

## Proposta di linee guida per la determinazione di autoanticorpi anti-fosfolipidi

**A. Tincani<sup>1</sup>, G. Ballestrieri<sup>1</sup>, N. Bizzaro<sup>2</sup>, D. Villalta<sup>3</sup>, R. Tozzoli<sup>4</sup>, P. Rizzotti<sup>5</sup>, per il Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA).**

<sup>1</sup>*Servizio e Cattedra di Immunologia Clinica e Allergologia, Ospedale Civile e Università degli Studi, Brescia;*

<sup>2</sup>*Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Civile, S. Donà di Piave (VE);*

<sup>3</sup>*Servizio di Immunologia e Microbiologia, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone;*

<sup>4</sup>*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Civile, Latisana (UD);*

<sup>5</sup>*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera, Verona*

### Introduzione

Questa proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-fosfolipidi è stata messa a punto dal Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA), un gruppo italiano costituito da specialisti di diverse discipline cliniche (immunologi clinici, internisti, reumatologi, patologi clinici, nefrologi e dermatologi) esperti nel campo della diagnostica clinica e di laboratorio delle malattie autoimmuni. Le raccomandazioni contenute in queste linee guida sono derivate dalla più recente letteratura scientifica e dalle indicazioni fornite dal gruppo di esperti in una Consensus Conference tenutasi a Monteriggioni (Siena) dal 18 al 20 gennaio 2001.

### Indicazioni cliniche

In base alla significatività della associazione<sup>1,2</sup>, i sintomi clinici che giustificano la ricerca di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) sono:

- Perdite fetali ricorrenti
- Trombosi venose
- Trombosi arteriose
- Trombocitopenia
- Ulcere agli arti inferiori
- Livedo reticularis
- Anemia emolitica

Altre condizioni, la cui associazione con aPL è stata riportata in alcuni studi ma che necessita però di ulteriori conferme, sono la malattia valvolare cardiaca (nodulazioni sui lembi valvolari mitralici e/o aortici) e un certo numero di manifestazioni neurologiche quali l'ischemia cerebrale transitoria, la mielite trasversa, la corea, la emicrania.

La presenza di aPL è anche uno dei criteri di classificazione del Lupus Eritematoso Sistemico<sup>3</sup>, ragione per cui la loro ricerca rientra nella routine di inquadramento di questa malattia.

A fronte delle numerose condizioni cliniche associate agli aPL, i criteri di classificazione della sindrome da antifosfolipidi, recentemente introdotti e condivisi a livello internazionale<sup>4</sup> (Tab. I), restringono le manifestazioni cliniche della sindrome alla patologia trombotica e abortiva, pur incoraggiando ricerche sperimentali e cliniche che definiscano la associazione fra aPL e le altre manifestazioni cliniche sopraelencate.

I primi dati epidemiologici oggi disponibili<sup>5</sup> (Tab. II), evidenziando una significativa frequenza della sindrome da antifosfolipidi (APS), sia primaria che secondaria, giustificano pienamente l'attuale diffusione dei tests per la determinazione di aPL.

### Test disponibili

Malgrado siano sempre più numerosi i tests ELISA per la rilevazione di aPL [anti-cardiolipina (aCL), anti-miscela di differenti fosfolipidi a carica elettrica negativa, anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidiletanolamina, etc.] o di anticorpi verso proteine in grado di legare i fosfolipidi [anti- $\beta_2$ -glicoproteina I ( $\beta_2$ GPI), anti-protrombina, etc.], con la possibilità di evidenziare anticorpi di classe IgG, IgM e IgA, gli attuali criteri di classificazione della APS considerano, per ora, significativi solo la positività al test del Lupus Anticoagulant e la dimostrazione di anticorpi a medio o alto titolo anti-cardiolipina  $\beta_2$ -dipendenti, di classe IgG e/o IgM (Tab. I).

La attribuzione di un preciso significato ad anticorpi anti-cardiolipina a basso titolo, ad anticorpi di clas-

**Tabella I.** Criteri classificativi della sindrome da antifosfolipidi (4).**Criteri clinici**

1. Trombosi vascolari: uno o più episodi di trombosi arteriose, venose o dei piccoli vasi, in qualsiasi organo o tessuto, confermate da tecniche di imaging, doppler o dall'istopatologia.
2. Patologia ostetrica:
  - a. Una o più morti fetali oltre la 10<sup>a</sup> settimana;
  - b. Uno o più parti prima della 34<sup>a</sup> settimana, accompagnati da preeclampsia o severa insufficienza placentare;
  - c. Tre o più aborti prima della 10<sup>a</sup> settimana.

**Criteri di laboratorio**

1. Anticorpi anticardiolipina (aCL)  $\beta_2$  dipendenti di classe IgG e/o IgM a titolo medio-alto, misurati con metodiche ELISA standardizzate, presenti in due o più occasioni ad almeno 8 settimane di distanza;
2. Lupus Anticoagulant positivo in due determinazioni a 8 o più settimane di distanza, rilevato secondo il metodo raccomandato dal Sottocomitato Lupus Anticoagulant/Phospholipid Dependent Antibodies del ISTH.

**Per la diagnosi sono necessari almeno 1 criterio clinico e 1 di laboratorio.**

**Tabella II.** Epidemiologia della sindrome da antifosfolipidi (5).**FREQUENZA DELLA SINDROME DA ANTIFOSFOLIPIDI**

Condizione clinica	Frequenza (%)
Trombosi venosa	24
Ictus cerebrale	6 - 29
Malattia coronarica	3 - 80
Poliabortività idiopatica	10 - 20
Lupus Eritematoso Sistemico	22 - 54

se IgA o ad anticorpi diretti verso la  $\beta_2$ GPI) o la protrombina, necessita di ulteriori studi e di standardizzazione delle metodiche.

**Requisiti minimi dei test di più comune utilizzo****a) Lupus Anticoagulant**

Le linee guida per la esecuzione del lupus anticoagulant sono state delineate dal un apposito sottocomitato internazionale (International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific Subcommittee on Lupus Anticoagulants /Phospholipids Dependent Antibodies<sup>6</sup>).

Praticamente il test, eseguito su plasma, si articola in:

- valutazione del tempo di coagulazione con un test fosfolipidi-dipendente (KCT, aPTT, DRVVT, etc.);
- mancata correzione dell'eventuale prolungamento con mixing di plasma normale;
- correzione ottenuta con aggiunta di fosfolipidi;
- esclusione di altre coagulopatie.

**b) Test aCL - ELISA**

La standardizzazione di questo test, eseguibile su siero o su plasma, è stata ed è oggetto di numerosi

studi (rivisti in 7); essa è comunque ancora non completata e solo scarsamente condivisa a livello internazionale.

Ci si limita quindi ad esporre taluni punti ritenuti di rilevante importanza:

- i campioni si debbono testare in duplicato;
- in accordo con i criteri di classificazione, già citati, il test ELISA degli anticorpi anticardiolipina deve rilevare anticorpi  $\beta_2$ GPI-dipendenti di classe IgG o IgM. Per avere nel sistema la quantità idonea di  $\beta_2$ GPI, è opportuno che il tampone di bloccaggio, di diluizione dei sieri e di lavaggio contengano 10% di siero bovino (fetale o adulto). L'introduzione di siero bovino nei tamponi di lavaggio garantisce che il livello di  $\beta_2$ GPI si mantenga costante nel sistema durante tutta la procedura;
- il cut-off deve essere determinato in ogni laboratorio testando un numero adeguato (100 o più) di sieri da soggetti normali, distribuiti per età e sesso. La distribuzione dei valori non risulta di solito normale, per cui il calcolo del cut-off deve utilizzare il sistema dei percentili. Dal momento che il metodo ELISA è molto sensibile, è consigliabile utilizzare il 99° percentile;
- per necessità di confronto, i risultati devono essere espressi in unità GPL o MPL (mg/ml di anticorpo), introducendo in ogni test una curva di calibrazione di almeno 5 punti, creata usualmente con gli stan-

dard di Harris o con standard secondari, calibrati su questi. Sono attualmente in valutazione come standard internazionali presso le organizzazioni preposte anticorpi monoclonali umani;

- consigliabile infine una valutazione semi-quantitativa dei risultati, cioè in range, secondo lo schema: negativo, se inferiore al cut-off; basso positivo, se <30 GPL/MPL; medio positivo, se > 30 e < 80 GPL/MPL; alto positivo, se > 80 GPL/MPL.

Allo stato attuale è raccomandato ai laboratori che testano routinariamente gli aCL di controllare periodicamente, almeno ogni 6 mesi, l'accuratezza e la riproducibilità della metodica mediante programmi accreditati di valutazione esterna di qualità o tramite scambio di sieri con altri laboratori impegnati nel settore.

### Bibliografia

1. Harris EN, Chan JK, Asherson RA, Aber VR, Gharavi AE, Hughes GRV. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Int Med* 1986; 146:2153-6.
2. Alarçon Segovia D., Perez-Vasquez M.E., Villa A.R., Drenkard C., Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Sem Arthritis Rheum* 1992; 21:275-85.
3. Hochberg MC. Updating The American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725-34.
4. 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.
5. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid syndrome. In: Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y, editors. *The Antiphospholipid Syndrome*. Boca Raton: CRC Press, 1996; 13-28.
6. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74:1185-90.
7. Tincani A, Balestrieri G, Allegri F, Cinquini M, Vianelli M, Taglietti M, et al. Overview on anticardiolipin ELISA standardization. *J Autoimmun.* 2000; 15:195-7.