

# Ruolo degli anticorpi anti-protrombina nella sindrome da antifosfolipidi\*

## *Role of anti-prothrombin in antiphospholipid syndrome*

M. Cinquini, M. Vianelli, F. Allegri, R. Cattaneo, G. Balestrieri, A. Tincani

Servizio di Reumatologia, Allergologia ed Immunologia Clinica, Spedali Civili di Brescia,  
Cattedra di Allergologia ed Immunologia Clinica dell'Università degli Studi di Brescia

### SUMMARY

We studied 99 patients with systemic autoimmune disease (5 males, 94 women; mean age 37 year, range 16-72): 28 Primary Antiphospholipid Syndrome, 67 Systemic lupus Erythematosus, 1 Mixed Connective Tissue Disease, 2 Undifferentiated Connective Tissue Disease and 1 Discoid Lupus. Based on the observation that native PT shows conformational changes in presence of  $Ca^{++}$  ions and discloses new epitopes available for binding with phospholipids, we performed 3 different methods for the detection of aPT in presence and absence of  $Ca^{++}$ , finding a different incidence of specific autoantibodies, associated with clinical features of APS (aPT in presence of  $Ca^{++}$ ) or non associated (aPT in absence of  $Ca^{++}$ ). The presence of aPT was significantly associated also with the presence of Lupus Anticoagulant (LAC). The detection of aPT (in presence of  $Ca^{++}$ ) significantly enhances diagnostic sensibility of APS allowing the identification of a subset of patients (6/99) with clinical features of APS, but with negative LAC, aCL and a $\beta$ 2-GPI; in fact (limited to thrombotic episodes) the sensibility rises from 56.2% with one test (LAC) to 81.1% with the application of LAC, aCL, a $\beta$ 2GPI and aPT.

Reumatismo, 2002; 54(3):243-250

### INTRODUZIONE

Nell'Ottobre 1998 a Sapporo, in una riunione a latere dell'VIII° Simposio Internazionale sugli Anticorpi Antifosfolipidi, un gruppo di esperti delineava le prime linee di consenso internazionale sui criteri di classificazione della Sindrome da Antifosfolipidi (APS) (1). I criteri diagnostici definiti comprendono, come sintomi clinici, trombosi, arteriosa e/o venosa, e/o patologia gravidica, e, come segni di laboratorio, la persistente positività di Anticoagulante Lupico (LAC) e/o di anticorpi anti-cardiolipina  $\beta$ 2-glicoproteina I ( $\beta$ 2-GPI) dipendenti (aCL).

L'insieme degli altri test di laboratorio, esploranti risposte anticorpali verso fosfolipidi diversi dalla cardiolipina (CL) o verso proteine leganti i fosfolipidi (PL), quali  $\beta$ 2-GPI, protrombina (PT), annessina V, Fattore V e proteina C o proteina S del-

la coagulazione (2), viene giudicato come necessitante di una ulteriore standardizzazione e/o di studi dimostranti una effettiva associazione con la sintomatologia clinica della sindrome.

Queste considerazioni sono particolarmente calzanti specie per quanto riguarda la determinazione degli anticorpi aPT.

In effetti, la dimostrazione che il prolungamento dei tempi di coagulazione nelle metodiche PL, fenomeno definito appunto LAC, è mediato nella larga maggioranza dei casi da aPT (3), unitamente ai vantaggi offerti dalle metodiche ELISA che, accanto ad una alta sensibilità, permettono l'analisi di consistenti casistiche e la precisa identificazione sia del sistema antigene-anticorpo implicato, sia della isotipia degli anticorpi evidenziati, hanno fatto sì che la prima introduzione di un test ELISA aPT (4) sia stata seguita da una nutrita serie di ricerche miranti a definire il ruolo di questi anticorpi nella APS (5-14), con risultati assolutamente contrastanti. Mentre taluni studi infatti negano una qualsiasi correlazione fra aPT e manifestazioni cliniche della APS, arrivando alla conclusione della non rilevanza clinica di questa me-

\*Lavoro premiato al XXXVIII Congresso SIR di Padova, 2001

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Massimo Cinquini, Servizio di Immunologia Clinica,  
Spedali Civili, Piazzale Spedali Civili 1, 25100 Brescia

todica (15), altri sottolineano invece una associazione statisticamente significativa fra riscontro di aPT ed i sintomi clinici della sindrome, inclusa la piastrinopenia (14).

Questa estrema difformità di risultati può trovare una serie di giustificazioni. In primo luogo, la dimostrata larga eterogeneità degli aPT, per quanto riguarda sia la fine specificità anticorpale (non tutti gli aPT esibiscono infatti una attività tipo LAC, 16), sia la affinità (gli aPT ad alta affinità che causano ipoprotrombinemia e facili emorragie sono scarsamente rappresentati, 17). A questa eterogeneità consegue inevitabilmente una diversa composizione delle casistiche studiate, e quindi una diversità dei risultati ottenuti.

Inoltre, la PT stessa è in grado di assumere diversi assetti conformazionali in situazioni chimico-fisiche diverse, con la esposizione di epitopi immunogeni caratteristici e peculiari dei diversi assetti conformazionali (18-22), così da permettere la produzione di anticorpi monoclonali specifici per le diverse conformazioni possibili, ossia per la forma nativa in assenza di  $Ca^{++}$ ioni ( $Ca^{++}$ ), in presenza di  $Ca^{++}$ , ed in presenza infine di  $Ca^{++}$  e PL (22-24).

È facilmente comprensibile come alla diversità delle metodiche utilizzate, differenti per tipo di plastica (polistirene, polistirene irradiato, PVC), per tamponi (PBS, TBS con o senza  $Ca^{++}$ ), per presentazione dell'antigene (PT, complesso PT-fosfatidilserina), possano corrispondere risultati non comparabili.

Considerato tutto questo, si è ritenuto interessante analizzare una nutrita coorte di pazienti, affetti da patologie autoimmuni includenti APS primarie e secondarie, con tre diverse metodiche per la rilevazione di aPT, e di comparare i risultati ottenuti con quelli della ricerca di LAC, aCL ed anti- $\beta$ 2GPI.

## PAZIENTI E METODI

### *Pazienti*

Sono stati presi in esame 99 pazienti con malattia autoimmune sistemica (5 M, 94 F; età media 37 anni, range 16-72), seguiti presso il Servizio di Reumatologia, Allergologia ed Immunologia Clinica degli Spedali Civili di Brescia: 28 pazienti con Sindrome da Antifosfolipidi Primaria (PAPS), diagnosticata in accordo con i criteri classificativi recentemente stabiliti (1); 67 pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico (LES), secondo i criteri classificativi ACR (25), di cui 17 con APS Secondaria; 1 Malattia Mista del Connettivo (MCTD); 2 Connet-

tivi Indifferenziate (UCTD) ed 1 Lupus Discoide (LED). La storia clinica dei pazienti è stata esaminata retrospettivamente per la ricorrenza di trombosi arteriose e/o venose, patologia gravidica, piastrinopenia (conteggio piastrine  $< 150.000/mm^3$ ).

I pazienti sono stati sottoposti, previo consenso informato, a prelievo venoso, ed il siero, aliquotato, è stato conservato a  $-25^\circ C$ .

Come controllo è stato utilizzato il siero, aliquotato e conservato a  $-25^\circ C$ , di 116 soggetti sani, donatori volontari di sangue.

### *Determinazione del LAC*

È stata condotta in accordo con Brandt et al (26).

### *Determinazione degli anticorpi anti-cardiolipina*

È stata condotta in accordo con quanto precedentemente descritto (27).

### *Determinazione degli anticorpi anti- $\beta$ 2GPI*

È stata condotta in accordo con con Balestrieri et al (28), utilizzando  $\beta$ 2GPI purificata da siero umano secondo quanto descritto da La Rosa e coll. (29).

### *Radioiodinazione con $^{125}I$ della protrombina*

PT umana purificata (Stago) è stata radioiodinata con  $Na^{125}I$ , impiegando la metodica della clorammina-T (30). L'attività specifica era 2.806 cpm/ng di proteina.

### *Preparazione di liposomi*

#### *fosfatidilserina-fosfatidilcolina (liposomi PS-PC)*

Una soluzione di PS-PC (Sigma), nel rapporto 90:10, peso:peso, veniva essicata sotto flusso di azoto. Dopo ulteriore permanenza sotto vuoto per eliminare i residui di solventi organici, il campione veniva ripreso in tampone 0,05 M tris-(metilidrossi)-aminometano, 0,1 M NaCl, pH 7,4 (TBS), sottoposto a Vortex e, quindi, sonicato due volte per 30 secondi (Gen Probe, Elma).

### *Valutazione della interferenza dell'EDTA*

#### *sul legame PT-PL*

Sono state allestite diverse soluzioni di  $^{125}I$ -PT:

- 0,5  $\mu g$   $^{125}I$ -PT in 1000  $\mu l$  TBS - Albumina bovina (BSA) 1%;
- 0,5  $\mu g$   $^{125}I$ -PT e 900  $\mu g$  di liposomi PS-PC in 1000  $\mu l$  TBS - 3 mM  $CaCl_2$  - BSA 1%;
- 0,5  $\mu g$   $^{125}I$ -PT e 900  $\mu g$  di liposomi PS-PC in 900  $\mu l$  TBS- 10 mM EDTA- BSA 1%.

Dopo incubazione per 3 ore a  $37^\circ C$  con periodica agitazione con Vortex, si sono determinati su gamma-counter (Wizard 1470, Wallac) i cpm di 50  $\mu l$

di surnatante dei diversi campioni, prelevati in doppio, prima e dopo centrifugazione a 10.000 g per 10 minuti, considerando la eventuale diminuzione della radioattività del surnatante come misura della formazione di complessi PT-liposomi.

Dopo questa prima fase, il campione b) è stato portato a 10 mM EDTA. Dopo incubazione per 3 ore a 37°C con periodica agitazione con Vortex, sono stati rivalutati i cpm di 50 µl di surnatante, prelevati in doppio, prima e dopo centrifugazione.

#### *Purificazione di IgG da siero umano e di cavallo*

Il precipitato in ammonio solfato (45%) dei sieri, ripreso in PBS (0,14 M NaCl, 0,01 M fosfati), è stato sottoposto a cromatografia di affinità su Proteina G-Sepharose (Pharmacia).

#### *Determinazione degli anticorpi anti-protrombina*

È stata attuata secondo tre diverse metodiche, miranti a definire la presenza di anticorpi verso la forma nativa della PT (metodica in 0,01M EDTA), o verso lo stato conformazionale della PT indotto da Ca<sup>++</sup>. Quest'ultima analisi è stata condotta in presenza o meno di alte concentrazioni di IgG di cavallo, impiegate per competere con l'eventuale legame aspecifico delle immunoglobuline umane alla fase solida. In breve:

a) ricerca di anticorpi IgG ed IgM aPT in assenza di Ca<sup>++</sup> (aPT-EDTA). PT umana (Stago, 10 µg/ml in tampone 0,05M calcio-carbonato, pH 9,6) viene distribuita (100 µl/pozzetto) su piastra di polistirene attivato (Combiplate EB, LabSystem). Dopo una notte a 4°C, la piastra viene bloccata con 150 µl/pozzetto di tampone di bloccaggio (PBS, BSA 1%, 0,5 mg/ml di IgG di cavallo, pH 7,2) per 1 ora a temperatura ambiente. Sono quindi seminati i sieri in esame (100 µl/pozzetto), diluiti 1:50 in tampone di diluizione (PBS, 1% BSA, 0,05% Tween 20, 0,5 mg/ml IgG di cavallo, 0,01 M EDTA, pH 7,2) e filtrati (filtri con porosità 0,2 µ, Nalgene, Nunc). Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente, seguono 3 lavaggi (PBS, 1% BSA, 0,05% Tween 20, 0,01 M EDTA, pH 7,2), 150µl/ pozzetto, e sono quindi distribuiti 100 µl/pozzetto di antisiero (anti-IgG o, alternativamente, anti-IgM umane, marcate con fosfatasi alcalina, - Jackson Immunoresearch), diluite 1:5000 in tampone di diluizione. Dopo 2 ore a temperatura ambiente, i pozzetti sono lavati 3 volte con tampone di lavaggio e viene distribuito il substrato (Phosphatase Substrate, Sigma). La piastra viene posta in incubazione a 37°C per lo sviluppo della reazione cromogena, che è poi letta allo spettrofotometro in assorbanza, ad una lunghezza d'on-

da di 405 nm, con automatica sottrazione del valore letto a 655 nm (Novapath microplate reader, Biorad). In ogni corsa sono inclusi sieri noti, testati a differenti diluizioni, in modo da coprire l'intero range di positività. La reazione viene bloccata, quando la lettura di questi campioni raggiunge i valori predeterminati. Il cut-off di normalità è stato stabilito utilizzando il 99,5 percentile di 116 sieri da soggetti sani, e risulta di 0,217 UO per gli anticorpi di classe IgG e 0,318 UO per le IgM.

b) ricerca di anticorpi IgG ed IgM aPT in presenza di Ca<sup>++</sup> (aPT-Ca<sup>++</sup> 1). Viene eseguita esattamente come la metodica precedente, con la sola variante dell'impiego di soluzione tampone TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4), addizionato di 0,005 M CaCl<sub>2</sub>, anziché PBS, 0,01 M EDTA. Il cut-off di normalità è stato stabilito utilizzando il 99,5 percentile di 116 sieri da soggetti sani, e risulta di 0,310 UO per gli anticorpi sia di classe IgG, sia di classe IgM.

c) ricerca di anticorpi IgG ed IgM aPT in presenza di Ca<sup>++</sup> (aPT-Ca<sup>++</sup> 2). Viene condotta come la precedente, fatta eccezione per: i) il mancato utilizzo nei tamponi di bloccaggio e di diluizione di IgG di cavallo, ii) la riduzione dei tempi di incubazione da 2 ore a 1 ora. Il cut-off di normalità è stato stabilito utilizzando il 99,5 percentile di 77 sieri da soggetti sani, e risulta di 0,120 UO per gli anticorpi di classe IgG e 0,130 UO per gli anticorpi di classe IgM.

#### *Esperimenti di inibizione*

Si è operato in accordo con Friguet et al (31), con calcolo della costante di associazione (K<sub>d</sub>).

#### *Analisi statistica*

È stato applicato il test del  $\chi^2$  ed il test di Spearman per determinare il significato statistico dei risultati ottenuti.

## RISULTATI

#### *Casistica in esame*

La tabella I riassume la distribuzione degli eventi clinici rilevanti per la sindrome da anticorpi antifosfolipidi (fatti trombotici e/o patologia gravidica e/o piastrinopenia) nella casistica considerata.

#### *Anticorpi anti-protrombina*

##### **1) Metodica in EDTA (aPT-EDTA)**

*1.1 Dimostrazione della conformazione nativa della PT in 0,001 M EDTA:* La PT, in presenza di PL e

**Tabella I** - Casistica esaminata.

Patologia (n. pz)	Trombosi			Patologia gravidica	Piastrinopenia (<150/m <sup>3</sup> )
	arteriose	venose	artero-venose		
LES* (50)	9	3	2	1	15
LES+APS ^ (17)	5	9	3	3	4
PAPS (28)	8	7	4	22	7
MCTD°, UCTD#, LED§(4)	2	1	0	2	1
TOTALI (99)		53		28	27

\* LES=Lupus Eritematoso Sistemico; ^ (P)APS =Sindrome da Antifosfolipidi (Primaria); °MCTD= Malattia Mista del Connettivo; # UCTD= Connettivite Indifferenziata; § LED=Lupus Discoide.

Ca<sup>++</sup> (Tab. II, campione b-1), tende a complessarsi in modo significativo con i liposomi di PS-PC, venendo quindi allontanata dalla fase fluida con la centrifugazione, come dimostrato dalla riduzione del 59% della radioattività del surmatante. L'EDTA, alla concentrazione 0,01M, non solo inibisce la formazione di tali complessi (Tab. II, campione c), ma è anche in grado di dissociare complessi fosfolipidi-protrombina preformati (Tab. II, campione b-2). Il campione a, costituito da sola <sup>125</sup>I-PT, dimostra la perfetta solubilità della molecola nelle condizioni in cui è stato condotto l'esperimento.

**1.2 sensibilità:** come evidenziato in tabella III, nel 31,3% dei pazienti esaminati per aPT-EDTA è stato possibile rilevare una risposta anticorpale, con un picco di incidenza nel gruppo delle APS secondarie

a LES (58,8%). In particolare, 18.1% dei pazienti esaminati sono risultati positivi per anticorpi IgG aPT-EDTA e 15.1% per anticorpi di classe IgM.

**1.3 prove di inibizione:** la aggiunta al mestruo di reazione di quantità crescenti di PT è in grado di inibire fino a valori superiori al 90% la attività di IgG purificate da sieri aPT-EDTA positivi. La costante di associazione (K<sub>d</sub>) determinata per IgG purificate da 7 sieri positivi risulta compresa fra 6,293 x 10<sup>-7</sup> e 1,393 x 10<sup>-6</sup> M, valori propri di anticorpi a bassa affinità.

## 2) Metodica in presenza di Ca<sup>++</sup> ioni (aPT-Ca<sup>++</sup> 1)

**2.1 Sensibilità:** come evidenziato in Tabella III, nel 48,4% dei pazienti esaminati per aPT-Ca<sup>++</sup>1 è stato possibile rilevare una risposta anticorpale, con la massima incidenza nuovamente nel gruppo delle

**Tabella II** - Valutazione della interferenza di EDTA (0,01 M) sulla formazione di complessi fosfolipidi-protrombina (PL-PT).

La PT, in presenza di PL e Ca<sup>++</sup> (campione b-1), tende in modo significativo a complessarsi con i liposomi di fosfatidilserina-fosfatidilcolina, venendo quindi allontanata dalla fase fluida con la centrifugazione, come dimostrato dalla riduzione del 59% della radioattività del surmatante. L'EDTA, alla concentrazione 0,01M, non solo inibisce la formazione di tali complessi (campione c), ma è anche in grado di dissociare complessi PL-PT preformati (campione b-2). Il campione a, costituito da sola <sup>125</sup>I-PT, dimostra la perfetta solubilità della molecola nelle condizioni in cui è stato condotto l'esperimento.

Campione	Tampone	CPM di 50 ml di surmatante		D%
		prima	dopo	
a) <sup>125</sup> I-PT	*TBS 1% BSA	52301	51703	- 1.14
b-1) <sup>125</sup> I-PT + PL	TBS 1% BSA, 6 mM CaCl <sub>2</sub> ,	50028	20494	- 59
b-2) al camp. b-1 è aggiunto	10 mM EDTA	63189	62132	- 1.67
c) <sup>125</sup> I-PT + PL	10 mM EDTA	55562	55765	+ 0.3

\* 0.05 M tris- (metilidrossi)-aminometano, 0.1 M NaCl, pH 7.4

**Tabella III** - Incidenza dei diversi tipi di aPT nella casistica considerata.

PAZIENTI	N° pazienti positivi per IgG e/o IgM		
	aPT-EDTA	aPT-Ca <sup>++</sup> 1	aPT-Ca <sup>++</sup> 2
LES* (50)	12 (24%)	18 (36%)	17 (34%)
LES+APS ^ (17)	10 (58.8%)	15 (88.2%)	13 (76.4%)
PAPS (28)	9 (32%)	15 (53.5%)	19 (67.8%)
MCTD°, UCTD#, LED§(4)	0	0	2 (50%)
TOTALI (99)	31 (31.3%)	48 (48.4%)	51 (51.5%)

\* LES=Lupus Eritematoso Sistemico; ^ (P)APS =Sindrome da Antifosfolipidi (Primaria); °MCTD= Malattia Mista del Connettivo; # UCTD= Connettivite Indifferenziata; § LED= Lupus Discoide.

**Tabella IVa** - Valutazione della associazione fra le diverse popolazioni di anticorpi esaminate (aCL, antib2GPI, aPT-EDTA, aPT-Ca<sup>++</sup> 1, aPT-Ca<sup>++</sup> 2). Test di Spearman.

	aCL	aβ2GPI	aPT-EDTA	aPT-Ca <sup>++</sup> 1	aPT-Ca <sup>++</sup> 2
aCL					
aβ2GPI	IgG p<.001 IgM p=ns*				
aPT-EDTA	IgG p=ns IgM p=ns	IgG p=ns IgM p=ns			
aPT-Ca <sup>++</sup> 1	IgG p=ns IgM p=ns	IgG p=ns IgM p=ns	IgG p=.02 IgM ns		
aPT-Ca <sup>++</sup>	2 IgG p=ns IgM p=ns	IgG p=ns IgM p=ns	IgG p=ns IgM p=.01	IgG p=ns IgM p=ns	

\*n.s.= associazione non significativa.

APS secondarie a LES (88,2%). Complessivamente, il 28,3% dei pazienti esaminati sono risultati positivi per anticorpi di classe IgG e il 35% per anticorpi di classe IgM.

**2.2 Prove di inibizione:** la specificità della reazione è stata documentata dalla possibilità di inibire il legame alla fase solida di IgG, purificate dal siero di pazienti aPT-Ca<sup>++</sup> 1 positivi. La costante di associazione ( $K_d$ ) determinata per IgG purificate da sieri positivi risulta compresa fra  $2,802 \times 10^{-8}$  e  $1,810 \times 10^{-7}$  M e  $1,393 \times 10^{-6}$  M, indicanti una energia di legame ca. 10 volte superiore a quella evidenziata dagli anticorpi rilevati in aPT-EDTA.

### 3) Metodica condotta in presenza di Ca<sup>++</sup> (aPT-Ca<sup>++</sup> 2)

**3.1 Sensibilità:** l'impiego di questa metodica ha ulteriormente incrementato (Tab. III) il numero di

pazienti positivi per aPT, fino al valore di 51,5%, con una incidenza massima (76,4%) ancora nel gruppo delle APS secondarie a LES. Per quanto riguarda le classi anticorpali, il 18,2% dei pazienti ha anticorpi IgG, il 41,4% IgM.

**Associazione fra le diverse popolazioni di anticorpi esaminate (LAC, aCL, antiβ2GPI, aPT-EDTA, aPT-Ca<sup>++</sup> 1, aPT-Ca<sup>++</sup> 2):** L'utilizzo del test di Spearman, applicabile solo per metodiche con risultato espresso in termini numerici (aCL, antib2GPI, aPT-EDTA, aPT-Ca<sup>++</sup> 1, aPT-Ca<sup>++</sup> 2), ha evidenziato (Tab. IVa) una associazione statisticamente significativa fra aCL/aβ2GPI, fra aPT-EDTA/aPT-Ca<sup>++</sup>1 relativamente agli anticorpi di classe IgG e fra aPT-EDTA/aPT-Ca<sup>++</sup>2 relativamente agli anticorpi di classe IgM. L'applicazione del test del  $\chi^2$  (Tab. IVb) ha evidenziato un'as-

**Tabella IVb** - Valutazione della associazione fra aCL, anti $\beta$ 2GPI, aPT-EDTA, aPT-Ca<sup>++</sup> 1, aPT-Ca<sup>++</sup> 2 e LAC. Test del  $\chi^2$ .

Metodica ELISA	LAC
aCL	P<.00001
a $\beta$ 2GPI	P<.00001
aPT-EDTA	P=.01
aPT-Ca <sup>++</sup> 1	P=.0001
aPT-Ca <sup>++</sup> 2	P=.0001

sociazione altamente significativa fra LAC/aCL, LAC/anti $\beta$ 2GPI, LAC/aPT-Ca<sup>++</sup>1 e LAC/aPT-Ca<sup>++</sup>2.

**Correlazione fra le diverse popolazioni di anticorpi esaminate (LAC, aCL, a $\beta$ 2GPI, aPT-EDTA, aPT-Ca<sup>++</sup> 1, aPT-Ca<sup>++</sup> 2), e i sintomi clinici della APS:** sia pure con indici di significatività diversi (Tab. V), LAC, aCL e a $\beta$ 2GPI risultano significativamente correlati sia con i fenomeni trombotici, sia con la patologia gravidica. Delle 3 diverse metodiche aPT, aPT-Ca<sup>++</sup>1 è significativamente associata alla patologia trombotica e aPT-Ca<sup>++</sup>2 sia alla patologia trombotica, sia alla patologia gravidica.

**Utilizzo di diverse metodiche e sensibilità diagnostica:** come mostrato in tabella VI, prendendo in considerazione solo il gruppo dei pazienti con episodi trombotici, la possibilità di porre una diagnosi di APS aumenta in modo significativo con l'aumentare dei test applicati, dal 56.2% con l'utilizzo del solo LAC all' 81.1% con l'impiego di tutte le metodiche.

**Tabella V** - Valutazione della correlazione fra le diverse popolazioni di anticorpi esaminate (LAC, aCL, anti $\beta$ 2GPI, aPT-EDTA, aPT-Ca<sup>++</sup> 1, aPT-Ca<sup>++</sup> 2) e i sintomi clinici della sindrome da antifosfolipidi.

TEST	N. positivi/pz con trombosi	N. positivi/pz con patologia gravidica	N° positivi/pz con piastrinopenia
LAC 27/48*	p=.004 16/28	p=.007 23/27	p=ns
aCL 29/53	p=.01 20/28	p=.0004 9/27	p=ns**
a $\beta$ 2-GPI 35/53	p=.02 23/28	p=.0008 11/27	p=ns
aPT-EDTA 21/53	p=ns 10/28	p=ns 9/27	p=ns
aPT-Ca <sup>++</sup> 1 35/53	p=.0002 14/28	p=ns 14/27	p=ns
aPT-Ca <sup>++</sup> 2 33/53	p=.02 20/28	p=.01 14/27	p=ns

\*in 5 pazienti con trombosi non è stato possibile valutare il LAC in quanto scoagulati.  
\*\*ns<.05

## DISCUSSIONE

Sulla base dei dati qui esposti sono possibili, almeno a nostro avviso, talune conclusioni. In primo luogo, la importanza, per le metodiche destinate alla rilevazione degli aPT, della natura chimico-fisica del mestruo di reazione. La semplice presenza o meno di Ca<sup>++</sup> nel mezzo di reazione condiziona non solo una diversa incidenza nel rilievo di specifici anticorpi, ma anche risultati significativamente associati alla sintomatologia clinica della APS (aPT-Ca<sup>++</sup>1 e 2) o con questi assolutamente non correlabili (aPT-EDTA). Inoltre anche una variazione di alcuni dettagli nella esecuzione di due metodiche condotte in presenza di calcio, consente di individuare due popolazioni di aPT (aPT-Ca<sup>++</sup>1 e 2) che sembrano essere diverse fra loro. In effetti, si è evidenziata una associazione fra aPT-Ca<sup>++</sup>1/aPT-Ca<sup>++</sup>2 ed aPT-EDTA, ma non fra di loro; ed una differente associazione degli aPT-Ca<sup>++</sup>1 e 2 con la trombosi e l'aborto. Questa constatazione fornisce anche una concreta chiave di interpretazione della discordanza in letteratura circa il significato degli aPT.

Associare ad aCL e LAC, unici dati di laboratorio riconosciuti nei recenti criteri preliminari per la classificazione delle APS (1), anche altri test non inclusi quali a $\beta$ 2GPI ed aPT, comporta comunque un progressivo aumento della sensibilità diagnostica, come dimostrato dalla analisi del gruppo di 53 pazienti con fenomeni trombotici (Tab. VI). Si passa infatti dal 56.2% dei pazienti riconosciuti dall'utilizzo del solo LAC all'81.1% dei pazienti riconosciuti con la applicazione di tutti i test, identificando inoltre un piccolo subset di pazienti (6) con fenomeni trombotici e positivi solo per aPT fra



**Tabella VI** - Incremento della sensibilità mediante l'associazione di più metodiche. Sono stati considerati i 53 pazienti (su 99 esaminati), che hanno avuto episodi trombotici.

Metodica	N.	%
LAC	27/48*	56.2
LAC+aCL	33/53	62.2
LAC+aCL+aβ2-GPI	37/53	69.8
LAC+aCL+ aβ2-GPI+ aPT-Ca <sup>++</sup> 1	43/53	81.1

\*in 5 pazienti con trombosi non è stato possibile valutare il LAC in quanto scagolati.

tutti i test per antifosfolipidi applicati. Già nel 1996 Alarçon-Segovia ha introdotto il concetto di "sindrome da anti-cofattore" per descrivere una situazione simile relativa agli aβ2GPI (32); questo particolare sottogruppo di pazienti sembra rappresentare la esatta controparte per gli anticorpi aPT. Evidentemente la importanza di questo dato non è me-

ramente classificativa, in quanto si riflette sulla gestione della terapia, implicando un trattamento anticoagulante a lungo termine, anziché per periodi limitati.

Così come il riscontro di positività per aCL e/o LAC in soggetti senza segni clinici di APS tradisce, come documentato dal follow-up, uno stato di trombofilia (33-37), lo stesso significato predittivo sembra sia da assegnarsi al riscontro di positività per aPT in pazienti senza la sintomatologia clinica della APS (11). Se il rischio non è tale da giustificare particolari atteggiamenti terapeutici (38), la sua conoscenza permette però una più razionale gestione di eventuali rischi trombotici ulteriori (ad esempio, terapie anticoncezionali).

In conclusione, l'insieme dei dati presentati, pur sottolineando la necessità di una standardizzazione delle metodiche, già da più parti enfatizzata (1), mette in luce, almeno a nostro avviso, il significato e la rilevanza per la diagnosi di APS della introduzione del test ELISA aPT-Ca<sup>++</sup>1 nello studio di pazienti affetti da trombosi.

#### RIASSUNTO

Si è esaminata una casistica di 99 pazienti con patologia autoimmune con 3 diverse metodiche per la rilevazione di aPT. La semplice presenza o assenza di Ca<sup>++</sup> condiziona non solo una diversa incidenza nel rilievo di specifici anticorpi, ma anche risultati significativamente associati alla sintomatologia clinica della APS (presenza di Ca<sup>++</sup>) o con questi assolutamente non correlabili (assenza di Ca<sup>++</sup>). La presenza di aPT è correlata con positività al LAC. Gli aPT permettono la identificazione di casi con sintomi propri della APS, ma negativi per gli altri anticorpi antifosfolipidi (LAC, aCL, aβ2GPI).

**Parole chiave** - Anti-protrombina, antifosfolipidi, trombosi, perdite fetali.

**Key words** - Anti-prothrombin, antiphospholipid, thrombosis, fetal loss.

#### BIBLIOGRAFIA

- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-11.
- Roubey RAS. *Textbook of Rheumatology* 13th edn Koopman WJ, 1997.
- Exner T. Some recent developments with lupus anticoagulant. *Blood Coag Fibrinol* 1994; 5: 281-9.
- Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1120-5.
- Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost* 1996; 75: 721-4.
- Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 77: 486.
- Guerin J, Smith O, White B, Sweetman G, Feighery C, Jackson J. Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. *Br J Haematol* 1998; 102: 896-902.
- Inanc M, Donohoe S, Ravirajan CT, Radway-Bright EL, Mackie I, Machin S, et al. Anti-beta-2-glycoprotein I, anti-prothrombin and anticardiolipin antibodies in a longitudinal study of patients with systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1089-94.
- Horbach DA, van Oort E, Donders RC, Drekken RHW, de Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assay for the detection of an-

- tiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1996; 6: 916-24.
10. Vaarala O, Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Aho K, Palosuo T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost* 1996; 75: 456-9.
  11. Palosuo T, Virtamo J, Taylor PR, Aho K, Puurunen M, Vaarala O. High antibody levels to prothrombin imply a risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in middle aged men- A nested case- control study. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1178-82.
  12. Bertolaccini ML, Atsumi T, Khamashta MA, Amengual O, Hughes GRV. Autoantibodies to human prothrombin and clinical manifestations in 207 patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998; 25: 1104-8.
  13. Funke A, Bertolaccini ML, Atsumi T, Amengual O, Khamashta MA, Hughes GRV. Autoantibodies to prothrombin-phosphatidylserine complex.. Clinical significance in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7: S221 (abstract), 1998.
  14. Tetsuya A, Masahiro I, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the Antiphospholipid Syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1982-92.
  15. Galli M. Should we include anti-prothrombin antibodies in the screening for the antiphospholipid syndrome? *J Autoimmun* 2000; 15: 101-5.
  16. Horbach DA, van Oort E, Drexler RH, de Groot PG. The contribution of anti-prothrombin-antibodies to lupus anticoagulant activity: discrimination between functional and non-functional anti-prothrombin-antibodies. *Thromb Haemost* 1998; 79: 790-5.
  17. Bajaj SP, Rapaport SI, Barclav S, Herbst KD. Acquired hypoprothrombinemia due to non neutralizing antibodies to prothrombin: mechanism and management. *Blood* 1985; 65: 1538-43.
  18. Bloom JW, Mann KG. Metal ion induced conformational transitions of prothrombin and prothrombin fragment I. *Biochemistry* 1980; 17: 4430-8.
  19. Benarous R, Gacon G. Ca<sup>2+</sup> - induced spectral changes in human prothrombin. *Biochim Biophys Acta* 1980; 622: 179-88.
  20. Osterberg R, Sjoberg B, Osterberg P, Stenflo J. Conformational change of human prothrombin induced by calcium ions: an X-ray scattering study. *Biochemistry* 1980; 19: 2283-6.
  21. Williams RJ. The physics and chemistry of the calcium-binding proteins. *Ciba Found Symp* 1986; 122: 145-61.
  22. Borowski M, Furie BC, Bauminger S, Furie B. Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. Conformation specific antibodies directed against the phospholipid-binding site on prothrombin. *J Biol Chem* 1986; 261: 14969-75.
  23. WU JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb Haemost* 1994; 71: 596-604.
  24. Tetsuya H, Ichikawa K, Yasuda S, Takeuchi R, Amasaki Y, Atsumi T, et al. IgM phosphatidylserine dependent monoclonal antiprothrombin antibody from a patient with Antiphospholipid Syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15, PD7.
  25. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
  26. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
  27. Harris EN. Special report. The Second International Anti-Cardiolipin Standardization Workshop/the Kingston Anti-Phospholipid Antibody Study (KAPS) group. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 476-84.
  28. Balestrieri G, Tincani A, Spatola L, Allegri F, Prati E, Cattaneo R, et al. :Anti-β<sub>2</sub>-glycoprotein I: a marker of antiphospholipid syndrome? *Lupus*: 1995; 4: 122-30.
  29. La Rosa L, Meroni PL, Tincani A, Balestrieri G, Faden D, Lojaco A, et al. Beta 2 glycoprotein I and placental anticoagulant protein I in placenta from patients with anti-phospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1994; 21: 1684-93.
  30. Mc Conahey PJ, Dixon FJ. A method of trace iodination of proteins for immunological studies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1966; 29: 185-9.
  31. Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohanian L, Goldberg ME. Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1985; 77: 305-19.
  32. Cabral AR, Amigo MC, Cabedies J, Alarcón-Segovia D. The antiphospholipid/cofactor syndromes: a primary variant with antibodies to beta 2 glycoprotein I but no antibodies detectable in standard antiphospholipid assays. *Am J Med* 1996; 101: 472-81.
  33. Alarcón-Segovia D, Perez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabedies J. Preliminary Classification Criteria for the Antiphospholipid Syndrome within Systemic Lupus Erythematosus . *Seminars Arthritis Rheumatism* 1992; 21: 275-86.
  34. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hannelkens CH, et al. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 997-1002.
  35. Wahl DG, Guillemin F, de Maistre E, Perret C, Le Comte T, Thibaut G, et al. Risk for venous thrombosis related to antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. A meta-analysis. *Lupus* 1997; 6:467-73.
  36. Petri M Epidemiology of the Antiphospholipid Syndrome. *J Autoimmun* 2000; 15:145-51.
  37. Vianelli M, Taglietti M, Biasini C, Frassi M, Spunghi M, Gorla R, et al. Prognostic value of antiphospholipid antibodies in long term follow up of patients with systemic lupus erythematosus. 5<sup>th</sup> European Conference on Systemic Lupus Erythematosus.
  38. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The Antiphospholipid Syndrome. *N Eng J Med* 2002; 346: 752-63.