21	29	72,4%	1	1	100,0%	NS^
Trombosi+triplice	14	24	58,3%	13	14	92,9%	<0.05*
Triplice+LES	4	5	80,0%	0	0	-	-
Trombosi+triplice+LES	11	15	73,3%	2	3	66,7%	NS^

LDA=Low dose Aspirin; Trombosi=pregressa trombosi; LES=Lupus Eritematoso Sistemico; Triplice=triplice positività aPL; ^NS=non significativo

Nell'ambito di questo profilo sono stati distinti i trattamenti convenzionali ed è emersa una differenza statisticamente significativa tra l'efficacia dei singoli trattamenti, come rappresentato nella Figura 7. Infatti la prevalenza di bambini nati vivi da madri trattate con terapie di II livello è pari a 92,9%, mentre nei trattamenti convenzionali oscilla dal 33,3% della sola LDA al 64,7% dell'eparina terapeutica ± LDA.

Figura 7- Prevalenza di bambini nati vivi nei trattamenti, in donne con triplice positività e trombosi



LDA=Low dose Aspirin; Profilattica=eparina profilattica; Terapeutica=eparina terapeutica

Non è stato possibile confrontare gli outcomes secondari tra gravidanze in trattamento convenzionale e quelle in trattamento di II livello a causa della scarsa numerosità della casistica. Pertanto gli outcomes secondari saranno analizzati esclusivamente nelle donne comprese nel gruppo “triplice positività aPL + pregressa trombosi”.

Nelle pazienti con questo profilo di rischio, non c'era differenza statisticamente significativa tra le complicanze materno-fetali, l'Apgar a 5 minuti e il peso < 10° percentile delle gravidanze in trattamento convenzionale e quelle in trattamento di II livello (Tabella 6). Invece, la settimana gestazionale media al parto era significativamente più bassa nelle donne trattate con terapia di II livello rispetto a quelle in trattamento convenzionale (Tabella 6).

Tabella 6 - Outcomes secondari distinti per tipologia di trattamento

		Convenzionale (N.14)		II Livello (N.13)		p-value <sup>^</sup>
		N	Prevalenza %	N	Prevalenza %	
Complicanze materno-fetali	no	8	57,1%	6	46,2%	NS <sup>^</sup>
	si	6	42,9%	7	53,8%	
percentile<10°	no	13	92,9%	13	100,00%	NS <sup>^</sup>
	si	1	7,1%	0	0,00%	
		(mean ± SD)		(mean ± SD)		
Settimana gestazionale		37,2±2,4		32,9±4,05		p<0,05
Apgar		8,5±1,6		8,9±1,04		NS <sup>^</sup>

<sup>^</sup>NS=non significativo

Sempre nel gruppo “triplice aPL + pregressa trombosi” abbiamo confrontato le caratteristiche cliniche e di laboratorio delle donne trattate con terapia convenzionale con quelle delle donne trattate con terapie di II livello (Tabella 7). Non è stata trovata nessuna differenza significativa in tutti i parametri esaminati ad eccezione dell’ impegno ostetrico tipico dell’APS che è risultato significativamente prevalente nelle donne in trattamento di II livello.

E’ stata quindi eseguita una regressione logistica per verificare l’effettiva significatività del contributo al miglioramento nell’outcome primario con il trattamento di II livello rispetto ai trattamenti convenzionali, nella popolazione che presenta il profilo di rischio “triplice positività aPL + pregressa trombosi”. Nella regressione sono stati inclusi, oltre alla tipologia di trattamento, anche altre possibili variabili confondenti quali: la presenza di altri autoanticorpi, la durata della malattia (maggiore o inferiore ai 2 anni) e l’età della madre alla gravidanza (maggiore o inferiore ai 35 anni). L’ odds ratio significativo del trattamento di II livello rispetto ai trattamenti convenzionali, relativo ai bambini nati vivi, è pari a 9,7 con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 1,1 e 84,3.

Tabella 7 - Caratteristiche cliniche e di laboratorio nei due gruppi di trattamento

		Convenzionale (N.24)		II livello (N.14)		p-value
		N	Prevalenza %	N	Prevalenza %	
Durata malattia	più di 2 anni	20	83,3%	11	45,8%	NS <sup>^</sup>
	massimo 2 anni	4	16,7%	3	12,5%	
Impegno Ostetrico nell'APS	no	14	58,3%	1	7,1%	p<0,05
	si	10	41,7%	13	92,9%	
Altri fattori di rischio	ND*	5	20,8%	0	0,0%	NS <sup>^</sup>
	no	7	29,2%	10	71,4%	
	si	12	50,0%	4	28,6%	
Anti-cardiolipina IgG	positivo	24	100,0%	14	100,0%	-
Anti-cardiolipina IgM	negativo	20	83,3%	12	85,7%	NS <sup>^</sup>
	positivo	4	16,7%	2	14,3%	
Anti-β2glicorproteina I IgG	negativo	0	0,0%	1	7,1%	NS <sup>^</sup>
	positivo	24	100,0%	13	92,9%	
Anti-β2glicorproteina I IgM	negativo	17	70,8%	12	85,7%	NS <sup>^</sup>
	positivo	7	29,2%	2	14,3%	
Lupus-Anticoagulants	positivo	24	100,0%	14	100,0%	-
Altri autoanticorpi	ND*	3	12,5%	0	0,0%	NS <sup>^</sup>
	negativo	8	33,3%	5	35,7%	
	positivo	13	54,2%	9	64,3%	
Età	<35	19	79,2%	9	64,3%	NS <sup>^</sup>
	≥35	5	20,8%	5	35,7%	
Inizio della terapia	ND*	0	0,0%	1	7,1%	NS <sup>^</sup>
	prima della gravidanza	7	29,2%	1	7,1%	
	durante la gravidanza	17	70,8%	12	85,7%	

\*ND = non disponibile; <sup>^</sup>NS = non significativo

## **5. DISCUSSIONE**

Il trattamento ottimale dell'APS ostetrica è attualmente sconosciuto. La terapia con LDA da sola o associata all'eparina a dosaggio profilattico rappresenta il trattamento convenzionale per l'APS esclusivamente ostetrica (50,51,52,53,54). Invece per l'APS caratterizzata da pregressa trombosi, la terapia più usata è costituita da eparina a dose terapeutica con o senza LDA (39,85). Tuttavia, nonostante questi trattamenti, circa il 20% delle gravidanze hanno esito sfavorevole (58).

Recentemente, in un nostro studio multicentrico caso-controllo (82) abbiamo individuato alcuni fattori di rischio aggiuntivi di perdita gravidica in corso di gravidanza trattata con terapie convenzionali e abbiamo rilevato un'elevata prevalenza di perdita gravidica (76,3%) nelle donne in trattamento con le terapie convenzionali e con almeno uno dei fattori di rischio aggiuntivi: triplice positività aPL, pregressa trombosi e impegno ostetrico dell'APS e LES o altre malattie autoimmuni.

Finora in letteratura, è stato poco indagato il rischio in relazione alla perdita di gravidanza nelle donne con APS. In particolare, sono stati trovati come fattori di rischio aggiuntivi la triplice positività aPL e/o la pregressa trombosi (35,81,86), l'alterata flussimetria dei vasi ombelicali o uterini (77,80), la presenza di LES (79), i bassi livelli di C3 e C4 (80) e la falsa positività del complesso TORCH IgM (80).

Nell'attuale studio sono state reclutate solo donne con i suddetti fattori di rischio aggiuntivi di perdita gravidica al fine di valutare la terapia più efficace per il buon esito della gravidanza. Abbiamo rilevato che, per un gruppo ben definito di pazienti, caratterizzate da triplice positività aPL e da trombosi pregressa, i trattamenti di II livello si associano ad una prevalenza significativamente più alta di nati vivi rispetto ai trattamenti convenzionali.

Si tratta di uno studio di natura retrospettiva cui hanno partecipato 15 centri europei. Nell'ambito dei tre fattori di rischio aggiuntivi, le pazienti erano ben distribuite per numerosità e

anche nei sette profili di rischio i diversi gruppi erano ben rappresentati, ad eccezione dei profili: “triplice positività aPL + LES” e “triplice positività aPL + LES + pregressa trombosi”, che includevano ciascuno meno del 10% dell'intera casistica.

Sono stati raccolti numerosi parametri clinici e di laboratorio. In particolare, il profilo anticorpale era caratterizzato da un'alta frequenza di aCL IgG, LA e  $\alpha 2$ GPI IgG e da una netta prevalenza dell'isotipo IgG che risulta, generalmente, associato ad una maggiore severità clinica dell'APS (87). Le determinazioni di laboratorio sono state eseguite presso i singoli centri con il metodo ELISA, ma con procedure diverse sia “home-made” che commerciali; questo può essere considerato in sintonia con quanto avviene nella pratica clinica reale. L'impegno ostetrico dell'APS era ben rappresentato con netta prevalenza della perdita fetale rispetto alle perdite embrionali e alla prematurità. Questo dato conferma i risultati ottenuti nello studio precedente (82), dove le gravidanze con rischi aggiuntivi, fallite in corso di terapia convenzionale, erano prevalentemente dovute a perdita fetale. Tra tutti i trattamenti usati in corso di gravidanza è prevalso, di gran lunga, quello a base di eparina profilattica  $\pm$  LDA (51,5%); mentre i trattamenti di II livello sono stati usati con minor frequenza (10,4%). L'uso prevalente del trattamento convenzionale, con eparina profilattica  $\pm$  LDA, potrebbe essere giustificato dai risultati riportati dalla letteratura (50,51,52), dove la maggior parte dei trials e degli studi osservazionali, riguardanti la terapia della APS ostetrica, considerano questo trattamento efficace e preferibile all'uso della sola LDA (88,89). E' comunque da sottolineare che la casistica inclusa in questi studi comprende, soprattutto, APS con impegno ostetrico esclusivo e non viene fatta menzione di fattori di rischio aggiuntivi. Invece, lo scarso impiego dei trattamenti di II livello potrebbe essere dovuto alla scarsità dei dati della letteratura e all'alto costo delle procedure impiegate. Nella nostra casistica, abbiamo osservato che i trattamenti di II livello sono stati impiegati quasi sempre in aggiunta a quello convenzionale in donne che avevano avuto perdite di gravidanza in corso di precedente terapia convenzionale e/o in donne che presentavano almeno due fattori di rischio aggiuntivi. Soltanto il 3% delle pazienti non ha ricevuto, in corso di gravidanza, nessun



trattamento; sono andate tutte incontro a perdita gravidica e l'assenza di terapia è risultata significativamente associata all'outcome negativo di gravidanza.

Sarebbe stato interessante analizzare, nel nostro studio, anche i risultati riguardanti i fattori di rischio per trombosi congeniti ed acquisiti ed il calo delle frazioni complementari C3 e C4, tuttavia non è stato possibile ottenere risultati attendibili, a causa dell'alta frequenza di dati mancanti.

L'esito favorevole delle gravidanze considerate globalmente nella nostra casistica di APS con fattori di rischio aggiuntivi è stato del 73,7%, in linea con i dati della letteratura che considerano tutte le varianti cliniche dell'APS. L'età gestazionale al parto, il peso dei neonati in percentile e l'Apgar Score, sono risultati nel range della normalità. Invece si sono osservate complicanze materno-fetali in un quarto delle pazienti e per la maggior parte esse erano sostenute da patologia placentare come è da attendersi in una trombofilia autoimmune gravata da altri fattori di rischio.

Quando sono stati analizzati i risultati in assenza della valutazione del rischio non sono emerse differenze significative tra i diversi trattamenti nella prevalenza dei nati vivi (outcome primario) e negli outcomes secondari che comprendevano le complicanze materno-fetali e le caratteristiche dei neonati. Solamente la settimana gestazionale al parto è risultata significativamente più bassa nelle donne in trattamento di II livello, probabilmente perché si trattava di pazienti più impegnate dal punto di vista clinico e quindi più esposte alla necessità di un parto prematuro.

I dati finora riportati non hanno tenuto in considerazione la stratificazione del rischio. In realtà l'analisi dell'efficacia dei trattamenti non può prescindere dalla stratificazione del rischio ovvero dal confronto dei trattamenti in situazioni omogenee per profili di rischio. Pertanto l'outcome primario è stato valutato in relazione ai sette profili di rischio individuati sulla base dei tre fattori indipendenti per l'insuccesso della gravidanza: la triplice positività aPL, la presenza di LES e la pregressa trombosi. Tuttavia, a causa della scarsa numerosità, non tutti i

trattamenti erano confrontabili nelle varie tipologie di profili di rischio (Tabella 4), pertanto, al fine di consentire una valutazione statistica più consistente, sono stati accorpati tutti i trattamenti convenzionali ovvero l'LDA, eparina profilattica  $\pm$  LDA e eparina terapeutica  $\pm$  LDA. Quest'ultima decisione, di compattare i trattamenti tradizionali per confrontarli con quelli di II livello, è stata presa anche sulla base dei dati emersi da un nostro precedente studio multicentrico (82) che ha evidenziato un' elevata prevalenza di perdita gravidica (76,3%) nelle donne in trattamento con le terapie convenzionali considerate globalmente.

Come si può osservare in Tabella 5 soltanto il profilo “triplice positività aPL + pregressa trombosi” ha mostrato una prevalenza significativamente maggiore dei nati vivi nelle donne in trattamento di II livello, rispetto a quelli in trattamento convenzionale. Pertanto abbiamo analizzato in dettaglio soltanto le caratteristiche di questo profilo. Abbiamo quindi osservato che l'aumento della prevalenza dei nati vivi aumentava significativamente con l'incremento di complessità del trattamento, per raggiungere la massima prevalenza nelle donne in terapia di II livello (Figura 7). La regressione logistica ha confermato la significativa prevalenza di nati vivi nelle donne in trattamento di II livello rispetto a quelli in terapia convenzionale.

Il confronto degli outcomes secondari tra i diversi trattamenti ha mostrato soltanto una età media gestazionale al parto significativamente inferiore nelle donne in terapia di II livello, dove, probabilmente, il parto è stato anticipato ai primi segni di complicanza, al fine di evitare ulteriori rischi in corso di un trattamento così complesso e già di per sé più rischioso della terapia convenzionale. Mentre le complicanze materno-fetali e le caratteristiche dei neonati non sono risultati significativamente diversi nelle donne in trattamento di II livello e in terapia convenzionale.

Quando sono state confrontate le caratteristiche cliniche e di laboratorio nelle donne sottoposte ai diversi tipi di trattamento nell'ambito del profilo “triplice positività aPL+pregressa trombosi”, soltanto una storia di impegno ostetrico dell'APS è risultata significativamente

prevalente nelle donne in terapia di II livello. Questo risultato si può facilmente spiegare perché la maggior parte di queste donne aveva avuto precedenti esperienze di fallimento in terapia convenzionale.

Il nostro rappresenta il primo studio in cui l'efficacia del trattamento nell'APS ostetrica è stata valutata in relazione al rischio. E' emerso che esiste un sottogruppo di pazienti caratterizzato dalla presenza di triplice positività aPL + pregressa trombosi dove la terapia di II livello risulta più efficace per numero di nati vivi rispetto al trattamento convenzionale. Questo risultato è in sintonia con alcuni lavori precedenti che individuano la triplice positività aPL e la pregressa trombosi come fattori di rischio di perdita gravidica (35,81,86).

In particolare il presente lavoro mette in evidenza l'importanza dell'uso del trattamento di II livello nell'APS ostetrica. Attualmente la tipologia di tale trattamento non è ancora ben definita, infatti vengono presi in considerazione i boli di immunoglobuline endovena e i trattamenti aferetici come la plasmferesi e l'immunoassorbimento. I boli di immunoglobuline endovena vengono generalmente riservati alle pazienti che hanno avuto un insuccesso gravidico in corso di trattamento convenzionale (90); essi hanno mostrato un'efficacia nettamente inferiore a quella della terapia convenzionale nella prevalenza dei nati vivi (60,91), oppure nessuna differenza significativa di outcomes rispetto al solo trattamento convenzionale (61). I trattamenti aferetici come la plasmferesi (64,67,66,92) o l'immunoassorbimento (69,93) sono stati finora raramente usati nell'APS ostetrica con risultati nella maggior parte dei casi positivi. Nel nostro studio sono stati usati i trattamenti aferetici e/o le immunoglobuline endovena, nella quasi totalità dei casi (95%), in associazione al trattamento convenzionale. In tutti questi lavori non vengono segnalati effetti collaterali rilevanti in corso di trattamento di II livello.

Alla luce di questi dati è difficile definire il trattamento di II livello ottimale per l'APS ostetrica. Tuttavia, sulla base della attuale esperienza e dei dati della letteratura possiamo sottolineare che i trattamenti di II livello risultano più efficaci se somministrati in associazione alla terapia convenzionale (64,66,67,69,92,93) piuttosto che da soli (60,91).

Possiamo concludere che il trattamento dell'APS ostetrica andrebbe differenziato sulla base del rischio. In particolare, nelle donne con “triplice positività aPL + pregressa trombosi” il trattamento di elezione potrebbe essere quello di II livello associato alla terapia convenzionale. In considerazione della natura retrospettiva del presente studio si auspicano studi prospettici su ampia scala per verificare i nostri risultati e per chiarire se l'indicazione al trattamento di II livello sia valida solo per le donne con pregressa perdita di gravidanza avvenuta in corso di terapia convenzionale o anche per quelle che non hanno sperimentato alcun trattamento perché prive di storia ostetrica.





## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Khamashta M. A. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. Second Edition. Editor Publ Springer, London, UK, 2000, pp 3-19.
2. Punzi L, Ruffatti A. Principali indagini di laboratorio. In: Malattie reumatiche. Todesco S, Gambari PF, Punzi L., McGraw-Hill Publ., Milano, 2007; pp 85-86.
3. Moore JE, Lutz WB. The natural history of SLE: an approach to its study through chronic biologic false positive reactors. *J Chronic Dis*, 1955; 1: 297-316.
4. Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. *Br J Haematol* 1978; 40: 143-151.
5. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; ii: 1211-4.
6. Tincani A, Balestrieri G, Spatola L, Cinquini M, Meroni PL, Roubey RA. Anticardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I immunoassays in the diagnosis of anti-phospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 396-402.
7. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. *Br. Med. J.* 1983; 287: 1088-89.
8. Alarcon Segovia D, Sanchez-Guerriero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 16: 482-88;1989.
9. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RHW, Machin SJ, Barquinero J, Out HH, Harris EN, Villaredell-Torres M, Hughes GRV. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine* 1989; 68: 366-74.
10. Mackworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other diseases. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 362-67.
11. Alarcon Segovia D, Sanchez-Guerriero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16: 482-88.
12. Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-7.
13. 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: $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120-4.
14. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement

on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.

15. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
16. De Groot PG, Derksen RHWM. Specificity and clinical relevance of lupus anticoagulant. *Vessel* 1995; 1: 22-6.
17. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticoagulant activity of  $\beta$ 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992; 68: 297-300.
18. Viard JP, Amoura Z, Bach JF. Association of anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992; 93: 181-6.
19. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL. Autoantibodies. Eds. Elsevier, 2006: 741-745.
20. Oosting JD, Derksen RHWM, 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.
21. 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.
22. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*. 2003; 101: 1827-32.
23. Galli M. Barbui T. Antiphospholipid antibodies and pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16: 211-25.
24. De Laat HB, Derksen RH, Urbanus RT, Roest M, de Groot PG. Beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2004; 104: 3598-602.
25. Reber G, de Merloose P. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies – when and how should they be measured? *Thromb Res* 2004; 114: 527-31.
26. Lee RM, Branch DW, Silver RM. Immunoglobulin Anti-beta2-glycoprotein antibodies in women who experience unexplained fatal death. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 748-53.
27. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus* 2002; 11: 269-75.



28. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 1147-52.
29. Harris EN, Baguley E, Asherson RA, Hughes GRV. Clinical and serological features of the antiphospholipid syndrome (APS). *Br J Rheumatol* 1987; 26 (suppl.2): 19.
30. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
31. Wisloff F, Jacobsen EM, Liestol S. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2002; 108: 263-71.
32. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, Koike T, Ichikawa K, Meroni P, Boffa MC 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.
33. Wong RC, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ, Homes P, Pollock W, Smith S, Steele RH, Sturgess A, Wilson RJ. Consensus guidelines on anti-cardiolipin antibody testing and reporting. *Pathology* 2004; 36: 63-8.
34. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, De Moerloose P, Boffa MC; Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1860-2.
35. Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T, Cavazzana A, Grava C, Noventa F, Tona F, Iliceto S, Pengo V. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost*. 2006; 96: 337-41.
36. 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.
37. Asherson RA, Cervera R, De Groot PG, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12:530-4.
38. Pasquali JL, Poindron V, Korganow AS, Martin T. The antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008; 22: 831-845.
39. Danza A, Ruiz-Irastorza G, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2012; 26: 65–76.
40. Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 2010; 363: 1740–1747.
41. Bick RL. Antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008; 22: 107–120.

42. Branch DW, Silver RM & Porter TF. Obstetric antiphospholipid syndrome: current uncertainties should guide our way. *Lupus* 2010; 19: 446–452.
43. Rai RS, Regan L, Clifford K et al. Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum Reprod* 1995; 10: 2001–2005.
44. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ et al. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010; 376: 631–644.
45. Clark EA, Silver RM & Branch DW. Do antiphospholipid antibodies cause preeclampsia and HELLP syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9: 219–225.
46. Chamley LW, Duncalf AM, Mitchell MD, Johnson PM. Action of anticardiolipin and antibodies to beta2-glycoprotein-I on trophoblast proliferation as a mechanism for fetal death. *Lancet* 1998; 352: 1037-8.
47. Di Simone N, Meroni PL, de Papa N, Raschi E, Caliandro D, De Carolis CS, Khamashta MA, Atsumi T, Hughes GR, Balestrieri G, Tincani A, Casali P, Caruso A. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 140-50.
48. Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, Espinola R, Xiaowei LE, Mao D, Vialpando CG, Salmon JE. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med.* 2002; 195: 211-20.
49. Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 167.e1-5.
50. Kutteh WH. Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1584-9.
51. Rai R, Cohen H, Dave M, Regan L Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholid antibodies (or antiphospholid antibodies). *BMJ* 1997; 314: 253-7.
52. Franklin RD, Kutteh WH. Antiphospholipid antibodies (APA) and recurrent pregnancy loss: treating a unique APA positive population. *Hum Reprod* 2002; 17: 2981-5.
53. Farquharson RG, Quenby S, Greaves M. Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a randomized, controlled trial of treatment. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 408-13.
54. Laskin CA, Spitzer KA, Clark CA, Crowther MR, Ginsberg JS, Hawker GA, Kingdom JC, Barrett J, Gent M. Low molecular weight heparin and aspirin for recurrent pregnancy loss: results from the randomized, controlled HepASA Trial. *J Rheumatol.* 2009; 36:279-87.

55. Empson M, Lassere M, Craig J et al. Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Apr 18; 2:CD002859.
56. Mak A, Cheung MW, Cheak AA, Ho RC. Combination of heparin and aspirin is superior to aspirin alone in enhancing live births in patients with recurrent pregnancy loss and positive anti-phospholipid antibodies: a meta-analysis of randomized controlled trials and meta-regression. *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49: 281-8.
57. Giannakopoulos B and Krilis SA. How I treat the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 11: 2020-2030.
58. Empson M, Lassere M, Craig JC, Scott JR. Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: A systematic review of therapeutic trials. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 135-44.
59. Bussel A, Boulechfar H, Naim R. Synchronisation d'épurations plasmatiques et d'immunoglobulines polyvalentes intraveineuses. Étude consécutive de 11 patients. *Ann Med Interne* 1993; 144: 532–8.
60. Triolo G, Ferrante A, Ciccia F, Accardo-Palumbo A, Perino A, Castelli A, Giarratano A, Licata G. Randomized study of subcutaneous low molecular weight heparin plus aspirin versus intravenous immunoglobulin in the treatment of recurrent fetal loss associated with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:728–31.
61. Branch DW, Peaceman AM, Druzin M, Silver RK, El-Sayed Y, Silver RM, Esplin MS, Spinnato J, Harger J. A multicenter, placebo-controlled pilot study of intravenous immune globulin treatment of antiphospholipid syndrome during pregnancy. The Pregnancy Loss Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 122–7.
62. Bosch T. Therapeutic apheresis—state of the art in the year 2005. *Ther Apher Dial* 2005; 9: 459–68.
63. Szczepiorkowski ZM, Bandarenko N, Kim HC, et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice: evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apher* 2007; 22: 106-75.
64. Frampton G, Cameron JS, Thom M, Jones S, Raftery M. Successful removal of anti-phospholipid antibody during pregnancy using plasma exchange and low-dose prednisolone. *Lancet* 1987; 2: 1023–4.
65. Roberts G, Gordon MM, Porter D, et al. Acute renal failure complicating HELLP syndrome, SLE and antiphospholipid syndrome: successful outcome using plasma-exchange therapy. *Lupus* 2003; 12: 251-7.
66. Ruffatti A, Marson P, Pengo V, Favaro M, Tonello M, Bortolati M, Minucci D, De Silvestro G. Plasma exchange in the management of high risk pregnant patients with primary antiphospholipid syndrome. A report of 9 cases and a review of the literature. *Autoimmun Rev* 2007; 6: 196–202.

67. El-Haieg DO, Zanati MF, El-Foual FM. Plasmapheresis and pregnancy outcome in patients with antiphospholipid syndrome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007; 99: 236-41.
68. Hauser AC, Hauser L, Pabinger-Fasching I, Quehenberger P, Derfler K, Hörl WH. The course of anticardiolipin antibody levels under immunoadsorption therapy. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 446-54.
69. Kobayashi S, Tamura N, Tsuda H, Mokuno C, Hashimoto H, Hirose S. Immunoadsorbent plasmapheresis for a patient with antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 399-401.
70. Maeshima E, Yamada Y, Kodama N, Mune M, Yukawa S. Successful pregnancy and delivery in a case of systemic lupus erythematosus treated with immunoadsorption therapy and cyclosporin A. *Scand J Rheumatol* 1999; 28: 54-7.
71. Nakamura Y, Yoshida K, Itoh S, Kanai Y, Tsuda H, Hashimoto H, Mitsuhashi N, Kuwabara Y. Immunoadsorption plasmapheresis as a treatment for pregnancy complicated by systemic lupus erythematosus with positive antiphospholipid antibodies. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 307-11.
72. Dittrich E, Schmaldienst S, Langer M, Jansen M, Horl WH, Derfler K. Immunoadsorption and plasma exchange in pregnancy. *Kidney Blood Press Res* 2002; 25: 232-9.
73. Bortolati M, Marson P, Chiarelli S, Tison T, Facchinetti M, Gervasi MT, De Silvestro G, Ruffatti A. Case reports of the use of immunoadsorption or plasma exchange in high-risk pregnancies of women with antiphospholipid syndrome. *Ther Apher Dial.* 2009; 13: 157-60.
74. Lima F, Khamashta MA, Buchanan NMM, Kerslake S, Hunt BJ, Hughes GRV. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 131-6.
75. Out HJ, Bruinse HW, Christiaens GC, van Vliet M, de Groot PG, Nieuwenhuis HK, Derksen RH. A prospective, controlled multicenter study on the obstetric risks of pregnant women with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 167: 26-32.
76. Silver RM, Draper ML, Byrne JL, Ashwood EA, Lyon JL, Branch DW. Unexplained elevations of maternal serum alpha-fetoprotein (AFP) in women with antiphospholipid antibodies: a harbinger of fetal death. *Silver RM et al Obstet Gynecol.* 1994; 83: 150-5.
77. Carmona F, Font J, Azulay M, Creus M, Fábregues F, Cervera R, Puerto B, Balasch J. Risk factors associated with fetal losses in treated antiphospholipid syndrome pregnancies: a multivariate analysis. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46: 274-9.
78. Caruso A, De Carolis S, Ferrazzani S, Valesini G, Caforio L, Mancuso S. Pregnancy outcome in relation to uterine artery flow velocity waveforms and clinical characteristics in women with antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol.* 1993; 82: 970-7.

79. Danowski A, de Azevedo MN, de Souza Papi JA, Petri M. Determinants of risk for venous and arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and in antiphospholipid syndrome with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2009; 36: 1195-9.
80. De Carolis S, Botta A, Santucci S, Garofalo S, Martino C, Perrelli A, Salvi S, Ferrazzani S, Caforio L, Scambia G. Predictors of Pregnancy Outcome in Antiphospholipid Syndrome: A Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010; 38: 116-24.
81. Ruffatti A, Tonello M, Cavazzana A, Bagatella P, Pengo V. Laboratory classification categories and pregnancy outcome in patients with primary antiphospholipid syndrome prescribed antithrombotic therapy. *Thromb Res* 2009; 123: 482-7.
82. Ruffatti A, Tonello M, Visentin MS, Bontadi A, Hoxha A, De Carolis S, Botta A, Salvi S, Nuzzo M, Rovere-Querini P, Canti V, Mosca M, Mitic G, Bertero MT, Pengo V, Boffa MC, Tincani A. 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.
83. Marcdante - Kliegman - Jenson - Behrman - Nelson , sezione 10 - medicina fetale e neonatale - Capitolo 54.- Accertamento della madre, del feto e del neonato Nelson - Manuale di Pediatria, Editore: Elsevier – Masson, 2012.
84. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P, Boffa MC. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553-8.
85. Wijetilleka S, Scoble T, Khamashta M. Novel insights into pathogenesis, diagnosis and treatment of antiphospholipid syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*; 2012, 24: 473–481.
86. Bramham K, Hunt BJ, Germain S, et al. Pregnancy outcome in different phenotypes of antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010; 9: 58-64.
87. 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 Feb; 6: 399-401. Epub 2007 Dec 7.
88. Erkan D, Patel S, Nuzzo M et al. Management of the controversial aspects of the antiphospholipid syndrome pregnancies: a guide for clinicians and researchers. *Rheumatology* 2008; 47: 23-7.
89. Thuthill JJ, Kammashta MA, Management of antiphospholipid syndrome, *J autoimmun* 2009; 33: 29-8.
90. Tincani A, Branch W, Levy RA, et al. Treatment of pregnant patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003; 12: 524-529.

91. Dendrinos S, Sakkas E, Makrakis E. Low-molecular-weight heparin versus intravenous immunoglobulin for recurrent abortion associated with antiphospholipid antibody syndrome. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2009; 104: 223–225.
92. Takeshita Y, Turumi Y, Touma S, Takagi N. Successful delivery in a pregnant woman with lupus anticoagulant positive systemic lupus erythematosus treated with double filtration plasmapheresis. *Ther Apher.* 2001 Feb; 5 :22-4.
93. Bussel A, Boulechfar H, Naim R. Immunoglobulins or plasma exchange? Synchronization of plasma exchange and intravenous polyvalent immunoglobulins. A consecutive study of 11 patients. *Ann Med Interne (Paris)*. 1993; 144: 532-8.

## RINGRAZIAMENTI

*Non posso non ringraziare la Prof.ssa Ruffatti, che mi ha dato la possibilità di collaborare con lei e con il suo gruppo, trasmettendomi la sua grande passione per la ricerca e dando vita ad una speciale sinergia di competenze, quali possono essere la Medicina e la Statistica. Con lei voglio ringraziare le persone che in questi anni mi hanno accompagnata, mettendo a disposizione la loro professionalità, in particolare ringrazio la dott.ssa Teresa Del Ross e la dott.ssa Marta Tonello.*

*Un ringraziamento anche alla dott.ssa Ariela Hoxha con la quale ho condiviso varie fasi di questo percorso e a tutti gli altri specializzandi e dottorandi con cui ho potuto condividere importanti occasioni di ricerca in questi anni.*

*Infine un ringraziamento alla mia famiglia e ai miei cari che mi hanno sempre sostenuta nelle mie scelte e incoraggiata in questo percorso così particolare per me.*