

LAVORO ORIGINALE

Significato clinico degli anticorpi anti acido lisobisfosfatidico nei pazienti con sindrome da antifosfolipidi primaria

Clinical value of antibodies to lysobisphosphatidic acid in patients with primary antiphospholipid syndrome

S. Olivieri¹, A. Ruffatti¹, A. Bontadi¹, A. Cavazzana¹, E. Salvan¹, S. Cuffaro¹, S. Giunco², L. Punzi¹

¹Cattedra e U.O.C. di Reumatologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Padova, Padova;

²Clinica Medica I, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Padova, Padova

SUMMARY

To assess the clinical value of anti-lysobisphosphatidic acid (anti-LBPA) antibodies in patients with primary antiphospholipid syndrome (APS), the sera of 140 primary APS patients were tested and compared with those of 70 control subjects affected with rheumatic systemic diseases (n. 24) or autoimmune thyroiditis (n. 46). Anti-LBPA anticardiolipin (aCL) and anti- β_2 Glycoprotein I (anti- β_2 GPI) antibodies were determined using a "home made" ELISA method. Lupus anticoagulant (LA) was assessed using a series of clotting tests in accordance with the literature. IgG anti-LBPA was significantly prevalent in primary APS ($p=0.000$) with a sensitivity of 58.6% and a specificity of 92.9%. IgM anti-LBPA showed a significant frequency in primary APS ($p=0.000$) with a sensitivity of 28.6% and a specificity of 97.1%. Anti-LBPA's sensitivity and specificity for APS were lower or equal to those of aCL and anti- β_2 GPI. The prevalence of anti-LBPA in the different clinical and laboratory subsets of APS was lower than those of aCL and anti- β_2 GPI. It is interesting to observe that both IgG and IgM anti-LBPA were never found alone. The comparison between anti-LBPA and LA showed that the former had a higher sensitivity but a lower specificity. In conclusion, in view of our results anti-LBPA cannot at present be considered a further tool to be utilized to diagnose APS and to differentiate the different clinical and laboratory subsets of this disease.

Reumatismo, 2010; 62(2):107-112

INTRODUZIONE

La sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) è una malattia sistemica di origine autoimmune caratterizzata da fenomeni trombotici, complicanze ostetriche e dalla presenza nel sangue di un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro complessi proteina-fosfolipide o i singoli componenti (fosfolipidi anionici e proteine come la β_2 Glicoproteina I (β_2 -GPI), la protrombina e l'annessina V) (1).

Recentemente, è stato dimostrato (2, 3) che l'acido lisobisfosfatidico (LBPA), un fosfolipide che risiede negli endosomi tardivi delle cellule, potrebbe rappresentare un nuovo target antigenico dell'APS. L'LBPA, infatti, è un isomero idrofobico del fosfatidilglicerolo che ha una struttura simile alla cardiolipina ed è localizzato in domini specifici delle membrane interne degli endosomi tardivi.

Quest'ultimi sono organelli intracellulari multivescicolari ricchi di esteri del colesterolo e di un subset di fosfolipidi, coinvolti nei differenti steps del meccanismo di immagazzinamento e smistamento proteico.

È stato inoltre evidenziato che gli anticorpi contenuti nei sieri di pazienti affetti da APS si legano all'LBPA contenuto negli endosomi tardivi e causano una ridistribuzione di diverse molecole tra cui la β_2 -GPI, proteina coinvolta nella patogenesi

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof.ssa Amelia Ruffatti

Cattedra e U.O.C. di Reumatologia

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Università degli Studi di Padova

Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova

E-mail: amelia.ruffatti@unipd.it

dell'APS (4). Scopo del nostro studio è quello di valutare attraverso un test ELISA "home made" se gli anticorpi dei pazienti affetti da APS primaria si legano all'LBPA e se hanno un valore clinico diagnostico.

Verrà anche confrontata l'associazione tra il legame con l'LBPA e quello con la cardioplipina (CL), la β_2 -GPI e il lupus anticoagulant (LA) sia nell'ambito dell'APS che dei suoi diversi subsets clinici e di laboratorio.

PAZIENTI E METODI

Casistica

Sono stati studiati 140 pazienti affetti da APS primaria diagnosticata sulla base dei criteri di classificazione di Sidney (5) che comprendevano la trombosi vascolare in qualsiasi distretto corporeo, valutata clinicamente e confermata da esami strumentali e l'impegno ostetrico caratterizzato da:

- 1) una o più morti fetali da causa sconosciuta prima della 10^a settimana di gestazione;
- 2) una o più nascite premature prima della 34^a settimana di gestazione di neonati morfologicamente normali, a causa di severa preclampsia o di segni di insufficienza placentare;
- 3) tre o più aborti spontanei consecutivi da causa sconosciuta prima della 10^a settimana di gestazione.

I criteri di laboratorio includevano la presenza di almeno uno dei seguenti anticorpi: LA e/o anticorpi α - β_2 GPI di classe IgG/IgM e/o aCL di classe IgG/IgM a titolo medio/alto.

La casistica è stata poi suddivisa sulla base delle caratteristiche cliniche dell'APS, vale a dire la trombosi vascolare, l'impegno ostetrico ed entrambi gli impegni e sulla base delle seguenti categorie anticorpali: categoria I presenza di 2 o più aPL, categoria IIa presenza del solo LA, IIb presenza dei soli aCL e IIc presenza dei soli anti β_2 GPI.

Abbiamo testato la positività degli anticorpi anti-LBPA e di tutti gli aPL standard nei pazienti con APS e in 70 pazienti di controllo affetti da vari tipi di connettiviti sistemiche o da tiroidite autoimmune. Cento soggetti sani omogenei per sesso e per età con i pazienti affetti da APS sono stati testati al fine di calcolare i rispettivi cut-off.

Determinazione degli anticorpi anti-LBPA

Il legame degli anticorpi con l'LBPA è stato valutato usando un test ELISA "home-made". Le piastre Polysorp (Nunc, Rokilde, Denmark), dopo es-

sere state seminate con una soluzione composta da 50 μ g/mL di LBPA sintetico (Avanti Polar Lipid, USA) in etanolo al 100%, e lasciate in frigorifero a 4°C per tutta la notte.

Il bloccaggio è stato eseguito tramite incubazione per 2 h a temperatura ambiente con una soluzione composta da FCS/PBS al 10% (fetal calf serum/phosphate buffered saline). Dopo un primo lavaggio con 10% FCS/PBS le piastre sono state seminate con i sieri dei pazienti diluiti 1:50 che sono stati lasciati incubare per 1 h. L'anticorpo di topo anti-LBPA (6C4, Echelon, Inc., USA) è stato utilizzato come standard per creare una curva di calibrazione.

Dopo 3 lavaggi con 10% FCS/PBS le piastre sono state messe a incubare per 1.5 h con 100 l di una soluzione composta da anticorpi antihuman IgG, antihuman IgM rispettivamente e antimouse IgG e IgM per la curva di calibrazione, coniugati a fosfatasi alcalina (Sigma, St. Louis, Mo, USA). I pozzetti sono stati poi lavati e messi a incubare a 37°C con *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma). L'enzima, reagendo con questo substrato provoca una conversione colorimetrica proporzionale alla concentrazione dell'anticorpo presente, la quale viene rilevata dallo spettrofotometro come valore di assorbanza.

I valori di assorbanza, ottenuti utilizzando un lettore per micropiastre (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) con filtro 405 nm, sono stati espressi in densità ottica (OD) e trasformati in unità arbitrarie confrontandoli con quelli di una curva di calibrazione costruita tramite diluizioni scalari dello standard noto. È stato considerato come cut-off il 99° percentile dei valori ottenuti nei soggetti sani.

Determinazione degli aPL standard

Gli anticorpi aCL sono stati studiati utilizzando un test ELISA "home made" seguendo i requisiti minimi proposti dal Forum Europeo degli anticorpi antifosfolipidi (6).

In accordo con le raccomandazioni del Forum Europeo sono state utilizzati come controlli interni gli anticorpi HcAL e EY2C9 rispettivamente per aCL IgG e aCL IgM. Inoltre, per creare la curva di calibrazione sono stati usati come standards LAPL GM-200 calibrators (Louisville APL Diagnostics, Inc., Doraville, GA, USA) (7). È stato considerato come cut-off il 99° percentile ottenuto testando i soggetti sani di controllo.

Gli anticorpi anti- β_2 GPI sono stati testati in accordo con le proposte del gruppo di standardizza-

zione del Forum Europeo sugli anticorpi antifosfolipidi (8). I risultati sono stati espressi come unità arbitrarie utilizzando una curva a otto punti di diluizione ottenuta da un pool di campioni positivi calibrati sugli anticorpi monoclonali di Koike (HCAL per gli anticorpi α - β_2 GPI IgG e EY2C9 per gli anticorpi α - β_2 GPI IgM) (9). È stato considerato come cut-off il 99° percentile ottenuto testando i soggetti sani di controllo.

La presenza di anticorpi lupus anticoagulant è stata valutata tramite una serie di tests emocoagulativi seguendo i suggerimenti internazionali forniti dalla Società di Trombosi ed Emostasi (10). Il tempo del Veleno di Vipera di Russell con fosfolipidi diluiti è stato utilizzato come screening test, mentre il tempo di tromboplastina parziale attivata con fosfolipidi diluiti è stato usato nei plasmi negativi al test di screening.

Analisi statistica

L'associazione degli anticorpi anti-LBPA di isotipo IgG e IgM con l'APS è stata analizzata con il test del χ^2 .

RISULTATI

I pazienti con APS primaria (19 uomini e 121 donne, età media 38 ± 12 DS) sono stati suddivisi in base alle caratteristiche cliniche e al profilo anticorpale. Vi erano 78 (55%) pazienti con trombosi vascolare, 50 (35,7%) con impegno ostetrico e 12 (8,5%) con entrambe le caratteristiche cliniche. In base al profilo anticorpale 16 (11%) pazienti appartenevano alla categoria I e 124 (89%) alla categoria II.

I pazienti di controllo affetti da altre malattie autoimmuni erano 70 (4 uomini e 66 donne, età media 37 ± 9 DS) rispettivamente affetti: 24 da connettiviti sistemiche e 46 da tiroidite autoimmune. I sieri di tutti i pazienti affetti da APS primaria e dei controlli sono stati testati per la presenza di anticorpi anti-LBPA e per confronto degli aCL, degli anti- β_2 GPI e del LA.

L'anticorpo anti-LBPA IgG era presente nel 58,6% dei pazienti affetti da APS e nel 7,1% dei pazienti di controllo. La positività per l'anticorpo anti-LBPA di classe IgM era pari al 28,6% nei soggetti con APS e al 2,9% nei controlli. Il test per l'associazione dell'anti-LBPA IgG con il gruppo APS è risultato significativo ($p=0,000$) con una sensibilità pari a 58,6% e una specificità pari al 92,9%. Il test per l'associazione dell'anti-LBPA IgM con il

Tabella I - Sensibilità e specificità per l'APS degli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA.

Anticorpi	Sensibilità per APS (%)	Specificità per APS (%)
Anti-LBPA IgG	58,6	92,9
aCL IgG	69,3	88,6
Anti-LBPA IgM	28,6	97,1
aCL IgM	42,1	98,6
Anti-LBPA IgG-anti- β_2 GPI IgG	58,6	92,9
	80,7	95,7
Anti-LBPA IgM-anti- β_2 GPI IgM	28,6	97,1
	39,3	92,9
Anti-LBPA IgG e/o IgM LA	72,8	88,6
	52,8	94,3

gruppo APS è risultato anch'esso significativo ($p=0,000$) anche se con una sensibilità minore pari al 28,6%, ma una specificità molto elevata pari al 97,1%.

Gli aCL IgG sono stati ritrovati nel 69,3% dei pazienti con APS e nell'11,4% dei controlli; mentre gli aCL IgM nel 42,1% dei pazienti con APS e nel 1,4% dei controlli. Gli anti- β_2 GPI IgG erano presenti nell'80,7% delle APS e nel 4,3% dei controlli, mentre gli anti- β_2 GPI IgM nel 39,3% delle APS e nel 7,1% dei controlli.

L'attività LA era positiva nel 52,7% delle APS e nel 5,7% dei controlli.

In Tabella I sono riportati i valori (%) della sensibilità e specificità per l'APS degli anticorpi anti-LBPA IgG e IgM assieme a quelli degli altri aPL convenzionali.

La sensibilità degli anti-LBPA è risultata minore rispetto a quella di tutti gli altri aPL e in particolare rispetto alla β_2 GPI di classe IgG. Gli anti-LBPA hanno presentato, invece, una maggiore sensibilità rispetto al LA.

Tutti gli aPL hanno mostrato un valore di specificità elevata e simile tra di loro ad eccezione del LA il quale ha rivelato una specificità leggermente inferiore.

I pazienti affetti da APS sono stati suddivisi in base alle caratteristiche cliniche in pazienti con trombosi, con impegno ostetrico e con entrambe le caratteristiche.

Nella Tabella II sono riportate le frequenze degli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA di ogni

Tabella II - Frequenza (%) degli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA nei pazienti con impegno ostetrico, con trombosi vascolare e con entrambi gli impegni dell'APS.

Anticorpi	Impegno ostetrico	Trombosi vascolare	Impegno ostetrico + Trombosi vascolare
LBPA IgG	28%	72%	100%
aCL IgG	48%	78%	100%
LBPA IgM	22%	35%	17%
aCL IgM	32%	50%	33%
LBPA IgG	28%	72%	100%
β_2 -GPI IgG	66%	87%	100%
LBPA IgM	22%	35%	17%
β_2 -GPI IgM	32%	45%	33%
LBPA IgG e/o IgM	48%	84,6%	100%
LA	26%	67%	83%

sottogruppo clinico. La prevalenza degli anticorpi anti-LBPA nell'impegno ostetrico è risultata minore rispetto a quella di tutti gli altri aPL determinati con metodo ELISA e superiore solo a quella del LA.

Anche nella trombosi vascolare la frequenza degli anticorpi anti-LBPA era inferiore a quella degli altri aPL ELISA e superiore a quella del LA.

Invece, nei pazienti con entrambi gli impegni dell'APS la frequenza degli anticorpi anti-LBPA era uguale a quella degli aCL e degli anti- β_2 GPI di tipo IgG, mentre era inferiore a quella degli aCL e degli anti- β_2 GPI di tipo IgM e maggiore a quella del LA.

I valori medi (\pm Deviazione Standard, DS) di aCL IgG e IgM nei pazienti con impegno ostetrico erano di 23,5 unità ($\pm 27,5$ DS) e 38 unità ($\pm 63,4$ DS) rispettivamente; questi valori erano più bassi rispetto a quelli ritrovati nei pazienti con trombosi vascolare (53,8 \pm 32,4 DS e 76,7 \pm 172,3 DS, rispettivamente) e a quelli riscontrati nei pazienti con entrambe le caratteristiche cliniche (65 \pm 24,6 DS e 50 \pm 103,5 DS, rispettivamente).

La stessa situazione valeva anche per i valori medi di anti- β_2 GPI IgG e IgM i quali erano più bassi nei pazienti con solo impegno ostetrico (34,5 \pm 75,3 DS e 12,8 \pm 20,3 DS, rispettivamente), più alti nei pazienti con trombosi vascolare (145,9 \pm 209,2 DS e 22,9 \pm 39,8 DS, rispettivamente) e ancora più elevati in quelli con entrambe le caratteristiche (183,9 \pm 239 DS e 16,5 \pm 25,7 DS, rispettivamente). Analogamente i valori anticorpali di anti-LBPA

Tabella III - Frequenza (%) della positività per gli anticorpi anti-LBPA, aCL, anti- β_2 GPI e LA nel gruppo di pazienti con APS appartenenti alla categoria I e II.

Anticorpi	Categoria II	Categoria I
LBPA IgG	0	67%
aCL IgG	12,5%	77%
LBPA IgM	0	31%
aCL IgM	6%	47%
LBPA IgG	0	67%
β_2 -GPI IgG	37,5%	85%
LBPA IgM	0	31%
β_2 -GPI IgM	37,5%	39,5%
LBPA IgG e/o IgM	0	94,3%
LA	12,5%	56%

IgG e IgM nei pazienti con impegno ostetrico (24 \pm 38,7 DS e 22 \pm 27,3 DS, rispettivamente) erano più bassi rispetto ai valori riscontrati nei pazienti con trombosi vascolari (46,6 \pm 30,4 DS e 31,8 \pm 41,3 DS, rispettivamente) e a quelli evidenziati nei soggetti con entrambe le caratteristiche cliniche (59,9 \pm 25,3 DS e 21,8 \pm 24,6 DS, rispettivamente).

Quando i pazienti con APS sono stati suddivisi in base al profilo anticorpale è stato osservato (Tabella III) che a differenza di tutti gli altri aPL gli anticorpi anti-LBPA sia IgG che IgM non sono mai stati ritrovati presenti da soli nei pazienti con APS. Nella categoria I la prevalenza degli anticorpi anti-LBPA IgG/IgM era sempre minore a quella degli aCL IgG/IgM e degli anti- β_2 GPI IgG/IgM e superiore solo a quella del LA.

DISCUSSIONE

Studi recenti hanno dimostrato che gli anticorpi di pazienti affetti da APS riconoscono un fosfolipide anionico (LBPA) presente negli endosomi tardivi di vari tipi di cellule in coltura (2). In particolare hanno trovato un'associazione degli anticorpi anti-LBPA con gli aCL, gli anti- β_2 GPI ed il LA, anche se gli anti-LBPA mostravano una minore sensibilità per l'APS rispetto agli aCL. Alla conclusione di questo studio, tuttavia, gli autori ponevano dei dubbi sulla reale utilità clinica degli anticorpi anti-LBPA.

Il nostro lavoro ha mostrato l'associazione significativa dell'anti-LBPA IgG con l'APS con una sensibilità del 58,6 % e una specificità del 92,9% e parimenti l'associazione significativa con l'APS dell'anti-LBPA IgM con una sensibilità del 28,6% ed una specificità molto elevata del 97,1%, attribuendo così a questi anticorpi valore nella diagnosi di APS primaria.

Tuttavia la sensibilità per l'APS degli anticorpi anti-LBPA IgG e IgM testati con un metodo ELISA "home made" è risultata inferiore a quella degli altri aPL determinati sempre con metodo ELISA "home made".

Tale sensibilità era solo superiore a quella del LA che era stato ricercato con metodi emocoagulativi, notoriamente meno sensibili.

La specificità per APS dell'anti-LBPA è risultata molto elevata, tuttavia del tutto simile a quella degli altri aPL ELISA e logicamente inferiore a quella del LA. Tali risultati attribuiscono agli anti-LBPA un valore diagnostico certamente non superiore a quello degli altri aPL.

Nella parte successiva dello studio abbiamo confrontato la distribuzione degli anti-LBPA con quella degli altri aPL nei diversi impegni clinici dell'APS ed abbiamo osservato che nell'impegno ostetrico la sua prevalenza era sempre inferiore a quella di tutti gli altri aPL ELISA e superiore solo a quella del LA; lo stesso comportamento è stato osservato nella trombosi; mentre nei pazienti con entrambe le caratteristiche cliniche era presente una prevalenza di anti-LBPA simile o inferiore a quella degli altri aPL ELISA e solo superiore a quella del LA. Pertanto anche in questo caso risulta impossibile attribuire agli anti-LBPA un valore clinico maggiore degli altri aPL nelle diverse forme cliniche dell'APS.

Il comportamento dei livelli anticorpali medi degli anti-LBPA è risultato analogo a quello degli al-

tri aPL ELISA; infatti, in accordo con un nostro lavoro precedente (11), i livelli erano bassi nell'impegno ostetrico, intermedi nella trombosi ed elevati nei pazienti con entrambe le caratteristiche cliniche.

Quando abbiamo esaminato il profilo anticorpale abbiamo notato che gli anticorpi anti-LBPA sia IgG che IgM non erano mai presenti da soli nei pazienti con APS, mentre tutti gli altri aPL avevano una frequenza di positività isolata variabile tra il 6 ed il 37,5%.

Nella categoria I la prevalenza degli anticorpi anti-LBPA era sempre minore a quella degli anticorpi aCL e anti- β_2 GPI e superiore solo a quella del LA.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che nella pratica clinica la determinazione degli anticorpi anti-LBPA non risulta un reale vantaggio sia nella diagnosi di APS che nella distinzione dei diversi subsets clinici e di laboratorio. Infatti, pur risultando altamente specifici per la sindrome essi mostrano sempre una minore sensibilità degli aCL e degli anti- β_2 GPI.

Nei confronti del LA gli anti-LBPA pur dimostrando una maggiore sensibilità, sicuramente attribuibile al diverso metodo di determinazione, non possono essere considerati di maggiore valore clinico a causa della minore specificità diagnostica.

Questi dati, un po' deludenti dal punto di vista clinico sicuramente necessitano di ulteriori studi volti a verificare il significato clinico nell'APS degli anti-LBPA che risultano attualmente di grande interesse biologico per la loro interferenza nella distribuzione e nell'accumulo della β_2 GPI all'interno delle strutture reminescenti vescicolari perinucleari degli endosomi tardivi (3) e per la capacità di allungare in vitro i tests della coagulazione fosfolipide-dipendenti.

RIASSUNTO

Lo scopo dello studio era di valutare il significato clinico degli anticorpi anti-LBPA nei pazienti affetti da sindrome da antifosfolipidi (APS) primaria e di confrontarlo con quello degli anticorpi anticardiolipina (aCL), degli anti- β_2 Glicoproteina I (anti- β_2 GPI) e del lupus anticoagulant (LA). Il gruppo di studio comprendeva 140 pazienti affetti da APS (50 con impegno ostetrico, 78 con trombosi e 12 con entrambe le caratteristiche) e 70 controlli (24 con connettivite e 46 con tiroidite autoimmune). I risultati ottenuti non possono al momento definire gli anti-LBPA come un ulteriore sussidio nella diagnosi di APS e nella distinzione dei diversi subsets.

Parole chiave - Acido lisobisfosfatidico, anticorpi antifosfolipidi, sindrome da anticorpi antifosfolipidi.

Key words - *Lysobisphosphatidic acid, antiphospholipid antibodies, antiphospholipid antibody syndrome.*

BIBIOGRAFIA

1. Kandiah DA, Sali A, et al. Current insights into the "antiphospholipid" syndrome: clinical, immunological and molecular aspects. *Adv Immunol* 1998; 70: 507-63.
2. Alessandri C, Bombardieri M, Di Prospero L, Conigliaro P, Conti F, Labbadia G, et al. Anti-lysobisphosphatidic acid antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 173-80.
3. Sorice M, Ferro D, Misasi R, Pittoni V, Longo A, Circella A, et al. Evidence for anticoagulant activity and β_2 -GPI accumulation in late endosomes of endothelial cells induced by anti-LBPA antibodies. *Thromb Haemost* 2002; 87:735-41.
4. Galve-de-Rochemonteix B, Lobayashi T, Rosnoblet C, Lindsay M, Parton RG, Reber G, et al. Interaction of anti-phospholipid antibodies with late endosomes of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 563-74.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi M, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
6. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni PL, et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553-8.
7. Pierangeli SS, Harris EN. Clinical laboratory testing for the antiphospholipid syndrome. *Clin Chim Acta* 2005; 357: 17-33.
8. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. Proposal for the measurement of anti-b2-Glycoprotein I antibodies. Standardization Group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1860-2.
9. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GR. Beta 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1453-61.
10. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciavarella N, Mazzucconi G, Schinco PC, et al. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med* 1996; 100: 530-6.
11. Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M, Bortolati M, Bison E, Salvan E, et al. Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 1693-6.