

## Anticorpi anti-fosfolipidi

A. Tincani<sup>a</sup>, G. Morozzi<sup>b</sup>, A. Ruffatti<sup>c</sup>, R. Ottaviani<sup>a</sup>, B. Abissoni<sup>a</sup>, G. Balestrieri<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Reumatologia, Allergologia, Immunologia Clinica, Ospedale Civile e Università degli Studi, Brescia*

<sup>b</sup> *Istituto di Reumatologia, Università degli Studi, Siena*

<sup>c</sup> *Istituto di Reumatologia, Università degli Studi, Padova*

### Introduzione

L'importanza pratica dei tests che indagano gli anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) deriva dal fatto che un riscontro di positività sicura in un paziente sintomatico, cioè con episodi tromboembolici o perdite gravidiche ripetute, porta a formulare la diagnosi di sindrome da antifosfolipidi (APS). In effetti è noto che questa diagnosi implica un trattamento cronico e non privo di rischi.

In accordo con i criteri di classificazione internazionale (1) gli esami di laboratorio necessari e sufficienti a formulare la diagnosi sono il lupus anticoagulant (LA) e gli anticorpi anti cardiolipina (aCL).

Il LA è un test funzionale che valuta il prolungamento in vitro dei test di coagulazione dipendenti dai fosfolipidi (KCT, aPTT, DRVVT, etc). Le specifiche che il test deve rispettare sono ben codificate in letteratura (Brandt et al, 1995, 2) e sono state oggetto di numerosi workshop da parte degli specialisti della coagulazione (International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific Subcommittee on Lupus Anticoagulants/phospholipids dependent antibodies). Dal punto di vista pratico è importante che la positività del test di screening venga sempre confermata dal mixing con plasma normale e corretta con l'aggiunta di fosfolipidi.

L'osservazione che l'attività del LA era legata ad anticorpi diretti verso i fosfolipidi a carica elettrica negativa ha stimolato la introduzione del test ELISA per gli aCL (3). Questa metodologia ha focalizzato l'attenzione sulla specificità anticorpale portando alla conclusione che la maggior parte dei cosiddetti anticorpi anti-fosfolipidi sono diretti verso le proteine che legano i fosfolipidi, che fanno parte del sistema di reazione (4). La logica conseguenza di queste acquisizioni è stata la descrizione di nuovi test ELISA che più direttamente esplorano la reazione verso queste proteine, come il test per gli anticorpi anti beta-2-glicoproteina I (anti  $\beta$ 2GPI) o quello degli anticorpi anti protrombina (anti-PT).

### Il gruppo FIRMA e gli anticorpi anti-fosfolipidi

Il gruppo FIRMA, a partire dalla sua istituzione, si è occupato attivamente degli aPL, concretizzando da un lato la stesura di linee guida, dall'altro la verifica sul campo della riproducibilità dei test ELISA più usati nella diagnostica degli aPL. Questa attività è riconducibile ad un controllo di qualità dei risultati ottenuti dai test ELISA per gli aPL eseguiti in diversi laboratori appartenenti a Centri di diversa estrazione e tradizione distribuiti su tutto il territorio nazionale, e rientra pertanto negli scopi istitutivi del FIRMA.

Le linee guida (5) sono state preparate con 2 specifici obiettivi: definire la indicazione clinica alla prescrizione degli esami di laboratorio e stabilire i criteri metodologici da seguire nella esecuzione dei test. Per quanto riguarda la indicazione clinica, riassunta in Tabella I, è utile ricordare che le patologie descritte come associate alla presenza di aPL, comprendono oltre a trombosi e perdite gravidiche, anche trombocitopenia, ulcere torpide agli arti inferiori, anemia emolitica, livedo reticularis etc., come recentemente rilevato da uno studio internazionale di ampio respiro (6).

**Tabella I. Indicazioni cliniche per la richiesta di anticorpi anti cardiolipina e lupus anticoagulant.**

*Indicazione per la esecuzione di aCL e LA  
(da linee guida FIRMA)*

- Pazienti con sintomi descritti in associazione a positività per aPL
- Pazienti con lupus eritematoso sistemico
- Pazienti con malattia autoimmune che progettono una gravidanza
- Pazienti con malattia autoimmune che vogliono assumere contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva
- Pazienti con trombofilia familiare

**Tabella II. Risultati di consenso ottenuti in 2 diversi progetti di controllo della riproducibilità dei test ELISA.**

Test	Campioni negativi	Risultati N° neg; N° pos	Campioni positivi	Risultati N° neg; N° pos	Campioni dubbi	Risultati N° neg; N° pos
<i>Sperimentazione 1999-2000</i>						
IgG aCL	20	235 neg; 21 pos	4	5 neg; 43 pos		
IgM aCL	22	253 neg; 9 pos	1	2 neg; 10 pos	1	6 pos; 6 neg
Anti $\beta$ 2GPI IgG	21	121 neg; 5 pos	3	0 neg; 17 pos		
Anti $\beta$ 2GPI IgM	23	130 neg; 8 pos	1	0 neg; 6 pos		
<i>Sperimentazione 2001-2002</i>						
IgG aCL	10	130 neg; 20 pos	1	0 neg; 15 pos		
IgM aCL	10	126 neg; 10 pos	1	0 neg; 15 pos		
Anti $\beta$ 2GPI IgG	9	86 neg; 4 pos	1	0 neg; 10 pos	1	5 neg; 5 pos
Anti $\beta$ 2GPI IgM	10	87 neg; 3 pos	1	0 neg; 9 pos		

Le linee guida sui test di laboratorio includono delle raccomandazioni di minima che si rifanno da un lato ai suggerimenti della letteratura internazionale, come per esempio la necessità di risultati ripetutamente positivi a titolo medio alto, incluso nei criteri internazionali per gli aCL, o la già citata necessità di verificare la positività del LA con il test di mixing e il test di conferma. Per i test ELISA, nelle linee guida è stata sottolineata la necessità che siano sempre effettuati in duplicato, vista la loro scarsa stabilità, e si avvalgano di verifiche prodotte all'interno di ogni singolo laboratorio come ad esempio la valutazione di una popolazione normale di discrete proporzioni o di sieri positivi già testati in altri centri. E' stato inoltre suggerito, sulla base anche di altre recenti esperienze (7), di utilizzare un metodo di refertazione che includa un giudizio del risultato con una suddivisione in negativo, basso positivo, medio positivo, alto positivo.

*I controlli di qualità dei test ELISA per gli aCL e per gli anti  $\beta$ 2GPI fa parte di un lavoro di continua verifica metodologica sui test per indagare l'autoimmunità, che il gruppo FIRMA ha come obiettivo primario. Per ora sono state svolte 2 sperimentazioni: la prima nel 1999-2000, prima della stesura delle linee guida, e la seconda nel 2001-2002, dopo la loro stesura e pubblicazione. Entrambi gli studi comprendevano laboratori di diversa impostazione, distribuiti sul territorio nazionale, e prevedevano che i sieri (24 nella prima sperimentazione e 11 nella seconda), raccolti perifericamente, fossero spediti in cieco dal laboratorio coordinatore di Siena.*

Nella prima sperimentazione, gli aCL sono stati eseguiti in 13 laboratori: 7 con metodi home-made e 6 con metodiche commerciali (Byk Goulden, Menarini-INOVA, Pasteur, 2 ORGen Tec, 1 Shield). Gli anti  $\beta$ 2GPI sono stati eseguiti in 6 Centri: in 3 casi con metodiche home-made e in 3 con metodiche commerciali (1 Shild e 2 ORGen Tec). Nella seconda gli aCL sono stati eseguiti in 16 laboratori: 7 con metodi home-made e 9 con metodi commerciali (3 ORGen Tec, 2 Pharmacia, 2 Diamedix, 1 INOVA,

1 Cambridge Life Science). Gli anti  $\beta$ 2GPI sono stati eseguiti in 10 laboratori, 6 con metodiche home-made e 4 con metodi commerciali (tutte ORGentec). L'analisi dei risultati è stata effettuata in entrambe le sperimentazioni attribuendo ad ogni campione un valore di consenso (positivo o negativo) corrispondente alla maggioranza delle risposte valutabili ottenute dai vari centri. La Tabella II riassume i risultati ottenuti.

#### *Commento*

Come si vede le metodiche ELISA per gli aPL risultano ancora piuttosto complesse dal momento che tanto nella sperimentazione del 1999-2000 che in quella del 2001-2002 un campione non ha potuto essere classificato in quanto ha ottenuto un ugual numero di risposte positive e negative. Le metodiche attuali sono probabilmente migliorate in quanto non si sono verificati dei "falsi negativi" nei campioni positivi. E' invece percentualmente significativa ancor oggi la presenza di "falsi positivi" nei campioni giudicati negativi. Questo dato può ovviamente avere un impatto pratico allarmante per la gestione dei pazienti e deve essere migliorato. Considerando comunque che i criteri di classificazione internazionali includono nella sindrome solo i valori di aCL medio-alti, sarebbe utile rendere operativa una refertazione che tenga in considerazione i livelli di positività, in effetti già consigliata nelle linee guida FIRMA. Applicando questo semplice accorgimento molti risultati classificati oggi come "falsi positivi", diventerebbero "falsi bassi positivi" e pertanto non avrebbero alcuna influenza pratica diretta nella gestione del paziente.

#### **Bibliografia**

1. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JCP, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.

2. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995;74:1185-90.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2: 1211-14.
4. Roubey RA. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1444-54.
5. Forum Interdisciplinare nella Ricerca delle Malattie autoimmuni (FIRMA). Linee guida. Atti del Congresso Società Italiana di Reumatologia. *Reumatismo* 2001; 53 (Suppl 4):169-84.
6. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002;46:1019-27.
7. 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.