

LAVORO ORIGINALE

Sensibilità e specificità degli anticorpi anti- β 2-glicoproteina I per l'impegno ostetrico della sindrome da anticorpi antifosfolipidi

Sensibility and specificity for pregnancy morbidity of anti- β 2-glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome

M. Tonello, A. Ruffatti, M. Favaro, T. Del Ross, D. Zamboni, P. Grypiotis, A. Cavazzana, M. Ciprian, S. Todesco

Cattedra e Unità Operativa Complessa di Reumatologia, Università degli Studi di Padova

SUMMARY

Objective: *This study aimed to evaluate the sensitivity and specificity of the anti- β 2-glycoprotein I antibodies for pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome (APS).*

Methods: *335 women were recruited and on the basis of their clinical features were subdivided into 2 groups homogeneous for number and age. The first (study) group contained the women whose pregnancy complications satisfied the classification criteria for APS. The second (control) group was made up of women with pregnancy complications not included in the classification criteria for APS. Anti- β 2-GPI, anticardiolipin antibodies (aCL) and lupus anticoagulants (LA) were determined in all of these women.*

Results: *The only antiphospholipid antibodies occurring with a significant frequency ($p=0,00$) in the women with pregnancy criteria for APS were the IgG anti- β 2-GPI and the IgG aCL present respectively in 23,92% and in 27,60% of the women. Its association was found to be significant ($p=0,000$). The distribution of the different levels of positivity of the IgG and IgM anti- β 2 GPI in the patients of the study and control groups was not significantly different. The highest sensitivity for pregnancy complications was that of the IgG aCL and of the IgG anti- β 2 GPI whose difference was not statistically significant. The comparison of the specificity of the IgG and IgM anti- β 2 GPI with that of the IgG and IGM aCL was not statistically significant.*

Conclusions: *The importance of determining the IgG anti- β 2 GPI as part of routine laboratory testing of women with pregnancy complications typical of APS was confirmed. Together with IgG aCL these antibodies have proved to be the most sensitive and specific markers of pregnancy complications in APS.*

Reumatismo, 2005; 57(4):262-266

INTRODUZIONE

Gli anticorpi anti- β 2-glicoproteina I (anti- β 2-GPI) appartengono al gruppo degli anticorpi antifosfolipidi (aPL). Essi sono specifici per una glicoproteina plasmatica ad attività anticoagulante che si lega a sostanze cariche negativamente come i fosfolipidi. Tale glicoproteina presenta in vitro una bassa affinità per i fosfolipidi anionici, tutta-

via dopo essersi legata agli anticorpi specifici sembra aumentare notevolmente tale affinità (1). La β 2-GPI costituisce quindi un cofattore che si lega ai fosfolipidi anionici, formando così un complesso antigenico (2, 3) riconosciuto dagli aPL più ricchi di significato clinico e per questo definiti "autoimmuni".

Attualmente gli aPL che costituiscono i criteri di laboratorio per la classificazione della sindrome da antifosfolipidi (APS) (4) sono gli anticardiolipina (aCL) e i lupus anticoagulants (LA), che si associano ad una sindrome clinica ben definita, caratterizzata da trombosi vascolare e da una serie di complicanze ostetriche (4). Gli anti- β 2-GPI sono stati ritrovati spesso in associazione con gli aCL e/o

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Marta Tonello
Cattedra e U.O. di Reumatologia
Università degli Studi di Padova
Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova
E-mail: amelia.ruffatti@unipd.it

con i LA in pazienti con manifestazioni cliniche correlate alla APS (5); tuttavia la loro presenza è stata dimostrata anche in pazienti negativi per aCL e LA e affetti da trombosi vascolari o impegno ostetrico (6).

C'è consenso sull'utilità clinica del dosaggio degli anti- β 2-GPI nella APS con trombosi, mentre la loro associazione con l'impegno ostetrico dell'APS è ancora oggetto di controversia (5). Forastiero et al (7) in uno studio che valuta il significato clinico degli anti- β 2-GPI nelle donne con perdita fetale, sulla base di una analisi multivariata sostengono l'associazione degli anti- β 2-GPI IgM con una storia di perdita fetale. Nello studio NOHA Gris et al (8) definiscono gli anti- β 2-GPI IgG come un fattore di rischio indipendente per la perdita fetale precoce da causa sconosciuta. Lee et al (9) invece nell'ambito di una casistica costituita da donne affette da aborti ripetuti o morti fetali tardive dimostrano che il test per la determinazione degli anti- β 2-GPI IgG e IgM non identifica pazienti negativi per aCL IgG e IgM. Pertanto gli autori concludono che non è conveniente inserire il dosaggio degli anti- β 2-GPI nella diagnosi di impegno ostetrico da APS. Faden et al (10) in uno studio prospettico che valuta gli anti- β 2-GPI come marker per le complicanze ostetriche affermano che la preeclampsia e la eclampsia sono significativamente correlate a questi anticorpi e suggeriscono la necessità della loro determinazione nelle donne con precedente storia di complicanze gravidiche. Lee et al in un lavoro successivo (11) non confermano tale correlazione e non consigliano di ricercare gli anticorpi anti- β 2-GPI in donne con pregressa preeclampsia.

Ci siamo proposti in questo studio di valutare la sensibilità e la specificità degli anti- β 2-GPI IgG e IgM per l'impegno ostetrico dell'APS. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli degli aCL IgG e IgM e dei LA al fine di identificare quale di questi anticorpi possa essere considerato il marker più sensibile e specifico per le complicanze ostetriche dell'APS.

PAZIENTI E METODI

Pazienti

I requisiti per l'inclusione nel lavoro erano la perdita fetale in qualsiasi età gestazionale, la preeclampsia, l'eclampsia, l'oligoidramnios, il ritardo di crescita intrauterina, e la nascita prematura, tutti da causa sconosciuta. Sono state escluse le donne che presentavano trombosi.

Tra il Novembre 1991 ed il Giugno 2003 sono state reclutate 335 pazienti e sulla base di un'accurata anamnesi sono state suddivise in due gruppi. Al primo, gruppo di studio, appartenevano le donne che presentavano un impegno ostetrico che soddisfaceva i criteri per la classificazione di APS (4). Tali criteri prevedono 3 o più aborti prima della decima settimana di gestazione, 1 o più perdite fetali dalla decima settimana di gestazione, una o più nascite premature prima della 34a settimana di gestazione per severa preeclampsia, eclampsia o insufficienza placentare. Questo gruppo era costituito da 163 soggetti con età media 33,28 anni (aa) \pm 4,7 deviazioni standard (DS) e range 19-44. Al secondo, gruppo di controllo, appartenevano 172 donne con età media 33,41 aa \pm 4,08 DS e range 23-46. Esse presentavano complicanze ostetriche non comprese nei criteri per la classificazione di APS.

Metodi

Ad ogni paziente veniva eseguito un prelievo di sangue per il dosaggio degli anti- β 2-GPI, degli aCL e dei LA. Tali anticorpi sono stati determinati tra il Novembre 1991 ed il Giugno 2003.

Gli anti- β 2-GPI IgG e IgM sono stati testati con un metodo ELISA "home made" sulla scorta dei dati della letteratura (12). I cut-off (11,6 unità arbitrarie (U), sia per gli anti- β 2-GPI IgG che per gli anti- β 2-GPI IgM) sono stati calcolati sulla media dei livelli rilevati nei sieri di 100 soggetti sani (50 donne e 50 uomini, donatori abituali di sangue) + 2,5 DS. Al fine di esprimere i risultati in classi di positività sono state definite come positività basse quelle comprese tra 11,6 e 19,9 U, come positività medie quelle tra 20 e 79,9 U e come positività elevate quelle superiori ad 80 U. Gli aCL IgG e IgM sono stati testati con metodi ELISA allestiti "home made" sulla scorta dei dati della letteratura (13, 14). Fino al 1999 è stata utilizzata la metodica ELISA secondo Harris (13) dal 2000 quella indicata dell'European Antiphospholipid Forum (14). I cut-off sono stati calcolati facendo la media dei livelli ottenuti dai sieri di 100 soggetti sani (50 donne e 50 uomini, abituali donatori di sangue) + 2,5 DS. I LA sono stati determinati secondo i criteri dell'International Society of Thrombosis and Haemostasis (15). Per la determinazione della positività dei LA sono stati utilizzati 2 tests: RVVT (tempo del veleno di vipera di Russell) e APTT (tempo di tromboplastina parziale attivata). I cut-off sono stati determinati con l'utilizzo di 20 plasmi di donatori abituali di sangue (10 donne e 10

uomini) ed espressi come media in secondi + 2,5 DS. I plasmi positivi per RVVT e/o APTT venivano valutati con il test di mixing. A loro volta i plasmi positivi al test di mixing venivano valutati con il test di conferma.

Analisi statistica

I risultati ottenuti nel gruppo di studio ed in quello di controllo sono stati confrontati con il test del chi quadrato, mentre le specificità e le sensibilità dei diversi aPL per l'impegno ostetrico dell'APS sono state confrontate con il test di confronto tra proporzioni. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

I risultati dei tests anticorpali degli aPL nelle pazienti con i criteri ostetrici per la classificazione di APS e nelle pazienti di controllo sono illustrati in tabella I. Si può osservare che nelle donne appartenenti al gruppo di studio vi era una prevalenza più elevata di tutti gli aPL esaminati rispetto a quelle del gruppo di controllo. Gli unici aPL che hanno mostrato una frequenza significativa ($p=0,000$) nelle donne con i criteri ostetrici per APS sono stati gli anticorpi anti- $\beta 2$ -GPI IgG e gli aCL IgG, pre-

sentì rispettivamente nel 23,92% e nel 27,60% dei casi. La frequenza degli anti- $\beta 2$ -GPI IgM, degli aCL IgM e dei LA è invece risultata non significativamente diversa tra il gruppo di studio e quello di controllo.

È stata valutata nel gruppo di studio l'associazione tra gli anti- $\beta 2$ -GPI IgG e gli aCL IgG ed è risultato che essi erano associati in 34/39 casi (87,17%), mentre in 5/39 (12,82%) erano presenti gli anti $\beta 2$ -GPI IgG da soli e in 10/45 (22,22%) gli aCL IgG da soli. Pertanto l'associazione tra i due anticorpi è risultata significativa ($p=0,000$).

La distribuzione dei diversi livelli di positività degli anti- $\beta 2$ -GPI IgG e IgM nelle pazienti del gruppo di studio e nei controlli è illustrata in tabella II, dove si può osservare una omogeneità dei risultati tra i due gruppi. L'analisi statistica non ha di conseguenza dimostrato la presenza di alcuna differenza significativa.

Dalle prevalenze anticorpali rilevate nelle pazienti del gruppo di studio e in quelle del gruppo di controllo sono state calcolate la sensibilità e la specificità dei diversi aPL per i criteri ostetrici di classificazione dell'APS, che sono riportate nella tabella III. Le sensibilità maggiori sono state quelle degli aCL IgG (27,60%) e degli anti- $\beta 2$ -GPI IgG (23,92%), che sono risultate non significativamente diverse. La specificità più elevata (100%) era

Tabella I - Risultati dei tests anticorpali nelle pazienti con e senza i criteri ostetrici per la classificazione di APS.

	Pazienti con i criteri (n. 163)		Pazienti senza i criteri (n. 172)		Significatività (p)
	n°	%	n°	%	
Anti-,2-GPI IgG	39	23,92	12	6,97	p = 0,000
Anti-,2-GPI IgM	12	7,36	8	4,65	n.s.
aCL IgG	45	27,60	11	6,39	p = 0,000
aCL IgM	10	6,13	7	4,06	n.s.
LA	2	1,22	0	0	n.s.

Tabella II - Distribuzione dei livelli di positività degli anticorpi anti-,2-GPI IgG e IgM nelle donne con i criteri ostetrici per la classificazione di APS e nei controlli.

		Pazienti con i criteri		Pazienti senza i criteri		Significatività (p)
		n.	%	n.	%	
Anti- $\beta 2$ -GPI IgG (livelli)	bassi	13	33,33	3	25,00	n.s.
	medi	25	64,10	8	66,66	n.s.
	elevati	1	2,56	1	8,33	n.s.
Anti- $\beta 2$ -GPI IgM (livelli)	bassi	6	50,00	5	50,00	n.s.
	medi	6	50,00	2	20,00	n.s.
	elevati	0	0	1	10,00	n.s.

Tabella III - Sensibilità e specificità dei diversi anticorpi antifosfolipidi per i criteri ostetrici di classificazione dell'APS.

	Sensibilità	Specificità
Anti- β 2-GPI IgG	23,92%	93,03%
Anti- β 2-GPI IgM	7,36%	95,35%
aCL IgG	27,60%	93,61%
aCL IgM	6,13%	95,94%
LA	1,22%	100%

presente nei LA che tuttavia avevano una scarsissima sensibilità (1,22%) per l'impegno ostetrico della APS. Il confronto della specificità degli anti- β 2-GPI IgG e IgM con quella degli aCL IgG e IgM è risultato privo di significatività statistica.

DISCUSSIONE

La diagnostica di laboratorio dell'impegno ostetrico dell'APS risulta di fondamentale importanza in considerazione dei grandi benefici del trattamento preventivo delle complicanze in corso di gravidanza (16-18). Poter disporre di nuovi markers diagnostici sarebbe di grande aiuto al fine di identificare le pazienti a rischio, programmare il protocollo terapeutico adatto e di conseguenza migliorare l'esito della gravidanza. Pertanto abbiamo indagato l'utilità diagnostica per l'impegno ostetrico dell'APS degli anticorpi anti- β 2-GPI che attualmente non vengono considerati un criterio di laboratorio valido per la classificazione dell'APS (4). Le pazienti reclutate nello studio avevano una discreta numerosità e comunque tale da garantire l'attendibilità dei risultati; inoltre i due gruppi, quello comprendente pazienti con i criteri ostetrici per la classificazione dell'APS e quello di controllo, erano omogenei per numero ed età. La decisione di escludere dallo studio le pazienti con trombosi è stata presa al fine di evitare una possibile interferenza nella valutazione della associazione degli anti- β 2-GPI con l'impegno ostetrico dell'APS.

Nel corso dello studio, durato 12 anni, sono state utilizzate per la determinazione degli aCL le tecniche ELISA secondo le modalità indicate dalla letteratura. In particolare fino al 1999 sono stati seguiti i criteri di Harris (13) e dal 2000 quelli del-

l'European Antiphospholipid Forum (14). Pertanto i risultati riguardanti gli aCL vanno valutati anche tenendo conto delle differenze del metodo usato per la loro determinazione.

Tra gli aPL esaminati quelli che hanno dimostrato maggior valore clinico sono stati gli anti- β 2-GPI IgG e gli aCL IgG, che sono risultati entrambi associati significativamente all'impegno ostetrico dell'APS. Sulla base di questi risultati, anche gli anticorpi anti- β 2-GPI IgG potrebbero essere considerati un criterio classificativo valido e pertanto inseriti nella routine di laboratorio per la diagnosi di APS con complicanze ostetriche. Tuttavia la significativa associazione della positività per aCL IgG con quella per anti- β 2-GPI IgG ($p=0,000$) attribuirebbe a questi ultimi anticorpi il valore di marker per i criteri ostetrici di APS in sostituzione degli aCL IgG piuttosto che in loro aggiunta. I livelli degli anticorpi anti- β 2-GPI IgG e IgM sono risultati omogenei nel gruppo di studio e nei controlli, attribuendo in questo modo uno scarso valore alla definizione del livello anticorpale nella diagnostica dell'impegno ostetrico dell'APS. È inoltre interessante osservare come nelle pazienti con i criteri ostetrici per APS sia bassa la prevalenza dei titoli anticorpali elevati sia di anti- β 2-GPI IgG che IgM.

Gli anti- β 2-GPI IgG hanno rivelato una specificità ed una sensibilità per i criteri ostetrici dell'APS sovrapponibili a quelle degli aCL IgG. Questo dato, in accordo con altri autori (8, 10) conferma l'opportunità di inserire la determinazione degli anti- β 2-GPI IgG nella diagnostica di laboratorio dell'impegno ostetrico dell'APS. Invece gli anti- β 2-GPI IgM al pari degli aCL IgM hanno mostrato una scarsa sensibilità, pur associata ad una buona specificità, e quindi un minor valore clinico. Come riportato da altri autori (16), anche nelle nostre pazienti i LA sono risultati scarsamente sensibili per l'impegno ostetrico dell'APS, di conseguenza, anche se altamente specifici, non possono essere considerati utili markers delle complicanze gravidiche dell'APS.

Sulla base dei risultati ottenuti confermiamo l'utilità della determinazione degli anti- β 2-GPI IgG nella routine di laboratorio nelle donne con manifestazioni ostetriche tipiche dell'APS. Tali anticorpi hanno infatti dimostrato di essere sensibili markers dell'impegno ostetrico dell'APS.

RIASSUNTO

Sono state valutate la sensibilità e la specificità degli anti-beta2 glicoproteina I (β 2-GPI), di classe immunoglobulinica (Ig) G e IgM per l'impegno osterico della sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS). Sono stati determinati gli anticorpi anti- β 2-GPI, gli anticorpi anticardiopina (aCL) e i lupus anticoagulants (LA) in 335 donne affette da complicanze ostetriche che in 163 corrispondevano ai criteri per la classificazione di APS ed in 172 non corrispondevano. A parità di specificità con gli altri aPL, le sensibilità più alte per l'impegno ostetrico dell'APS erano quelle degli anti- β 2-GPI IgG e degli aCL IgG la cui differenza non era statisticamente significativa. Pertanto gli anticorpi anti- β 2-GPI IgG possono essere considerati sensibili markers dell'impegno ostetrico dell'APS.

Parole chiave - Anti- β 2 glicoproteina I, sindrome da antifosfolipidi, perdita fetale.

Key words - *Anti- β 2 glycoprotein I, antiphospholipid syndrome, fetal loss.*

BIBLIOGRAFIA

1. Willems GM, Janssen MP, Pelsers MAL, Comfurius P, Galli M, Zwaal RFA, et al. Role of divalency in the high affinity binding of cardiolipin antibody- β 2-glycoprotein-I complexes to lipid membranes. *Biochemistry* 1996; 35: 13833-42.
2. Galli M, Comfurius P, Maasen C, Hemker HC, de Beats MH, van Breda-Vriesman PJC, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544-7.
3. Matsuura E, Ingarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336: 177-8.
4. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette J-C, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Report of an International Workshop Arthritis Rheum 1999; 42: 1309-11.
5. Reber G, de Moerloose P. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies-When and how should they be measured? *Throm Res* 2004; 114: 527-31.
6. Day H M, Thiagarajan P, Reveille J D, Tinker KF, Arnett FC. Autoantibodies to β 2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid antibody syndrome: clinical correlations in comparison with other antiphospholipid antibody tests. *J Rheumatol* 1998; 25: 667-74.
7. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, Carreras LO. Relationship of anti beta2-glycoprotein I and prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. *Throm. Haemost* 1997; 78: 1008-14.
8. Gris JC, Quere I, Sanmarco M, Boutiere B, Mercier E, Amiral J, et al. Antiphospholipid and antiprotein syndrome in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Narnes Obstetricians and Haematologists Study-NOHA. *Throm Haemost* 2000; 84: 228-36.
9. Lee RM, Emlen L, Scott JR, Branch DW, Silver RM. Anti-beta2- glycoprotein I antibodies in women with recurrent spontaneous abortion, unexplained fetal death, and antiphospholipid syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 642-8.
10. Faden D, Tincani A, Tanzi P, Spatola L, Lojcono A, Tarantini M, et al. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies in a general obstetric population: preliminary results on the prevalence and correlation with pregnancy outcome. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies are associated with some obstetrical complications, mainly preeclampsia-eclampsia. *Obstet Gynecol* 1997; 73: 37-42.
11. Lee RM, Brown MA, Branch DW, Ward K, Silver RM. Anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein-I antibodies in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 294-300.
12. Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of anti-phospholipid antibodies by ELISA using β 2-glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods* 1991; 143: 223-9.
13. Harris EN. Antiphospholipid antibodies (Annotation). *Brit J Haematol* 1990; 74: 1-9.
14. 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.
15. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scarrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: An update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
16. Kutteh W H, Ermel L D. A clinical trial for the treatment of antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss with lower dose heparin and aspirin. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 402-7.
17. Rai R, Cohen H, Dave M, Regan L. Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* 1997; 314: 253-7.
18. Ruffatti A, Favaro M, Tonello M, De Silvestro G, Pengo V, Fais G et al. Efficacy and safety of nadroparin in the treatment of pregnant women with antiphospholipid syndrome: a prospective cohort study. *Lupus* 2005; 14: 1-9.