



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Direttore: Prof. G. Semenzato

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

**FATTORI DI RISCHIO PER IL PRIMO EVENTO TROMBOTICO IN  
SOGGETTI POSITIVI PER ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI.  
STUDIO MULTICENTRICO, PROSPETTICO, DI FOLLOW-UP**

*Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo*  
*Coordinatore dell'Indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi*  
*Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Amelia Ruffatti*

*Dottoranda: Dott.ssa Manuela Ciprian*

# INDICE

RIASSUNTO.....	Pag. 1
SUMMARY.....	Pag. 3
INTRODUZIONE.....	Pag. 5
- Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL).....	Pag. 5
- La Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS).....	Pag. 7
- Spettro clinico degli aPL.....	Pag. 10
MATERIALI E METODI .....	Pag. 17
- Protocollo di studio.....	Pag. 17
- Determinazione degli anticorpi anticardiolipina e anti- $\beta$ 2 glicoproteina I .....	Pag.18
- Determinazione dei Lupus Anticoagulants.....	Pag. 22
- Analisi statistica.....	Pag. 24
RISULTATI.....	Pag. 26
- Il primo evento trombotico.....	Pag. 29
- Analisi dei fattori di rischio per trombosi.....	Pag. 32
DISCUSSIONE.....	Pag. 37
BIBLIOGRAFIA.....	Pag. 41

## RIASSUNTO

**Introduzione.** La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è definita dalla persistente presenza di anticorpi antifosfolipidi (aPL) nel sangue in associazione a manifestazioni trombotiche e/o impegno ostetrico. Alcuni studi hanno recentemente tentato di identificare gli elementi predittivi dell'evento trombotico negli aPL carriers, ma differenze sostanziali nel disegno degli studi, nei criteri di selezione dei pazienti, nei profili anticorpali e nei fattori di rischio considerati, rendono difficile trarre delle conclusioni definitive.

**Obiettivi.** Identificare i fattori di rischio per il primo evento trombotico nei pazienti positivi per aPL e valutare l'efficacia della profilassi.

**Metodi.** Lo studio ha incluso pazienti/soggetti provenienti da 11 Centri Reumatologici facenti parte del Gruppo di Studio sulla APS della Società Italiana di Reumatologia.

I criteri di inclusione erano i seguenti: età compresa tra 18 e 65 anni, anamnesi negativa per trombosi. I criteri di laboratorio erano: due positività consecutive per aPL, in accordo con i criteri di Sidney, ad almeno 12 settimane di distanza l'una dall'altra. Le donne con l'impegno ostetrico della APS erano incluse. I dati demografici, di laboratorio e clinici erano raccolti all'arruolamento ed annualmente durante il follow-up. Il profilo anticorpale era determinato anche al momento dell'evento trombotico. Gli anticorpi anti-cardiolipina e anti- $\beta$ 2glicoproteina I sono stati determinati da 5 Centri con metodo Elisa "in-house" e dai rimanenti 6 Centri con kits commerciali. Il Lupus Anticoagulant (LA) è stato testato secondo i criteri dell' International Society of Thrombosis and Haemostasis.

**Risultati.** Duecentocinquantotto pazienti/soggetti (223 donne e 35 uomini di età media 40,9 anni  $\pm$  11,1 DS) sono stati reclutati tra l'Ottobre 2004 e l'Ottobre 2008. Il follow-up medio è stato di 35 mesi  $\pm$  11,9 DS (range 1-48). Quattordici pazienti (5,4%, annual incidence rate 1,86%) hanno sviluppato il primo evento trombotico (in 9 casi venoso, in 5 arterioso) durante il follow-up. Sette di questi stavano assumendo un trattamento profilattico al momento dell'evento (6 in modo continuativo ed 1 in corso di gravidanza). In 5 casi il primo evento trombotico si è verificato durante un periodo ad alto rischio (gravidanza/puerperio, immobilizzazione o chirurgia). L'ipertensione ed il LA sono stati identificati dall'analisi multivariata come fattori di rischio indipendenti per la trombosi (OR=3,6 con 95% CI= 1,2-11,  $p<0.05$  e OR=3,7 con 95% CI= 1-13,8,  $p<0.05$ , rispettivamente). E' risultato inoltre che la profilassi con aspirina a basso dosaggio (100 mg) e/o eparina durante i periodi ad alto rischio

è significativamente protettiva (OR=0,1 con 95% CI= 0,01-0,9,  $p<0.05$ ), mentre la profilassi data in modo continuativo non è protettiva.

**Conclusioni.** Da questo studio prospettico di follow-up è risultato, in linea con quanto emerso nel nostro precedente studio retrospettivo, che l'ipertensione è un fattore di rischio per il primo evento trombotico in aPL carriers asintomatici. Inoltre anche il LA è risultato un fattore di rischio per trombosi e la profilassi, somministrata nei periodi ad alto rischio, è risultata, infine, protettiva.

## SUMMARY

**Background.** Antiphospholipid syndrome (APS) is defined by the persistent presence of antiphospholipid antibodies (aPL) in the blood in association with thrombotic events and/or pregnancy morbidity. Several studies have recently endeavoured to identify the predictors of thrombotic events in aPL carriers, but substantial differences in study designs, patient selection criteria, aPL profiles and risk factors make it difficult to draw any conclusions.

**Objectives.** To assess risk factors for first thrombotic events in aPL positive carriers and to evaluate the efficacy of prophylactic treatments.

**Methods.** The study included patients/subjects attending 11 Rheumatologic Centres belonging to the network of the APS Study Group of the Italian Society of Rheumatology. The inclusion criteria were the following: age between 18 and 65 years and no history of thrombosis. The laboratory criteria were: two consecutive, positive aPL tests carried out, in accordance with the Sydney criteria, at least 12 weeks apart. Women with APS-related pregnancy morbidity were also included. Demographic, laboratory and clinical parameters were collected at enrolment and once a year during the follow-up period. Testing was also carried out at the time of the thrombotic event. Anticardiolipin and anti- $\beta$ 2glycoprotein I antibodies were measured in 5 Centres by “in-house” ELISAs and in the remaining 6 Centres by commercial kits. Lupus Anticoagulant (LA) was tested using platelet-poor plasma following internationally accepted guidelines.

**Results.** Two hundred fifty-eight patients/subjects (223 women and 35 men; mean age: 40.9 years  $\pm$  11.1 SD) were recruited between October 2004 and October 2008. The mean follow-up was 35.0 months  $\pm$  11.9 SD. Fourteen patients (5.4%, with an annual incidence rate of 1.86%) developed a first thrombotic event (9 venous and 5 arterial) during the follow-up period. Seven of these were receiving prophylactic treatment at the time of the event (6 continuous and 1 during pregnancy prophylaxis). Five of the first-time events occurred during high risk periods (pregnancy/puerperium, immobilization or surgery). Hypertension and LA activity were identified by multivariate logistic regression analysis as independent risk factors for thrombosis (OR=3.6 with 95% CI= 1.2-11,  $p$ <0.05 and OR=3.7 with 95% CI= 1-13.8,  $p$ <0.05, respectively). It was found, moreover, that thromboprophylaxis with low dose aspirin (100 mg) and/or heparin during high risk periods was significantly protective (OR=0.1 with

95% CI= 0.01-0.9,  $p < 0.05$ ), whereas prophylaxis continuously administered was not protective.

**Conclusions.** The findings of this prospective, follow-up study is in line with those of our previous retrospective one as hypertension was found to be a risk factor for first thrombotic events in asymptomatic aPL carriers. LA was found to be a risk factor for thrombosis, and thromboprophylaxis, administered during high risk periods, was, indeed, protective.

## INTRODUZIONE

### *Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL)*

Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro fosfolipidi, proteine leganti i fosfolipidi o complessi fosfolipide-proteina. La loro associazione con eventi trombotici e/o ben definite complicanze ostetriche configura la Sindrome da aPL (APS) (1), che può verificarsi in forma isolata (APS primaria) o in associazione ad una malattia autoimmune (APS secondaria), principalmente il Lupus Eritematoso Sistemico (LES).

I principali aPL attualmente riconosciuti, secondo una classificazione peraltro ancora non ben definita ed in continua evoluzione, 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) (2).

Gli aCL sono specifici per complessi fosfolipidi-proteine o fosfolipidi di carica elettrica negativa, principalmente la cardiolipina, così chiamata da Pangborn che nel 1941 la isolò da un estratto alcolico di miocardio bovino che veniva usato come sorgente di antigene nella VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), test per la sifilide ancora correntemente usato (3). Nel 1952 venne poi descritta da Moore e Mohr la falsa positività della VDRL in soggetti che non presentavano evidenza clinica di infezione luetica e ne venne segnalata la presenza in pazienti affetti da malattie autoimmuni (4). Nel 1983 venne messo a punto da Nigel Harris un metodo radioimmunologico per la determinazione degli aCL che risultava diverse centinaia di volte più sensibile della VDRL nello svelare tali anticorpi nei pazienti affetti da LES. Gli aCL svelati con tale metodo erano fortemente associati con i LA, la falsa positività per la VDRL e le trombosi (5). Al metodo radioimmunologico seguirono ben presto le metodiche immunoenzimatiche (ELISA), oggi in uso (6). Tali metodiche sono di facile esecuzione e vengono utilizzate per la determinazione degli anticorpi specifici per i fosfolipidi, per i complessi fosfolipidi-proteine e per le proteine leganti i fosfolipidi. Si possono così distinguere gli aCL "veri" che si legano ai soli fosfolipidi e sono in genere privi di significato clinico, e gli aCL "spuri" diretti contro complessi fosfolipidi-proteine, fra cui principalmente la  $\beta$ 2-GPI, che sono in maggior misura legati alle manifestazioni cliniche della APS (7-9). Le metodiche ELISA sono state oggetto di numerosi tentativi di standardizzazione finalizzati a renderle più specifiche e ripetibili; i risultati sono sufficientemente attendibili da quando sono

stati introdotti degli standards per il calcolo dei livelli anticorpali (unità GPL e MPL) e si sono resi disponibili sieri di riferimento con valori noti delle stesse unità (10).

I LA sono anticorpi anti- $\beta_2$ -GPI, anti-protrombina e antifosfolipidi anionici che in vitro determinano l'allungamento del tempo di coagulazione nei test emocoagulativi fosfolipide-dipendenti. Individuati per la prima volta nel 1952 da Conley ed Hartmann (11) nel siero di due pazienti affetti da LES, essi agiscono inibendo l'attivazione della protrombina in trombina e quindi del fibrinogeno in fibrina, con conseguente ritardo nella formazione del coagulo. In generale la positività per LA viene considerata più specifica per APS, mentre gli aCL sono ritenuti più sensibili (12). Nonostante la frequente concordanza fra i LA e gli aCL (13) e gli anti- $\beta_2$ -GPI (14), questi anticorpi non sono identici. Infatti alcuni LA reagiscono con fosfolipidi diversi dalla cardiolipina o con proteine diverse dalla  $\beta_2$ -GPI (15,16), mentre alcuni aCL (13) e alcuni anti- $\beta_2$ -GPI (14) non hanno attività anticoagulante lupica.

Gli anti- $\beta_2$ -GPI rappresentano i principali anticorpi anti-cofattore. La scoperta dei cofattori risale all'inizio degli anni '90 quando due gruppi dimostrarono che il vero bersaglio antigenico degli anticorpi antifosfolipidi non sono i fosfolipidi di per sé, ma delle proteine plasmatiche, denominate appunto cofattori, legate ad una superficie anionica, non necessariamente antifosfolipidica (7,8). I cofattori possono reagire con gli anticorpi specifici sia da soli sia legati ai fosfolipidi anionici. Tra essi si annoverano la  $\beta_2$ -GPI (7-8, 17), la protrombina (16, 18-19), l'annessina V (20), la proteina C attivata e la proteina S (15), le LDL ossidate (21) e vari altri. Il più noto fra i diversi cofattori è la  $\beta_2$ -GPI. In vitro essa si comporta come un inibitore della coagulazione impedendo l'attivazione della protrombina da parte dei fattori Xa e Va su una superficie fosfolipidica. Essa inoltre fungerebbe da antiaggregante piastrinico, inibendo l'aggregazione ADP-dipendente. In vivo, invece, il suo ruolo non è noto, dato che la sua carenza non sembra associata ad un aumento del rischio trombotico. E' dimostrato che gli anticorpi anti-cofattore, isolato o complessato con i fosfolipidi (in particolare gli anti- $\beta_2$ -GPI e gli anti-protrombina), sono più specifici per malattia autoimmune rispetto agli altri anticorpi diretti contro i soli fosfolipidi anionici, pur essendo stati descritti anche in altre forme morbose, in particolare quelle di natura infettiva (6-8).



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

Benché la prima definizione della APS risalga al 1987 (1), solo nel 1999 (22) vennero stabiliti dei criteri ufficialmente accettati per la classificazione della Sindrome. Tali criteri sono stati rivisti nel corso dell'XI Congresso Internazionale sugli Anticorpi Antifosfolipidi (Sidney, 2004) e pubblicati di recente (2). La APS richiede la combinazione di almeno uno fra i criteri clinici ed uno fra i criteri di laboratorio.

### **CRITERI CLINICI**

#### **1. Trombosi vascolari**

Uno o più episodi di trombosi arteriosa, venosa o dei piccoli vasi, in qualsiasi tessuto od organo. 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.

#### **2. Impegno ostetrico**

- a. 1 o più perdite da causa sconosciuta di un feto morfologicamente normale in età gestazionale  $\geq 10^\circ$  settimana;
- b. 1 o più nascite premature di un neonato morfologicamente normale in età gestazionale  $< 34^\circ$  settimana, per severa preeclampsia o eclampsia o insufficienza placentare;
- c. 3 o più aborti da causa sconosciuta, consecutivi, spontanei, in età gestazionale  $< 10^\circ$  settimana. Vanno escluse le cause anatomiche, ormonali e cromosomiche.

## CRITERI DI LABORATORIO

1. Presenza nel plasma dei LA, in due o più determinazioni eseguite ad almeno 12 settimane di distanza l'una dall'altra. Essi devono essere determinati secondo le linee guida della Società Internazionale di trombosi ed emostasi (23).
2. Presenza nel siero di aCL diretti contro il complesso cardioplipina/ $\beta$ 2-GPI. 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 (24-26).
3. Presenza nel siero di anticorpi anti- $\beta$ 2-GPI 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 (27).

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
  - Ia : solo LA positivo
  - Ib : solo aCL positivo
  - Ic: solo anti- $\beta$ 2-GPI positivo

Si sottolinea che la trombosi può essere più frequente quando coesistono più fattori di rischio e che le attuali evidenze suggeriscono che la positività antifosfolipidica multipla è associata con una forma più severa di malattia aumentando in maniera significativa il rischio trombotico (28). Infine, poiché non sono state riscontrate differenze cliniche fra la forma

primaria e quella secondaria della APS, si invita, piuttosto che a distinguere i pazienti, a documentare la coesistenza di LES o di altre malattie (Tab. 1).

**Tabella 1.** Prevalenza della APS nelle seguenti patologie autoimmuni

PATOLOGIA AUTOIMMUNE	PREVALENZA NELLA APS
Lupus Eritematoso Sistemico	36,2%
Lupus-like Syndrome	5%
Sindrome di Sjögren	2,2%
Artrite Reumatoide	1,8%
Sclerosi Sistemica	0,7%
Vasculiti Sistemiche	0,7%
Dermatomiosite	0,5%

Le differenze più rilevanti rispetto ai precedenti criteri classificativi di Wilson et al. (22) riguardano soprattutto il laboratorio, dove sono stati introdotti come criterio gli anti-β2-GPI, è stata consigliata la definizione dei cut-off in percentili (in riferimento a valori ottenuti da un campione di 100 donatori di sangue) ed è stato modificato l'intervallo fra le due determinazioni consecutive (da 6 a 12 settimane). Nella pratica clinica infatti non è infrequente una positività anticorpale transitoria, legata per esempio ad eventi infettivi intercorrenti (29) ed in circa ¼ dei pazienti si assiste a variazioni spontanee degli aPL. Il presupposto è che il nuovo intervallo non riduca la sensibilità dei criteri (2, 30), ma conferisca maggior sicurezza affinché gli aPL riscontrati siano rilevanti nel predisporre all'APS. Tuttavia la scelta di tale intervallo rimane basata sull'opinione di esperti ed a tutt'oggi non vi sono studi di validazione (2, 31).

Dal punto di vista clinico è stato fissato l'intervallo cronologico fra l'evento clinico e il riscontro della positività di laboratorio che prima, invece, rimaneva discrezionale. Inoltre è stato introdotto il concetto di stratificazione del rischio, ovvero di suddivisione dei pazienti con APS in base alla presenza o assenza di altri fattori di rischio per trombosi, sia arteriosa che venosa.

## *Lo spettro clinico degli aPL*

Le manifestazioni cliniche degli aPL coprono un ampio spettro ( Tab.2).

**Tabella 2.** Spettro clinico degli anticorpi antifosfolipidi (aPL)

- APS con eventi vascolari
- APS catastrofica
- APS con manifestazioni ostetriche
- Pazienti con positività degli aPL e manifestazioni non trombotiche
- Soggetti con positività per aPL, asintomatici (aPL carriers)

Nell'ambito delle manifestazioni vascolari della APS si possono osservare quadri clinici di diversa gravità, che vanno dalla trombosi venosa profonda singola o multipla, alla trombosi arteriosa singola o multipla, alla trombosi del microcircolo, alla sindrome catastrofica. Quest'ultima ha una prevalenza nell'APS dell'1% ed è caratterizzata dall'interessamento clinico, in un periodo di giorni (meno di una settimana), di almeno tre organi, con evidenza istopatologica di occlusioni multiple dei piccoli vasi. E' associata ad una prognosi molto severa con mortalità intorno al 50% dei casi (32).

Nella APS 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 (31).

La trombosi venosa, specialmente a carico dei vasi profondi degli arti inferiori, è la più comune manifestazione della Sindrome ed è complicata fino nel 50% dei casi da embolia polmonare. La trombosi arteriosa rappresenta un evento meno frequente e la gravità clinica è correlata alla sede, all'estensione dell'occlusione e alla rapidità con cui si instaura. Il distretto cerebrovascolare è la sede più comune di trombosi arteriosa; seguono il distretto coronarico e quindi le localizzazioni meno frequenti come l'a. succlavia, l'a. renale, l'a. retinica e le arterie delle gambe.

L'impegno ostetrico comporta, oltre alle manifestazioni indicate nei criteri classificativi, numerose altre complicanze gravidiche sia materne che fetali. Tra le complicanze fetali sono da segnalare: il ritardo di crescita intrauterino (IUGR), l'oligoidramnios, il distacco intempestivo di placenta, il parto pretermine, o per rottura prematura delle membrane o indotto per sofferenza fetale. Delle complicanze materne ricordiamo: la preeclampsia o

gestosi, le trombosi arteriose o venose, la corea gravidarum (disturbi dei movimenti), la sindrome sierositica post-partum (pleurite, pericardite).

Varie manifestazioni cliniche, che risultano associate agli aPL, non sono tuttavia considerate criterio clinico per la diagnosi di Sindrome. 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 (Tab. 3).

**Tabella 3:** Definizione delle manifestazioni cliniche non trombotiche della APS<sup>[2]</sup>.

MANIFESTAZIONE	DEFINIZIONE
Piastrinopenia	Conta piastrinica inferiore a 100.000/ $\mu$ l, confermata a distanza di almeno 12 settimane.
Malattia cardiaca valvolare	Ecocardiografia positiva per lesione e/o rigurgito e/o stenosi della valvola mitrale e/o aortica.
Livedo reticularis	Disegno cutaneo persistente e non reversibile col calore, violaceo, rosso o blu, reticolare o uniforme, su tronco, braccia o gambe.
Nefropatia	Microangiopatia trombotica di arteriole e capillari glomerulari e/o una o più caratteristiche istologiche specifiche <sup>°</sup> .

<sup>°</sup>Caratteristiche istologiche: fibrosi intimale ed iperplasia con o senza ricanalizzazione, occlusione fibrocellulare o fibrosi di arterie o arteriole, atrofia corticale focale, depositi eosinofili in aree di atrofia tubulare<sup>[33]</sup>.

Nel Consensus di Sidney, pur riconoscendo trattarsi di aspetti clinici frequenti nella APS, viene ribadita la non specificità degli stessi (2).

Esiste infine il gruppo dei soggetti positivi per aPL in assenza di qualsivoglia manifestazione clinica della sindrome (aPL carriers). I dati epidemiologici relativi agli aPL ne mostrano una relativamente ampia distribuzione al di fuori dell'APS. Sono stati trovati in soggetti apparentemente sani con una prevalenza variabile dall'1 al 5% sia gli aCL che i LA (34). Come per altri autoanticorpi, la prevalenza aumenta con l'età (35) e ancor più negli anziani

affetti da malattie croniche (34). Inoltre gli aPL si ritrovano in numerose malattie come le infezioni e i tumori, nei disordini indotti dai farmaci e, soprattutto, in diverse malattie autoimmuni.

La frequenza di aPL carriers nelle malattie autoimmuni (Tab. 4) è stata indagata in diversi studi.

**Tabella 4.** Prevalenza dei carriers di antifosfolipidi (aPL) in corso di patologie autoimmuni

Patologia Autoimmune	Prevalenza aPL carriers
Lupus Eritematoso Sistemico	23%
Sindrome di Sjögren	10%
Artrite Reumatoide	28%
Sclerosi Sistemica	19%
Sclerosi Multipla	32,6%
Tireopatie Autoimmuni	43%

Nel LES, ad esempio, la prevalenza varia dal 12 al 30% (36, 31) per gli aCL, dal 15 al 34% per i LA (31,37) e si aggira intorno al 20% per gli anti- $\beta$ 2GPI (38).

La prevalenza degli aPL in corso di Sindrome di Sjögren è stata riscontrata nel 10% dei pazienti (39), mentre nell'Artrite Reumatoide sale al 28% (40). Si pone al 19% dei pazienti in corso di Sclerosi Sistemica (41). Studi epidemiologici hanno evidenziato la presenza cospicua degli aPL anche in corso di Sclerosi Multipla e di Tiroiditi Autoimmuni. Precisamente nell'ambito della Sclerosi Multipla la prevalenza degli aPL è del 32,6% (42-43) mentre è risultata del 43% nell'ambito delle Tireopatie Autoimmuni (44).

Soltanto una parte dei soggetti positivi per aPL sviluppa le manifestazioni cliniche tipiche della APS. Al momento non si sa perché alcuni aPL carriers sviluppino l'evento trombotico ed altri no. Potrebbe essere importante, nell'indurre la comparsa dell'evento vascolare, la presenza di un fattore di rischio addizionale. Il ruolo svolto dai fattori di rischio aggiuntivi, congeniti e acquisiti, reversibili e non, rimane un'area di investigazione corrente, anche se appare evidente che l'eliminazione dei fattori di rischio reversibili e la profilassi durante i

periodi ad alto rischio (come gli interventi chirurgici o l'immobilizzazione prolungata) sono cruciali per la profilassi primaria della trombosi (45,46).

Rispetto al rischio di sviluppare una trombosi per un soggetto positivo per aPL, disponiamo dei risultati di alcuni studi retrospettivi eseguiti negli anni '90; uno di questi (47) riscontrava la correlazione di nuovi eventi trombotici con la positività ad alto titolo degli aCL IgG, dato non confermato nel secondo studio dove peraltro non erano considerati altri aPL al di fuori degli aCL (48). Un terzo studio (49) infine mostrava l'efficacia della profilassi a lungo termine con ASA in una coorte di 65 donne affette dalla forma ostetrica della Sindrome. Tuttavia due di questi studi (47,48) non erano ristretti ai soli aPL carriers ma consideravano anche pazienti già affetti dalla forma vascolare e/o ostetrica della APS; il terzo (49) presentava la restrizione del campione ad un solo sesso; tutti classificavano l'APS su criteri diversi da quelli attuali anche perché eseguiti in epoca antecedente, per cui nessuno studio considerava l'eventuale positività per anti- $\beta$ 2GPI; infine non era considerata la presenza di fattori di rischio per l'evento trombotico concomitanti. Uno studio retrospettivo più recente, del 2004 (50), dimostra che livelli elevati di aCL predicono stroke e TIA soltanto nella popolazione di sesso femminile e indipendentemente da altri fattori di rischio. Si tratta tuttavia di uno studio che presenta alcuni limiti: è stato eseguito su una popolazione di età media abbastanza avanzata (59 anni), non ha valutato l'effetto di altri fattori di rischio per trombosi e si è basato per la definizione di positività antifosfolipidica su una sola determinazione anticorpale.

Disponiamo dei risultati anche di due studi "cross-sectional" (51,28). Il primo (51), che includeva sia pazienti affetti da APS che carriers asintomatici, ha individuato che la probabilità di un evento trombotico era aumentata dalla gravidanza o da interventi chirurgici soltanto nella popolazione di sesso femminile. Inoltre l'ipertensione, il fumo e l'associazione di più fattori di rischio per trombosi erano significativamente associati con eventi trombotici arteriosi.

Il secondo (28) era basato su una sola determinazione di anticorpi antifosfolipidi e comprendeva una popolazione affetta da numerose co-morbidità caratterizzate soprattutto da progressi eventi trombotici. Tale studio ha rivelato che i titoli elevati di aCL e le positività multiple per aPL sono associate con un aumentato rischio di un precedente evento trombotico. Sono stati pubblicati inoltre tra il 1992 ed il 2009 numerosi studi di tipo "caso-controllo" (52-58). Alcuni sostengono l'associazione con la trombosi degli alti livelli di aCL (52,53,58), mentre altri (56,54) negano questa associazione. In aggiunta Saidi et al. (58) definiscono

come fattori di rischio per stroke anche il LA e gli anticorpi anti-fosfatidilserina; mentre De Groot et al. (55) trovano la più forte associazione con la trombosi venosa nella combinazione di LA, anti- $\beta$ 2GPI e anti-protrombina. Infine Neville et al. (57) definiscono gli aPL fattori predittivi di trombosi arteriosa e di tromboembolismo venoso, soprattutto nei primi 2 anni di follow-up. La maggior parte di questi studi presenta alcuni limiti, come l'età media elevata nella popolazione di studio (54,56), la definizione di positività antifosfolipidica sulla base di una sola determinazione anticorpale (52-58), la mancanza di valutazione di altri fattori di rischio per trombosi (52,54-56,58); inoltre alcuni considerano una popolazione comprendente anche pazienti con pregressa trombosi (57,56,54) e non esclusivamente carriers.

Di maggior interesse scientifico sono i tre studi prospettici; in particolare quello di Finazzi et al. (59) è uno studio multicentrico che considera una coorte di 360 pazienti (118 uomini e 242 donne), positivi per aCL e/o LA, seguiti per un follow-up medio di 3,9 anni. Una parte di questi soggetti era già affetto dalla APS, mentre gli altri erano carriers. In questo studio non sono stati considerati gli anticorpi anti- $\beta$ 2GPI né sono stati analizzati altri fattori di rischio per trombosi. Gli autori hanno trovato una bassa incidenza di trombosi (2,5% pazienti/anno) e come fattori indipendenti predittivi per trombosi un precedente evento trombotico e livelli di aCL >40 U.

Giron Gonzales et al (46) hanno considerato una popolazione di 404 soggetti, positivi per aCL e/o LA secondo i criteri di Sapporo (22), che hanno suddiviso in due gruppi composti rispettivamente da 226 pazienti affetti da APS (in 176 casi vascolare, in 55 casi ostetrica) e 178 carriers. Il primo gruppo è stato esaminato retrospettivamente: gli interventi chirurgici e la prolungata immobilizzazione sono risultati associati significativamente al tromboembolismo venoso, mentre l'ipercolesterolemia e l'ipertensione arteriosa alla trombosi arteriosa. Invece i carriers di aPL sono stati studiati prospetticamente e non hanno manifestato alcun evento trombotico. Vi è da dire tuttavia che 15 di essi (8,4%) erano stati trattati con profilassi primaria in occasione di situazioni ad alto rischio (immobilizzazione, chirurgia, gravidanza).

Forastiero et al. (60) hanno considerato una popolazione mista di pazienti con APS e carriers e si sono posti l'obiettivo di valutare il valore predittivo per trombosi degli anticorpi anti- $\beta$ 2GPI e anti-protrombina. Gli autori hanno concluso che la presenza di anti- $\beta$ 2GPI e anti-protrombina è predittiva di un rischio più elevato di eventi tromboembolici soprattutto nei pazienti positivi per LA.



L'uso della profilassi primaria nei soggetti positivi per aPL è controverso (51,61). Infatti Erkan et al. (51) in un primo studio cross-sectional avevano dimostrato che l'uso dell'aspirina e/o dell'idrossiclorochina poteva essere protettivo contro la trombosi nei carriers asintomatici, mentre gli stessi autori successivamente con un trial randomizzato, controllato, a doppio cieco con placebo (61) hanno dimostrato che la profilassi primaria della trombosi con aspirina a basso dosaggio non risulta protettiva nei soggetti positivi persistentemente per aPL.

Per quanto riguarda la nostra esperienza nel 2004 è stato promosso dal Gruppo di Studio della APS della Società Italiana di Reumatologia uno studio ambispettivo per la sorveglianza dei soggetti positivi per aPL e con anamnesi negativa per trombosi vascolare, con l'obiettivo di valutare i fattori predittivi di un primo evento trombotico e l'efficacia della profilassi primaria.

La parte retrospettiva (62) è stata condotta con i dati raccolti da 11 Centri Reumatologici Italiani ed ha considerato una popolazione di 370 soggetti, di età media 34 anni, positivi per anticorpi antifosfolipidi, senza storia di trombosi, seguiti per un follow-up medio di 59,3 mesi. Sono state comprese nello studio anche le donne con Sindrome ostetrica esclusiva. I dati sono stati raccolti seguendo i criteri di Sapporo (22). Durante il follow-up sono stati registrati 30 eventi trombotici (incidenza 1,64 per 100 pazienti/anno), dei quali 12 venosi e 18 arteriosi. Sette eventi si sono verificati durante periodi ad alto rischio trombotico e 8 in corso di profilassi (ASA o eparina). Dall'analisi statistica multivariata l'ipertensione ed i livelli medio/alti di aCL G sono risultati fattori di rischio indipendenti per il primo evento trombotico (OR 7.14 con 95%CI 2.63-19.40 e 3.43 con 95%CI 1.38-8.50, rispettivamente). Inoltre la profilassi anti-trombotica a lungo termine e nei periodi ad alto rischio, considerata insieme, è risultata protettiva (OR 0.07 con 95%CI 0.02-0.24).

Allo scopo di verificare i risultati ottenuti nello studio retrospettivo abbiamo successivamente avviato la parte prospettica, che costituisce l'oggetto della tesi.



# MATERIALI E METODI

## Protocollo di Studio

Abbiamo condotto uno studio osservazionale multicentrico prospettico di una coorte di soggetti positivi per aPL, con anamnesi negativa per manifestazioni trombotiche (arteriose, venose o del microcircolo). E' stata tollerata la presenza dell'impegno ostetrico della APS, diagnosticato sulla base dei criteri della letteratura (2). I pazienti erano testati per aPL per le seguenti ragioni: precedente sindrome ostetrica, Lupus Eritematoso Sistemico o altre malattie autoimmuni, familiarità per aPL o APS, prima di cominciare terapia con estro-progestinici o trattamento ormonale sostitutivo, per allungamento del tempo di tromboplastina parziale attivata o per falsa positività per la sifilide.

Sono stati arruolati pazienti che presentavano i seguenti requisiti:

- Età compresa tra 18 e 65 anni
- Almeno 2 positività consecutive, a distanza di almeno 12 settimane l'una dall'altra, per i seguenti aPL: aCL IgG e/o IgM a titolo medio/alto, anti-β2GPI IgG e/o IgM a titolo medio/alto, Lupus Anticoagulants. Tali caratteristiche sierologiche risultano conformi ai criteri di Myiakis et al. del 2006 (2).

E' stato considerato "tempo zero" il momento del riscontro della conferma della positività per aPL, pertanto in tale momento di ogni paziente venivano registrati:

- Dati demografici (età e sesso)
- Presenza nel soggetto di malattie autoimmuni
- Per le pazienti di sesso femminile gli eventi ostetrici: gravidanze a termine e/o presenza di APS ostetrica definita, secondo i criteri di Myiakis, di tipo a, b o c (2)
- Profilo autoanticorpale: anticorpi anti-fosfolipidi (aCL IgG/IgM e anti-β2 IgG/IgM a titolo medio/alto, LA), anticorpi anti-nucleo (ANA), anti-DNA doppia elica, anti-antigeni nucleari estraibili (anti-ENA)
- Fattori di rischio per trombosi sia arteriosa che venosa: fumo, diabete mellito, ipercolesterolemia (livelli di colesterolo totale  $\geq$  240mg/dl o assunzione di terapia ipolipemizzante), ipertensione arteriosa (livelli di pressione sistole/diastolica tali da

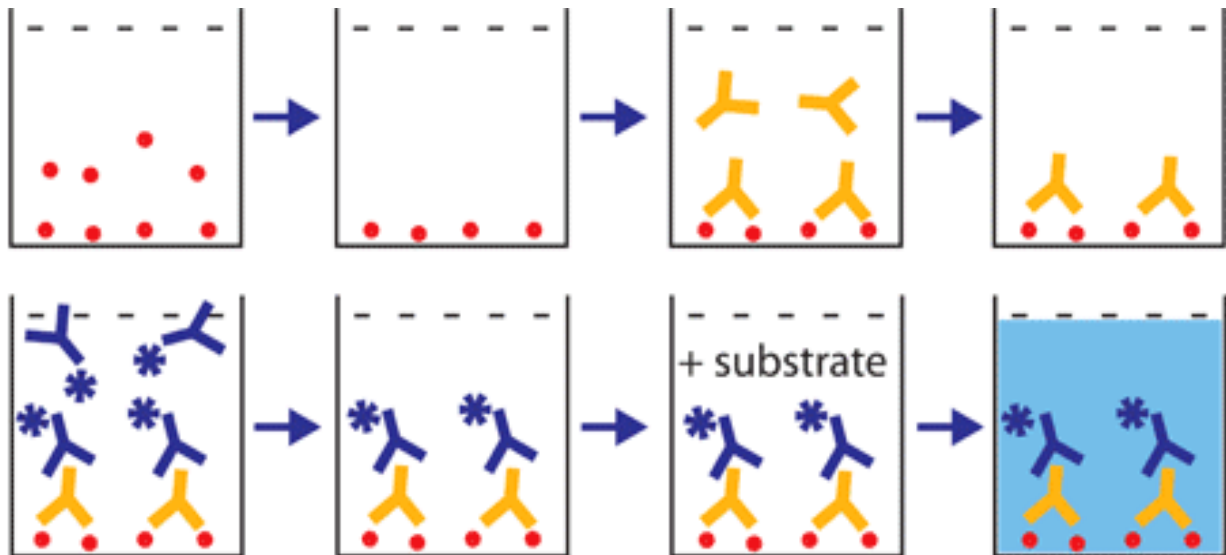
- Profilassi antitrombotica con antiaggreganti e/o anticoagulanti, differenziando se assunta in modo continuativo o soltanto in concomitanza a periodi considerati ad alto rischio trombotico (quali la gravidanza/puerperio e gli interventi chirurgici o immobilizzazioni prolungate). I motivi dell'assunzione della profilassi anti-trombotica continuativa con aspirina a basso dosaggio erano: presenza di LES o altre malattie autoimmuni, l'impegno ostetrico dell'APS, la positività per LA e la trombocitemia; mentre la profilassi continuativa con warfarin era assunta per la presenza di ipertensione polmonare in malattia autoimmune sistemica.

L'arruolamento dei soggetti (tempo 0) avveniva tra il 15 Ottobre 2004 ed il 15 Ottobre 2006: ogni soggetto veniva seguito in regime ambulatoriale con un follow-up annuale fino al termine dello studio fissato per il 15 Ottobre 2008. Il periodo di follow-up risultava quindi variabile da un minimo di 2 ad un massimo di 4 anni. Ad ogni follow-up venivano registrati nuovamente i parametri clinici sopra riportati ed il profilo anticorpale aggiornati. Il follow-up veniva interrotto prima della data stabilita e quindi il soggetto usciva dallo studio per la comparsa di un evento trombotico o in caso di mancata compliance o di decesso per altre cause. In caso di evento trombotico venivano nuovamente registrati tutti i parametri sopra elencati, aggiornati alla situazione del paziente al momento della trombosi.

La dimostrazione dell'evento trombotico doveva essere effettuata con una o più delle seguenti metodiche di imaging: l'ecodoppler arterioso e/o venoso, la scintigrafia ventilo-perfusoria, la TC spirale, la risonanza magnetica cerebrale, l'angiografia e la biopsia tissutale con esame istopatologico.

### **Determinazione degli anticorpi anticardiolipina e anti- $\beta$ 2glicoproteina I**

Per la determinazione degli aCL e degli anti- $\beta$ 2GPI è stato utilizzato da 5 Centri partecipanti un metodo immunoenzimatico (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) home made (Fig.1) allestito sulla scorta dei requisiti minimi fissati dall' "European Forum on Antiphospholipid Antibodies" (10,27).



**Figura 1: Schema del metodo ELISA**

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

I valori di cut off per i livelli medio/alti erano in tutti i Laboratori il 99° percentile ottenuto testando 50-100 soggetti sani omogenei per sesso ed età con il gruppo di studio.

Gli altri 6 Centri hanno usato per la determinazione kit commerciali ed hanno seguito nella definizione dei risultati le istruzioni indicate dalla Ditta fornitrice.

Descriviamo di seguito la metodica “home made” eseguita presso il nostro Laboratorio.

#### Protocollo per la determinazione degli anticorpi anti-cardiolipina (aCL)

Venivano seminati 25 µl/pozzetto di una soluzione di cardiolipina bovina (Sigma Chemicals, St Louis, MO), in etanolo assoluto alla concentrazione finale di 50 µg/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>x2H<sub>2</sub>O 76g, NaCl 48g, H<sub>2</sub>O a 10 litri a pH=7,2), 150 µl/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 µl/pozzetto) e venivano seminati in doppio (100 µl/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 µl/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 µl/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.

Riportiamo di seguito il protocollo seguito presso il nostro Laboratorio per la determinazione degli anticorpi anti- β<sub>2</sub>GPI.

#### Protocollo per la determinazione degli anticorpi anti-β<sub>2</sub>GPI

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 β<sub>2</sub>GPI 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  $\beta_2$ GPI. Le piastre venivano lasciate in frigo (+4°C) *overnight*.

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.

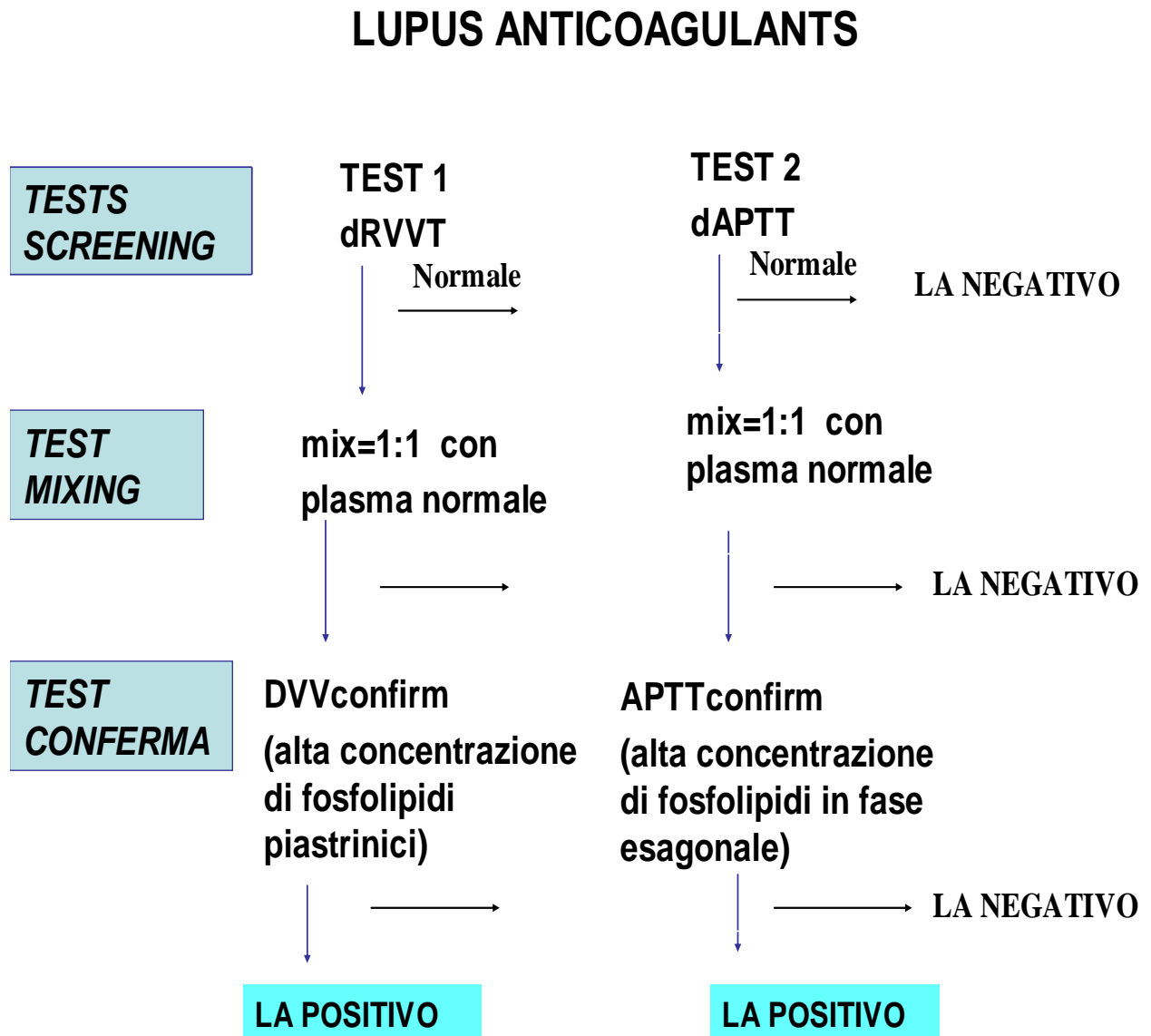
Scaduta l'ora di incubazione, svuotate le piastre del bloccaggio, si seminavano in doppio 100 µl/pozzetto i sieri diluiti e quelli delle curve (dalla soluzione più diluita alla più concentrata, lasciando il primo punto in bianco, corrispondente a concentrazione nulla), lasciando solo la soluzione tampone 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 (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 (63), (HCAL per gli anti- $\beta_2$ GPI IgG e EY2C9 per gli anti- $\beta_2$ GPI 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.

## 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 (23) (Figura 2).



**Figura 2.** Determinazione dei Lupus Anticoagulants (LA) : Brandt et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 74:1185,1995.



Venivano utilizzati come tests di screening 2 tipi diversi di test emocoagulativi fosfolipide-dipendenti: il dRVVT (tempo del veleno di vipera di Russell diluito) che, attivando il Fattore X, esplora la via comune della cascata coagulativa, ed il dAPTT (tempo di tromboplastina parziale attivata con fosfolipidi diluiti) che esplora invece la via intrinseca. I cut off venivano determinati con l'utilizzo di 20 plasmi di donatori abituali di sangue ed espressi come media in secondi + 2,5 deviazioni standard.

- Test dRVVT: è un test che attiva direttamente il Fattore X (via comune) in presenza di fosfolipidi, a bassa concentrazione, e calcio. Veniva usato un kit commerciale. I plasmi di pazienti che presentavano un tempo di coagulazione allungato venivano mescolati alla stessa concentrazione con un pool di plasmi di pazienti sani (1:1) per escludere che l'allungamento fosse dovuto al deficit di uno dei fattori della coagulazione della via comune. Il valore veniva espresso come ratio (valore del mix/valore del pool di sani). Quando la ratio dava un valore allungato si passava al test di conferma eseguito con l'utilizzo di un kit commerciale contenente un' elevata concentrazione di fosfolipidi, che permetteva di valutare la presenza dei LA misurando la ratio (valore del test dRVVT/valore del test di conferma): i pazienti con un valore inferiore alla soglia determinata sui soggetti sani di controllo venivano considerati negativi per la presenza di LA e venivano testati con il secondo test coagulativo (dAPTT); quelli con una ratio superiore alla soglia venivano considerati pazienti positivi per la presenza di LA nel loro plasma.
- Test dAPTT: è un test che valuta la presenza di anticorpi che interferiscono con la via intrinseca della coagulazione. Tale test utilizza un kit commerciale contenente cefalina estratta da tessuto cerebrale di coniglio, utilizzata come attivatore della silice. I plasmi dei pazienti che presentavano un tempo di coagulazione allungato venivano mescolati alla stessa concentrazione con un pool di plasmi di pazienti sani (1:1) per escludere che l'allungamento fosse dovuto ad un deficit di uno dei fattori di coagulazione della via intrinseca. Il valore veniva espresso come ratio (valore del mix/valore del pool di sani) e quando la ratio era allungata si passava al test di conferma utilizzando un altro kit commerciale. Questo test consiste nel valutare il dAPTT con (Clotting time 2) e senza (Clotting time 1) fosfolipidi esagonali dopo aver mescolato il plasma in esame con un pool di controlli sani (1:1). I fosfolipidi esagonali sono in grado di neutralizzare i LA nel caso in cui siano presenti nel plasma. I risultati venivano

espressi come differenza tra clotting time 1 e 2. Risultati inferiori al valore di soglia indicavano un plasma negativo per LA, mentre quelli superiori indicavano presenza di LA nel plasma.

In presenza di positività ad almeno uno dei 2 test di screening si passava allo step successivo:

- Test di mixing il cui scopo era stabilire se l'allungamento del tempo di coagulazione fosse dovuto al deficit di uno o più fattori della coagulazione. In tal caso si otteneva la correzione del tempo di coagulazione con l'aggiunta al campione in esame di un pool di plasmi ottenuti da donatori.

In caso mancata correzione del tempo di coagulazione si passava al test successivo.

- Test di conferma (DVV confirm o APTT confirm). La conferma della positività per LA si otteneva quando il tempo di coagulazione si correggeva in seguito all'aggiunta di un eccesso di fosfolipidi, i quali erano in grado di neutralizzare i LA e di annullarne l'effetto.

### **Analisi statistica**

Le variabili categoriali analizzate nello studio sono descritte secondo le distribuzioni di frequenze assolute e relative, mentre le continue (età all'ingresso dello studio e durata del follow-up) sono presentate con medie e deviazioni standard.

L'analisi univariata, per la valutazione dell'associazione dell'evento trombotico con i diversi fattori di rischio, è stata condotta tramite il calcolo dei test statistici del Chi quadrato di Pearson e di Fisher e dei "crude" odds ratios (OR) con intervalli di confidenza al 95% (CI). Nell'analisi univariata è stata condotta anche l'analisi della sopravvivenza con il metodo Kaplan Meier e con il log rank test per analizzare il tempo di sopravvivenza all'evento trombotico nei gruppi di pazienti con e senza il fattore di rischio.

E' stato inoltre utilizzato il test di Mc Namer per valutare la significatività dei cambiamenti dei fattori di rischio nei pazienti prima e dopo la trombosi.

L'analisi di sopravvivenza multivariata è stata condotta tramite il modello di rischio proporzionale di Cox , per determinare i valori predittivi dei fattori di rischio indipendenti nei confronti dell'evento trombotico. Nel modello sono stati considerati tutti i fattori risultati significativi all'analisi univariata, ed in aggiunta ulteriori possibili fattori confondenti.

E' stato utilizzato il metodo forward conditional per selezionare il modello finale. I risultati sono espressi come hazard ratio (HR proporzioni di rischio) con intervallo di confidenza al 95%.

La soglia di significatività per i test e gli intervalli di confidenza degli odds ratios è dello 0,05.

Tutte le analisi statistiche sono state realizzate utilizzando il Software SPSS versione 14.0.

## **RISULTATI**

Hanno partecipato allo studio 11 Centri Reumatologici Italiani: Bergamo, Brescia, Milano, Napoli, Padova 1, Padova 2, Pavia, Salerno, Torino, Trieste e Verona.

Sono stati arruolati 258 soggetti provenienti dai rispettivi ambulatori di Reumatologia. Vi erano 223 donne (86,4%) e 35 uomini (13,6%) che avevano, al momento dell'ingresso nello Studio, un'età media di 40,9 anni  $\pm$  11,1 DS (range 18-65). I soggetti sono stati seguiti per un periodo di follow-up medio di 35,0 mesi  $\pm$  11,9 DS (range 1-48).

Le caratteristiche cliniche, i fattori di rischio per trombosi ed i trattamenti profilattici negli aPL carriers al momento dell'arruolamento sono riportati in Tabella 4. Mentre tutti gli altri parametri clinici sono stati considerati soltanto all'arruolamento, invece le situazioni a rischio di trombosi registrate (gravidanza, puerperio ed interventi chirurgici) sono il risultato della somma di quelle verificatesi per tutta la durata del follow-up.

**Tabella 4.** Caratteristiche cliniche dei carriers di anticorpi antifosfolipidi all'arruolamento

<b>Caratteristiche cliniche</b>	<b>Prevalenza</b>
Malattie autoimmuni	177/258 (68,6%)
Lupus Eritematoso Sistemico	70/258 (27,1%)
Altre*	107/258 (41,5%)
Assenza di malattie autoimmuni	81/258 (31,4%)
Donne con esperienza di gravidanza	144/223 (64,6%)
Sindrome da antifosfolipidi ostetrica **	
presente	49/144 (34,0%)
assente	95/144 (66,0%)
Fattori di rischio trombofilico	
Gravidanza/Puerperio	26/155‡ (16,8%)
Fumo	60/258 (23,3%)
Ipertensione	47/258 (18,2%)
Ipercolesterolemia	22/258 (8,5%)
BMI > 85° percentile	15/258 (5,8%)
Pillola/terapia ormonale sostitutiva	12/258 (4,7%)
Diabete mellito	5/258 (1,9%)
Profilassi	
A lungo termine §	140/258 (54,3%)
Solo durante situazioni ad alto rischio ^	68/98 (69,4%)

\*50 connettiviti indifferenziate, 32 tiroiditi autoimmuni, 9 artriti reumatoidi, 7 piastrinopenie autoimmuni, 7 vasculiti, 6 sclerosi sistemiche, 6 sindromi di Sjögren 15 altri tipi di malattie autoimmuni; 36 pazienti hanno avuto contemporaneamente più di una malattia autoimmune.

\*\* 32 perdite fetali (tipo a), 11 nati prematuri (tipo b) e 13 aborti precoci (tipo c);

7 di queste donne hanno avuto contemporaneamente più di un tipo di sindrome ostetrica;

‡ donne in età fertile;

§ 138 con LDA e 2 con warfarina.

^15 chirurgia/immobilizzazione (14 con EBPM, 1 con warfarina); 53 gravidanze (25 con LDA, 12 con EBPM e 16 con entrambe); 30 eventi (9 chirurgia/immobilizzazione e 21 gravidanze) non sono stati trattati.

Le positività per i diversi tipi di anticorpi antifosfolipidi e per gli altri autoanticorpi negli aPL carriers al momento dell'arruolamento è riportata in Tabella 5.

**Tabella 5** Profilo anticorpale nei carriers di anticorpi antifosfolipidi all'arruolamento

<b>Autoanticorpi</b>	<b>Prevalenza</b>
aCL* IgG a titolo medio/alto	101/258 (39,1%)
aCL* IgM a titolo medio/alto	130/258 (50,4%)
Anti-β2 GPI** IgG a titolo medio/alto	104/258 (40,3%)
Anti-β2GPI** IgM a titolo medio/alto	79/258 (30,6%)
Lupus Anticoagulants	130/258 (50,4%)
Categoria antifosfolipidica I	130/258 (50,4%)
Categoria antifosfolipidica II	128/258 (49,6%)
Anticorpi antinucleo	163/258 (63,2%)
Anticorpi anti-DNA doppia elica	33/255 (26,4%)
Anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili	52/258 (12,9%)

\*aCL: anticorpi anti-cardiolipina, \*\*anti-β2GPI: anticorpi anti-β2glicoproteina I

### **Il primo evento trombotico**

Nel corso del follow-up si sono verificati 14 eventi trombotici in 14 soggetti (5,4%) con una incidenza di trombosi per 100 pazienti per anno di 1,86.

Vi erano 10 donne e 4 uomini di età media 39,9 anni  $\pm$  11,7 DS (range 23-60), che sono stati seguiti per un follow-up medio di 21,4 mesi  $\pm$  18,3 DS (range 1-47,6).

Le trombosi erano rispettivamente 5 arteriose (35,7%) e 9 venose (64,3%). Le trombosi arteriose coinvolgevano il distretto cerebrale in tutti i casi e le venose interessavano in 1 caso il Sistema Nervoso Centrale (seno sigmoideo e seno trasverso di sx e vena giugulare interna di sx) mentre negli altri 8 casi gli arti inferiori. In particolare 7 di queste ultime coinvolgevano il circolo venoso profondo ed una era una trombosi venosa superficiale idiopatica.

Sette pazienti (50%) al momento dell'evento trombotico stavano assumendo un trattamento profilattico (6 in modo continuativo ed 1 in corso di gravidanza). In 5 casi (35,7%) la trombosi si è verificata durante un periodo ad alto rischio (gravidanza, puerperio, immobilizzazione o chirurgia).

Abbiamo riportato nelle tabelle 6 e 7 le caratteristiche cliniche, il profilo anticorpale, i fattori di rischio e l'eventuale profilassi antitrombotica rispettivamente alla data dell'arruolamento e al momento dell'evento trombotico.

Quando i profili clinici (compresi i fattori di rischio e la profilassi) e di laboratorio registrati alla comparsa della trombosi sono stati confrontati con quelli basali non è stata trovata alcuna differenza significativa.

**Tabella 6** Caratteristiche cliniche, di laboratorio e tipo di profilassi all'arruolamento dei 14 pazienti con evento trombotico

N.	Sesso	Età (anni)	Malattie Autoimmuni *	APS ostetrica	Profilo anticorpale§	Fattori di rischio	Profilassi **
1	F	41	TA	Non storia di gravidanza	LA	Nessuno	no
2	M	60	no	-	aCL IgM/anti-β2GPI IgM	Nessuno	no
3	F	43	UCTD	Non storia di gravidanza	LA/aCL IgM	Nessuno	no
4	M	52	TA	-	aCL IgM/antiβ2GPI IgM	Nessuno	no
5	F	23	LES	Non storia di gravidanza	LA/anti-β2GPI IgM	Nessuno	LDA
6	F	58	LES	tipo a	LA	ipercolesterolemia	LDA
7	F	23	LES	Non storia di gravidanza	LA/aCL IgG e IgM/anti-β2GPI IgG e IgM	Nessuno	LDA
8	F	30	no	Non storia di gravidanza	LA/aCL IgG/anti-β2GPI IgG	Iperensione	LDA
9	F	47	UCTD	Non storia di gravidanza	LA/aCL IgG/anti-β2GPI IgG	iperensione/fumo	no
10	F	38	UCTD, PA	No	LA	Nessuno	no
11	F	29	no	tipo a, b	aCL IgG	Gravidanza	LDA
12	F	35	no	tipo a	LA/aCL IgG e IgM/anti-β2GPI IgG e IgM	Gravidanza	LMWH
13	M	43	LES	-	LA/aCL IgG/anti-β2GPI IgG	iperensione/fumo	LDA
14	M	36	LES	-	LA	Iperensione	LDA

\* TA, tiroidite autoimmune; UCTD, connettivite indifferenziata; LES, Lupus Eritematoso sistemico; PA, piastrinopenia autoimmune.

\*\* LDA, aspirina a basso dosaggio; LMWH, Eparina a basso peso molecolare.

§ LA, Lupus anticoagulant; aCL, anticorpi anticardiolipina; anti-β2GPI, anticorpi anti-β2glicoproteina I.



**Tabella 7** Caratteristiche cliniche, di laboratorio e tipo di profilassi nei 14 pazienti al momento dell' evento trombotico

N.	Sesso	Età (anni)	Follow-up (mesi)	Evento trombotico*	Profilo anticorpale§	Fattori di rischio	Profilassi **
1	F	44	40	TVP	aCL IgG	nessuno	no
2	M	64	48	TVP	aCL IgM/anti-β2GPI IgM	chirurgia, ipertensione	no
3	F	44	10	Ictus	LA/aCL IgM	Nessuno	no
4	M	62	15	TVP	aCL IgM/anti-β2GPI IgM	Nessuno	no
5	F	25	24	TVP	aCL IgG e IgM/ anti-β2GPI IgM	immobilizzazione	no
6	F	61	48	Tromboflebite idiopatica	LA/aCL IgG e IgM/ anti-β2GPI IgM	Nessuno	LDA
7	F	23	2	TVP	LA/aCL IgG e IgM/ Anti-β2GPI IgG e IgM	nessuno	LDA
8	F	30	6	Ictus	LA/aCL IgG/ Anti-β2GPI IgG e IgM	ipertensione, gravidanza	LDA
9	F	50	39	TIA Trombosi venosa cerebrale	LA/aCL IgG/ anti-β2GPI IgG	ipertensione, fumo	no
10	F	39	14	Trombosi venosa cerebrale	LA	Puerperio	no
11	F	29	2	TVP	aCL IgG	Gravidanza	LDA+LWMH
12	F	35	10	Ictus	LA/aCL IgG/ Anti-β2GPI IgG e IgM	ipertensione	LDA
13	M	43	1	Ictus	LA, aCL IgG/anti-β2GPI IgG	ipertensione, fumo	LDA
14	M	39	39	TVP	LA	ipertensione	LDA

\* TVP, trombosi venosa profonda.

\*\* LDA, aspirina a basso dosaggio; LMWH,eparina a basso peso molecolare.

§ LA, Lupus Anticoagulant; aCL, anticorpi anti-cardiolipina; anti-β2GPI, anticorpi anti-β2glicoproteina I

### **Analisi dei fattori di rischio per trombosi**

Le caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio registrate al momento dell'ingresso nello studio sono state analizzate statisticamente allo scopo di valutare una loro eventuale associazione con gli eventi trombotici (v. Tabella 8).

L'analisi univariata ha mostrato l'associazione significativa con l'evento trombotico dell'ipertensione ( $p < 0.05$ ) e della positività per LA ( $p < 0.005$ ); quest'ultima era significativa non quando era presente come positività isolata ma quando era considerata in tutte le sue possibili combinazioni.

**Tabella 8.** Analisi univariata: associazione con gli eventi trombotici dei dati demografici, clinici, anticorpali, dei fattori di rischio e della profilassi a lungo termine.

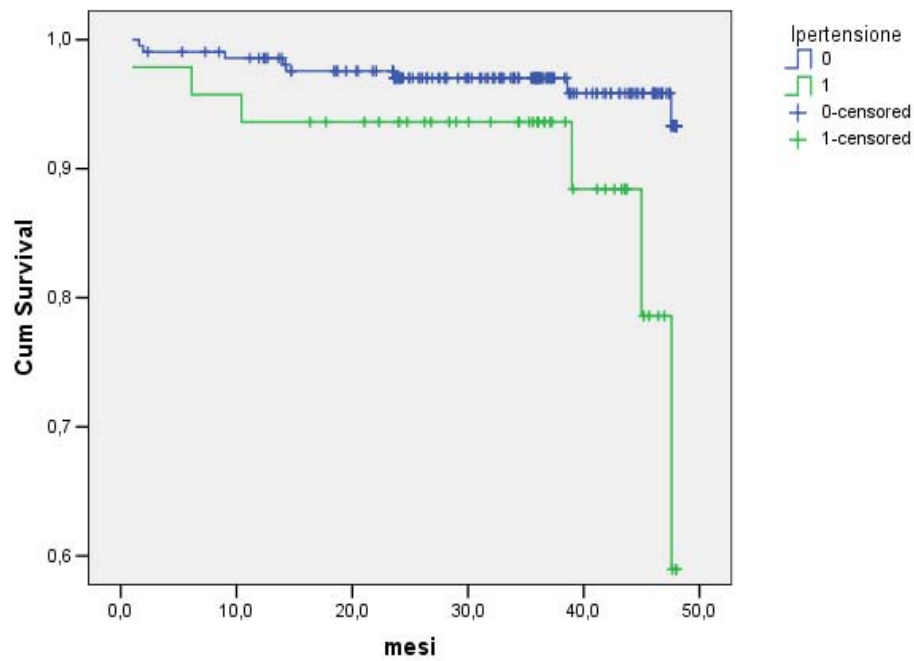
Variabili esaminate		NO trombosi		Trombosi		Significatività
		N.	%	N.	%	
Sesso	M	31	12.7	4	28.6	n.s.
	F	213	87.3	10	71.4	
Età media	≤ 45	166	68	10	71.4	n.s.
	> 45	78	32	4	28.6	n.s.
Malattie autoimmuni *	no	77	31.6	4	28.6	n.s.
	si	167	68.4	10	71.4	
APS ostetrica **	no	94	67.1	1	25.0	n.s.
	Si	46	32.9	3	75.0	
Lupus anticoagulant	no	125	51.2	3	21.4	<b>p&lt;0.05</b>
	Si	119	48.8	11	78.6	
Anticorpi anti-cardiolipina IgG	no	149	61.1	8	57.1	n.s.
	si	95	38.9	6	42.9	
Anticorpi anti-cardiolipina IgM	no	175	71.7	9	64.3	n.s.
	si	69	28.3	5	35.7	
Anticorpi antiβ2-glicoproteina I IgG	no	145	59.4	9	64.3	n.s.
	si	99	40.6	5	35.7	
Anticorpi antiβ2-glicoproteina I IgM	no	170	69.7	9	64.3	n.s.
	si	74	30.3	5	35.7	
Categoria antifosfolipidica	I	121	49.6	9	64.3	n.s.
	II	123	50.4	5	35.7	
Anticorpi antinucleo	no	90	36.9	5	35.7	n.s.
	Si	154	63.1	9	64.3	
Anticorpi anti-DNA doppia elica	no	210	87.1	12	85.7	n.s.
	Si	31	12.9	2	14.3	
Anticorpi anti-antigeni nucleari estraibili	no	196	80.3	10	71.4	n.s.
	si	48	19.7	4	28.6	
Ipertensione	no	203	83.2	8	57.1	<b>p&lt;0.05</b>
	Si	41	16.8	6	42.9	
Ipercolesterolemia	no	212	91.0	12	92.3	n.s.
	Si	21	9.0	1	7.7	
Fumo	no	186	76.2	12	85.7	n.s.
	Si	58	23.8	2	14.3	
Altri fattori di rischio ^	no	215	88.1	14	100	n.s.
	Si	29	11.9	0	0	
Profilassi a lungo termine §	no	112	45.9	6	42.9	n.s.
	Si	132	54.1	8	57.1	

\*70 Lupus Eritematoso sistemico e 107 altre malattie autoimmuni;\*\* 26 perdite fetali (tipo a), 7 nati prematuri (tipo b), 9 aborti precoci (tipo c) ed in 7 casi più di un tipo di APS ostetrica; ^ Pillola/terapia ormonale sostitutiva, BMI > 85° percentile e diabete mellito; §138 con aspirina a basso dosaggio e 2 con warfarina.

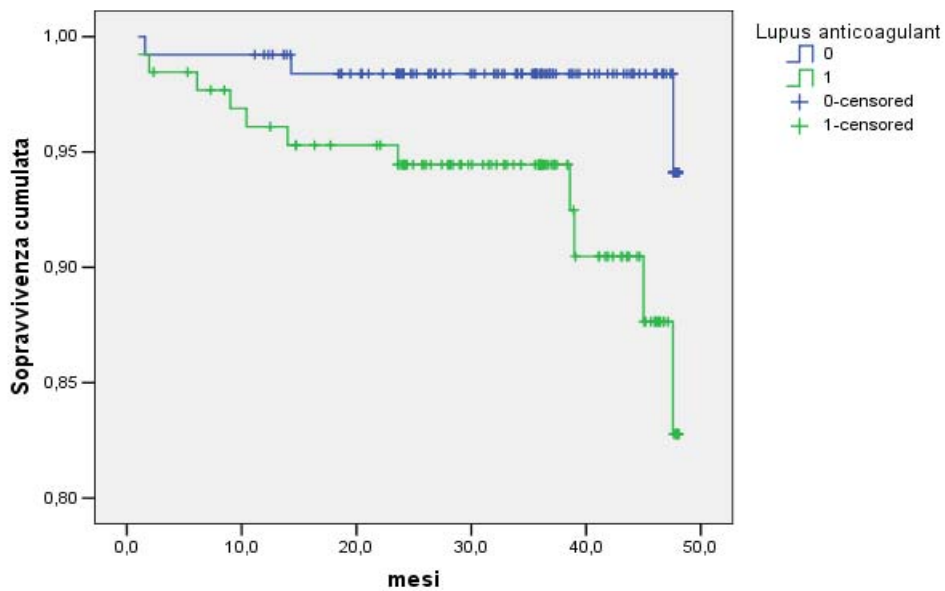
Inoltre è stata analizzata l'associazione della profilassi eseguita nelle situazioni a rischio con gli eventi trombotici. Nel corso del follow-up sono state registrate 98 situazioni a rischio; più precisamente 74 gravidanze/puerperio e 24 interventi chirurgici/immobilizzazioni. Sessantotto di questi (69,4%) sono stati trattati rispettivamente con aspirina a basso dosaggio (LDA) in 25 casi (36,8%), eparina a basso peso molecolare (LMWH) in 26 casi (38,2%), LDA + LMWH in 16 casi (23,5%) e warfarin in 1 (1,5%). L'analisi statistica ha evidenziato una protezione significativa nei confronti della trombosi da parte della profilassi somministrata nelle situazioni a rischio ( $p < 0,05$ ).

L'analisi della sopravvivenza univariata eseguita con il metodo Kaplan Meyer ed il log rank test ha ribadito una significativamente minore sopravvivenza all'evento trombotico dei soggetti con ipertensione ( $p < 0,01$ ) o positivi per LA ( $p < 0,05$ ) (Figure 3 e 4).

**Figura 3.** Curva di sopravvivenza dell'ipertensione



**Figura 4.** Curva di sopravvivenza del Lupus Anticoagulant



L'analisi di sopravvivenza multivariata condotta tramite il modello di rischio proporzionale di Cox al fine di determinare i fattori di rischio indipendenti nei confronti dell'evento trombotico ha considerato i fattori risultati significativi all'analisi univariata e ulteriori possibili variabili confondenti (sesso, età, profilo antifosfolipidico, malattie autoimmuni e fattori di rischio). Sono risultati fattori di rischio indipendenti per l'evento trombotico l'ipertensione ( $p < 0,05$ , HR 3,8 con CI 95% 1,3-11,1) ed il LA ( $p < 0,05$ , HR 3,9 con CI 95% 1,1-14).

L'analisi univariata dell'associazione tra ogni variabile e trombosi venosa o arteriosa, considerate separatamente, ha evidenziato un'associazione significativa con la trombosi arteriosa degli anticorpi anti- $\beta$ 2GPI di classe IgG ( $p < 0,05$ ) e della triplice positività antifosfolipidica (aCL + anti- $\beta$ 2GPI + LA) ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSIONE

Il nostro lavoro è uno studio prospettico di follow-up che considera una coorte di 258 soggetti arruolati in 11 Centri Reumatologici Italiani e seguiti per un periodo medio di 35 mesi. Al momento dell'arruolamento essi erano persistentemente positivi per anticorpi antifosfolipidi secondo i criteri di Sidney (2). La positività per LA è stata rilevata da tutti i Centri secondo i criteri della Letteratura internazionale (23), mentre gli altri anticorpi antifosfolipidi sono stati determinati con una varietà di metodiche che rispecchia quanto avviene realmente nella pratica clinica.

L'analisi univariata, comprendente anche le curve di sopravvivenza, ha esaminato 19 variabili relative a dati demografici, clinici, autoanticorpali, fattori di rischio e profilassi continuativa e ha rilevato soltanto l'ipertensione arteriosa ed il LA come fattori di rischio predittivi per trombosi. Inoltre, sempre lo stesso modello, quando ha esaminato la profilassi in corso di tutte le situazioni a rischio, avvenute durante il follow-up, ha trovato che la profilassi antitrombotica prevalentemente con LDA e/o LMWH è risultata significativamente protettiva nei riguardi dell'evento trombotico. Questo dato conferma l'esperienza di Giron-Gonzales et al. (46) che è l'unica con cui ci possiamo confrontare. In questo studio 178 carriers di aPL, di cui 15 trattati con profilassi nelle situazioni a rischio, non hanno manifestato alcun evento trombotico nel corso di un follow-up medio di 36 mesi. Pertanto tali Autori sottolineano l'importanza di identificare nei carriers le situazioni a rischio al fine di adottare una profilassi mirata.

Invece la profilassi continuativa, a base di LDA, è risultata non efficace nella prevenzione della trombosi in accordo con lo studio prospettico di Erkan et al. (61) e con i risultati del nostro precedente studio retrospettivo (62). In quest'ultimo (62) non era risultata protettiva neanche la profilassi nelle situazioni a rischio, probabilmente perché, in considerazione della natura retrospettiva dello studio, non era stato possibile esaminare tutti gli eventi a rischio di trombosi intercorsi durante il follow-up, bensì erano state soltanto analizzate le situazioni a rischio presenti al momento dell'ingresso nello studio.

Il risultato principale è stato ottenuto con l'analisi multivariata che ha ribadito i risultati dell'univariata evidenziando l'ipertensione ed il LA come fattori di rischio indipendenti per trombosi. L'ipertensione arteriosa rappresenta una conferma dei risultati ottenuti nello studio retrospettivo multicentrico precedente (62). Inoltre essa non costituisce un dato sorprendente

perché in considerazione della sua caratteristica di indurre un danno endoteliale potrebbe costituire il cosiddetto “second hit” in grado di scatenare la trombosi in presenza di anticorpi antifosfolipidi. Tale osservazione risulta in analogia con altre ipotesi che attribuiscono questo ruolo alle infezioni ed all’infiammazione (64,65).

L’associazione del LA con la trombosi è stata descritta in diversi studi caso-controllo (55,58,66). Nel nostro lavoro viene confermata questa associazione; inoltre, in accordo con altri autori (67,68), il LA è risultato fattore predittivo indipendente per trombosi soltanto quando è stato considerato come anticorpo associato ad altri aPL e non come positività isolata.

Il primo evento trombotico nei nostri carriers di aPL si è manifestato con una bassa frequenza (5,4%) ed un basso tasso di incidenza di trombosi per 100 pazienti per anno (1,86). Tuttavia tali valori risultano del tutto simili a quelli riportati in letteratura (47-49,51-53,59). E’ interessante osservare che, al momento della trombosi, 5 pazienti erano in situazioni a rischio e solo 2 di questi assumevano profilassi anti-trombotica. Gli eventi venosi sono prevalsi su quelli arteriosi (9 versus 5) e sottolineiamo che abbiamo incluso tra le trombosi venose anche una tromboflebite superficiale in considerazione della sua natura idiopatica. Infatti tale evento, che si è verificato in assenza completa di fattori di rischio come varici, traumi e obesità nonché di situazioni a rischio trombotico, è stato da noi considerato un evento probabilmente associabile alla presenza degli anticorpi antifosfolipidi.

Quando è stata esaminata l’associazione di tutte le variabili con la trombosi venosa e arteriosa, considerate separatamente, l’analisi univariata ha evidenziato gli anticorpi anti- $\beta$ 2GPI di classe IgG e la triplice positività antifosfolipidica come fattori predittivi di trombosi arteriosa. Recentemente Urbanus et al.(66), in uno studio caso-controllo, hanno associato gli anticorpi anti- $\beta$ 2 GPI di classe IgG allo stroke in una popolazione di donne di età compresa tra 18 e 49 anni. A prescindere dalla diversa natura del nostro studio, tale osservazione risulta in sintonia con i nostri risultati che evidenziano un’associazione significativa tra anticorpi anti- $\beta$ 2 IgG e trombosi arteriosa, la quale anche nella nostra casistica interessava nel 100% dei casi il distretto cerebrale. Non trova invece conferma negli studi osservazionali presenti in letteratura l’associazione della trombosi arteriosa con la triplice positività antifosfolipidica. Quest’ultima invece risulta oggetto di numerosi studi di coorte in pazienti con APS sia vascolare che ostetrica, dove si dimostra un parametro associato a recidiva di trombosi e di



perdita fetale (67,69,70). Se il suddetto risultato trovasse conferma in altri studi prospettici su carriers di aPL risulterebbe di grande interesse nella loro gestione clinica.

Lo scopo del nostro studio prospettico era di verificare i risultati ottenuti nel lavoro retrospettivo precedente. Essi sono stati confermati dal rilievo dell'ipertensione arteriosa come fattore di rischio indipendente per trombosi ed, in parte, dal valore protettivo della profilassi eseguita in corso di situazioni a rischio trombotico. Invece il profilo antifosfolipidico predittivo di trombosi è risultato diverso; infatti mentre nello studio retrospettivo erano significativamente associati all'evento trombotico gli aCL IgG, nell'attuale lavoro prospettico sono stati rilevati come fattori predittivi di evento trombotico arterioso gli anti- $\beta$ 2GPI IgG e la positività multipla e come fattore di rischio indipendente per la trombosi sia arteriosa che venosa il LA. Tali differenze potrebbero essere attribuite alla diversa natura dei due studi e siamo indotti a considerare statisticamente più validi i risultati dell'attuale studio prospettico.

In conclusione il nostro lavoro, che mette in evidenza l'importanza dell'ipertensione arteriosa e del LA come fattori di rischio indipendenti per trombosi negli aPL carriers, nonché il ruolo protettivo della profilassi anti-trombotica nelle situazioni a rischio, fornisce degli elementi utili alla gestione clinica degli aPL carriers. Tuttavia i nostri risultati necessitano di una verifica da parte di altri studi prospettici condotti su carriers di aPL persistentemente positivi e asintomatici, che si auspica vengano in futuro espletati e che risultano attualmente, al meglio delle nostre conoscenze, non presenti in letteratura.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) 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.
- 2) Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi M, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb and Haem* 2006; 4: 295-306.
- 3) Pangborn M.C. A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1941; 48:484-486.
- 4) Moore J.E. and Mohr C. F. Biologically false positive serologic tests for syphilis: type, incidence, and cause. *JAMA* 1952. 1952: 467-473.
- 5) Harris E.N., Gharavi A.E., Boey M.L., et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; ii:1211-4.
- 6) Tincani A., Balestrieri G., Saptola L., Cinquini M., Meroni PL., Roubey R.A. Anticardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I immunoassays in the diagnosis of anti-phospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 396-402.
- 7) 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.
- 8) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4120-4.
- 9) Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992;1:75-81.
- 10) Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004;114:553-8.

- 11) Conley CL and Hartmann RC. A haemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-622.
- 12) De Groot PG, Derksen RHW. Specificity and clinical relevance of lupus anticoagulant. *Vessel* 1995;1:22-6.
- 13) Galli M, Comfurius P, Barbui T, and al. Anticoagulant activity of  $\beta$ 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992; 68:297-300.
- 14) Viard J-P, Amoura Z, Bach J-F. 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.
- 15) Oosting JD, Derksen RHW, Bobbink IWG, and al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipid with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993;81:2618-25.
- 16) Bevers EM, Galli M, Barbui T, and al. 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.
- 17) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, et al. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*. 1990; 336:177-178.
- 18) Arvieux J, Damige L, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost*. 1995;74: 1120-1125.
- 19) Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost*. 1997; 77:486-491.
- 20) Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Gotoh M, Tsukamoto M. Anti-annexin V in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. *Am J Haemat* 47:ol. 1994; 56-58.

- 21) Vaarala O, Alftan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1993; 341: 923-925.
- 22) Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-11.
- 23) Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
- 24) 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.
- 25) Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus* 2002; 11: 269-75.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Neville C, Rauch J, Kassis J, et al. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003;90:108-15.
- 29) Danowski A, Kickler TS, Petri M. Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I: prevalence, clinical correlation and importance of persistent positivity in patients with Antiphospholipid Syndrome and Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2006; 33: 1775-9.
- 30) Wisloff F, Jacobsen EM, Liestol S. Laboratory diagnosis of the Antiphospholipid Syndrome. *Thromb Res* 2002; 108:263-71.
- 31) 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.

- 32) 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.
- 33) Tektonidou MG, Sotsiou F, Nakopoulou, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Antiphospholipid Syndrome nephropathy in patients with Systemic Lupus Erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2569-79.
- 34) Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 2000;15:145-51.
- 35) Ruffatti A, Rossi L, Calligaro A, et al. Autoantibodies of systemic rheumatic diseases in the healthy elderly. *Gerontology* 1990;36:104-111.
- 36) Merkel PA, Chang YC, Pierangeli SS, Convery K, Harris EN, Polisson NP. The prevalence and clinical association of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort with connective tissue diseases. *Am J Med* 1996;101:576-83.
- 37) Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990; 112:682-98.
- 38) Sebastiani GD, Galeazzi M, Tincani A, Piette JC, Font J, Allegri F, Mathieu A, Smolen J, De Ramon Garrido E, Fernandez-Nebro A, Jedryka-Goral A, Papasteriades C, Morozzi G, Bellisai F, De Pità O, Marcolongo R. Anticardiolipin and anti- $\beta$ 2GPI antibodies in a large series of European patient with Systemic Lupus Erythematosus. Prevalence and clinical associations. *Eur Conc Act Immugen of SLE. Scand J Rheumatol* 1999; 28:344.
- 39) Ramos-Casals M, Brito-Zeròn P, Font J. The overlap of Sjogren's syndrome with other systemic autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2007; 36(4): 246-55.
- 40) Olech E, Merrill JT. The prevalence and clinical significance of antiphospholipid antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2006; 8(2):100-8.
- 41) Marie I, Jouen F, Hellot MF, Levesque H. Anticardiolipin and anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies and lupus-like anticoagulant: prevalence and significance in Systemic Sclerosis. *Br J Dermatol* 2008; 158(1):141-4.

- 42) Roussel V, Jabertau MO, Couderq C, Lacombe C, Michelet V, Gil R, Couratier P, Vallat JM, Preud'homme JL Prevalence and clinical significance of anti-phospholipid antibodies in multiple sclerosis: a study of 89 patients. *J Autoimmun* 2000; 14:259-65.
- 43) Chapman J The interface of multiple sclerosis and antiphospholipid antibody. *Thromb Res.* 2004;114:477-481.
- 44) Nabriski D, Ellis M, Ness-Abramof R, Shapiro M, Shenkman L Autoimmune thyroid disease and antiphospholipid antibodies. *Am J Hematol* 2000; 64(1):73-5.
- 45) Erkan D, Leibowitz E, Berman J, Lockshin MD. Perioperative medical management of antiphospholipid syndrome: hospital for special surgery experience, review of literature, and recommendations. *J Rheumatol* 2002; 29:843-9.
- 46) Giron-Gonzales Ya, Del Rio EG, Rodriguez C et al. Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibodies: prospective analysis of 404 individuals. *J Rheumatol* 2004; 31:1560-7.
- 47) Silver RM, Draper MD, Scott JR, et al. Clinical consequences of antiphospholipid antibodies: an historic cohort study. *Obst & Gyn* 1994; 83:372-377.
- 48) Shah NM, Khamashta MA, Atsumi T, et al. Outcome of patients with anticardiolipin antibodies: a 10 year follow-up of 52 patients. *Lupus* 1998; 7:3-6.
- 49) Erkan D, Merrill JT, Yazici Y, et al. High thrombosis rate after fetal loss antiphospholipid syndrome: effective prophylaxis with aspirin. *Arthr & Rheum* 2001; 44:1466-1469.
- 50) Janardhan V, Wolf PA, Kase CS, Massaro JM, D'Agostino RB, Franzblau C, Wilson PWF Anticardiolipin Antibodies and risk of ischemic stroke nad transient ischemic attack. The Framingham Cohort and Offspring Study. *Stroke*, 2004; 35:736-741.
- 51) Erkan D, Yazici Y, Peterson MG, Sammaritano L and Lockshin MD A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in Antiphospholipid Syndrome. *Rheumatology*, 2002; 41:924-929.
- 52) Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, et al. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1992; 117:997-1002.
- 53) Vaarala O, Manttari M, Manninen V, et al. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995;91:23-7.

- 54) Runchey SS, Folsom AR, Tsai MY, Cushman M, Mc Govern PD Anticardiolipin antibodies as a risk factor for venous thromboembolism in a population-based prospective study. *British J of Haematology*, 2002; 119: 1005-1010.
- 55) De Groot P, Lutters B, Derksen R, Lisman T, Meijers J, Rosendaal F Lupus Anticoagulant and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1993-7.
- 56) Naess IA, Christiansen SC, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstroem J A prospective study of anticardiolipin antibodies as a risk factor for venous thrombosis in a general population (the HUNT study). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 44-9.
- 57) Neville C, Rauch J, Kassis J, Solymoss S, Joseph L, Belisle P, Levine J, Fortin PR Antiphospholipid antibodies predict imminent vascular events independently from other risk factors in a prospective cohort. *Thromb Haemost* 2009; 101:100-107.
- 58) Saidi S, Mahjoub T, Almawi WY Lupus anticoagulants and anti-phospholipid antibodies as risk factors for a first episode of ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2009; 7:1075-80.
- 59) Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, et al. Natural History and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med* 1996; 100:530-6.
- 60) Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L, Bonaccorso S, Aversa L A prospective study of antibodies to  $\beta$ 2-glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1231-8.
- 61) Erkan D, Harrison MJ, Levy R, Peterson M, Petri M, Sammaritano L, Unalp-Arida A, Vilela V, Yazici Y, Lockshin MD Aspirin for primary thrombosis prevention in the Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2382-2391.
- 62) Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, Nuzzo M, Rampudda M, Bertero MT et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers. A multicentre, retrospective follow-up study. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 397-399.
- 63) Ichikawa K, Tsutsumi A, Atsumi T, Matsura E, Kobayashi S, Hughes GR, Khamashta MA, Koike T A chimeric antibody with the human gamma 1 constant region as a putative standard for assay to detect IgG beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum* 1999; 86:575-83.



- 64) Shoenfeld Y, Blank M, Cervera R, Font J, Raschi E, Meroni PL Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:2-6.
- 65) Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* 2005;106:2340-6.
- 66) Urbanus R, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, De Groot P, Algra A Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol* 2009; 8:998-1005.
- 67) 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.
- 68) Pengo V, Biasiolo A, Gresele P, Marongiu F, Erba N, Veschi F, Ghirarduzzi A, Barcellona D, Tripodi A A comparison of Lupus Anticoagulant-positive patients with clinical picture of Antiphospholipid Syndrome and those without. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:e309-e310.
- 69) Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T et al. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost* 2006; 96:337-41.
- 70) Ruffatti A, Tonello M, Cavazzana A et al. Laboratory classification categories and pregnancy outcome in patients with primary antiphospholipid syndrome prescribed antithrombotic therapy. *Thromb Res* 2009; 123:482-7.