


La ricerca del lupus anticoagulant: raccomandazioni del gruppo di studio sulla coagulazione di SIPMeL

Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL)—guidelines for laboratory detection of Lupus Anticoagulant (LA)

Cristina Legnani¹  · Giuliana Martini² · Michele Bertini³ · Pierfrancesco Agostini⁴ · Francesco Bondanini⁵ · Maria Rita Cozzi⁶ · Marta Sofia Angela Demicheli⁷ · Giovina Di Felice⁸ · Cristina Novembrino⁹ · Oriana Paoletti¹⁰ · Simona Pedrini¹¹ · Lucia Ruocco¹² · Agostino Steffan⁶ · Lucia Terzuoli¹³ · Sophie Testa¹⁰

Ricevuto: 6 marzo 2018 / Accettato: 11 aprile 2018 / Pubblicato online: 26 aprile 2018
© Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio 2018

Riassunto Per porre diagnosi di sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è necessario che siano presenti almeno un criterio clinico (trombosi venosa/arteriosa o complicanza della gravidanza) e persistente positività degli anticorpi anti-

fosfolipidi (confermata a distanza di almeno 12 settimane). I criteri di laboratorio per definire la presenza di anticorpi antifosfolipidi sono: presenza di LAC e/o aumento degli anticorpi anticardiolipina (IgG o IgM) e/o anti β 2 glicoproteina I (IgG o IgM). Le variabili che possono influenzare il risultato dei test utilizzati per la diagnostica del LAC sono numerose; la standardizzazione dei test per questa diagnostica è scarsa ed è stata riportata un'ampia variabilità interlaboratorio in termini di sensibilità e specificità. La probabilità di errori diagnostici in senso negativo (false negatività) e positivo (false positività) è quindi piuttosto elevata. Allo scopo di migliorare l'accuratezza diagnostica di questi test, nel 2009 lo specifico sottocomitato per la standardizzazione dei metodi dell'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) ha aggiornato le linee guida già pubblicate in precedenza. Il Gruppo di Studio in Coagulazione della SIPMeL ha voluto riassumere in questo articolo le linee guida raccomandate dall'ISTH. Successivamente, è stata pubblicata una diversa linea guida da parte del *Clinical & Laboratory Standard Institute* (CLSI) che per alcuni aspetti si pone su posizioni diverse o contrastanti. Poiché le raccomandazioni indicate dal CLSI vengono seguite da molti Laboratori, si è cercato di rivedere in modo critico queste diverse posizioni. Il Gruppo di Studio SIPMeL ritiene necessario ribadire che per porre diagnosi di APS i test per la diagnostica del LAC devono essere eseguiti seguendo le linee guida ISTH.

Per il Gruppo di Studio in Coagulazione della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (GdS-COAG SIPMeL).

✉ C. Legnani
legnanicristina@gmail.com

- ¹ UO Angiologia e Malattie della Coagulazione, Azienda Ospedaliera di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, Italia
- ² Centro Emostasi, Laboratorio, Spedali Civili, Brescia, Italia
- ³ UOC di Patologia Clinica e Ambulatorio per lo studio della Trombofilia, Ospedale S. Filippo Neri, ASL Roma1, Roma, Italia
- ⁴ UOC Patologia Clinica, PO San Paolo, Asl Bari, Bari, Italia
- ⁵ UOC Biochimica Clinica, Ospedale Sandro Pertini, ASL Roma2, Roma, Italia
- ⁶ Immunopatologia e Biomarcatori Oncologici, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico, Aviano, PN, Italia
- ⁷ Laboratorio Malattie Emorragiche e Trombotiche, Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria, Italia
- ⁸ Laboratorio Analisi Roma, IRCCS Ospedale Bambino Gesù, Roma, Italia
- ⁹ Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, e Laboratorio Centrale Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italia
- ¹⁰ Centro Emostasi e Trombosi, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, ASST Cremona, Cremona, Italia
- ¹¹ Servizio di Medicina di Laboratorio, Istituto Ospedaliero, Fondazione Poliambulanza, Brescia, Italia

¹² Ambulatorio Antitrombosi, UO Laboratorio Analisi Cliniche, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa, Italia

¹³ Dipartimento Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Siena, Siena, Italia

Parole chiave Lupus Anticoagulant · LAC · Sindrome da anticorpi antifosfolipidi · Anticorpi antifosfolipidi · Linee guida

Summary *To diagnose antiphospholipid syndrome (APS) it is necessary the presence of at least one clinical criterion (venous/arterial thrombosis or pregnancy complications) and persistent positivity of antiphospholipid antibodies (confirmed at least 12 weeks apart). The laboratory criteria to define the presence of antiphospholipid antibodies are: LA presence and/or increase of anticardiolipin and/or anti β 2 Glycoprotein I antibodies (IgG or IgM). Several variables can influence the result of the tests used for LA diagnosis, standardization of tests is poor and a wide inter-laboratory variability has been reported in terms of sensitivity and specificity. The probability of diagnostic errors (false negativity or false positivity) is therefore quite high. In order to improve the diagnostic accuracy of LA tests in 2009 the specific subcommittee for standardization of the methods of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) has updated the guidelines previously published. The Study Group on Coagulation of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) summarizes in this article the ISTH guidelines. Subsequently, the Clinical & Laboratory Standard Institute (CLSI) has published its guideline which shows, in some respects, different or conflicting positions. Since the recommendations indicated by the CLSI are followed by many Laboratories, we tried to critically review these different positions. The Study Group of SIPMeL deems necessary to reiterate that for APS diagnosis the LA tests must be performed according to the ISTH guidelines.*

Keywords *Lupus Anticoagulant · LA · Antiphospholipid syndrome · Antiphospholipid antibodies · Guidelines*

Introduzione

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (*antiphospholipid syndrome*, APS) è una malattia autoimmune descritta per la prima volta negli anni '80 associata al lupus eritematoso sistemico (LES).

L'APS è definita primaria se non si associa ad altre condizioni cliniche, secondaria se associata ad altre malattie quali, più frequentemente, il LES, le infezioni, le terapie farmacologiche, le neoplasie e, più raramente, le altre malattie autoimmuni [1]. Clinicamente si manifesta con trombosi venose e/o arteriose, spesso ricorrenti, complicanze ostetriche (più frequentemente poliabortività e/o morte fetale) ed è talora associata a piastrinopenia.

Una piccola percentuale di pazienti (<1%) può sviluppare una sindrome catastrofica caratterizzata da trombosi dei

piccoli vasi e conseguente sofferenza multiorgano ed elevata mortalità (50%). Alcune situazioni cliniche come le infezioni intercorrenti o gli interventi chirurgici sono riconosciute come fattori precipitanti [2].

La patogenesi è da ascrivere alla presenza di anticorpi antifosfolipidi, i quali manifestano la loro attività procoagulante con meccanismo complesso e non ancora completamente chiarito.

Differente significato clinico è attribuibile alla positività ai singoli test per la ricerca degli anticorpi antifosfolipidi. Per esempio, isolate positività dei test per la diagnosi del Lupus Anticoagulant (LAC) [definita come categoria IIa] non sembrano associarsi a significativo aumento del rischio tromboembolico e lo stesso si può dire dell'isolata positività agli anticorpi anticardiolipina (definita categoria IIb) o degli anticorpi anti- β 2 glicoproteina I (definita categoria IIc) [3]. È ampiamente dimostrato che la positività a più di un test si associa a un più elevato rischio tromboembolico e di complicanze ostetriche, così come la triplice positività (positività a tutti i tre test per la ricerca degli anticorpi antifosfolipidi) si associa al più alto rischio tromboembolico e di complicanze ostetriche [3].

Gli anticorpi diretti contro il dominio 1 della β 2 glicoproteina I si associano con più alta probabilità alla triplice positività degli anticorpi antifosfolipidi, alla persistenza degli anticorpi stessi e agli eventi clinici, pur non migliorando l'accuratezza diagnostica rispetto al pannello di esami standard [4, 5].

La prevalenza dell'APS è di circa 40–50 casi ogni 100.000 persone, l'incidenza è di 5 nuovi casi per 100.000 persone/anno, mentre la positività agli anticorpi antifosfolipidi si riscontra con una frequenza assai più elevata: 1–5% della popolazione generale [1].

È importante rilevare che l'APS colpisce generalmente persone giovani, più frequentemente di sesso femminile. Pertanto, l'età, l'anamnesi, la storia clinica e una corretta stratificazione dei fattori di rischio sia tromboembolici sia cardiovascolari devono essere attentamente valutate prima di procedere all'esecuzione dei test.

La terapia di elezione del paziente con APS che sviluppa trombosi idiopatica è la terapia anticoagulante orale a lungo termine, con antagonisti della vitamina K (AVK). In caso di trombosi secondarie, si può prendere in considerazione una terapia a breve termine, se il profilo anticorpale è a basso rischio (es. singola positività). Per pazienti asintomatici con APS, in presenza di fattori di rischio cardiovascolari sono indicate basse dosi di acido acetilsalicilico come profilassi primaria [6]. Pazienti con trombosi arteriose potrebbero beneficiare di terapia anticoagulante con AVK a lungo termine con target INR 3, oppure l'associazione tra AVK e antiaggregante a basse dosi, in presenza di basso rischio emorragico o dopo recidiva [7]. Pazienti in gravidanza con APS, senza eventi tromboembolici, possono essere trattate con dosi

profilattiche di eparina a basso peso molecolare e basse dosi di acido acetilsalicilico, mentre per le pazienti in gravidanza con precedenti eventi tromboembolici si raccomanda l'uso di dosi terapeutiche di eparina a basso peso molecolare associate a basse dosi di acido acetilsalicilico [8].

Come è noto, per porre diagnosi di APS è necessario che siano presenti almeno un criterio clinico (trombosi venosa/arteriosa o complicanza della gravidanza) e la persistente positività degli anticorpi antifosfolipidi (confermata a distanza di almeno 12 settimane).

I criteri di laboratorio per definire la presenza di anticorpi antifosfolipidi sono tre: presenza di LAC e/o aumento degli anticorpi anticardiolipina (IgG o IgM) e/o anti $\beta 2$ glicoproteina I (IgG o IgM) [9].

Le variabili che possono influenzare il risultato dei test utilizzati per la diagnostica del LAC sono numerose e comprendono: contenuto/tipo di fosfolipidi (PL) e tipo di attivatore presenti nei reagenti, modalità di manipolazione dei campioni di plasma, tipo di espressione dei risultati e valori di *cut-off* utilizzati. Come conseguenza, la standardizzazione dei test per questa diagnostica è scarsa ed è stata riportata un'ampia variabilità inter-laboratorio in termini di sensibilità e specificità [10–14]. La probabilità di errori diagnostici in senso negativo (false negatività) e positivo (false positività) è quindi piuttosto elevata. In particolare preoccupano i risultati falsamente positivi, perché in tal caso il paziente potrebbe essere sottoposto a una terapia anticoagulante a lungo termine non giustificata e non necessaria [14].

Allo scopo di migliorare l'accuratezza diagnostica di questi test, nel 2009 lo specifico sottocomitato per la standardizzazione dei metodi dell'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) ha aggiornato le linee guida [15] già pubblicate in precedenza [16]. Lo scopo di questo articolo è riassumere le linee guida raccomandate dall'ISTH. Successivamente, è stata pubblicata una diversa linea guida da parte del *Clinical & Laboratory Standard Institute* (CLSI) che per alcuni aspetti si pone su posizioni diverse o contrastanti [17]. Poiché le raccomandazioni indicate da questo Istituto vengono seguite da molti Laboratori, cercheremo anche di rivedere in modo critico queste diverse posizioni. Anche la *British Society of Haematology* ha pubblicato nel 2012 le sue linee guida [18] e per certi aspetti le raccomandazioni si pongono in posizione intermedia tra quelle dell'ISTH e quelle del CSLI.

Gli operatori devono comunque tenere presente che nel lavoro che riporta i criteri per la diagnosi di APS [9] è chiaramente indicato che i test per la diagnostica del LAC devono essere eseguiti seguendo le linee guida ISTH [15].

Selezione dei pazienti e timing del prelievo

Linee guida ISTH

Secondo quanto pubblicato dallo *Scientific and Standardization Committee* (SSC) dell'ISTH, i test per la diagnostica del LAC dovrebbero essere limitati ai pazienti che hanno una significativa probabilità di avere l'APS secondo i criteri clinici sopra-riportati [9], o ai soggetti in cui, a seguito di esami di routine, è stato incidentalmente evidenziato un allungamento dell'aPTT. L'esecuzione dei test per la diagnostica del LAC in modo generalizzato, includendo pazienti/individui diversi da quelli sopra-descritti, viene scoraggiata in quanto, data la scarsa specificità dei test che in questo momento abbiamo a disposizione, aumenterebbe in modo inaccettabile la probabilità di false positività. Sempre per lo stesso motivo è indispensabile confermare un'eventuale positività dei test in una seconda occasione a distanza di almeno 12 settimane dal test iniziale.

Il prelievo deve essere eseguito a distanza di 3–6 mesi dall'evento trombotico acuto, perché in queste circostanze ci potrebbe essere un aumento del livello del Fattore VIII e della proteina C reattiva, che possono determinare, rispettivamente, false negatività e false positività [19, 20]. Inoltre, il prelievo deve essere eseguito prima di iniziare una terapia anticoagulante (AVK, eparina non frazionata, anticoagulanti orali diretti), o dopo la sua adeguata sospensione, in quanto queste terapie possono interferire pesantemente sul risultato dei test. Per quanto riguarda i pazienti in terapia con AVK si raccomanda di eseguire il controllo a distanza di almeno 2 settimane dalla sospensione della terapia o comunque quando l'INR risulti $<1,5$. In alternativa, se l'INR è compreso tra 1,5 e 3,0, si può prendere in considerazione l'esecuzione dei test su una miscela del plasma del paziente e un pool di plasma normali (PPN); in questo caso, però, l'interpretazione dei risultati potrebbe essere difficile, dal momento che il plasma del paziente è stato diluito 1:2 con PPN. Al contrario degli AVK che determinano una carenza di fattori che può essere corretta eseguendo i test di miscela (diluizione 1:2 con PPN), gli effetti sulla coagulazione degli anticoagulanti orali diretti (anti IIa e anti Xa) non possono essere annullati aggiungendo un PPN e quindi questi farmaci interferiscono in modo ancora più significativo sul risultato dei test, determinando in genere false positività o valori di difficile interpretazione [21]. L'eparina non frazionata interferisce pesantemente sui risultati dei test per la diagnostica del LAC. Anche se molti reagenti commerciali contengono sostanze neutralizzanti l'eparina, non è raccomandata l'esecuzione di test in pazienti in trattamento con eparina non frazionata, in quanto la concentrazione di eparina potrebbe essere superiore alla capacità neutralizzante del reagente. Per questi motivi, prima di procedere all'esecuzione dei test per la diagnostica del LAC è consigliabile esegui-

re un tempo di trombina per escludere la presenza di eparina non frazionata; nel caso in cui i test vengano comunque eseguiti in pazienti in trattamento con eparina non frazionata, occorre porre molta prudenza nella loro interpretazione. L'eparina a basso peso molecolare sembra invece interferire poco sul risultato dei test, almeno nel caso in cui il prelievo venga eseguito al punto di valle, ovvero dopo almeno 12 ore dall'ultima somministrazione. Non è invece necessario sospendere i farmaci antiaggreganti.

Durante la gravidanza, per effetto dell'aumento di tutti i fattori pro-coagulanti, i tempi di coagulazione possono essere significativamente accorciati e quindi l'interpretazione del risultato dei test può essere complessa.

Prima di effettuare i test per la diagnostica del LAC è inoltre raccomandabile eseguire i test di routine (PT e aPTT) in modo da escludere la presenza di coagulopatie non prima diagnosticate e/o eventuale terapia anticoagulante.

Linee guida CLSI

Il CLSI non pone limiti per quanto concerne l'esecuzione dei test in pazienti anticoagulati con AVK e suggerisce che se si usa plasma diluito 1:1 con PPN i test possano essere eseguiti anche se l'INR è $>3,0$. Entrambe le linee guida riconoscono che ci può essere la possibilità di falsi negativi se si utilizza plasma diluito e che eseguire i test con plasma indiluito se l'INR è $\geq 1,5$ può generare risultati sia falsamente negativi che falsamente positivi.

Le linee guida CLSI suggeriscono inoltre di utilizzare per l'esecuzione dell'aPTT di routine reagenti poco sensibili al LAC per ridurre la probabilità di identificare LAC deboli in soggetti asintomatici.

Prelievo di sangue e manipolazione dei campioni

Linee guida ISTH

Il prelievo di sangue deve essere eseguito utilizzando trisodio citrato (0,109 M) in rapporto 9:1. Per garantire che il campione in esame sia povero di piastrine ($<10 \times 10^9/L$), dopo la prima centrifugazione (2000 g per 15 min a temperatura ambiente controllata) il plasma deve essere trasferito in una provetta di plastica e nuovamente centrifugato a maggiore velocità (>2500 g per almeno 10 min a temperatura ambiente controllata). Dopo questa seconda centrifugazione il plasma deve essere trasferito in idoneo contenitore per l'esecuzione del test o per il congelamento e durante questa operazione occorre fare attenzione a non includere piastrine residue che potrebbero essersi raccolte sul fondo della provetta [22]. Assicurarci che il plasma sia povero di piastrine attraverso questa doppia centrifugazione è importante, perché l'eventuale presenza di piastrine e/o frammenti

piastrinici può causare falsa negatività dei test a causa della presenza di fosfolipidi a carica negativa sulla superficie delle membrane piastriniche, specialmente nel caso si lavori su plasma congelato. L'ultracentrifugazione (>5000 g) non è invece raccomandata perché può causare la generazione di micro-particelle che possono interferire sul risultato dei test. Prima della pubblicazione delle linee guida dell'ISTH, per eliminare eventuali piastrine residue si procedeva, dopo la prima centrifugazione, alla filtrazione del plasma tramite specifici filtri di acetato di cellulosa (0,22 μm). Questa operazione è ora invece sconsigliata perché, a parte l'aumento dei costi, determina la perdita di proteine ad alto peso molecolare, in particolare del Fattore von Willebrand [23]. La perdita di questo fattore causa una riduzione del livello del Fattore VIII e quindi un possibile allungamento dei tempi di coagulazione.

Nel caso non sia possibile eseguire i test su plasma fresco, questo può anche essere congelato, purché le procedure di congelamento e scongelamento siano eseguite in modo rapido e standardizzato per evitare la perdita dei fattori coagulativi più labili. Il congelamento deve essere rapido (bagno con ghiaccio secco/alcool o azoto liquido) e il plasma va poi conservato a temperatura uguale o inferiore a -70°C . Lo scongelamento deve avvenire per immersione del campione in un bagnomaria a 37°C per 5 minuti, per evitare la formazione di crioprecipitato; dopo scongelamento il plasma deve poi essere miscelato accuratamente prima dell'analisi.

Linee guida CLSI

Nessuna differenza.

Scelta dei test

Linee guida ISTH

Come noto, non esiste alcun test che sia in grado identificare tutti i pazienti con fenomeno LAC e per questo motivo in passato si suggeriva di fare quanti più test possibile. Questa strategia determina però un inaccettabile aumento del numero di falsi positivi. L'ISTH raccomanda quindi di eseguire solo due test, basati su principi differenti: (1) dRVVT (*diluted Russell Viper Venom Time*), ritenuto più robusto e specifico per rilevare il fenomeno LAC nei pazienti ad alto rischio di trombosi [24, 25]; (2) aPTT, utilizzando reagenti a bassa concentrazione di fosfolipidi e contenenti silice come attivatore, ritenuti molto sensibili al LAC [11, 12]. Tutti gli altri test utilizzati in passato come il tempo di protrombina diluito, aPTT che utilizzano attivatori diversi dalla silice, quali caolino o acido ellagico, test basati sull'uso di altri veleni di serpente, come Ecarina o Textarina, non sono raccomandati a causa della loro scarsa sensibilità e/o riproducibilità [25].

Linee guida CLSI

Il CLSI raccomanda l'uso di un dRVVT e un aPTT sensibile al LAC, non necessariamente contenente silice come attivatore. Questa raccomandazione si basa sul risultato di alcuni lavori che hanno dimostrato come la sensibilità del reagente aPTT al LAC non dipenda solo dal tipo di attivatore, ma anche dal tipo e concentrazione dei fosfolipidi [26, 27]. Gli stessi lavori hanno però anche evidenziato che alcuni reagenti commerciali contenenti acido ellagico come attivatore hanno una minore sensibilità al LAC. Inoltre, il CLSI non raccomanda l'uso di reagenti aPTT diluiti (per ottenere una bassa concentrazione di fosfolipidi), ma di utilizzare un reagente sensibile al LAC. In entrambi i casi ci possono essere delle limitazioni: se si usa un reagente poco sensibile anche diluendo i fosfolipidi, non è detto che il test abbia una migliore performance e d'altro canto se si usa un reagente sensibile ma a concentrazione standard di fosfolipidi (ovvero non diluito) la loro alta concentrazione potrebbe neutralizzare anticorpi deboli e quindi portare a false negatività.

Infine, mentre l'ISTH raccomanda di utilizzare solo due test, il CLSI non esclude la possibilità che il Laboratorio possa utilizzare anche metodi basati su principi diversi.

Procedure diagnostiche

Linee guida ISTH

La procedura diagnostica raccomandata si basa sui seguenti step: test di screening, test di miscela e test di conferma da eseguire in modo sequenziale.

I test di screening devono essere eseguiti con reagenti a bassa concentrazione di fosfolipidi per assicurare il massimo di sensibilità al LAC e come indicato in precedenza devono essere due, un dRVVT e un aPTT (che contenga silice come attivatore).

Nel caso il test o i test di screening risultino alterati si devono eseguire i test di miscela. Il test di miscela serve per verificare se l'allungamento del/i test di screening è dovuto a carenza di fattori o alla presenza di un inibitore (fosfolipide dipendente o no) e consiste nel ripetere il/i test di screening alterato/i utilizzando una miscela 1:1 tra plasma del paziente e un plasma normale entro 30 minuti (senza pre-incubazione). Come plasma normale è raccomandabile utilizzare un PPN preparato localmente seguendo le stesse raccomandazioni indicate per il plasma dei pazienti. Questo può poi essere congelato rapidamente in aliquote a -70°C e scongelato al momento dell'uso. Nel caso non sia possibile preparare un PPN, è possibile utilizzare prodotti commerciali (liofili o congelati) se sono stati preparati secondo le indicazioni sopra-riportate. Se il test di miscela si normalizza con aggiunta di PPN, significa che l'alterazione osservata

sul/i test di screening è dovuta a carenza di fattori. Al contrario, se rimangono alterati, ovvero se l'aggiunta di PPN non è in grado di normalizzare il test di screening, si può presupporre sia presente un inibitore (fosfolipide dipendente o no) e quindi devono essere eseguiti i test di conferma.

I test di conferma, al contrario dei test di screening, devono essere eseguiti con reagenti ad alta concentrazione di fosfolipidi per aumentare la specificità. A questo scopo possono essere utilizzati fosfolipidi a doppio strato (*bilayer*) o in fase esagonale, mentre non è raccomandato l'uso di piastrine congelate/scongelate a causa della scarsa standardizzazione nella loro preparazione. Ovviamente il test di conferma deve essere eseguito con lo stesso reagente utilizzato per il test di screening risultato alterato, salvo che per la più alta concentrazione di fosfolipidi. Se con l'aggiunta di alte concentrazioni di fosfolipidi il test si normalizza, si può porre diagnosi di LAC. Se invece il test di conferma risulta ancora alterato, ovvero l'aggiunta di alte concentrazioni di fosfolipidi non è in grado di normalizzarlo, allora si è in presenza di un inibitore non fosfolipide dipendente (es. inibitore specifico contro un fattore coagulativo).

Recentemente molte aziende suggeriscono di eseguire la ricerca del LAC attraverso l'uso dei cosiddetti test integrati. I test integrati consistono nell'eseguire simultaneamente sia il test di screening che il test di conferma su ciascun campione indipendentemente dal risultato del test di screening e senza eseguire il test di miscela. L'ISTH ha ribadito in alcuni lavori pubblicati dopo la stesura delle linee guida che l'uso dei test integrati è assolutamente da scoraggiare in quanto non prevedono l'esecuzione dei test di miscela [28–30].

Linee guida CLSI

La più importante differenza tra la linea guida ISTH e quella CLSI è rappresentata dall'ordine in cui i test di screening, miscela e conferma devono essere eseguiti. Come sopra indicato, in base a quanto pubblicato dall'ISTH, i test di screening, miscela e conferma vanno eseguiti in modo sequenziale e in questo ordine. Il CLSI, invece, sostiene che procedere al test di conferma solo nel caso in cui il test di miscela abbia dimostrato una mancata correzione è pericoloso perché può aumentare la probabilità di ottenere risultati falsamente negativi, in quanto il test di miscela può diluire l'effetto *in vitro* della presenza di anticorpi antifosfolipidi potenzialmente rilevanti dal punto di vista clinico. Per questo motivo il CLSI raccomanda di cambiare l'ordine dei test in: test di screening, test di conferma e test di miscela, quest'ultimo eseguito solo se necessario. Secondo queste linee guida il test di miscela può essere utile solo nei casi in cui si osservi un prolungamento del test di screening senza una correzione corrispondente del test di conferma in assenza di altre alterazioni coagulative evidenziate dai test di routine. Questa situazione potrebbe presentarsi quando c'è una coagulopatia

non diagnosticata o se gli anticorpi antifosfolipidi sono sufficientemente potenti da impedire all'eccesso di fosfolipidi presenti nel test di conferma di correggere il prolungamento del test di screening. In questi casi eseguire il test di miscela e il test di conferma su una miscela 1:1 tra plasma del paziente e PPN, in modo da diluire gli anticorpi antifosfolipidi, può consentire la corretta diagnosi del LAC.

Ricordiamo, inoltre, che un prolungamento del test di screening senza correzione del corrispondente test di conferma potrebbe presentarsi in presenza di un inibitore specifico contro un fattore coagulativo, quindi la procedura suggerita dal CLSI rischia di trascurare e rendere farragginosa la diagnosi di queste condizioni, che il più delle volte sono associate ad aumento significativo del rischio emorragico (es. in pazienti con inibitore specifico contro il Fattore VIII).

Per quanto riguarda l'uso dei test integrati, il CLSI non è contrario a patto che tali test vengano eseguiti su una miscela 1:1 con PPN e non su plasma indiluito.

Nel 2012 anche il *British Committee for Standards in Hematology* ha pubblicato le sue linee guida [18], che per molti aspetti sono simili a quelle pubblicate dall'ISTH. In relazione all'uso dei test integrati, queste linee guida indicano che i test di miscela certamente migliorano la specificità, ma al contempo, introducendo un fattore di diluizione, possono dare risultati falsamente negativi in caso di LAC deboli. Quindi, come raccomandato dal CLSI, in assenza di altre condizioni che possano giustificare un prolungamento dei tempi di coagulazione, suggeriscono che i campioni con test di miscela negativo ma con test di screening e di conferma positivi debbano essere considerati LAC positivi.

Negli ultimi anni, l'uso dei test integrati è diventato relativamente comune nei Laboratori, poiché certamente questa procedura è più rapida e semplice, in quanto l'interpretazione dei risultati si basa solo sulla percentuale di correzione tra i tempi di coagulazione registrati con basse e alte concentrazioni di fosfolipidi. Ciononostante, come già indicato precedentemente e in accordo con le linee guida dell'ISTH, riteniamo che la diagnostica del LAC non possa prescindere dall'esecuzione dei test di miscela, almeno fino a quando non ci saranno chiare evidenze che indichino la non necessità di eseguire tali test. Si sottolinea, comunque, che in base alle attuali evidenze la mancata esecuzione dei test di miscela può determinare un alto rischio di risultati falsamente positivi.

Espressione dei risultati

Linee guida ISTH

I risultati devono essere espressi come ratio tra il tempo di coagulazione del plasma del paziente e quello di un PPN per

tutti i test (screening, miscela e conferma), in modo da minimizzare la variabilità intra- e inter-assay dovute alla performance dell'analizzatore, alla qualità e stabilità dei reagenti ecc.

Per i test di miscela si può utilizzare, in alternativa, un indice di correzione (ICA), calcolato secondo la seguente formula: $ICA = [(\text{tempo di coagulazione della miscela} - \text{tempo di coagulazione del test di screening del PPN}) / \text{tempo di coagulazione del test di screening del plasma del paziente}] \times 100$ [31].

Per i test di conferma può essere utilizzato un indice di correzione calcolato secondo la seguente formula: $[(\text{Ratio test di screening} - \text{Ratio test di conferma}) / \text{Ratio test di screening}] \times 100$ [32], o in alternativa, la ratio normalizzata screening/conferma, ovvero $\text{Ratio test di screening} / \text{Ratio test di conferma}$ [33].

Linee guida CLSI

Per il calcolo della ratio, al contrario dell'ISTH, il CLSI consiglia di utilizzare il valore medio dell'intervallo di riferimento; questo perché diversi PPN possono generare tempi di coagulazione diversi e ciò potrebbe generare problemi di false positività o negatività se il tempo di coagulazione del PPN si posiziona agli estremi dell'intervallo di riferimento. L'intervallo di riferimento va comunque determinato testando soggetti apparentemente sani nell'arco di diversi giorni. Il CLSI raccomanda anche l'esecuzione dei test su un PPN, come controllo normale, per verificare eventuali derive del sistema reagente/strumento. Un vantaggio dell'uso del valore medio dell'intervallo di riferimento è anche quello di semplificare le procedure di calcolo delle ratio in sistemi informatizzati.

Calcolo degli intervalli di riferimento/valori di cut-off e interpretazione dei risultati

Linee guida ISTH

I test di screening, miscela e conferma devono essere eseguiti sul plasma di almeno 40 soggetti apparentemente sani di età inferiore a 50 anni. Per i test di screening e miscela va poi utilizzato come *cut-off* il valore corrispondente al 99° percentile della distribuzione dei risultati, che corrisponde alla media ± 3 DS se la distribuzione dei valori è gaussiana. I test di screening e miscela devono essere considerati alterati se superano i valori di *cut-off* calcolati localmente. Poiché nei soggetti/pazienti con LAC positivo non sempre il test di conferma rientra nell'ambito dei valori ottenuti nei soggetti sani, per evitare di avere falsi negativi si raccomanda di utilizzare, anziché il 99° percentile, il valore medio ottenuto nella popolazione di soggetti sani. Il LAC deve essere considerato positivo se la percentuale di correzione del

Tabella 1 Confronto delle raccomandazioni per la diagnostica del LAC contenute nelle linee guida ISTH e CLSI

	ISTH 2009 [15]	CLSI 2014 [17]
Preparazione del campione	Doppia centrifugazione	Doppia centrifugazione
Test da utilizzare	dRVVT e aPTT	dRVVT e aPTT e/o altri
Ordine dei test	Screening–Miscela–Conferma	Screening–Conferma–(Miscela)
Calcolo della ratio	Valore del PPN	Valore medio del range di riferimento
Intervalli di riferimento/Valori di <i>cut-off</i>	99° percentile	97,5° percentile
Test di miscela	1:1 con PPN e interpretare utilizzando ICA o ratio	1:1 con PPN e interpretare utilizzando ICA o ratio
Valutazione del test di conferma	% di correzione o Ratio normalizzata screening/conferma	% di correzione o Ratio normalizzata screening/conferma
Pazienti in terapia con AVK	Plasma indiluito se INR <1,5; miscela 1:1 con PPN se INR 1,5–3,0	Test di screening e conferma su plasma diluito 1:1 con PPN
Pazienti in terapia con eparina non frazionata	Non eseguire o interpretare con cautela	Eseguibile se il reagente contiene sostanze neutralizzanti
Commento interpretativo dei risultati	Raccomandato	Raccomandato

AVK = anticoagulanti anti-vitamina K; CLSI = *Clinical & Laboratory Standard Institute*; ICA = [(tempo di coagulazione della miscela – tempo di coagulazione del test di screening del PPN)/tempo di coagulazione del test di screening del plasma del paziente] × 100; ISTH = *International Society on Thrombosis and Haemostasis*; % correzione = [(Ratio test di screening – Ratio test di conferma)/Ratio test di screening] × 100; PPN = pool di plasmi normali; Ratio normalizzata screening/conferma = Ratio test di screening/Ratio test di conferma.

test di conferma supera il valore di *cut-off*. L'uso di *cut-off* stabiliti altrove anche se con gli stessi reagenti e strumenti è sconsigliato [34].

Il LAC deve essere considerato positivo anche se uno solo dei due test eseguiti (dRVVT e aPTT) è risultato positivo.

Data la scarsa standardizzazione dei test, è necessario eseguire in ogni seduta analitica i test anche su campioni noti o plasmi liofilici commerciali.

Linee guida CLSI

Il CLSI sottolinea il fatto che per utilizzare il 99° percentile i soggetti sani dovrebbero essere almeno 120, o anche di più se la distribuzione dei valori non è gaussiana. Inoltre, propone di utilizzare la media ± 2DS o il 97,5° percentile della distribuzione dei valori ottenuti in soggetti sani per aumentare la sensibilità dei test. È ovvio che l'impiego del metodo proposto dal CLSI può determinare un aumento dei falsi positivi, così come, viceversa, il metodo proposto dall'ISTH può determinare un aumento dei falsi negativi.

Refertazione

Linee guida ISTH

I test devono essere riportati sul referto con risultati quantitativi, ma devono essere accompagnati da un commento interpretativo che indichi se tali risultati sono compatibili con la presenza/assenza del fenomeno LAC. Commenti come “dubbio” o “borderline” sarebbero da evitare, piuttosto

è preferibile raccomandare un controllo dei test a distanza di qualche giorno. In caso di positività del/i test, nel referto deve essere raccomandato un controllo a distanza di almeno 12 settimane.

In ogni caso, i test per la diagnostica del LA devono essere interpretati nel contesto di un profilo completo comprendente anche il dosaggio degli anticorpi anticardiolipina e anti β2 glicoproteina I (IgG e IgM). Secondo quanto riportato in letteratura, la presenza di medio-alto titolo di questi anticorpi dello stesso isotipo (specialmente se di classe IgG) e LAC positivo identifica i pazienti a più alto rischio di trombosi [35, 36] e più frequentemente la positività viene confermata a distanza di 12 settimane [37]. La positività isolata del LAC è invece più frequente nei soggetti asintomatici [38].

Linee guida CLSI

Le raccomandazioni del CLSI sono simili, salvo che per il suggerimento a utilizzare commenti come “dubbio” o “borderline” se il risultato dei test non consente una chiara interpretazione.

Nella Tabella 1 si riporta il confronto delle raccomandazioni per la diagnostica del LAC contenute nelle linee guida ISTH e CLSI.

Conflitti di interesse Nessuno.

Studi condotti su esseri umani o animali L'articolo non contiene studi eseguiti su esseri umani e su animali da parte degli autori.

Consenso informato Non applicabile.

Bibliografia

1. Cervera R (2017) Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 151(Suppl 1):S43–S47
2. Giannakopoulos B, Krilis SA (2013) The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 368:1033–1044
3. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C et al (2005) Antibody profiles for the diagnosis of anti phospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 93:1147–1152
4. Pengo V, Ruffatti A, Tonello M et al (2015) Antiphospholipid syndrome: antibodies to Domain 1 of beta2-glycoprotein 1 correctly classify patients at risk. *J Thromb Haemost* 13:782–787
5. De Craemer AS, Devreese KM (2016) Role of anti-domain 1- β 2 glycoprotein I antibodies in the diagnosis and risk stratification of antiphospholipid syndrome: reply. *J Thromb Haemost* 14:2078–2080
6. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I et al (2011) Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. *Lupus* 20:206–218
7. Pengo V, Denas G, Padayattil SJ et al (2015) Diagnosis and therapy of antiphospholipid syndrome. *Pol Arch Med Wewn* 125:672–677
8. Bates SM, Greer IA, Middeldorp S et al (2012) VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 141(Suppl 2):e691S–e736S
9. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T et al (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4:295–306
10. Jennings I, Kitchen S, Woods TA et al (1997) Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK national external quality assessment scheme (NEQAS) for blood coagulation. *Thromb Haemost* 77:934–937
11. Arnout J, Meijer P, Vermeylen J (1999) Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European concerted action on thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human beta(2)-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 81:929–934
12. Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V et al (2003) Lupus anticoagulant (LA) testing: performance of clinical laboratories assessed by a national survey using lyophilized affinity-purified immunoglobulin with LA activity. *Clin Chem* 49:1608–1614
13. Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J et al (2005) Multilaboratory testing of thrombophilia: current and past practice in Australasia as assessed through the Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Program for Hematology. *Semin Thromb Hemost* 31:49–58
14. Pengo V, Biasiolo A, Gesele P et al (2007) Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J Thromb Haemost* 5:925–930
15. Pengo V, Tripodi A, Reber G et al (2009) Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 7:1737–1740
16. Brandt JT, Triplett DA, Alving B et al (1995) Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 74:1185–1190
17. CLSI (2014) Laboratory testing for the Lupus Anticoagulant; approved guideline. CLSI document H60-A. Wayne, PA, USA:CLSI
18. Keeling D, Mackie I, Moore GW et al (2012) Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 157:47–58
19. Schouwers SM, Delanghe JR, Devreese KM (2010) Lupus Anticoagulant (LAC) testing in patients with inflammatory status: does C-reactive protein interfere with LAC test results? *Thromb Res* 125:102–104
20. Devreese KM (2014) Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int J Lab Hematol* 36:352–363
21. Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A et al (2017) Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants. *Autoimmun Rev* 16:173–178
22. CLSI (2010) Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline—third edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA, USA:CLSI
23. Favaloro EJ (2007) Preanalytical variables in coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 18:86–89
24. Galli M, Finazzi G, Bevers EM et al (1995) Kaolin clotting time and dilute russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and beta 2-glycoprotein i-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 86:617–623
25. Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG (2008) Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev* 22:93–105
26. Kershaw G, Favaloro EJ (2012) Laboratory identification of factor inhibitors: an update. *Pathology* 44:293–302
27. Kumano O, Ieko M, Naito S et al (2012) APTT reagent with elagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent. *J Thromb Haemost* 10:2338–2343
28. Tripodi A, Pengo V (2011) More on: laboratory investigation of lupus anticoagulants: mixing studies are sometimes required. *J Thromb Haemost* 9:2126–2127
29. Pengo V (2012) ISTH guidelines on Lupus Anticoagulant testing. *Thromb Res* 130(Suppl 1):S76–S77
30. Tripodi A (2012) To mix or not to mix in Lupus anticoagulant testing? That is the question. *Semin Thromb Hemost* 38:385–389
31. Rosner E, Pauzner R, Lusky A et al (1987) Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 57:144–147
32. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M et al (2002) Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment. Performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with Staclot LA. *Thromb Haemost* 88:583–586
33. Jacobsen EM, Barna-Cler L, Taylor JM et al (2000) The Lupus Ratio test—an interlaboratory study on the detection of lupus anticoagulants by an APTT-based, integrated, and semi-quantitative test. Fifth International Survey of Lupus Anticoagulants—ISLA 5. *Thromb Haemost* 83:704–708
34. Tripodi A, Chantarangkul V, Cini M et al (2017) Variability of cut-off values for the detection of lupus anticoagulants: results of an international multicenter multiplatform study. *J Thromb Haemost* 15:1180–1190
35. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C et al (2010) Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 8:237–242
36. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C et al (2011) Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood* 118:4714–4718

37. Pengo V, Ruffatti A, Del Ross T et al (2013) Confirmation of initial antiphospholipid antibody positivity depends on the antiphospholipid antibody profile. *J Thromb Haemost* 11:1527–1531
38. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P et al (2007) A comparison of lupus anticoagulant-positive patients with clinical picture of antiphospholipid syndrome and those without. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:e309–e310