L'interpretazione del dato autoanticorpale nella sindrome da anti-fosfolipidi

N. Bizzaro

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, Tolmezzo (UD)

Riassunto

La misurazione degli anticorpi anti-cardiolipina, anti-β_2- glicoproteina I e del lupus anticoagulant ha consentito negli ultimi 15 anni di migliorare sostanzialmente l'approccio diagnostico e terapeutico dei pazienti con evento tromboembolico su base autoimmune. Tuttavia, nonostante la loro importanza clinica, questi test rimangono ancora poco riproducibili a causa della carente standardizzazione dei metodi. A complicare il quadro, intervengono l'elevato numero di richieste in pazienti con bassa probabilità pre-test di malattia, la approssimativa definizione dei livelli decisionali, la non uniforme modalità di refertazione e la difficile interpretazione clinica dei risultati. Questa rassegna prende in esame i numerosi aspetti controversi che sono alla base della variabilità pre e post-analitica dei test per la determinazione degli anticorpi anti-fosfolipidi, la cui conoscenza è necessaria per una corretta interpretazione dei risultati e per la compilazione del referto.

Summary

Interpretation of antibody results in the anti-phospholipid syndrome.

In the last 15 years the evaluation of anti-cardiolipin antibodies, anti-β_2-glicoprotein I and lupus anticoagulant has substantially improved the diagnostic and therapeutic approach in patients with an autoimmune based thromboembolic event. However, in spite of their clinical value, these tests are poorly reproducible due to the poor level of method standardization. Matters are complicated further by the high number of requests from patients with low pre-test probability of disease, the approximate definition of decisional levels, the lack of uniformity in report modalities, and the difficult clinical interpretation of the results. This review analyzes the various controversial aspects of tests used to determine the anti-phospholipid antibodies and their fundamental role in the pre- and post-analytical variability, the knowledge of which is necessary in order to correctly interpret results and compile the medical report.

Key words: Anti-phospholipid antibodies; anti-cardiolipin antibodies; anti-β_2GPI antibodies; lupus anticoagulant; pre-analytical variables.

Introduzione

La diagnosi della sindrome da anti-fosfolipidi (APS) costituisce in ambito reumatologico un caso particolare. Mentre infatti per la diagnosi e la classificazione di tutte le altre malattie autoimmuni sistemiche sono necessari più criteri clinici e di laboratorio, per la APS sono sufficienti un solo segno clinico, la trombosi, e un solo parametro immunosierologico, la positività degli anticorpi anti-fosfolipidi (aPL). Entrambi questi parametri dovrebbero perciò, almeno in teoria, essere dotati di specificità assoluta, ma così non è. Un evento tromboembolico può essere infatti dovuto a numerose cause diverse da quella autoimmune, e la specificità diagnostica degli aPL è tutt'altro che assoluta. Il problema maggiore in questa diagnostica è dunque il consistente numero di casi falsi positivi, con evidenti ricadute sul piano terapeutico dal momento che una corretta profilassi del paziente con APS prevede la somministrazione di una terapia anticoagulante a lungo termine se non per tutta la vita[1].

Appare perciò chiaro come una corretta e accurata misurazione degli aPL sia della massima importanza. Va poi tenuto conto che quando il test viene richiesto in soggetti che hanno avuto un evento trombotico, essendo già soddisfatto a priori il criterio clinico, il peso nella formulazione diagnostica di APS ricade esclusivamente sul test di laboratorio. Inoltre, poiché gli aPL costituiscono uno dei criteri per la diagnosi di lupus eritematoso sistemico (LES) e, nei pazienti affetti da LES, conferiscono un aumentato rischio di sviluppare

Corrispondenza a: Dott. Nicola Bizzaro, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, via Morgagni 18, 33028 Tolmezzo (UD). E-mail: nbizzaro@ass3.sanita.fvg.it

trombosi, è altrettanto evidente che il risultato del test condiziona sia la diagnosi che la decisione di instaurare una terapia profilattica anticoagulante.

Nonostante gli evidenti progressi compiuti nella fase analitica del dosaggio degli aPL, molto resta ancora da fare per il corretto impiego dei test e nella interpretazione dei risultati.

L'appropriatezza della richiesta

L'appropriatezza della richiesta è considerata a ragione una componente essenziale della fase preanalitica, con importanti effetti sulla specificità diagnostica e sul valore predittivo dei test di laboratorio. Il che significa che per una efficace diagnosi è necessario richiedere i test utili nei pazienti con la maggior probabilità pretest di essere affetti dalla malattia.

In accordo con le linee guida internazionali, i pazienti da sottoporre al test aPL sono quelli affetti da trombosi venosa o arteriosa, aborto ricorrente, pre-eclampsia, piastrinopenia non altrimenti spiegata, ulcere alle gambe, livedo reticularis, anemia emolitica, sintomi neurologici[2] e da LES[3].

E' ritenuto inutile e svantaggioso nell'ottica del rapporto costo/beneficio, richiedere il test a scopo preventivo nelle donne che assumono estroprogestinici, data la bassissima probabilità che donne sane siano positive per aPL[4].

Quali sono i test che vanno richiesti ed eseguiti nel sospetto di APS? I criteri classificativi preliminari proposti nel 1999 dal gruppo internazionale che da anni si occupa della APS sono rappresentati dalla positività degli anticorpi anti-cardiolipina (aCL) $\beta_2$glicoproteina I (β_2GPI)-dipendenti e del lupus anticoagulant (LAC)[2]. E' sempre necessario eseguire ambedue i test in parallelo perché è sufficiente che uno solo dei due sia positivo per configurare la diagnosi di APS. In occasione del congresso internazionale sui fosfolipidi tenutosi a Sidney alla fine del 2004, il gruppo di studio internazionale che si occupa di questa patologia ha stabilito di inserire tra gli esami diagnostici anche il dosaggio degli anticorpi anti-β_2GPI[5]. I nuovi criteri di laboratorio e le modalità di classificazione sono elencati in Tabella I.

A margine, è importante sottolineare che i criteri classificativi adottati dagli organismi internazionali si propongono sostanzialmente la confrontabilità degli studi e perciò privilegiano la specificità dei test. Questo è il motivo per cui i criteri hanno bassa sensibilità diagnostica e tendono a sottostimare la diagnosi in pazienti con bassi livelli anticorpali o con altri anticorpi della famiglia dei fosfolipidi, quali gli anti-protrombina, gli anti-fosfatidil serina, gli anti-annexina, ecc.

Accettabilità del campione e variabilità preanalitica

I test ELISA per aCL e anti-β_2GPI vanno eseguiti su campioni di siero. Se si utilizza plasma citratato si possono ottenere valori inferiori a quelli ottenuti nei campioni di siero per la diluizione dovuta alla presenza dell'anticoagulante[6].

Come quasi tutti gli anticorpi, anche gli aCL e gli anti-β_2GPI sono molto robusti e non presentano problemi particolari nella fase pre-analitica. E' esperienza comune ed è comunque anche stato dimostrato che la conservazione tra -20 e -80 °C mantiene inalterata la reattività e la concentrazione anticorpale per almeno 10 anni[7]. Ripetuti scongelamenti e ricongelamenti del siero non costituiscono un aspetto critico, così come non vi è necessità di un rapido stoccaggio in congelatore dopo il prelievo e la sierazione.

Un discorso diverso deve invece essere fatto per il LAC. I test che più comunemente vengono utilizzati sono il tempo di coagulazione al caolino (KCT) e il test al veleno di vipera Russel diluito (dRVVT). Il KCT è un test globale (esplora l'intera cascata coagulativa), molto sensibile (per l'assenza di fosfolipidi nella sua formulazione), capace di rivelare la presenza di LAC anche a basso titolo, ma è meno specifico del dRVVT che esplora invece la cascata coagulativa a valle del fattore X attivato ed essendo di semplice esecuzione oltre che automatizzabile, è di fatto il test più diffuso nei laboratori clinici.

Trattandosi di test coagulativi, vanno eseguiti in tempi brevi o il plasma deve essere subito congelato per

Tabella I. Nuovi criteri di laboratorio per la sindrome da anti-fosfolipidi e categorie per la classificazione anticorpale, proposti dal gruppo di studio internazionale alla fine del 2004 a Sidney.

Criteri

- Positività del lupus anticoagulant rilevato secondo le raccomandazioni del Sottocomitato sul lupus anticoagulant/anticorpi anti-fosfolipidi della Società Internazionale di Trombosi ed Emostasi.
- Positività ad alto-medio titolo degli anticorpi anti-cardiolipina di classe IgG e/o IgM, ottenuta con metodo ELISA standardizzato.
- Positività degli anticorpi anti-β_2GPI di classe IgG e/o IgM, ottenuta con metodo ELISA standardizzato.

Per essere considerato positivo, un paziente deve risultare positivo ad uno dei tre test in due successive occasioni a distanza di almeno 12 settimane.

Classificazione delle categorie anticorpali

Ia: Presenza di soli anticorpi anti-cardiolipina (IgG e/o IgM).

Ib: Presenza del solo lupus anticoagulant.

Ic: Presenza di soli anticorpi anti-β_2GPI (IgG e/o IgM).

II. Presenza di più anticorpi (qualsiasi combinazione).

essere rapidamente scongelato al momento dell'esecuzione dell'esame. Ripetuti scongelamenti e ricongelamenti sono da evitarsi nel modo più assoluto. La fragilità del dosaggio non è tanto legata agli anticorpi ad attività LAC, quanto ai cofattori labili della coagulazione (FV e FVIII) che incominciano a perdere attività dopo 4-5 ore dal prelievo se non immediatamente congelati. E' intuitivo che una carenza di fattori labili può fornire risultati alterati del test anche in assenza di anticorpi LAC. Per tale motivo, il test non andrebbe eseguito in pazienti in terapia anticoagulante, evento che si verifica invece frequentemente dal momento che molto spesso il test viene richiesto a scopo diagnostico in pazienti con trombosi recente, quando è già stata instaurata una terapia anticoagulante. In questi casi, per evitare di fornire risultati inaccurati, se il paziente è in terapia eparinica, è sufficiente eseguire il tempo di trombina per valutare la possibile interferenza dovuta alla presenza di eparina non-frazionata. Se invece il paziente è in terapia anticoagulante orale, è possibile ottenere dati accurati solo se l'INR è <3.5, diluendo il plasma 1:2 con plasma normale. Il test non è invece accurato per valori di INR >3.5[8].

Una volta centrifugato ad elevato numero di giri per 20 minuti per eliminare le piastrine, il plasma va filtrato su membrana da 0.22 μm per eliminare anche gli eventuali frammenti residui delle membrane piastriniche che, essendo costituite da fosfolipidi, potrebbero adsorbire gli anticorpi e produrre risultati falsi negativi.

Intervalli di riferimento e livelli decisionali

Gli aPL sono autoanticorpi naturali e come tali sono presenti a bassissime concentrazioni in tutti gli individui. In generale, secondo quanto proposto da Harris[9], quasi tutti i produttori di kit diagnostici ELISA tarano i loro sistemi analitici in modo che il cut-off sia posizionato attorno alle 10 unità sia per gli aCL IgG e IgM che per gli anti-β_2GPI IgG e IgM e questo valore soglia trova in genere conferma quando nei singoli laboratori clinici si determina l'intervallo di riferimento in una popolazione di soggetti sani. Tuttavia, stimolazioni policlonali che si possono avere in seguito a malattie infettive o linfoproliferative croniche o quando è presente una malattia autoimmune, possono dar luogo a un aumento dei livelli anticorpali di qualche unità. Per tale motivo è bene che ciascun laboratorio determini i propri intervalli di riferimento su casistiche che comprendano anche sieri di pazienti con malattie infammatorie croniche e malattie infettive. Uno studio condotto dal gruppo di studio europeo sui fosfolipidi ha evidenziato che gli intervalli di riferimento degli aCL vengono determinati nei modi più vari e disomogenei, con risultati ovviamente molto diversi negli esami eseguiti sugli stessi sieri[10]. Viene pertanto suggerito che, poiché la distribuzione dei valori non ha andamento gaussiano, l'intervallo di riferimento venga definito applicando il 99° percentile. I risultati andrebbero espressi in unità internazionali (GPL o MPL ovvero μg/ml di anticorpo), introducendo in ogni serie analitica una curva di calibrazione di almeno 5 punti, utilizzando gli standard primari di Harris o standard secondari[4,11].

L'incertezza di quale sia la miglior maniera di determinare gli intervalli di riferimento ha suggerito agli organismi internazionali di consigliare di adottare tre fasce di positività per gli aCL: a basso titolo quando i valori sono compresi tra 10 e 30 unità, a titolo intermedio tra 30 e 80 unità e ad alto titolo quando il livello anticorpale è superiore a 80 unità[9]. Questa divisione in categorie ha ovviamente migliorato la comparabilità dei dati ma non ha certamente risolto il problema. Recenti studi di metanalisi hanno evidenziato però che solo livelli >40 unità hanno significato clinico sia dal punto di vista diagnostico che come livello decisionale terapeutico[11,12].

A prescindere dal suo significato diagnostico, il livello anticorpale ha comunque un valore prognostico relativo, nel senso che se è più probabile che una trombosi si manifesti in presenza di valori elevati di aCL o di anti-β_2GPI piuttosto che in presenza di valori medio-bassi, è vero anche che vi sono pazienti con bassi titoli (< 20 unità) che sviluppano tromboembolia.

Algoritmo diagnostico

Una volta selezionato correttamente il paziente, la richiesta, come detto, deve comprendere sia il test aCL β_2GPI-dipendente (isotipi IgG e IgM) che il LAC. Il test per anti-β_2GPI IgG e IgM che ha una sensibilità inferiore a quella degli aCL ed è raramente positivo quando gli aCL sono assenti[4,13], secondo le più recenti raccomandazioni internazionali, dovrebbe comunque essere eseguito insieme al test aCL per confermarne la specificità del riscontro e perché la sua positività comporta un aumentato rischio trombotico[5].

Per quanto riguarda il LAC, il test va eseguito secondo una precisa sequenza diagnostica su tre livelli indicati come test di screening, di miscela e di conferma[14]. Se lo screening è positivo, si ripete il test dRVVT utilizzando una miscela in parti uguali di plasma in esame e plasma con tempo di tromboplastina normale per evidenziare la eventuale presenza di deficit di fattori della coagulazione. In assenza di LAC, una concentrazione normale di fattori coagulativi nel plasma normale è infatti in grado di normalizzare il test. Se il tempo di coagulazione non si normalizza e si suppone quindi che siano presenti anticorpi ad attività LAC, si esegue un test dRVVT di conferma utilizzando un reagente ad elevato contenuto fosfolipidico, in grado di adsorbire tutti gli anticorpi presenti nel plasma in esame. Se ciò avviene, il tempo di coagulazione si normalizza e conferma la presenza di LAC; se ciò non avviene, è verosimile che siano presenti altri anticorpi (non LAC) diretti verso fattori della coagulazione (nella maggior parte dei casi, verso il fattore VIII). Uno sche-

ma riassuntivo dell'algoritmo diagnostico è rappresentato in Figura 1.

E' opportuno ricordare che il test di miscela comporta una diluizione 1:2 del plasma in esame e che pertanto anticorpi con debole attività LAC potrebbero risultare non rilevabili.

In caso di positività dei test (aCL, anti-β_2GPI e LAC) è necessario ripeterli a distanza di 12 settimane per verificarne la persistenza e, qualora il paziente abbia avuto un evento trombotico, porre diagnosi di APS[5]. Si ritiene invece che, pur in presenza di un test positivo, un evento trombotico accaduto più di 5 anni prima del rilievo di laboratorio non possa soddisfare i criteri per la diagnosi di APS[5], anche se evidentemente non può escluderla qualora i test non siano mai stati eseguiti in precedenza. In quest'intervallo invece il simultaneo riscontro di almeno un criterio clinico ed uno di laboratorio consente di porre diagnosi.

Poiché tra gli esami diagnostici che vengono richiesti in presenza di un evento trombotico, oltre ai test immunologici vengono spesso inclusi anche test coagulativi alla ricerca di una possibile diatesi trombofilica congenita, è necessario conoscere che la presenza di LAC interferisce con il test per la ricerca della resistenza alla proteina C attivata (APC-R) che può risultare falsamente positivo. Quindi, nel caso di doppia positività per LAC e APC-R, il risultato di quest'ultima è verosimilmente da considerarsi un falso positivo[15].

Differenza critica

Se dal punto di vista diagnostico i livelli anticorpali hanno un significato relativo e possono oscillare tra le 40 e le 80 unità senza spostare la categoria di positività e modificare l'interpretazione del risultato, una differenza critica è stata invece dimostrata quando si utilizzino le concentrazioni anticorpali nel monitoraggio dei pazienti con APS. Una consistente diminuzione del livello anticorpale o il loro rientro al di sotto del valore soglia, si accompagna in genere ad un minor rischio trombotico e in alcuni casi ciò induce, qualora non siano presenti altri fattori di rischio, ad interrompere la terapia anticoagulante. Il che sposta il problema dal significato clinico della differenza tra valori elevati e valori medio-bassi, a quello analitico: in laboratorio siamo cioè in grado di misurare accuratamente i livelli anticorpali? Per gli aCL non esistono studi specifici sull'argomento ma possono essere utilizzati i dati ricavati da verifiche esterne di qualità (VEQ) che dimostrano quanto poco riproducibili siano i test eseguiti in diversi laboratori con kit diversi[16]. In un recente studio condotto dal gruppo di studio in autoimmunologia della SIMeL[17] abbiamo bene evidenziato questo problema nel dosaggio degli anticorpi anti-Scl70 e non vi è ragione di ritenere che la situazione per gli aCL sia molto diversa.

Per il LAC, nonostante le difficoltà di standardizzazione della procedura analitica, un recente studio condotto a livello nazionale nell'ambito della Federazione dei Centri per la Sorveglianza degli Anticoagulati (FCSA) ha dimostrato invece che dal 84 al 99% dei 70 centri partecipanti erano in grado di differenziare livelli bassi, medi ed elevati di attività e di identificare correttamente campioni contenenti eparina e con deficit di fattori[18]. Resta da vedere però se questi risultati, ottenuti in centri specialistici, possono essere estesi a tutti i laboratori che eseguono il test.

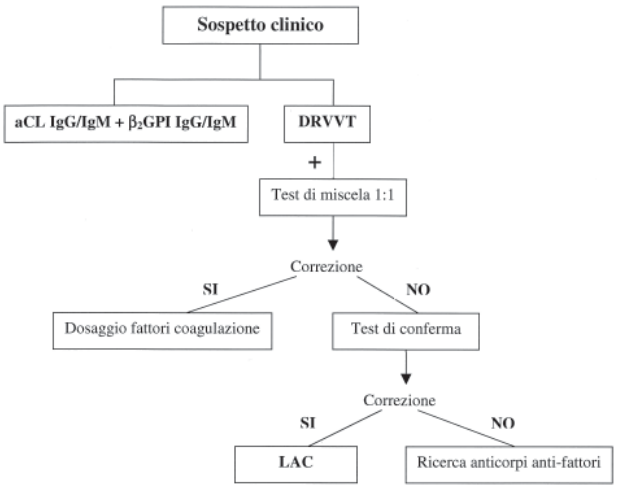

Figura 1. Algoritmo diagnostico per la diagnosi di laboratorio della sindrome da antifosfolipidi.

Specifiche di qualità

L'accuratezza analitica nel dosaggio degli aCL è difficile da dimostrare, dato che non esistono metodi di riferimento. L'imprecisione analitica non è diversa da quella che si osserva nel dosaggio di altri anticorpi e oscilla tra il 10 e il 30% nella serie e tra il 20 e il 50% tra le serie[10,19]. Viene comunque raccomandato di utilizzare metodi che consentano di mantenere il coefficiente di variazione (CV) nella serie al di sotto del 20%. Se il CV è < 20% è accettabile eseguire i test in singolo, altrimenti è fortemente raccomandata l'esecuzione in doppio[6].

La specificità diagnostica del test aCL è strettamente legata alla presenza di β_2GPI nel mezzo di reazione, in quantità saturanti il legame con i fosfolipidi. Esistono infatti anticorpi aCL β_2GPI-indipendenti (aspecifici) che si possono ritrovare in numerose malattie infettive (AIDS, tbc, sifilide, ecc.) e aCL β_2GPI-dipendenti (specifici) che si associano invece a trombosi[20]. Oltre ad essere un cofattore essenziale del test aCL, anche l'origine della β_2GPI è un aspetto importante per l'accuratezza del test. La β_2GPI bovina, utilizzata per molti anni nei test aCL ELISA, pur presentando un'analogia strutturale del 80% con quella umana[21], non consente l'identificazione di tutti gli anticorpi aCL β_2GPI-dipendenti. Un 10% circa degli aCL sono infatti rivolti verso la sola β_2GPI umana e la sensibilità del test è perciò maggiore quando si utilizza β_2GPI umana[22]. Attual-

mente, la maggior parte dei kit aCL, ma non tutti, utilizza la proteina umana purificata.

E' stato recentemente suggerito che l'impiego di sieri di riferimento costituiti dagli anticorpi monoclonali umani o umanizzati HCAL (anticorpo monoclonale chimerico di classe IgG derivante da un monoclonale murino aCL)[23] e EY2C9 (anticorpo monoclonale anti-β_2GPI umano di isotipo IgM ottenuto da un paziente con APS)[24], pur con i limiti dell'utilizzo di anticorpi monoclonali nel valutare popolazioni policlonali, possa migliorare la performance del test[25]. Questi anticorpi, entrambi diretti verso la β_2GPI, sono attualmente distribuiti a pagamento dal CDC di Atlanta (Georgia, USA) ai centri che ne fanno richiesta; alcune aziende di diagnostici hanno questi monoclonali nel loro listino commerciale.

Interferenze

Tra le possibili interferenze all'origine di risultati falsi positivi nei test aCL e anti-β_2GPI, vi è la presenza di gammopatie monoclonali[26] e, limitatamente all'isotipo IgM, la presenza di fattore reumatoide o di crioglobuline[27]. Queste condizioni andrebbero perciò escluse ed eventualmente segnalate in caso di positività dei test in pazienti con queste patologie.

Il referto

Per quanto riguarda il tempo di risposta, ogni laboratorio può stabilire la frequenza di esecuzione del test in rapporto alle richieste e alle esigenze locali. Anche per gli aCL e gli anti-β_2GPI come per tutti gli altri dosaggi anticorpali, è più importante fornire un dato accurato piuttosto che in breve tempo.

Nel referto, sia per il test aCL che per gli anti-β_2GPI, va sempre riportato il valore quantitativo degli anticorpi di classe IgG e IgM. Per gli aCL, in accordo con le linee guida internazionali, va indicato anche che valori <30 GPL o MPL sono da considerarsi bassi, intermedi tra 30 e 80, e alti se >80. Per gli anti-β_2GPI invece, data la maggiore specificità del test, qualsiasi valore superiore al cut-off è ritenuto già di per sé significativo.

Sostanzialmente, un commento ai risultati va inserito solo in caso di positività dei test, segnalando che bassi livelli anticorpali possono essere presenti in individui sani o in numerose patologie non APS correlate e che livelli medio-alti che persistano per oltre 12 settimane, costituiscono uno dei criteri per la diagnosi di APS. E' perciò sempre opportuno che venga anche segnalata la necessità di ripetere l'esame a distanza di 3 mesi.

Inoltre, è possibile che vi siano talora risultati discordanti tra i dati ottenuti nella misurazione degli aCL e degli anti-β_2GPI[28]. In queste situazioni, sarà opportuno segnalare che se i primi sono dotati di maggiore sensibilità diagnostica rispetto agli anti-β_2GPI, quest'ultimi sono in genere considerati più specifici e che comunque sarà necessario ripetere i dosaggi a distanza di qualche mese per confermare o meno le positività riscontrate.

Bibliografia

1. Gharavi AE, Pierangeli SS, Wilson WA. Anticardiolipin antibodies: importance, controversies, discrepancies; the need for guidelines and calibrators. Clin Exp Rheumatol 2001; 19:237-9.
2. 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: report of an international workshop. Arthritis Rheum 1999; 42:1309-11.
3. Hochberg MC. The American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40:1725.
4. Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. Br J Haematol 2000; 109:704-15.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the preliminary classification criteria for antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2005; 3:1-12.
6. Wong RCW, Gillis D, Adelstein S, Baumgart K, Favaloro EJ, Hendle MJ, et al. Consensus guidelines on anti-cardiolipin antibody testing and reporting. Pathology 2004; 36:63-8.
7. McIntyre JA, Wagenknecht DR. Effect of storage conditions on the ELISA activity of antiphospholipid antibodies. Thromb Haemost 1994; 73:676.
8. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment. Performance of dilute Russel viper venom test and silica clotting time in comparison with Staclot LA. Thromb Haemost 2002; 88:583-6.
9. Harris EN. The second international anticardiolipin standardization workshop: the Kingston Antiphospholipid Antibody Study (KAPS) group. Am J Clin Pathol 1990; 94:476-84.
10. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations. A cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. Thromb Haemost 2001; 86:575-83.
11. Harris EN, Pierangeli SS. Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. Lupus 2002; 11:269-75.
12. Galli M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis: do test patterns identify the patients' risk? Thromb Res 2004;114:597-601.
13. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Tampoia M, Tozzoli R. Prevalence and clinical correlation of anti-phospholipid-binding protein antibodies in anticardiolipin-negative patients with systemic lupus erythematosus and women with unexplained recurrent miscarriages. Arch Pathol Lab Med 2005; 129:61-8.
14. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. 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 1995; 74:1185-90.
15. Halbmeyer WM, Haushofer A, Schön R, Fischer M. Influence of lupus anticoagulant on a commercially available kit for APC-Resistance. Thromb Haemost 1994; 72:645-6.
16. Bizzaro N, White PAE, Tozzoli R. Verifica esterna di qualità in autoimmunità. Prime esperienze dei laboratori clinici italiani con i programmi UK-NEQAS. Riv Med Lab 2002; 4:45-51.
17. Villalta D, Bizzaro N, Platzgummer S, Antico A, Tampoia M, Camogliano L, et al. Accuracy of semiquantitative immunoenzymatic methods in quantitation of anti-topoisomerase I (Scl-70) antibodies. Clin Rheumatol 2005; 24:453-9.
18. Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V, Pengo V. Lupus anticoagulant (LA) testing: performance of clinical laboratories assessed by a national survey using lyophilized affinity-purified immunoglobulin with LA activity. Clin Chem 2003; 49:1608-14.
19. Favaloro EJ, Silvestrini R. Assessing the usefulness of anticardiolipin antibody assays: a cautious approach is suggested by high variation and limited consensus in multilaboratory testing. Am J Clin Pathol 2002; 118:548-57.
20. Matsuura E, Igarashi I, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet 1990; 336:177-8.
21. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. EMBO J 1999; 18:5166-74.
22. Tincani A, Meroni PL. Anticardiolipin antibodies: to be or no to be detectable. Clin Exp Rheumatol 2001; 18:240-1.
23. Ichikawa K, Tsutsumi A, Atsumi T, Matsuura E, Kobayashi S, Hughes GR, et al. A chimeric antibody with the human gamma 1 constant region as a putative standard for assays to detect β2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibodies. Arthritis Rheum 1999; 42:2461-70.
24. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GR. β2-glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum 1994; 37:1453-61.
25. 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.
26. Bizzaro N, Pasini P, Finco B. False-positive reactions for IgA anti-phospholipid antibodies in patients with IgA monoclonal gammmopathy. Clin Chem 1999; 45:2007-10.
27. Spadaro A, Riccieri V, Terracina S, Rinaldi T, Taccari E, Zoppini A. Class specific rheumatoid factors and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. Lupus 2000; 9:56-60.
28. Micheloud D, Sanchez-Ramon D, Carbone J, Rodriguez-Molina JJ, Fernandez-Cruz E, Lopez-Longo FJ, et al. Discordance between anti-beta2-glycoprotein-I and anti-cardiolipin antibodies in patients with clinical criteria of antiphospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol 2005; 23:525-8.