

La sindrome antifosfolipidi: revisione critica degli attuali aspetti diagnostici, patogenetici e terapeutici

Sommario

La sindrome antifosfolipidi (aPS) identifica una condizione ad aumentato rischio di occlusione vascolare e/o complicanze gravidiche, la cui definizione è stata stabilita nel 2005 sulla base di un consenso internazionale.

I pazienti sono definiti affetti da aPS se presentano almeno un criterio clinico (occlusione vascolare e/o complicanza gravidica) e un criterio di laboratorio, in un definito periodo di tempo; i criteri di laboratorio che definiscono la aPS sono la positività ripetuta (confermata dopo 12 settimane) per la ricerca degli anticorpi del tipo lupus anticoagulante (LA) e/o la positività per gli anticorpi in fase solida anti-cardiolipina (aCL) o anti- β_2 glicoproteina I (β_2 GPI).

Nonostante i progressi degli ultimi 20 anni dovuti all'interesse di molti specialisti, immunologi, ematologi, reumatologi o ginecologi, la aPS rimane non completamente conosciuta in molti aspetti, tuttora controversi e discussi.

Scopo della presente tesi è di presentare un aggiornamento sui criteri di laboratorio attualmente applicati, sulle ipotesi patogenetiche in discussione e sulle proposte terapeutiche nelle varie e differenti manifestazioni cliniche, con particolare riferimento alla terapia anticoagulante.

Sarà infine brevemente descritta la casistica dei pazienti con aPS afferenti al Centro Sorveglianza Pazienti in Terapia Anticoagulante (TAO), n.278 della Federazione Centri Sorveglianza Anticoagulati – U.O. Laboratorio Analisi Chimico-cliniche Ospedale S. Chiara, A.O.U. Pisana

INDICE

1) Introduzione	pag. 3
2) Definizione	pag. 4
3) Patogenesi	pag. 7
4) Diagnosi:	pag. 10
<i>Diagnostica degli anticorpi in fase solida</i>	pag. 10
<i>Diagnostica dell'anticoagulante tipo lupus</i>	pag. 12
<i>Ulteriori aspetti critici della diagnostica</i>	pag. 15
5) Aspetti terapeutici	pag. 17
6) Conclusioni	pag. 22
7) Esperienza del centro TAO (n. 278 FCSA)	pag. 23
8) Bibliografia	pag. 28

1) INTRODUZIONE

Il termine Sindrome da anticorpi antifosfolipidi (aPS), comunemente detta Sindrome Antifosfolipidi, definisce la condizione clinica caratterizzata dall'associazione di anticorpi diretti verso complessi molecolari, costituiti da fosfolipidi e proteine (aPL), con patologie tromboemboliche e/o complicanze della gravidanza.

La aPS comporta un elevato impatto economico e sociale : nella seduta dell'8 marzo 2011 la Commissione Igiene e Sanità del Senato della Repubblica, approvando un documento su “Le malattie ad andamento degenerativo di particolare rilevanza sociale”, ha confermato l'inserimento fra le «nuove» malattie reumatiche, della Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi.

Nonostante i numerosi progressi fatti negli ultimi 20 anni dall'interesse di ematologi, reumatologi e ginecologi, l'aPS rimane ancora controversa per molti aspetti, con particolare riferimento agli aspetti patogenetici, diagnostici e terapeutici.

A questo proposito sarà di seguito sintetizzato un aggiornamento della letteratura particolarmente rivolto alle controversie relative a questi ultimi aspetti.

Per concludere viene presentata una breve casistica clinica afferente *al Centro Sorveglianza Pazienti in Terapia Anticoagulante (TAO), n.278 della Federazione Centri Sorveglianza Anticoagulati – U.O. Laboratorio Analisi Chimico-cliniche Ospedale S. Chiara, A.O.U. Pisana.*

2) aPS : DEFINIZIONE

La sindrome è stata così nominata in quanto, per definizione, i pazienti che ne risultano affetti presentano una positività per gli aPL, che deve essere persistente nel tempo ed a titolo significativo.

Con il termine di aPL viene individuata una categoria ampia ed eterogenea di anticorpi messi in evidenza da sistemi che impiegano i fosfolipidi come substrato; in realtà gli aPL non reagiscono direttamente con i fosfolipidi, bensì sono diretti contro proteine plasmatiche che hanno affinità per le superfici a carica netta negativa e che legano i fosfolipidi.

Gli aPL possono essere di classe IgG o IgM e solo raramente IgA; sono distinti e definiti nelle seguenti 3 categorie :

1. *Lupus anticoagulant (LA)* : anticorpi in grado di prolungare un qualsiasi test fosfolipide-dipendente che esplori globalmente o in parte la cascata coagulativa. La denominazione è fondamentalmente dovuta al tipo di patologia, Lupus Eritematoso Sistemico (LES), in cui il fenomeno venne osservato; solo successivamente è diventato chiaro che non tutti i pazienti con LA presentavano un LES.
2. *Anticorpi anticardiolipina (aCL)*: anticorpi in grado di riconoscere i fosfolipidi, in particolare la cardiolipina, fissati a superfici solide. Se questi anticorpi sono evidenziati con il test ELISA classico (in cui l'antigene è la cardiolipina e il tampone è rappresentato da siero bovino contenente beta2 glicoproteina I [β 2GPI]) sono definiti aCL- β 2GPI-dipendenti ; se evidenziati con un test ELISA in assenza di β 2GPI sono definiti aCL autentici e sono principalmente presenti nelle malattie infettive.

3. *Anticorpi anti-β2GPI*: sono gli anticorpi in grado di riconoscere la beta2 glicoproteina I ; sono evidenziati con un test ELISA in cui l'antigene è rappresentato dalla β2GPI umana, adsorbita su piastra da microtitolazione in assenza di fosfolipidi. Gli anticorpi quantificati con questo test sono specie-specifici, cioè capaci di riconoscere la β2GPI umana e non quella bovina.

I criteri su cui si è basata nel tempo la diagnosi di aPS sono stati vari e differenti: quelli attualmente accettati per la definizione della sindrome sono stati stabiliti da un gruppo internazionale di esperti riuniti in un workshop dedicato, svoltosi nel 2006 a Sydney, prima dell'*Eleventh International Congress on antiphospholipid antibodies*(1) (Tab. 1).

Tabella 1

La diagnosi di aPS è basata sulla presenza di almeno un criterio clinico e un criterio di laboratorio, di seguito specificati. La diagnosi è esclusa se meno di 12 settimane o più di 5 anni separano il test aPL positivo e le manifestazioni cliniche.

Criteri clinici : trombosi vascolare e/o complicanze della gravidanza

Trombosi vascolare

• Uno o più episodi di trombosi arteriosa, venosa o del microcircolo, in ogni tessuto od organo. La trombosi deve essere confermata dalla diagnostica per immagini, dal doppler o dall'istopatologia, con l'eccezione delle trombosi venose superficiali. Per la conferma istopatologica, la trombosi deve essere presente senza significativa evidenza di infiammazione della parete vascolare.

Complicanze della Gravidanza

- Una o più morti di feti morfologicamente normali da causa sconosciuta alla o oltre la 10° settimana di gravidanza. La normale morfologia fetale deve essere documentata dall'ecografia o dall'esame diretto del feto, oppure*
- Una o più nascite premature di neonati morfologicamente normali alla o prima della 34° settimana di gravidanza, a causa di preeclampsia o eclampsia severa, o grave insufficienza placentare, oppure*
- Tre o più aborti spontanei consecutivi da causa sconosciuta prima della 10a settimana di gravidanza, con esclusione di anomalie anatomiche od ormonali materne o cause*

cromosomiche paterne o materne.

Criteria di Laboratorio

- *Positività per Lupus Anticoagulant (LA) diagnosticata in accordo ai criteri SSC-ISTH (Tab. 2), riscontrabile in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane.*
- *Positività (titolo alto o moderato, i.e. >40 GPL o MPL, o >99° percentile) per anticorpi anticardiolipina (aCL) IgG e/o IgM riscontrabile in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane, misurata con un test ELISA standardizzato per anticorpi anticardiolipina β 2-glicoproteina I-dipendenti (2)*
- *Positività per anticorpi anti β 2 glicoproteina I ($\alpha\beta$ 2-GPI) di isotipo IgG e/o IgM (a titolo >99° percentile) riscontrabile in due o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane, misurata con un test ELISA standardizzato secondo le procedure raccomandate (3)*

Tabella 2. Criteri aggiornati SSC-ISTH per la diagnosi di LA (4)

- *Prolungamento di almeno un test della coagulazione fosfolipide-dipendente (test di screening)*
- *Evidenza di un'attività inibitoria dimostrata dall'effetto del plasma paziente su un pool di plasmi normali (test della miscela).*
- *Evidenza che l'attività inibitoria sia dipendente dai fosfolipidi (test di conferma). Tale evidenza può essere ottenuta mediante supplementazione o modifica dei fosfolipidi (fosfolipidi in fase esagonali, fosfolipidi sintetici, frammenti piastrinici).*
- *Il LA deve essere attentamente distinto da altre condizioni che possono dare quadri di laboratorio ad esso sovrapponibili, o che possono essere contemporaneamente presenti. I dosaggi di specifici fattori della coagulazione e la storia clinica (Tab. 3) possono essere utili nel differenziare il LA da altre condizioni.*

Tabella 3. Diagnosi differenziale degli inibitori della coagulazione

1. Inibitori associati a sintomi emorragici

- *Anti-fattore VIII, II, IX, X, XI*
- *Anti-fibrinogeno/fibrina*
- *Anticoagulanti eparino-simili*

2. Inibitori con o senza emorragie

- *Anti-fattore V*

3. Inibitori di solito non associati ad emorragia

- *LA (con la possibile eccezione di una concomitante ipoprotrombinemia)*
- *Anti-fattore XII*

3) aPS: PATOGENESI

Studi nell'animale in cui anticorpi isolati da pazienti con aPS erano iniettati in topi e cavie da esperimento suggeriscono che c'è un diretto legame tra la presenza degli aPL e l'aumentato rischio di sviluppare trombosi o di complicanza gravidica: tuttavia il meccanismo patogenico che lega la presenza degli aPL con le manifestazioni cliniche è tutt'ora sconosciuto e oggetto di numerosi studi e pubblicazioni.

D'altra parte i metodi di laboratori usati per la ricerca degli aPL non contribuiscono in maniera soddisfacente a fare chiarezza : infatti l'unico dato chiaro relativo ai 3 test disponibili è che tutti necessitano della β_2 GPI per il loro risultato migliore. Di conseguenza a questa osservazione è stato riconosciuto a questa proteina un ruolo importante nella patogenesi della aPS, che però a tutt'oggi resta non completamente chiarito.

La β_2 GPI è una proteina plasmatica senza alcuna funzione nota; sia modelli animali che umani sprovviste della proteina non esprimono alcuna anomalia emostatica. L'ipotesi più probabile finora avanzata sul ruolo della proteina è che gli autoanticorpi che sono presenti nella aPS inducano una nuova funzione della stessa. Infatti è noto che l'interazione con superfici endoteliali che esprimono transitoriamente fosfatidilserina modifica la conformazione circolare della proteina, in cui il dominio I interagisce con il V, e la trasformano in una conformazione aperta e lineare: è stato quindi dimostrato che gli autoanticorpi presenti nella aPS stabilizzano la β_2 GPI nella conformazione aperta e permettono il legame e l'attivazione di differenti cellule, comprese cellule endoteliali, monociti e piastrine, tutte comunque coinvolte nella bilancia emostatica (Fig.1)

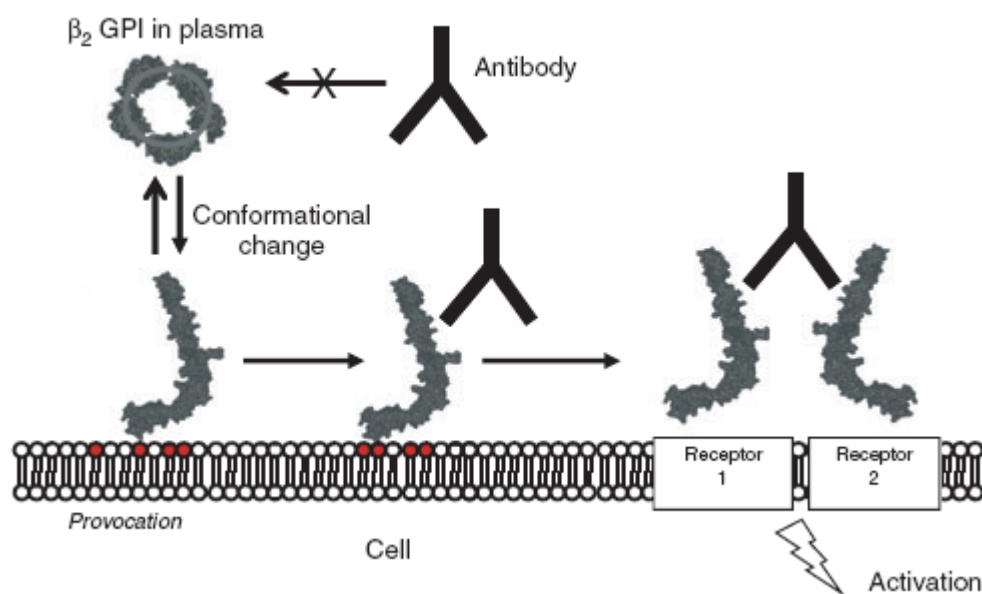


Fig 1 : Modello di attivazione cellulare da parte di autoanticorpi anti β_2 GPI.

La β_2 GPI circola nel plasma in una conformazione chiusa. Dopo un lieve danno, le cellule esprimono fosfatidilserina sulla loro superficie. La β_2 GPI si legherà a questi siti di membrane anioniche e come conseguenza cambierà la sua conformazione da chiusa a lineare, esponendo epitopi per gli anticorpi. Questi ultimi si legheranno e stabilizzeranno la β_2 GPI nella sua conformazione lineare. La β_2 GPI poi sarà in grado di interagire con i recettori che si trovano sulla superficie delle cellule.

Gli interrogativi successivi sono quindi : quale via metabolica rappresenta l'obiettivo dei complessi β_2 GPI-anticorpi, comportando l'attivazione di queste cellule? Quali e quanti recettori sono coinvolti in questo fenomeno ? Le numerose ipotesi avanzate sono elencate nella tabella successiva :

Proposed mechanism	Target
Inhibiting protein C-axis	Protein C Protein S Thrombomodulin APC resistance EPCR
Increased thrombin generation	Prothrombin binding Microparticles TFPI Protein Z Factor XI Factor XII Heparin cofactor II
Disruption of protective shield	Annexin A5
Altered fibrinolysis	tPA Annexin A2 β_2 GPI cleavage
Unbalanced complement	C3 C5a Membrane attack complex
Platelet adhesion	von Willebrand factor
Platelet activation	LRP8 GPIb α PF4 Thromboxane A2
Endothelial cell activation	TLR4 → tissue factor TLR2 → tissue factor Prostacyclin NO
Monocyte activation	Tissue factor
Neutrophil activation	Tissue factor
Trophoblast activation	Growth factor binding
Angiogenesis	VEGF and bFGF
Increased atherosclerosis	Ox-LDL

APC, activated protein C resistance; EPCR, endothelial protein C receptor; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; tPA, tissue plasminogen activator; LRP8, low-density lipoprotein receptor8; GPIb α , glycoprotein Ib; PF4, platelet factor 4; TLR4, toll-like receptor4; TLR2, toll-like receptor2; NO, nitric oxide; VEGF, vascular endothelial growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; Ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein

E' interessante sottolineare che in modelli animali di aPS con deficit funzionale o assoluto della maggior parte di questi recettori si osserva un rischio inferiore per la formazione di trombi, suggerendo che ognuno di questi recettori può essere coinvolto nello sviluppo di complicanze trombotiche. Il contributo, individuale o collettivo, dei recettori al rischio di trombosi arteriosa, venosa o placentare e di microangiopatia in vivo rimane sconosciuto. Non è possibile escludere che in vivo differenti tipi cellulari usino differenti recettori per l'interazione con la beta 2 glicoproteina I.

Inoltre il fatto che la maggior parte degli studi sulla partecipazione di differenti recettori nell'aPS sia stata condotta nello stesso modello murino non permette di stabilire una relazione " specifico recettore – determinata localizzazione trombotica" (11). In definitiva nonostante i numerosi sforzi degli ultimi 30 anni ancora non è chiaro come gli aPL aumentino il rischio trombotico: molte teorie sono state avanzate ma nessuna è stata definitivamente confermata (5-15).

4) aPS: DIAGNOSI

Di seguito sono descritti i criteri diagnostici, essenziali per porre diagnosi di aPS, che continuano però a presentare aspetti controversi e in discussione, anche per quanto riguarda la loro associazione con l'evento clinico.

4a) Diagnostica degli anticorpi in fase solida

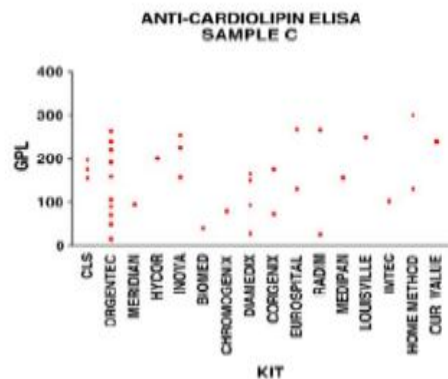
Nel corso degli anni sono stati numerosi gli antigenici proposti come target degli anticorpi presenti nel plasma di pazienti affetti da aPS : soltanto una minima parte è stata valutata e confermata in studi clinici o è risultata associata a manifestazioni cliniche proprie della sindrome (16, 17). Attualmente i due soli anticorpi raccomandati dalle linee guida aggiornate al 2006 sono gli aCL e gli anti- β 2-GPI (1).

Peraltro a tutt'oggi nel settore persiste una importante incertezza diagnostica che può essere attribuita da una parte alla scarsa numerosità di studi prospettici e controllati, che stabiliscano definitivamente la reale importanza clinica di questi anticorpi, e dall'altra all'insufficiente standardizzazione dei metodi ELISA necessaria per esprimere ed interpretare in modo uniforme i risultati.

Da alcuni anni sono in commercio numerosi kit sia per la determinazione degli aCL che degli anti- β 2GPI che differiscono per il tipo di piastra utilizzato, per le caratteristiche dell'antigene (origine umana o bovina e differente qualità) , per il tipo di tampone bloccante, di calibratore, di controllo positivo ed anche per le modalità di espressione dei risultati . Tutte queste variabili rendono impossibile il confronto dei risultati ottenuti con i diversi sistemi e, considerando anche quanto emerso dai tentativi di standardizzazione internazionali condotti in questi ultimi anni, risulta particolarmente difficile poter selezionare un kit come gold-standard. Per quanto riguarda gli aCL l'Australasian Quality Assurance Program ha riportato risultati con alta variabilità anche quando lo stesso plasma era testato nei differenti laboratori usando lo stesso kit commerciale (18); risultati simili sono stati ottenuti da Pengo et al (19).

I risultati di studi di sorveglianza relativi agli anti- β 2GPI non sono migliori, presentando anch'essi una variabilità eccezionalmente elevata (19,20) che in questo caso è principalmente dovuta alla qualità della β 2GPI usata come antigene (fig.2).

Figura 2



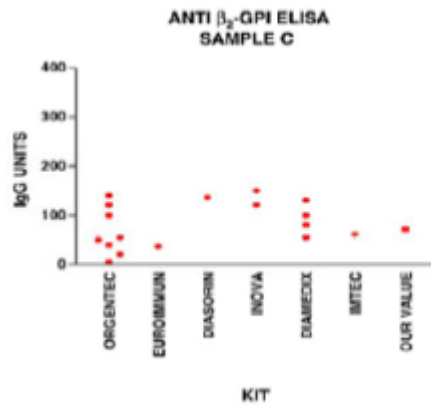


Fig. 2 Dosaggio degli anticorpi aCL e anti-β2GPI ottenuto dai partecipanti ad uno studio nazionale utilizzando kit commerciali, calibrati secondo standard locali.

In attesa di una standardizzazione di entrambi i test che riceva il consenso sia delle società scientifiche che delle aziende produttrici, per ovviare a queste problematiche viene attualmente suggerito di usare β2GPI purificata (preferibilmente) umana come cofattore nel test aCL e come antigene nel test anti-β2GPI; inoltre viene suggerito di usare per le determinazioni locali il cut off definito come valore maggiore del 99° percentile della distribuzione dei risultati ottenuti in una popolazione di soggetti sani (n.120)(43).

4b) Diagnostica dell'anticoagulante tipo-lupus (LA)

L'esecuzione del test per la ricerca del LA rappresenta una problematica ancora assai controversa a livello internazionale. Recentemente Pengo et al (21) in uno studio osservazionale con diagnosi centralizzata di LA hanno riportato che il 33% dei campioni raccolti in centri di trombosi e diagnosticati localmente come LA positivi in realtà risultavano come LA negativi quando determinati nel laboratorio centralizzato. Inoltre la quantificazione dell'anticorpo LA non è ancora possibile.

Per ovviare a quanto sopra, attualmente è suggerito di eseguire la diagnosi di LA in accordo ai criteri dello Scientific and Standardization Committee (SSC) della International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (22), aggiornati recentemente (23), secondo le seguenti fasi:

a) Preparazione del plasma e tests di screening.

Come per gli altri tests dell'emostasi, i campioni di sangue devono essere prelevati con minima stasi venosa. Il plasma deve essere preparato se possibile entro 1 ora dal prelievo mediante centrifugazione standard del sangue (2000g per 15', temp. amb.) e seconda centrifugazione ad alta velocità (> 2500g per 10', temp. amb.). Queste procedure sono necessarie per minimizzare la contaminazione con piastrine o altre membrane cellulari, poiché le piastrine devono essere considerate importanti sorgenti di fosfolipidi e riducono la sensibilità dei test, soprattutto dopo congelamento-scongelamento del plasma: infatti sarebbe preferibile eseguire i test su plasma fresco. Tuttavia, può essere usato anche plasma appropriatamente congelato, ricordando però che congelamento e scongelamento devono essere eseguiti rapidamente, rispettivamente con azoto liquido e incubazione a 37° per 2-3 minuti. Si raccomanda di utilizzare non più di due tests di screening basati su principi differenti: il primo potrebbe essere un tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) con silice come attivatore e basso contenuto di fosfolipidi; il secondo invece potrebbe essere il test al veleno di vipera Russell diluito (dRVVT), ovvero un test globale dipendente dai fosfolipidi, che esplora la porzione di cascata coagulativa a valle del Fattore X attivato. Il metodo più usato per esprimere i risultati è la ratio.

Se i criteri di screening sono soddisfatti è imperativo escludere la presenza di eparina prima di procedere allo step successivo, eseguendo un tempo di trombina, che risulta prolungato in presenza di eparina non frazionata, ma normale in presenza di LA. Invece l'eparina a basso peso molecolare non dovrebbe influenzare i suddetti test utilizzati.

b) *Dimostrazione della presenza di un inibitore: test della miscela.*

La presenza nel plasma di un inibitore della coagulazione viene dimostrata dalla persistenza dell'allungamento del tempo di coagulazione in una miscela di plasma del paziente con un volume equivalente di plasma da pool normale (PNP), secondo le seguenti procedure:

- Si esegue con qualunque dei test di screening (vedi sopra).
- Si eseguono 40 campioni di donatori sani miscelandoli 1:1 con pool normale senza incubazione
- Si stabilisce il cut off prendendo il 99° percentile

- Il risultato del campione in esame si considera negativo se il valore supera il cut off (non c'è stata correzione), oppure positivo se il valore è sotto il cut off (la miscela ha corretto il difetto)

Nel primo caso, ovvero se il risultato della miscela è più lungo del 99° percentile della distribuzione dei risultati ottenuti con i plasmi di soggetti sani, dovrebbe essere eseguito un test di conferma (24).

Inoltre è doveroso aggiungere che sebbene il principio sia semplice, l'applicazione pratica è più complessa poiché mancano criteri di riferimento su cosa si debba intendere per "persistenza dell'allungamento" e per "correzione" del test. Per questo la FCSA raccomanda:

1. usare per miscela pool di plasmi normali privi di piastrine, preparati in casa e congelati opportunamente
2. stabilire " a priori" criteri locali univoci per l'interpretazione del test

c) Conferma della fosfolipide-dipendenza dell'inibitore ed esclusione di altre coagulopatie

Una volta stabilita la presenza di un inibitore della coagulazione nel plasma del paziente, la terza fase diagnostica è rappresentata dalla dimostrazione che tale inibitore è diretto contro i fosfolipidi e non contro i fattori della cascata coagulativa .

Diversi tests, anche commercialmente disponibili, si basano sul rationale che l'aggiunta di un eccesso di fosfolipidi (lisato piastrinico o fosfolipidi a conformazione esagonale) neutralizza l'effetto dell'anticoagulante lupico e quindi normalizza il test.

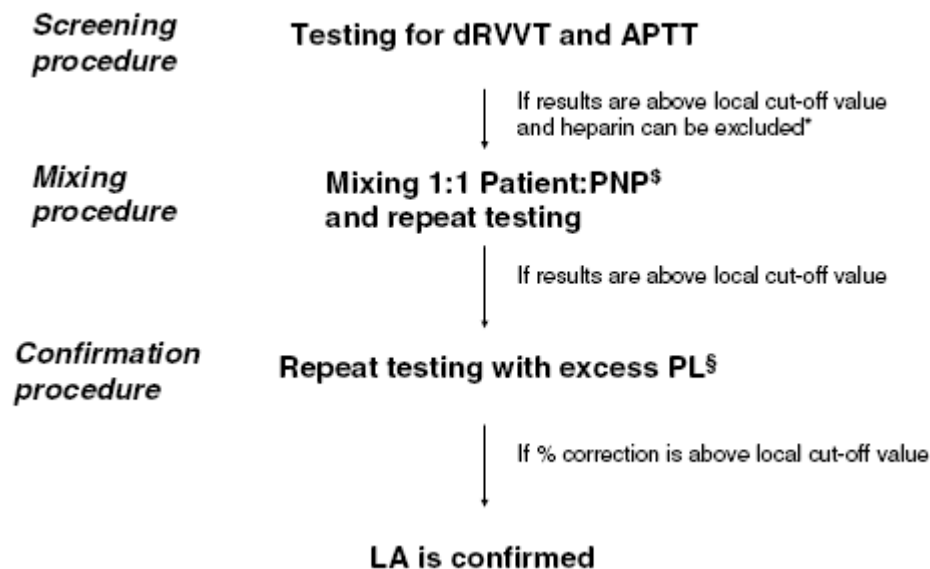
Anche in questo caso si esegue il test di conferma su 40 donatori sani e si stabilisce il cut off della percentuale di correzione.

La presenza del LA è confermata quando la percentuale di correzione del test di coagulazione (screening versus conferma) è più alta rispetto al valore cut-off locale, usando la seguente formula :

$$\% \text{ correzione} = [(CTS-CTC) / CTS] \times 100$$

dove: CTS tempo di coagulazione test screening o screen ratio (screen pz/ screen pool)

CTC tempo di coagulazione test di conferma o confirm ratio (confirm pz/ confirm pool)



d) **Diagnosi in corso di terapie.**

A causa della possibile interferenza sui test, è preferibile non eseguire la diagnosi di LA in corso di terapia anticoagulante orale e/o eparinica. Tuttavia, se fosse necessario è bene osservare le seguenti raccomandazioni:

1. Se il paziente è in terapia anticoagulante orale è possibile eseguire la normale diagnostica (screening e conferma) su plasma paziente addizionato in parti uguali con un pool di plasma normale privo di piastrine residue
2. Alcuni test commerciali contengono nelle loro formulazione degli inibitori specifici dell'eparina. In tali casi è possibile eseguire la normale diagnostica anche in corso di terapia eparinica, ma le Società Scientifiche suggeriscono di interpretare i risultati con cautela.

Nessuna interferenza è invece conosciuta da Aspirina e clopidogrel.

4c) Ulteriori aspetti critici della diagnostica

Pareri contrastanti sono evidenziati dall'analisi della letteratura relativamente all'associazione dei vari anticorpi sopra citati e le manifestazioni cliniche della Sindrome:

- 1) dalle esperienze del gruppo di Padova (25) e di altri ricercatori (26, 27) è risultato che gli anticorpi anti- β 2GPI (a β 2GPI) hanno un valore predittivo maggiore per le trombosi, rispetto agli anticorpi anti-CL (aCL).

- 2) Per alcuni autori l'isolata positività di questi ultimi, anche se associata ad eventi trombotici, non permette di fare diagnosi di aPS (28,29).
- 3) Il gruppo di Padova inoltre definisce come pazienti con rischio maggiore quelli con triplice positività oppure con positività ad alti titoli sia di aCL che anti- β 2GPI, mentre la positività di questi ultimi due associata a LA negativo comporta un'associazione modesta con l'evento clinico(28).
- 4) Secondo altri dati, invece, la maggiore associazione con gli eventi trombotici è stata osservata con gli aCL ad alto titolo (> 40 U GPL) (30).
- 5) Per concludere si riportano i risultati di una sistematica revisione della letteratura dal 1988 al 2000 (34), in cui è stato analizzato il rischio relativo, espresso come odds ratio (OR) per trombosi arteriose e venose, degli anticorpi sopra citati:
 - Per quanto riguarda il LA, sono stati analizzati 12 studi nei quali è sempre stata dimostrata l'associazione del test con la trombosi sempre statisticamente significativa. Peraltro viene fatto notare che i test utilizzati per la diagnosi sono eterogenei ma che nessun singolo test è specifico e sensibile al 100%. Il dRVVT e il Kaolin Clotting Time (KCT) sono risultati i test più comunemente usati ma il primo è risultato il migliore predittore del rischio trombotico.
 - Per gli anticorpi aCL sono stati analizzati 14 studi (esclusi quelli retrospettivi), riportando l'odds ratio (OR) del test nei confronti del rischio trombotico. L'associazione risultava statisticamente significativa solo nel 50% degli studi: OR compreso fra non significativo e 4.9. D'altra parte l'associazione degli aCL con la trombosi era strettamente dipendente dal titolo anticorpale, ovvero viene confermato il dato descritto sopra: infatti negli studi nei quali erano inseriti pazienti con alto titolo di aCL (>40 GPL) l'associazione raggiungeva sempre la significatività statistica e l' OR era compreso tra 1.5 e 10.
 - Il significato degli anti β 2-GPI è stato analizzato principalmente in studi retrospettivi la cui maggioranza ha dimostrato una significativa associazione con le trombosi: l'analisi cumulativa di 1506 pazienti ha dato un OR di 5.3, indipendentemente dall'isotipo dell'anticorpo e dalla sede della trombosi. Rispetto agli aCL questi anticorpi sembrano mostrare una migliore associazione con gli eventi vascolari ma nella pubblicazione viene fatto notare che mancano studi prospettici definitivi.

5) aPS : ASPETTI TERAPEUTICI

L'evento trombotico arterioso e/o venoso e le complicanze ostetriche della gravidanza rappresentano i criteri clinici per porre diagnosi di aPS.

Il primo rappresenta l'evento clinico più frequente e clinicamente rilevante :circa il 35 % dei pazienti con aPL ha una storia di trombosi, che è venosa nel 70% e arteriosa in circa il 30% dei casi.

Le trombosi profonde degli arti inferiori, con o senza embolia polmonare, sono gli eventi venosi più frequenti, mentre il circolo cerebrale è la sede più comune delle occlusioni arteriose. Dopo un primo episodio di trombosi i pazienti con aPS hanno un più alto rischio di recidiva, tipicamente nello stesso distretto del primo evento .

Comunemente una fase iniziale a base di eparina non frazionata o di eparina a basso peso molecolare seguito dalla terapia anticoagulante orale (TAO) rappresenta il trattamento di scelta nei pazienti con tromboembolismo venoso e ischemia cerebrale. Scopo del suddetto trattamento è il mantenimento dell'international normalized ratio (INR) compreso tra 2.0-3.0 , a tempo indeterminato; lo stesso trattamento con o senza aspirina è indicato nella trombosi arteriosa.

Tuttavia a tutt'oggi non esiste un consenso unanime per le linee di trattamento nelle varie situazioni cliniche: di seguito sono analizzate le controversie e gli aspetti ancora in discussione nei pazienti con trombosi venose, con tromboembolismo arterioso e nelle pazienti con complicanze gravidiche.

4a) Trattamento dei pazienti con aPS e TEV

La profilassi secondaria con anticoagulanti orali antagonisti della vitamina K (VKA) si è dimostrata efficace nei pazienti con aPS che hanno presentato un primo evento trombotico (35), ma a tutt'oggi permangono le controversie a proposito del dosaggio ottimale da utilizzare .

Infatti in letteratura sono presenti studi con risultati contrastanti : in più studi retrospettivi il rischio di recidiva di trombosi è risultato più basso quando la terapia anticoagulante era somministrata ad elevato dosaggio ovvero con un mantenimento dell'INR superiore a 3 (36, 37), il quale peraltro risultava anche associato ad un aumento del rischio emorragico (38,39); d'altra parte sono anche

pubblicati dati in cui il regime ad alto dosaggio di VKA può essere associato, oltre che ad un maggiore numero di eventi emorragici, anche ad un aumento degli eventi trombotici (40). Questo potrebbe essere relazionato al fatto che un più alto target di INR è causa di maggiori fluttuazioni dello stesso, per la difficoltà stessa dei pazienti di mantenere il range (43).

Allo scopo di far chiarezza relativamente a questo aspetto mediante studi prospettici sono stati condotti 2 studi clinici multicentrici randomizzati, da 2 gruppi di studio differenti (CANADIAN study e WAPS, Warfarin in AntiPhospholipid Sindrome, study in Europa e Argentina); l'obiettivo di entrambi gli studi era sovrapponibile, ovvero confrontare le due differenti intensità di dosaggio di anticoagulante nella prevenzione della recidiva trombotica, in pazienti con aPS (41, 42).

Nello studio americano sono stati arruolati 114 pazienti, che sono stati monitorati per una media di 2.7 anni (vedi Tab. fondo pagina).

La recidiva trombotica si verificava in 6 dei 56 pazienti (10.7%) che ricevevano l'alto dosaggio di warfarin (INR compreso tra 3.1 e 4.0); mentre nei pazienti assegnati a ricevere il trattamento a moderata intensità (INR compreso tra 2.0 e 3.0) la recidiva si osservava in 2 dei 58 pazienti (3.4%). (Il rischio di recidiva trombotica era calcolato con il modello di Cox di rischio proporzionale. Hazard ratio, 3.1; 95% I.C. 0.6 - 15.0; P= 0.15).

Outcome and Subgroup	INR of 3.1–4.0			INR of 2.0–3.0			Hazard Ratio (95% CI)	P Value
	No. of Patients	No. with Outcome	Patient-Years of Follow-up	No. of Patients	No. with Outcome	Patient-Years of Follow-up		
Recurrent thrombosis								
All patients	56	6	148	58	2	158	3.1 (0.6–15.0)	0.15
Patients with previous arterial thrombosis	14	3	35	13	1	38	3.1 (0.3–30.0)	0.30
Patients with previous venous thrombosis	42	3	113	45	1	119	2.9 (0.3–28.0)	0.34
Patients with systemic lupus erythematosus	10	2	30	16	1	52	3.5 (0.3–38.0)	0.28
Patients with lupus anticoagulant	34	4	86	36	2	100	2.1 (0.4–12.0)	0.37
Bleeding								
Any	56	14	97	58	11	126	1.9 (0.8–4.2)	0.13
Major	56	3	111	58	4	133	1.0 (0.2–4.8)	0.96

Un sanguinamento maggiore si verificava in 3 pazienti del gruppo ad alta intensità di trattamento e in 4 soggetti dell'altro gruppo. 11 pazienti nel gruppo a moderato dosaggio e 14 nel gruppo ad elevato dosaggio presentavano almeno 1 episodio di sanguinamento minore.

Nel secondo studio (vedi tab. fondo pagina) sono stati arruolati 109 soggetti, i quali sono stati randomizzati nei seguenti gruppi di trattamento:

- 1) Warfarin ad alta intensità: INR compreso tra 3.0 e 4.5
- 2) Warfarin a dosaggio standard ovvero con un INR compreso tra 2.0 e 3.0 oppure sola aspirina (100mg/die)

I pazienti arruolati erano monitorati per un tempo mediano di 3.6 anni.

Il disegno dello studio prevedeva due endpoint co-primari :

- i. Morte vascolare o eventi trombotici maggiori
- ii. Idem come sopra più emorragia maggiore

Gli endpoint secondari erano : totali, minori e maggiori eventi trombotici, eventi fatali e non fatali cerebrovascolari e cardiaci.

La recidiva di trombosi era osservata in 6 dei 54 pazienti (11.1%) che ricevevano un dosaggio ad alta intensità ed in 3 dei 55 pazienti (5.5%) assegnati al trattamento convenzionale.

Nessuna differenza significativa era osservata tra i 2 gruppi ad eccezione del sanguinamento minore che era significativamente più presente nel gruppo ad alta intensità di trattamento ($P=0.0269$). La mancanza di differenza nei risultati principali era confermata anche quando erano esclusi dall'analisi i pazienti trattati con aspirina (3 soggetti).

Table 2 Major study end-points according to treatment group

Outcome	High-intensity anticoagulation (n = 54)	Conventional treatment (n = 55)	Hazards ratio (95% CI)	P-value
Vascular death, major thrombosis*	5 (9.3%)	3 (5.5%)	1.63 (0.39–6.83)	0.5043
Vascular death, major thrombosis or major hemorrhage	6 (11.1)	5 (9.1)	1.17 (0.36–3.83)	0.7979
Death	3 (5.6%)	2 (3.6%)	1.41 (0.23–8.47)	0.7078
Total thrombosis†	6 (11.1%)	3 (5.5%)	1.97 (0.49–7.89)	0.3383
Ischemic stroke	2	2		
Transient ischemic attacks	2	1		
Deep venous thrombosis	2	0		
Pulmonary embolism	1	0		
Superficial thrombophlebitis	1	0		
Total hemorrhage	15 (27.8%)	8 (14.6%)	2.18 (0.92–5.15)	0.0755
Major hemorrhage	2 (3.7%)	3 (5.5%)	0.66 (0.11–3.96)	0.6518
Minor hemorrhage	15 (27.8%)	6 (10.9%)	2.92 (1.13–7.52)	0.027

I risultati finali di entrambi gli studi erano in accordo nel dimostrare che la recidiva trombotica era più bassa nei pazienti trattati con un dosaggio standard di VKA (INR 2.0 - 3.0) , il quale si è anche dimostrato in entrambi gli studi più sicuro in termini di sanguinamento minore e maggiore. Nelle conclusioni gli Autori considerano il trattamento con VKA ad alta intensità non superiore al dosaggio standard nella prevenzione delle recidive tromboemboliche, oltre che associato ad un maggior numero di complicanze emorragiche.

In letteratura sono presenti i seguenti commenti agli studi (43)

I principali bias dei 2 studi sono i seguenti:

- 1) I risultati di laboratorio dei vari centri partecipanti non erano confermati da un laboratorio di riferimento
- 2) La popolazione degli studi non era omogenea in termini di test di laboratorio: solo il 18 % dei pazienti nel Canadian study presentavano un profilo di anticorpi antifosfolipidi ad alto rischio (LA e aCL positivi) , mentre nello studio WAPS erano il 55% .

Gli stessi Autori (43) relativamente al trattamento dei pazienti con aPS e tromboembolismo venoso (TEV) suggeriscono un trattamento a lungo termine a base di VKA nei pazienti con :

- I. TEV non secondario
- II. Embolismo polmonare
- III. Profilo di laboratorio con tripla positività di aPL
- IV. Stato trombofilico concomitante
- V. Malattia autoimmune associata

Invece un trattamento a breve termine (6 mesi) potrebbe essere considerato se la TEV è secondaria, se è presente un'unica positività relativa agli aPL (LA, aCL o a β 2GPI) o in caso di mancanza di trombofilia o di malattia autoimmune.

4b) Trattamento dei pazienti con aPS e tromboembolismo arterioso

In letteratura è presente un primo studio retrospettivo (Khamashta nel 1995) nel quale il 46% dei pazienti presentavano un evento arterioso come prima manifestazione tromboembolica e nel quale si concludeva che solo un alto dosaggio di VKA (INR > 3.0) riduceva drammaticamente la recidiva trombotica, mentre né un trattamento a base di aspirina né una terapia VKA standard

sembravano essere il trattamento ottimale per la prevenzione secondaria delle complicanze trombotiche(45).

Nonostante le evidenze di questo studio nella linee guida della British Society of Haematology (46), sulla base di studi osservazionali, si suggerisce un trattamento a lungo termine con VKA che abbia un INR target di 2.5.

Sulla stessa linea si esprimono anche le linee guida della società americana cardio toracica: infatti mentre nei pazienti con ictus non cardio-embolico o con attacco ischemico transitorio sono raccomandati antiaggreganti piuttosto che VKA , in specifiche popolazioni, per esempio appunto i pazienti con aPS, gli esperti raccomandano gli VKA (47).

Nei pazienti ad alto rischio ovvero con tripla positività, con eventi multipli nelle immagini cerebrali oppure pazienti che hanno presentato più di un evento clinico, dovrebbe essere considerato, in assenza di un elevato rischio emorragico e in aggiunta ai VKA , un basso dosaggio di aspirina (100mg/die).

Infine nei pazienti con tripla positività e con precedente infarto miocardico in letteratura sono presenti i seguenti schemi terapeutici (48,49):

- I. VKA a lungo termine, con INR compreso tra 3.0 e 4.0
- II. VKA con INR compreso tra 2.0 e 3.0 più aspirina a bassa dose

4c) Trattamento di pazienti con aPS in gravidanza

Nonostante la mancanza di studi clinici esiste un consenso generale secondo il quale il trattamento di pazienti con precedente trombosi isolata o associata a complicanza ostetriche , dovrebbe prevedere un dosaggio pieno di eparina non frazionata oppure di eparina a basso peso molecolare (EBPM) associata ad aspirina a basso dosaggio (50,51).

Nelle pazienti con tripla positività, con minaccia di interruzione di gravidanza o nelle pazienti con tromboembolismo o in quelle in cui il protocollo standard (EBPM più aspirina bassa dose) è fallito, dovrebbero essere previsti o l'uso di immunoglobuline e.v. (52) o la plasmateresi, con o senza immunoglobuline (53).

5) CONCLUSIONI

La aPS è una sindrome rara ma considerata potenzialmente molto grave. Pertanto ancora oggi in letteratura si auspica un miglioramento relativo alle conoscenze patogenetiche e ai test di laboratorio per la sua diagnosi. In particolare sono raccomandate le seguenti azioni (43) :

1. Nuovi sforzi dovrebbero essere fatti per standardizzare il rilevamento di anticorpi di fase-solidi, che risultano in ritardo rispetto alla standardizzazione del LA. Alcuni problemi che rendono difficile la standardizzazione potrebbero derivare dai numerosi comitati delle differenti società scientifiche coinvolte e dalle varie aziende produttrici che sono coinvolte nell'accordare un comune consenso
2. Mentre la potenza degli anticorpi in fase solida può essere determinata, la quantificazione del LA non è ancora possibile e questo rende difficile stabilire se un LA ad alto titolo costituisce un fattore di rischio maggiore per lo sviluppo di un evento clinico in confronto ad un LA a basso titolo. Anche per questo aspetto saranno necessari ulteriori sforzi per una migliore comprensione e maggiore chiarezza.
3. La ripetuta positività per LA e/o per anticorpi in fase solida è considerato un fattore di rischio per gli eventi clinici; tuttavia non sono disponibili precise e confermate informazioni circa il rischio relativo della singola o della combinata positività. Studi molto recenti hanno dimostrato che la positività multipla è più frequentemente associata allo sviluppo del tromboembolismo o della complicanza ostetrica (31,32,43,44,54).
Inoltre poichè permane la controversia della standardizzazione dei metodi di laboratorio per il rilevamento degli anticorpi un importante contributo potrebbe derivare dallo svolgimento di studi clinici con centralizzazione dei test e dalla collaborazione delle differenti società scientifiche coinvolte (43, 55).

CASISTICA del Centro Terapia Anticoagulante Orale

La casistica dei pazienti affetti da aPS che afferiscono al centro TAO (presso U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche specialistiche - S.Chiara) conferma quanto sopra discusso, con riferimento particolare per quegli aspetti che risultano ancora discussi e controversi, sopra analizzati.

1. Dal punto di vista epidemiologico, la sindrome è da considerarsi malattia rara ed infatti i pazienti con aPS afferenti al centro rappresentano una minima percentuale della casistica totale, ovvero 11 su un totale di 825 pazienti (1.3%). Inoltre in letteratura è riportato che in poco più della metà dei casi la sindrome si presenta come entità a sé stante (forma Primitiva), mentre nei restanti casi si associa (forma Secondaria) ad altre malattie autoimmuni soprattutto a LES: infatti anche nella casistica descritte tre pazienti presentano diagnosi di LES.
2. Sempre da un punto di vista epidemiologico la casistica conferma l'età media della sindrome : risultano interessati prevalentemente soggetti giovani fra i 20 ed i 40 anni ed infatti l'età media della prima diagnosi relativa alla nostra casistica è pari a 39 anni.
Inoltre, relativamente al sesso risultano più colpite le donne, con una frequenza almeno tre volte superiore a quella dei maschi; ed infatti la nostra casistica è composta da dieci donne e un maschio.
3. Da un punto di vista terapeutico, come discusso sopra, non esiste a tutt'oggi un consenso definitivo circa l'intensità di trattamento a base di anticoagulanti orali nei pazienti affetti da APS: infatti per quanto sia stato suggerito in passato un più alto dosaggio con mantenimento dell'INR tra 3 e 4, successivamente è stato anche dimostrato che quest'ultimo non offre vantaggi rispetto al dosaggio standard (INR: 2-3), in termini di efficacia e tollerabilità. La nostra casistica conferma quest'ultima osservazione. Infatti, in base a quanto richiesto dallo specialista al momento dell'inserimento presso il centro, quattro pazienti eseguono un trattamento ad elevata intensità ed hanno un target terapeutico di INR pari a 3.0 (range: 2.5-3.5). Sette pazienti ricevono un dosaggio standard di terapia con target terapeutico di INR pari a 2.5 (range: 2.0-3.0). Da un punto di vista di efficacia di trattamento sono state osservate complicanze trombotiche in pazienti che eseguono entrambi i

dosaggi: purtroppo l'esiguo numero di casi non permette un confronto tra gruppi.

Per quanto riguarda le complicanze emorragiche un' unica paziente ha presentato una complicanza emorragica in corso di trattamento, eseguito a dosaggio standard con target terapeutico di INR: 2.5

4. Per quanto riguarda gli aspetti diagnostici, è importante sottolineare che le manifestazioni cliniche della aPS sono complesse ed in effetti i pazienti spesso interpellano Specialisti diversi (Internisti, Immunologi Clinici, Reumatologi, Ginecologi, Neurologi, Coagulologi, Ematologi) prima di giungere ad una corretta diagnosi.

Come già specificato attualmente i criteri clinici per porre diagnosi di aPS sono rappresentati dalle complicanze gravidiche e dalle complicanze trombotiche vascolari, associate ad un criterio di laboratorio: tra gli eventi vascolari il piu' frequente (31.7%) è la trombosi venosa , in particolare a carico delle vene degli arti inferiori. Altri quadri, che non costituiscono criterio diagnostico, sono rappresentati dalla trombocitopenia , alterazioni cutanee (livaedo reticularis, pelle con aspetto 'marmorizzato' bianco e bluastro), ictus (13.1%), tromboflebiti superficiali, embolia polmonare, attacchi ischemici cerebrali transitori (TIA) ed anemia.

Le conferme della nostra casistica riguardano tutti questi aspetti clinici: infatti tutti gli undici pazienti sono arrivati alla prescrizione di terapia anticoagulante orale da parte di vari specialisti e dopo accertamenti o visite presso differenti discipline, con lunghi iter diagnostici: tre pazienti hanno presentato complicanze gravidiche, ma prima della diagnosi avevano consultato immunologi o ematologi. Sette pazienti hanno manifestato trombosi venosa di cui la maggioranza (quattro) agli arti inferiori.

Gli aspetti piu' controversi della casistica riguardano però la diagnosi di laboratorio : praticamente nessun paziente possiede uno studio di laboratorio che garantisca il rispetto dei criteri attualmente accettati e sopra specificati. Se è presente diagnosi di LA non è disponibile documentazione relativa ai criteri SSC-ISTH. Relativamente alla positività per anticorpi anticardiolipina o beta2glicoproteina I di nessun paziente è disponibile la documentazione circa la conferma della positività alla 12° settimana , nè informazioni sul titolo anticorpale .

Per tale motivo relativamente ai pazienti che continuano ad afferire al centro TAO di S. Chiara (otto/undici) è stato ritenuto opportuno ripetere una valutazione dei criteri di laboratorio considerati attualmente per la diagnosi, unitamente alla conferma del dato clinico già disponibile nell'archivio del centro.

Materiali e metodi

Nessuno dei pazienti ha interrotto la terapia anticoagulante e la ricerca degli anticorpi di tipo lupico è stata eseguita in accordo ai criteri dello Scientific and Standardization Committee (SSC) della International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) : ovvero essendo i pazienti in terapia anticoagulante orale la procedura diagnostica prevista è stata eseguita su plasma paziente addizionato in parti uguali con un pool di plasma normale privo di piastrine residue.

La ricerca degli anticorpi anti glicoproteina I è stata eseguita con ELISA classico, utilizzando beta2 glicoproteina I umana, purificata. I risultati vengono espressi come percentuale di lettura del campione in esame rispetto al siero positivo di riferimento (100%): il campione è considerato positivo se il suo valore è uguale o maggiore del 10%.

La ricerca degli anticadiolipina è stata eseguita con metodo ELISA classico, utilizzando siero fetale bovino come tampone. Sono considerati positivi i sieri che contengono > 10 GPL e > 5 MPL (le unità GPL e MPL sono calcolate sulla media di 2 letture di assorbanza di ogni siero, confrontata con la curva di calibrazione del siero standard).

Per la ricerca degli anticorpi di tipo lupico sono stati effettuati il tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) basale e corretto; il test al veleno di vipera Russel diluito (dRVVT o LAC screen) di screening, di miscela e di conferma e il test del tempo di coagulazione alla silice (SCT) di screening, di miscela e di conferma, con l'utilizzo dello strumento ACL TOP 500[®] della Instrumentation Laboratory . I campioni di plasma aliquotati una prima volta sono stati di nuovo centrifugati a 3500 RPM per 10 minuti e ulteriormente separati per ottenere un plasma il più possibile povero in piastrine interferenti.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

<i>Paziente</i>	<i>Evento clinico</i>	<i>LA</i>	<i>antiβ2GPI</i>	<i>aCL</i>
Caso 1 <i>Anno nascita:</i> 1978	Complicanze ostetriche	positivo	positivo	Positivo (titolo elevato)
Caso 2 <i>Anno nascita:</i> 1959	Ischemia cerebrale	positivo	negativo	Positivo (basso titolo)
Caso 3 <i>Anno nascita:</i> 1975	TVP	Positivo	Negativo	Positivo (alto titolo)
Caso 4 <i>Anno nascita:</i> 1954	TVP	?	Negativo	Negativo
Caso 5 <i>Anno nascita:</i> 1982	TVP	?	Negativo	Positivo (basso titolo)
Caso 6 <i>Anno nascita:</i> 1972	Trombosi vasi cerebrali	Negativo (2011 altro lab)	Negativo	Negativo
Caso 7 <i>Anno nascita:</i> 1941		Positivo	Positivo	Positivo(alto titolo)
Caso 8 <i>Anno nascita:</i> 1944	Trombosi vasi cerebrali	Positivo	Positivo	Positivo (alto titolo)

Per cinque pazienti è stato confermato il criterio di laboratorio, in termini di LA e/o di anticorpi in fase solida: in tre di questi è stata rilevata la tripla positività anticorpale; in un paziente è risultata positiva la ricerca degli anticorpi LA e gli aCL ma solo a basso titolo; un paziente risultato positivo per LA e positivo per aCL ad alto titolo.

Per un paziente (n. 6) il criterio di laboratorio non può essere confermato in quanto gli anticorpi in fase solida sono risultati negativi; non è stato possibile ripetere l'anticorpo LA, che però era risultato negativo alla ricerca eseguita nel 2011, presso altro laboratorio.

Per altri due pazienti invece (n.4 e n.5) non è stato possibile ripetere l'anticorpo LA, mentre gli anticorpi in fase solida risultavano assenti (n.4) o a basso titolo (n.5).

Da un punto di vista di laboratorio quindi la casistica conferma quanto riportato in letteratura: la positività per la ricerca dell'anticorpo tipo LA è il dato più frequentemente associato all'evento clinico, mentre non è possibile dedurre ulteriori informazioni circa l'importanza e il significato della positività multipla ai differenti test, dato l'esiguo numero dei soggetti.

Inoltre i risultati degli anticorpi in fase solida sono espressi in maniera differente rispetto a quanto suggerito dalle linee guida attuali la qualcosa , come discusso precedentemente, rappresenta una situazione assai frequente e che costituisce uno dei principali aspetti controversi che caratterizzano la sindrome.

Anche nella nostra esperienza la aPS risulta ancora una sindrome complessa con ancora molte controversie aperte con particolare riferimento agli aspetti diagnostici e terapeutici.

Da ultimo sottolineiamo un aspetto emerso dall'approccio ai pazienti ai quali sono stati ripetuti i test : per quanto tutti abbiano dato il proprio consenso allo studio di laboratorio ciò è stato accettato al fine della sola conferma diagnostica, mentre tutti hanno espresso perplessità e/o rifiuto per un'eventuale conseguente interruzione della terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Miyakis S, Loskshin MD, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
2. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M 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
3. Reber G, Tincani A, Sanmarco M et al. Proposals for the measurement of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1860-2
4. Brandt JT, Triplett DA, Alving B et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant: an update. *Thromb Haemost* 1995; 1185-90.
5. PenningsMTT, vanLummelM, DerksenRHWM et al. Interaction of b2-glycoprotein I with members of the low density lipoprotein receptor family. *JThrombHaemost*2006; 4:1680–90.
- 6 Shi T, Giannakopoulos B, Yan X et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *ArthritisRheum*2006;54:2558–67.
- 7 SikaraMP, RoutsiasJG, SamiotakiM, PanayotouG, Moutsopoulos HM, Vlachoyiannopoulos PG. {beta}2 Glycoprotein I ({beta}2GPI) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 115:713–23.
- 8 Forastiero R, Martinuzzo M, Carreras LO, Maclouf J. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid antibodies: association with increased excretion of platelet-derived thromboxane urinary metabolites. *J ThrombHaemost*1998;79:42–5.
- 9 Raschi E, TestoniC, BosisioDet al. Role of theMyD88 transduction signalling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood*2003;101:3495–500.
- 10 SattaN, Dunoyer-Geindre S, ReberGet al. The role of TLR2in the inflammatory activation of mouse fibroblasts by human antiphospholipid antibodies. *Blood*2007;109:1507–14.

- 11 PG de Groot, RT Urbanus et al : Pathophysiology of thrombotic APS : where do we stand ?
Lupus (2012) 21, 704-707
- 12 Sorice M, Longo A, Capozzi A et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum* 2007;56:2687–97.
- 13 Stalc M, Poredos P, Peternel P, Tomsic M, Sebestjen M, Kveder T. Endothelial function is impaired in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2006;118:455–61.
- 14 Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/ PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2008;118:3453–61.
- 15 Di Simone N, Marana R, Castellani R et al. Decreased expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a newly identified pathogenic mechanism of antiphospholipid mediated defective placentation. *Arthritis Rheum* 2010; 62:1504–12.
16. Arnout J and Vermeylen J. Current status and implications of autoimmune antiphospholipid antibodies in relation to thrombotic disease. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 931-42
17. De Groot PG, Derksen RHW. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1854-60
18. Favolaro EJ et al : assessing the usefulness of anticardiolipin antibody assays: a caution approach is suggested by high variation and limited consensus in multi laboratory testing. *Am J Clin Path.* 2002; 118:548-57
19. Pengo et al : Italian Federation of anticoagulants Clinics (FCSA). Antiphospholipid antibody ELISAs : survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity – purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2- Glycoprotein I activity. *Thromb. Res* 2007: 120:127-33
20. Favolaro EJ et al : A review of β 2-GPI antibody testing results from a peer-driven multilaboratory quality assurance program. *Am J Clin Path* 2007: 127: 441-8
21. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P et al; Participating Centres of Italian Federation of Thrombosis Centres (FCSA). Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J Thromb Haemost* 2007;5:925-30.
22. 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.
23. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG.

- Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737-40
24. Devreese KM. No more mixing tests required for integrated assay systems in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulants? *J Thromb Haemost* 2010;8:1120-2.
 25. Pengo V. Communication. 48th Annual SSC meeting, Boston, MA, USA July 18 2002. See annual SSC reports at the ISTH website: <http://www.med.unc.edu/isth>
 26. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcon-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti β_2 -glycoprotein I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995; 22: 1899-906.
 27. Balestrieri G, Tincani A, Spatola L et al. Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies: a marker of antiphospholipid syndrome ? *Lupus* 1995; 4: 122-30.
 28. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005;93:147–52.
 29. Pengo V. : APS – controversies in diagnosis and management, critical overview of current guidelines. *Thrombosis Research* 127 Suppl. 3 (2011) S51–S52
 30. Galli M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis: do test patterns identify the patient's risk? Proceedings of the XI International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Sidney, Australia, November 14-18, 2004.
 31. Zoghalmi-Rintelen C, Vormittag R, Sailer T et al. The presence of IgG antibodies against β_2 -glycoprotein I predicts the risk of thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1160-5
 32. Pengo V. Anti- β_2 -glycoprotein I antibody testing in the laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1158-9
 33. Bas de Laat H, Derksen RHW, Urbanus RT et al. β_2 -glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2004; 104: 3598-3602.
 34. Galli M. Which antiphospholipid antibodies should be measured in the aPS ? *Haemostasis* 2000; 30 (suppl2). 57-69
 35. Ruiz-Irastorza G, Hunt BJ, Khamashta MA. A systematic review of secondary thromboprophylaxis in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 2007;57:1487–95.

36. Rosove MH, Brewer PM. Antiphospholipid thrombosis: clinical course after the first thrombotic event in 70 patients. *Ann Intern Med* 1992;117:303-8.
37. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hunt BJ, Escudero A, Cuadrado MJ, Hughes GR. Bleeding and recurrent thrombosis in definite antiphospholipid syndrome: analysis of a series of 66 patients treated with oral anticoagulation to a target international normalized ratio of 3.5. *Arch Intern Med* 2002; 162:1164-9.
- 38 Al-Sayegh FA, Ensworth S, Huang S, Stein HB, Klinkoff AV. Hemorrhagic complications of long-term anticoagulant therapy in seven patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1997; 24: 1716–8.
- 39 Ode' n A, Fahle' nM. Oral anticoagulation and risk of death: a medical record linkage study. *Br Med J* 2002; 325: 1073–5.
40. Torn M, van der Meer FJ, Rosendaal FR. Lowering the intensity of oral anticoagulant therapy: effects on the risk of hemorrhage and thromboembolism. *Arch Intern Med* 2004;164:668-73.
- 41 Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med* 2003;349:1133–8.
- 42 Finazzi G, Marchioli R, Brancaccio V et al. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost* 2005; 3:848–53.
- 43 A. Tripodi, P. G. de Groot e V. Pengo: Antiphospholipid syndrome: laboratory detection, mechanisms of action and treatment. *J Internal Medicine* 2011; 270:110-122
44. Crowther MA, Ginsberg JS. Antiphospholipid antibody syndrome. In: Goldhaber SZ, Ridker PM, eds. *Thrombosis and thromboembolism*. Vol. 44 of *Fundamental and clinical cardiology*. New York: Marcel Dekker, 2002:49-66.
45. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, Taub NA, Hunt BJ, Hughes GR. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:993–7.
46. 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.
47. Albers GW, Amarencu P, Easton JD, Sacco RL, Teal P, American College of Chest Physicians. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008;133:630S–69S.

48. Hurlen M, Abdelnoor M, Smith P, Erikssen J, Arnesen H. Warfarin, aspirin, or both after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002;347:969–74.
- 49 van Es RF, Jonker JJ, Verheugt FW, Deckers JW, Grobbee DE. Aspirin and coumadin after acute coronary syndromes (the ASPECT-2 study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 109–13.
- 50 Tincani A, Branch W, Levy RA et al. Treatment of pregnant patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003;12:524–9.
- 51 Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA. Management of thrombosis in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus in pregnancy. *Ann NY Acad Sci* 2005;1051:606–12.
- 52 Ruffatti A, Marson P, Pengo V et al. Plasma exchange in the management of high risk pregnant patients with primary antiphospholipid syndrome. A report of 9 cases and a review of the literature. *Autoimmun Rev* 2007; 6:196–202.
- 53 Asherson RA, Espinosa G, Cervera R, Font J, Reverter JC. Catastrophic antiphospholipid syndrome: proposed guidelines for diagnosis and treatment. *J Clin Rheumatol* 2002; 8:157–65.
- 54 Pengo V, Ruffatti A, Legnani C et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2010; 8:237–42.
55. de Laat B, Derksen RH, Reber G et al. An international multicentre- laboratory evaluation of a new assay to detect specifically lupus anticoagulants dependent on the presence of anti-beta2- glycoprotein autoantibodies. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 149–153.