



Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

TESI DI LAUREA

**Valutazione di due Pool Plasmi Normali nella diagnostica
del Lupus Anticoagulante**

Relatore: Dr. Elia Ranzato

Co-relatrice: Dr.ssa Daniela Cabodi

Stage svolto presso "Laboratorio analisi – Ospedale San Giovanni Bosco"

Candidata: Marta Suppo

Anno accademico 2023/2024

Indice

ABSTRACT.....	1
INTRODUZIONE	8
1. LUPUS ANTICOAGULANT.....	8
2. ANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI (aPL).....	11
3. LA SINDROME DA ANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI	17
3.1 Manifestazioni cliniche.....	19
3.2 Manifestazioni ostetriche della sindrome da anti-fosfolipidi.....	21
3.3 Sindrome anti-fosfolipidica catastrofica	23
4. EPIDEMIOLOGIA.....	30
4.1 Impatto dell'età e del sesso sulla frequenza della sindrome da anti-fosfolipidi.....	31
4.2 Mortalità nella sindrome da anti-fosfolipidi	33
5. DIAGNOSI	34
6. VIVERE CON LA SINDROME DA ANTI-FOSFOLIPIDI	40
7. TRATTAMENTO E PREVENZIONE	42
8. SCOPO DELLA TESI	45
9. MATERIALI E METODI	46
10. RISULTATI	49
11. CONCLUSIONE	55
BIBLIOGRAFIA.....	58
RINGRAZIAMENTI.....	65

ABSTRACT

Il lupus Anticoagulant (LA) rappresenta un indicatore protrombotico ed è uno dei criteri di laboratorio per confermare la presenza della sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS). Il test del Lupus Anticoagulant (LA) è impiegato per individuare gli autoanticorpi generati dal sistema immunitario che mirano ai fosfolipidi o ai complessi proteine-fosfolipidi sulla superficie delle cellule. Il nome di questi autoanticorpi deriva dal fatto che sono stati identificati per la prima volta in pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES), possono svilupparsi in pazienti non affetti da patologie autoimmuni e sono presenti nel 2-4% della popolazione.

In laboratorio gli anticorpi interferiscono sui test che vengono utilizzati per indagare i processi coagulativi. Inibiscono, *in vitro*, le reazioni su cui si basa il test del tempo di tromboplastina parziale (PTT), che costituisce uno dei test globali per la valutazione dello stato coagulativo del paziente. *In vivo*, la presenza di LA aumenta il rischio di sviluppare manifestazioni trombotiche.

Gli anticorpi LA sono uno dei tre principali anticorpi anti-fosfolipidi, gli altri due anticorpi sono l'anticardiolipina (aCL) e gli anti β 2-glicoproteina I (β_2GPI). La presenza di LA aumenta il rischio di sviluppare eventi trombotici nelle vene degli arti inferiori, ictus, arresto cardiaco o embolia polmonare. Inoltre, può portare sia ad aborti spontanei, dovuti alla formazione di coaguli che bloccano i vasi o all'attacco dei tessuti placentari da parte degli autoanticorpi; sia alla sindrome catastrofica che è caratterizzata da una rapida trombosi in più letti vascolari, che porta a insufficienza multiorgano e ad alto rischio di morte.

Calcolare la prevalenza e l'incidenza dell'APS è difficile a causa dell'ampia gamma di manifestazioni cliniche associate agli aPL e alla carenza di studi epidemiologici sulla popolazione. Tuttavia, la prevalenza complessiva dell'APS è di circa 50 persone su 100.000, con un'incidenza stimata di 7,1-13,7 su 100.000 anni-persona. È stato osservato che è una patologia che colpisce anche i bambini.

La prevenzione per la sindrome anti-fosfolipidica può essere suddivisa in primaria e secondaria. La prevenzione primaria della trombosi nei pazienti con sindrome anti-fosfolipidica (APS) si concentra sulla

gestione dei fattori di rischio modificabili e sulla profilassi durante i periodi di rischio elevato, come gli interventi chirurgici. Per la prevenzione secondaria della trombosi nell'APS viene prescritto il trattamento con warfarin (INR target da 2,5 a 3), aggiungendo LDA (aspirina a basso dosaggio) se i pazienti hanno ulteriori fattori di rischio CVD (malattie cardiovascolari).

È fondamentale diagnosticare gli anticorpi LA, utilizzando i numerosi test disponibili non essendo possibile effettuare una misurazione diretta. Le linee guida internazionali della Società Internazionale di Trombosi ed Emostasi (ISTH) e del Scientific Standardisation Committee (SCC) indicano che la diagnosi richiede l'utilizzo di una combinazione di due test basati su due principi differenti. Uno basato su Veleno Diluito di Vipera di Russel (DRVV) attivatore il Fattore X ed il secondo basato su PTT attivatore del fattore XII. La combinazione fra i due test è sufficiente per la valutazione della presenza degli anticorpi.

L'obiettivo del progetto di lavoro svolto presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale San Giovanni Bosco prevedeva la raccolta di campioni sottoposti ai test per la ricerca LA afferenti dal territorio dell'ASL Città di Torino che rispettassero i criteri di positività nei sei mesi di

attivazione dello studio. I campioni sono stati testati utilizzando i test normalmente a disposizione in laboratorio con la scelta del PPN liofilo utilizzato nella pratica quotidiana. I campioni risultati positivi secondo le linee guida internazionali venivano arruolati e i plasmi residui congelati. Lo studio si prefiggeva di testare i plasmi residui conservati congelati in sedute dedicate ed in parallelo utilizzando due differenti PPN liofili, quello in uso ed un secondo che rispettasse le caratteristiche necessarie per l'utilizzo nella diagnostica. Le sedute dedicate ai plasmi per lo studio sono state eseguite in parallelo per ridurre al minimo la variabilità legata ad aliquote diverse e a tempi di lavorazione differenti. Al termine della raccolta dei dati è stata condotta una analisi statistica al fine di valutare le eventuali differenze ed il peso di due NPP differenti sulla diagnosi di LA. L'analisi statistica utilizzata è il Kappa di Cohen, il quale permette di valutare il grado di accordo tra i due test.

Lo studio del Lupus Anticoagulant (LAC) richiede l'invio di due provette sodio-citrato correttamente identificate e riempite. I campioni, trasportati a temperatura ambiente, vengono centrifugati due volte per ottenere un plasma povero di piastrine (PPP) con un conteggio piastrinico inferiore a $10 \times 10^9/L$. Un conteggio piastrinico diverso può

interferire con i tempi di coagulazione, fornendo risultati errati. Le aliquote vengono identificate con i dati del paziente e congelate a -20°C per un massimo di due settimane. I campioni sono stati testati utilizzando un coagulometro automatizzato ACLTOP 750 LAS, che esegue test coagulativi, immunologici e cromogenici.

La gestione dei campioni è automatizzata dallo strumento, che utilizza cut-off di positività (ratio normalizzata di 1.20) per determinare se eseguire la cascata dei test (screening, miscela, conferma). Il laboratorio utilizza due metodi: PTT con attivatore silice (Silica Clotting Time -SCT) e il test con Veleno di Vipera Russel Diluito (DRVVT).

Per la valutazione dei test di miscela, viene usato un pool di plasmi normali (PPN) privo di anticoagulante lupico, che deve avere bassi residui piastrinici e valori di coagulazione nella norma. Due pool liofilizzati certificati per l'assenza di LA impiegati nello studio, effettuando i test sulla stessa aliquota di plasma al fine di ridurre variazioni legati all'uso di aliquote di plasma differenti.

Entrambi i reattivi utilizzati per la diagnosi (SCT e DRVVT) vengono utilizzati con due quantitativi di fosfolipidi differenti. I test di base possiedono un basso quantitativo di fosfolipidi (test di screening) ed il

test di conferma possiede un alto quantitativo di fosfolipidi (test di conferma). Un allungamento del test di screening ed una normalizzazione del test di conferma è indice di una possibile presenza di LA. I risultati ottenuti dai test vengono espressi in RATIO tra il tempo di coagulazione del plasma del paziente e quello di un PPN per tutti i test ed il risultato globale per ogni test viene espresso in Ratio Normalizzata (Ratio Screening/Ratio Conferma).

Il test di miscela viene eseguito in automatico dal coagulometro ed utilizza una diluizione 1:1 plasma paziente-pool normale. Il significato del test di miscela, in accompagnamento ad i test di screening e del test di conferma, è quello di mettere in risalto se l'allungamento del test PTT possa essere legato ad una carenza dei fattori della coagulazione o alla presenza di inibitori (LA o inibitori fattore specifico) coadiuvando nella corretta interpretazione del risultato.

Nel semestre sottoposto ad analisi i campioni analizzati sono stati 877 e campioni risultati positivi sono stati 109 con una percentuale di positività pari al 12%. I risultati ottenuti sono stati valutati utilizzando il test Kappa di Cohen che ha mostrato una ottima concordanza di

risultati indicando che entrambi i PPN utilizzati nello studio possono essere utilizzati nella diagnostica quotidiana per la ricerca di LA.

INTRODUZIONE

1. LUPUS ANTICOAGULANT

Il test del Lupus Anticoagulant (LA) viene utilizzato per la ricerca di autoanticorpi che vengono prodotti dal sistema immunitario e sono in grado di attaccare i fosfolipidi o i complessi proteine-fosfolipidi, esposti sulla superficie cellulare. Il meccanismo con cui questi anticorpi vadano ad interferire con il sistema coagulativo o come portino ad un aumento del rischio trombotico non è del tutto chiarito.

Gli aPL vennero riscontrati per la prima volta negli anni '40, sotto forma di falsa positività per la VDRL, test utilizzato per la diagnosi della sifilide e che ricerca anticorpi diretti contro fosfolipidi del treponema che compaiono durante l'infezione luetica¹. Alcuni soggetti presentavano test positivo in assenza di infezione, nel corso del tempo, sviluppavano malattie autoimmuni o mostravano la presenza di altri autoanticorpi. In pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES), nello stesso periodo, fu riscontrata un'anomalia della coagulazione con

¹ Sifilide. La sifilide è un'infezione sostenuta da un batterio Gram negativo appartenente alla famiglia delle spirochete, il *Treponema pallidum*.

un prolungamento dei test coagulativi fosfolipidi dipendenti. Tale alterazione, venne dimostrato, associata a test VDRL falsamente positivo.

Nel 1972 questo test venne chiamato Lupus Anticoagulant (LA). In realtà, nonostante l'attività anticoagulante in vitro, in vivo il LA era stato descritto in pazienti che presentavano trombosi ripetute e in donne con aborti ricorrenti (3). Nei primi anni '80, grazie al Hughes, la positività per il LA venne associata ad una determinata categoria di pazienti: giovani con ictus, aborti o gravidanze difficili, qualche volta disastrose.

Gli anticorpi LA sono uno dei tre principali anticorpi anti-fosfolipidi associati con un aumentato rischio di trombosi e di sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS), gli altri due sono gli anticorpi anticardiolipina (aCL) e gli anti β 2-glicoproteina I (β ₂GPI).

La presenza di tali anticorpi in associazione a un quadro clinico caratterizzato da eventi trombotici e/o ben definite complicanze ostetriche configura la Sindrome da aPL (APS) malattia sistemica

autoimmune che venne descritta per la prima volta nel 1983 da Graham Hughes (2).

Gli anticorpi LA non possono essere misurati in maniera diretta, ma esistono molteplici test utilizzabili per la loro rilevazione generalmente utilizzati in combinazione fra di loro. In presenza di LA il tempo necessario alla coagulazione in test dipendenti da reagenti contenenti fosfolipidi, risulta allungato e per tal motivo i primi test ad essere utilizzati nella diagnosi sono il PTT (tempo di tromboplastina parziale attivato) o un test sensibile come il DRVVT (test LA-sensibile con Veleno di Vipera Russel).

2. ANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI (aPL)

Attualmente i criteri diagnostici e ricercati nella pratica clinica sono:

1. gli anticorpi anticardiolipina (aCL)
2. gli anticorpi anti- β 2-glicoproteina I (anti- β 2- GPI).
3. gli anticorpi anticoagulanti lupici o lupus anticoagulante (LA)

1. Gli anticorpi anti-cardiolipina (aCL) sono autoanticorpi in grado di attaccare la cardiolipina (Fig.1), una molecola espressa sulla superficie di numerose cellule e piastrine, del suo stesso organismo. Così come altri fosfolipidi, la cardiolipina è un fattore importante nella regolazione del processo emostatico e la presenza di autoanticorpi anti-cardiolipina aumenta il rischio di sviluppare una frequente e inappropriata formazione di coaguli (trombi) sia al livello venoso che arterioso, con modalità non ancora ben chiare. Gli anticorpi anti-cardiolipina sono i più comuni anticorpi anti-fosfolipidi riscontrati.

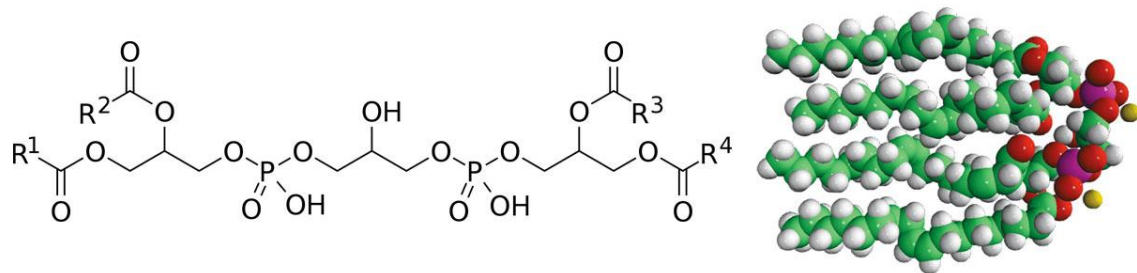


Figura 1. Cardiolipina

2. Gli anticorpi anti-beta 2 glicoproteina 1 (B2GP1) sono autoanticorpi associati all'eccessiva tendenza alla coagulazione. Beta-2-glycoprotein I (Fig. 2) è una glicoproteina plasmatica che nel dominio 1' contiene i siti di legame per gli Anticorpi anti Lipidi, mentre il dominio 5' lega i siti anionici dei fosfolipidi. A livello plasmatico è presente in due conformazioni: una forma con dominio 1 non esposta perché legata con il dominio 5 (Fig. 2B) e una con la regione antigenica1 esposta (Fig. 2A). La predominanza della conformazione ad anello indica una bassa presenza di complessi β 2GPI-Ab anti-PL. Il cambiamento di conformazione da anello a forma lineare si ottiene dopo legame con lipidi con un meccanismo ancora poco chiaro.

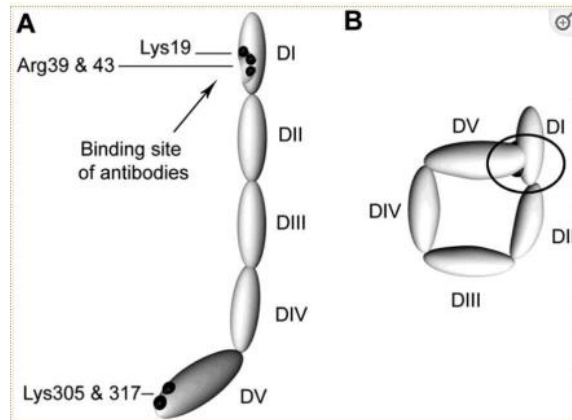


Fig. 2 Beta-2-glycoprotein I

Gli $\alpha\beta 2$ GPI rappresentano i principali anticorpi anti-cofattore.

Appartengono alla categoria dei cofattori la protrombina, l'annexina V, la proteina C attivata, la proteina S, le LDL ossidate (14). La $\beta 2$ GPI

in vitro impedisce l'attivazione della protrombina, comportandosi

come un inibitore della coagulazione. Essa fungerebbe da

antiaggregante piastrinico, inibendo l'aggregazione ADP-dipendente.

In vivo il suo ruolo non è noto, mentre in circolo risulta in parte legata

alle lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL) che neutralizza gli

effetti pro-infiammatori e ne promuove la clearance legandosi al

complesso $\beta 2$ GPI/oxLDL; in questo modo gli $\alpha\beta 2$ GPI favorirebbero i

processi aterosclerotici.

3. Anticorpi Lupus Anticoagulant è la categoria di anticorpi eterogenei che prende il nome dal fatto che sono stati identificati per la prima volta in pazienti affetti da LES (lupus eritematoso sistemico), mentre l'indicazione Anticoagulant prende origine dalla capacità di interferire *in vitro* nei processi coagulativi. Gli autoanticorpi LA possono svilupparsi in pazienti non affetti da patologie autoimmuni, ma da altri tipi di patologie o che vengono sottoposti ad alcune terapie.

Sia gli aCL che gli a β 2GPI si ricercano di isotipo principalmente IgG e IgM. La positività per il LA viene in generale considerata più specifica per la APS, mentre gli aCL sono ritenuti essere gli anticorpi più sensibili.

I LA sono anticorpi anti- β 2GPI, anti-protrombina o altri anti-fosfolipidi anionici, che allungano il tempo di coagulazione *in vitro* nei test emocoagulativi fosfolipide-dipendenti: aPTT, dRVVT e KCT. Agiscono legandosi ad una superficie fosfolipidica anionica e inibendo l'attivazione della protrombina a trombina, con conseguente ritardo nella formazione del coagulo.

Dal 1983 grazie alla realizzazione, da parte di Harris e Gharavi, di un metodo radioimmunologico per la determinazione degli anticorpi

anticardiolipina (aCL), la ricerca degli aPL si è ampiamente diffusa ed il loro significato clinico è divenuto evidente (4).

Tali autoanticorpi possono svilupparsi in soggetti con patologie autoimmuni (Lupus eritematoso sistemico [LES], APS).

Nel 1999 in seguito al Simposio Internazionale sugli Anti-fosfolipidi vennero stabiliti i criteri preliminari per la classificazione della APS, noti come Criteri di Sapporo (7). Successivamente i criteri sono stati rivisti nel 2006 nel Consensus tenutosi a Sydney (8).

Nonostante la possibile concordanza fra i LA, gli aCL e gli a β 2GPI, questi anticorpi non sono considerati identici. Infatti, alcuni aCL e alcuni a β 2GPI (7) non hanno attività anticoagulante lupica, mentre il LA può reagire con proteine diverse dalla β 2GPI o con fosfolipidi diversi dalla cardiolipina (9,10). Il LA è maggiormente correlato con lo sviluppo di trombosi e di complicanze ostetriche rispetto agli aCL; mentre la presenza di LA β 2GPI-dipendenti si associa maggiormente alla trombosi rispetto agli a β 2GPI riscontrati con un test indipendente. (11)

Tre test principali utilizzati per rilevare l'aPL sono gli anticorpi anticardiolipina (aCL), anticorpi β_2 glicoproteina-I (β_2 GPI) e test del lupus anticoagulante (LA).

La sola positività agli anticorpi anti-fosfolipidi, senza sintomi clinici correlati all'aPL, non è considerata situazione ottimale per una diagnosi di APS. La sindrome anti-fosfolipidica può essere osservata in pazienti con altre malattie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico (LES), in individui altrimenti sani (APS primaria). La positività a tali test può essere transitoria quando è indotto da farmaci o infezioni e tende a scomparire dopo la sospensione del farmaco o la risoluzione dell'infezione.

Lo studio dell'APS parte dallo studio dei test globali ed in particolare modo del APTT (tempo di protrombina parzialmente attivata) che in caso di positività risulta generalmente prolungato ed avvisare la ricerca dedicata per diagnosticare l'APS (sindrome anti-fosfolipidica). Per determinare l'APS devono essere soddisfatte due condizioni:

- La presenza di aPL (anticorpi anti-fosfolipidi) circolante nel plasma e/o nel siero;

- anamnesi di trombosi e/o morbidità in gravidanza inclusa la perdita del feto.

3. LA SINDROME DA ANTICORPI ANTI-FOSFOLIPIDI

La sindrome da anticorpi Anti-fosfolipidi (APS) costituisce uno stato di ipercoagulabilità acquisita con un eterogeneo spettro di manifestazioni cliniche, prevalentemente trombotiche (arteriose, venose o del microcircolo) o di morbidità in gravidanza legate a insufficiente vascolarizzazione della placenta (aborti, nascite premature e preeclampsia²). Gli eventi vascolari possono essere più o meno importanti e variare da una trombosi delle vene superficiali fino ad arrivare a trombosi multiple in differenti distretti (APS catastrofica). Gli eventi vascolari più comuni sono la trombosi delle vene profonde degli arti inferiori (Fig. 3) e della circolazione arteriosa del cervello. Possono, inoltre, svilupparsi manifestazioni microvascolari come l'emorragia

² insorgenza ex novo o il peggioramento dell'ipertensione esistente con proteinuria dopo la ventesima settimana di gestazione

alveolare diffusa³ (DAH) e manifestazioni non trombotiche come la trombocitopenia.

La sindrome è caratterizzata dalla persistenza di anticorpi anti-fosfolipidi (lupus anticoagulant, anti-beta-2-glicoproteina-1 ed anticorpi anti-cardiolipina). L'interazione di questi anticorpi con le proteine plasmatiche, soprattutto β_2 GPI, ma anche con le altre proteine quali protrombina, plasminogeno, antitrombina, proteina C, proteina S che avviano uno stato pro-infiammatorio tramite l'attivazione delle cellule endoteliali, monociti, piastrine, neutrofili, complemento e fattore tissutale. Contemporaneamente, gli anticorpi, danno origine ad uno stato protrombotico attraverso l'attivazione dell'emostasi. Non in tutti i pazienti, però, la presenza di anticorpi anti-lipidi indica la certezza di eventi trombotici avvalorando la tesi che siano necessari altri fattori di rischio per sviluppare la patologia. (18)

³ sindrome di sanguinamento ricorrente o persistente nei polmoni, causata, nella maggior parte dei casi, da una malattia autoimmune.

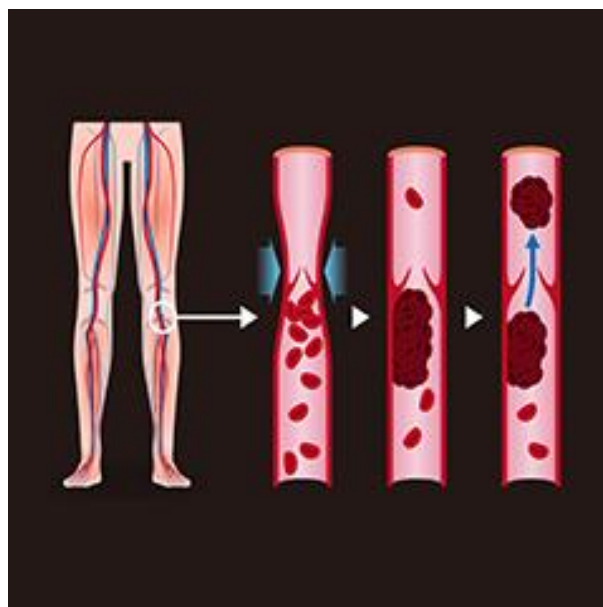


Figura 3. Trombosi venosa

3.1 Manifestazioni cliniche

Le vene profonde degli arti inferiori e le arterie cerebrali rappresentano le sedi più comuni di trombosi venosa e arteriosa nella sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS). Tuttavia, i trombi possono anche svilupparsi in sedi atipiche per la popolazione generale, come le arterie che alimentano i visceri intestinali e i seni venosi durali del cervello. I pazienti affetti da APS sono anche esposti al rischio di trombosi microvascolare in vari organi, tra cui pelle, occhi, cuore, polmoni e reni. (Fig. 4)

Una metanalisi ha evidenziato che la positività al test dell'anticoagulante lupico (con un odds ratio superiore a 10) è associata a un rischio di tromboembolia maggiore rispetto alla presenza di anticorpi anticardiolipina.

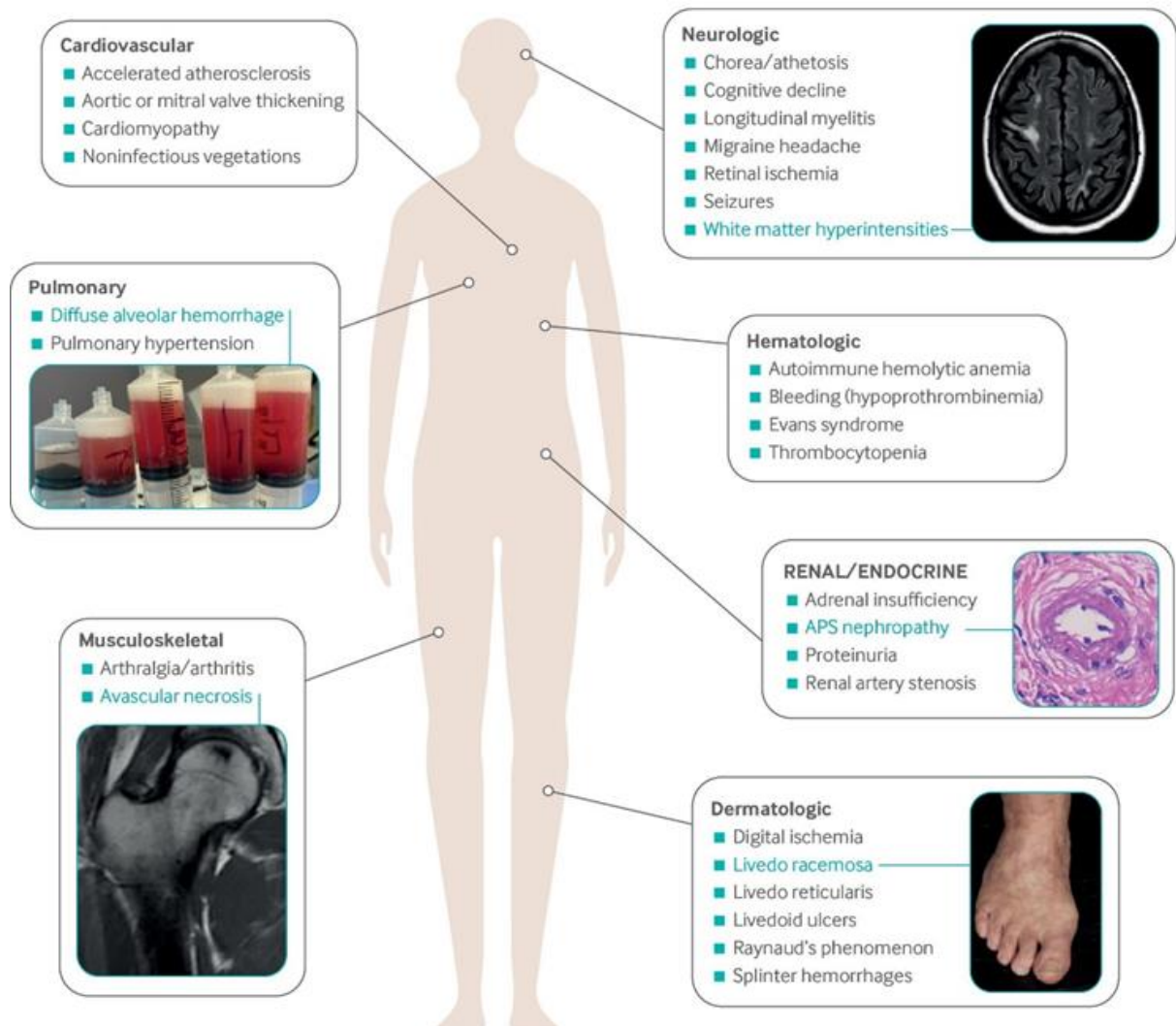


Figura 4. Manifestazioni cliniche associate all'APS (21)

3.2 Manifestazioni ostetriche della sindrome da anti-fosfolipidi

Un'analisi di pubblicazioni fino al 2009 ha indicato che la presenza di anticoagulante lupico e di anticorpi anticardiolipina è associata alla morte fetale dopo la decima settimana di gestazione, ma non ha trovato prove sufficienti per stabilire un legame significativo tra anticorpi anti- β 2 GPI e morbilità in gravidanza. Due revisioni sistematiche più recenti hanno confermato la mancanza di prove che colleghino gli anticorpi anti- β 2 GPI alla morte fetale, evidenziando invece una forte associazione tra la positività al test dell'anticoagulante lupico e la morte fetale. Uno studio multicentrico caso-controllo ha esaminato 582 nati morti e 1547 nati vivi, rilevando che il 9,6% delle morti fetali a oltre 20 settimane di gestazione presentava anticorpi anti-fosfolipidi, con un rischio di morte fetale da tre a cinque volte superiore. Anche nei pazienti con sindrome da anti-fosfolipidi già nota, il rischio di morte fetale rimane elevato nonostante il trattamento con eparina e aspirina a basso dosaggio; due studi prospettici osservazionali hanno riportato tassi di mortalità fetale del 10-12% nonostante i trattamenti standard (12).

Il parto pretermine causato da preeclampsia con caratteristiche gravi o da insufficienza placentare (ad esempio, restrizione della crescita fetale) è probabilmente il criterio ostetrico più specifico per la sindrome da anti-fosfolipidi. Una metanalisi del 2011 ha dimostrato che la presenza di anticoagulante lupico e di anticorpi anticardiolipina è significativamente associata alla preeclampsia, con un odds ratio di 2,34 e 1,52 rispettivamente. Anche se i dati disponibili per gli anticorpi anti- β 2 GPI erano più limitati, due studi di coorte hanno suggerito una potenziale associazione con la preeclampsia. Una metanalisi del 2022 ha confermato un'associazione tra restrizione della crescita fetale e anticorpi anticardiolipina (odds ratio di 2,25) e anti- β 2 GPI (odds ratio di 1,31), ma non con la positività al test dell'anticoagulante lupico. Studi prospettici osservazionali indicano che il 9-10% delle donne gravide con sindrome da anti-fosfolipidi sviluppa preeclampsia grave nonostante i trattamenti standard.

L'aborto spontaneo ricorrente precoce (prima delle 10 settimane di gestazione) è la complicazione ostetrica per la quale si considera più spesso una diagnosi di sindrome da anti-fosfolipidi, ma il ruolo degli anticorpi anti-fosfolipidi in questa condizione è meno chiaro (13). Studi

ben progettati sono necessari per definire meglio l'associazione tra anticorpi anti-fosfolipidi e aborto spontaneo precoce.

3.3 Sindrome anti-fosfolipidica catastrofica

La sindrome catastrofica anti-fosfolipidica è caratterizzata da una rapida trombosi in più letti vascolari, che porta a insufficienza multiorgano e ad alto rischio di morte. Fortunatamente, questa complicanza si verifica solo in una piccola percentuale di pazienti con sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi. La sindrome catastrofica anti-fosfolipidica è uno stato tromboinfiammatorio sistemico che deve essere distinto da altri disturbi trombotici sistemici come la porpora trombotica trombocitopenica, la sindrome emolitica uremica e la trombocitopenia indotta da eparina. Sebbene non siano universali, spesso possono essere identificati fattori scatenanti come infezioni, tumori maligni, interventi chirurgici o interruzione della terapia anticoagulante. Rappresenta circa l'1% dei casi di sindrome da anti-fosfolipidi (APS) e si distingue per il coinvolgimento di tre o più organi in un breve lasso di tempo (meno di una settimana), con l'osservazione

istopatologica di occlusioni dei piccoli vasi (microangiopatia trombotica). Questa condizione è associata a una prognosi severa, con un tasso di mortalità che si aggira intorno al 50% dei casi (14).

Anche le mutazioni nei geni regolatori del complemento sono state implicate come potenziale fattore di rischio. Sono comunemente colpiti il sistema nervoso centrale, la pelle e i reni, ma possono essere colpiti anche il cuore, i polmoni, il fegato e il tratto gastrointestinale.

I criteri di classificazione per la sindrome anti-fosfolipidica catastrofica possono essere:

- Evidenza del coinvolgimento di tre o più organi, sistemi e/o tessuti. Solitamente, evidenza clinica di occlusioni vascolari, confermata da tecniche di imaging quando appropriato. Il coinvolgimento renale è definito da un aumento del 50% della creatinina sierica, grave ipertensione sistemica (>180/100 mm Hg) e/o proteinuria (>500 mg/24 h).
- Sviluppo delle manifestazioni simultaneamente o in <1 settimana.
- Conferma dell'occlusione dei piccoli vasi in almeno un organo tessuto mediante istopatologia. Per la conferma istopatologica,

devono essere presenti prove significative di trombosi, sebbene occasionalmente possa coesistere una vasculite.

- Conferma di laboratorio della presenza di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL): anticoagulante lupico e/o anticorpi anticardiolipina. Se al paziente non è stata precedentemente diagnosticata una sindrome da anti-fosfolipidi (APS), la conferma di laboratorio richiede che gli aPL vengano rilevati in due o più occasioni a distanza di almeno 6 settimane (non necessariamente al momento dell'evento), secondo i criteri preliminari proposti per la classificazione di APS definita.

Per l'APS decisamente catastrofico:

- Tutti e quattro i criteri.
- Probabile APS catastrofico.
- Tutti e quattro i criteri, ad eccezione del coinvolgimento di soli due organi, sistemi e/o tessuti.
- Tutti e quattro i criteri, ad eccezione dell'assenza di conferma di laboratorio ad almeno sei settimane di distanza a causa della

morte prematura di un paziente mai sottoposto a test per aPL prima della catastrofica APS. (19,20)

La sindrome antifosfolipidica è associata a una serie di manifestazioni autoimmuni e infiammatorie. Queste caratteristiche vengono talvolta definite risultati “non critici” perché non sono state considerate sufficientemente specifiche da essere incluse nei criteri di classificazione del 2006. Le manifestazioni non gravi più comuni sono la trombocitopenia e la *Livedo Reticularis* (Livedo Reticolare)⁴ (Fig. 5).

⁴ condizione dermatologica caratterizzata da un modello distintivo di discolorazione cutanea che assume l'aspetto di una rete o marmorizzazione sulla pelle.



Figura 5. Livedo Reticularis

Anche manifestazioni meno comuni, come il danno valvolare cardiaco, l'emorragia alveolare diffusa e la nefropatia associata agli anticorpi anti-fosfolipidi, sono legate a morbilità pericolosa per gli organi. Dal punto di vista del paziente, l'obbligo di assumere farmaci come gli antagonisti della vitamina K a lungo termine, così come l'affaticamento, dolore e sintomi precoci possono avere un impatto negativo sulla qualità fisica ed emotiva del paziente.

È stato svolto uno studio su pazienti con sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi ed ha riscontrato che dolore, affaticamento, mancanza di consapevolezza da parte degli operatori sanitari/pubblici e imprevedibilità dei farmaci sono i principali fattori che riducono la qualità della vita.

Inoltre, studi recenti hanno dimostrato un'associazione tra l'accumulo di danni (misurato dall'indice dei danni della sindrome antifosfolipidica) e la qualità della vita. Sono attualmente in corso studi internazionali per aggiornare i criteri di classificazione che possano rappresentare meglio l'intero spettro patologico della sindrome da anti-fosfolipidi.

All'interno dello spettro clinico degli anticorpi anti-fosfolipidi (aPL), si possono osservare pazienti con aPL positivi che presentano manifestazioni non trombotiche, oltre a soggetti aPL positivi asintomatici (portatori di aPL). (Tabella 1)

Tabella 1. Manifestazioni cliniche dell'APS non incluse nei criteri di Sydney

MANIFESTAZIONI CLINICHE NON INCLUSE NEI CRITERI

<u>Piastrinopenia</u>	Conta piastrinica inferiore a 100.000/ μ l, confermata a distanza di almeno 12 settimane.
<u>Malattia cardiaca valvolare</u>	Riscontro ecocardiografico di lesione, e/o rigurgito e/o stenosi della valvola mitrale e/o aortica.
<u>Livedo reticularis</u>	Presenza di disegno cutaneo persistente e non reversibile col calore, violaceo, rosso o blu, reticolare o uniforme, su tronco, braccia o gambe.
<u>Nefropatia</u>	Microangiopatia trombotica che coinvolge sia le arteriole che i capillari glomerulari e/o una o più caratteristiche istologiche specifiche ^o .
<u>Manifestazioni neurologiche</u>	Comprendono demenza, disturbi cognitivi, emicrania, mielopatia trasversa ed epilessia.

4. EPIDEMIOLOGIA

Calcolare con precisione la prevalenza e l'incidenza dell'APS è difficile a causa dell'ampia gamma di manifestazioni cliniche associate agli aPL, delle definizioni incoerenti di positività agli aPL e degli studi limitati basati sulla popolazione. Tuttavia, la prevalenza complessiva dell'APS è di circa 50 persone su 100.000, con un'incidenza stimata di 7,1-13,7 su 100.000 anni-persona.

La sindrome viene diagnosticata anche in individui giovani. La prevalenza nella popolazione di anticorpi anti-fosfolipidi persistentemente positivi tra individui sani deve ancora essere rigorosamente determinata. Dal punto di vista pediatrico la sindrome da anti-fosfolipidi è considerata rara, poiché è sottodiagnosticata per una serie di ragioni, tra cui il fatto che la gravidanza (e la morbilità associata) saranno meno comuni in questo gruppo. Un registro di 121 bambini ha riportato un'età media all'esordio della sindrome da anti-fosfolipidi di 7-10 anni. Le manifestazioni non trombotiche della sindrome, come la trombocitopenia e l'anemia emolitica autoimmune, potrebbero essere più comuni nella popolazione pediatrica (15).

Nella Tabella 2 si possono osservare i diversi studi effettuati per spiegare l'epidemiologia nella popolazione generale.

Tabella 2. Epidemiologia di APS nella popolazione generale

Garcia [6••]	county	2015	criteria	Record-linkage system				
Hwang [8]	South Korea	2008–2017	Diagnostic and utilization codes combination	Nationwide claims database	3088	0.75 (0.91/0.59)	6.19 (7.62/4.76)	30–39 and 70–79/70–79
Luissi [7]	Argentina	2000–2015	Sydney 2006 criteria	Health management organization	53 (50 definite)	2.6 (2.9/2.0)	40.5 (NA/NA)	30–39/60–69
Radin [9]	Northwest Italy (Piedmont and Aosta Valley)	2010–2019	Definite APS diagnoses	Regional rare disease registry	740	1.1 (NA/NA)	16.8 (NA/NA)	NA
Rodziewicz [10]	UK	1990–2016	Diagnostic codes	Nationwide claims database	2606	1.8 (7.3/2.2)*	43 (50/9.8)*	35–39/50–59
Siso-Almirall [11]	Spain (Catalonia)	2012–2017	ICD9 codes	Regional healthcare database	2999	NA	40 (NA/NA)	NA

*Peak incidence and prevalence estimates

F female, M male, APS antiphospholipid syndrome, ICD International Classification of Diseases

4.1 Impatto dell'età e del sesso sulla frequenza della sindrome da anti-fosfolipidi.

Le donne sono più suscettibili alle malattie autoimmuni sistemiche, che spesso si manifestano durante la mezza età o gli anni riproduttivi.

Negli ultimi studi basati sulla popolazione, l'età media della diagnosi di APS è stata riportata intorno ai 50 anni. Sono stati eseguiti numerosi studi internazionali per la valutazione dell'epidemiologia della sindrome. Nel Regno Unito ha osservato che l'età di massima incidenza per gli uomini è di 55-59 anni, mentre per le donne è di 35-39 anni. In

uno studio sulla popolazione coreana l'APS tendeva ad aumentare con l'avanzare dell'età solo tra gli uomini, raggiungendo il massimo tra i 70 ei 79 anni, mentre nelle donne incidenza si è registrata tra i 30-39 anni. Negli Stati Uniti si è verificato negli uomini di 55-64 anni e nelle donne di 75 anni e più. Le cause delle differenze di età al picco di incidenza dell'APS potrebbero includere variazioni nella distribuzione di APS primaria e secondaria, oltre a differenze nel background etnico e razziale della popolazione studiata. Rispetto ad altre patologie autoimmuni, ad esempio LES, l'APS si manifesta con maggiore incidenza in età più avanzata. L'aumento dell'età porta ad un aumento della prevalenza di aPL e dell'incidenza di eventi trombotici, complicando l'attribuzione di tali eventi alla presenza di aPL.

La sindrome si manifesta nei bambini e i diversi studi dimostrano che l'età media al momento della diagnosi è di 10 anni. L'APS pediatrica si suddivide in primaria e secondaria, la prima si verifica in età più giovane mentre la seconda è più comune durante gli anni dell'adolescenza.

Sia nella coorte APS piemontese che nella coorte Euro-Phospholipid, la percentuale di donne risultate positive era superiore al 70% del totale dei campioni analizzati. (24)

4.2 Mortalità nella sindrome da anti-fosfolipidi

La mortalità dell'APS si è rivelata superiore rispetto a quella della popolazione generale in entrambi gli studi basati sulla popolazione e nelle coorti di riferimento. Rodziewicz et al. hanno segnalato tassi di mortalità più alti tra i pazienti con APS rispetto alla popolazione generale del Regno Unito. Un'analisi condotta negli Stati Uniti ha riscontrato che i pazienti con APS hanno un rischio di mortalità standardizzato di 1,61 rispetto alla popolazione generale. Nel progetto Euro-Phospholipid (iniziato nel 1999) (22), un gruppo di pazienti seguiti su vari centri specializzati ha avuto un tasso di sopravvivenza del 90,7% dopo 10 anni e un tasso standardizzato di mortalità non aggiustato dell'1,8. (21)

5. DIAGNOSI

Nelle indicazioni sulla diagnosi di APS di Sapporo (1998) viene classificato come caso di APS quello in cui almeno un criterio clinico e uno di laboratorio vengono rispettati. I criteri di laboratorio includono una presenza di anticorpi IgG e/o IgM aCL a medio o alto titolo e/o LAC presenti in due o più determinazioni a distanza di almeno 6 settimane. Tali criteri vengono ampliati nel 2006 con quelli che vengono definiti i criteri di Sydney con l'aggiunta degli anticorpi IgG/IgM anti-beta2GP1 e l'indicazione di una positività ai test che duri almeno dalle 6 alle 12 settimane.

Per diagnosticare l'APS in laboratorio possono essere utilizzati i due tipi di test:

- Test in fase solida per aCL e β 2GPI.
- Test coagulativi per LA.

I metodi in fase solida utilizzano la tecnica ELISA su siero per identificare e quantificare l'isotopia anticorpale immunoglobulina G, immunoglobulina M [IgM], immunoglobulina A, cardiolipina e

protrombina. I test coagulativi utilizzano plasma e sono basati sulla rilevazione della formazione del coagulo.

La ricerca di aCL e a β 2-GPI viene effettuata tramite test immunochimici. In questi test, gli anticorpi vengono rilevati esponendo campioni di siero all'antigene pertinente, che è immobilizzato su superfici solide (come piastre di polistirene). Il complesso anticorpo-antigene viene poi identificato utilizzando anticorpi secondari specifici coniugati con perossidasi tramite saggi sandwich, noti come saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), oppure, più recentemente, attraverso saggi di chemiluminescenza (CLIA). (23)

Entrambi i sistemi, ELISA e CLIA presentano vantaggi e svantaggi. I test ELISA (Fig. 6) sono sufficientemente sensibili e specifici, ma sono poco adatti all'automazione e richiedono tempi lunghi (almeno due ore per ottenere i risultati). L'eterogeneità dei test commerciali e la mancanza di standardizzazione rappresenta uno dei principali problemi dell'utilizzo dei test ELISA, mancando la possibilità di un affidabile confronto fra test differenti. Una possibilità interessante, da questo punto di vista, è rappresentata dai test in chemiluminescenza,

più sensibili e specifici, altamente automatizzati, meno impegnativi nella gestione, più veloci ma più costosi rispetto agli ELISA. (1)

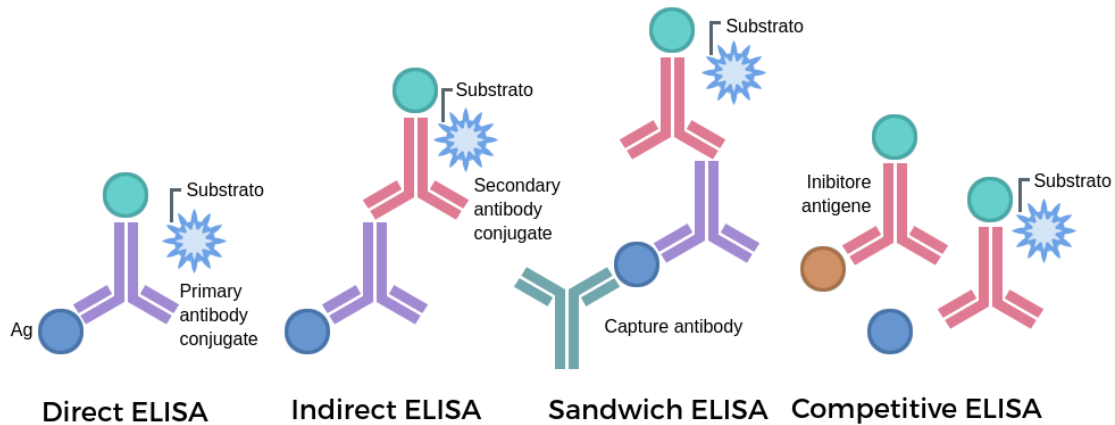


Figura 6. ELISA

Questa eterogeneità fra i metodi impiegati complica la diagnosi di laboratorio e la gestione dei pazienti con APS, essendo difficile stabilire valori limite uniformi per la diagnosi e il trattamento.

Vantaggio significativo del rilevamento degli anticorpi in fase solida è che questi non risultano influenzati dall'eventuale utilizzo di terapie anticoagulanti; interferenza che invece viene registrata nei test di tipo coagulativo che costituiscono altra categoria fondamentale per la diagnosi di APS.

Le linee guida internazionali della Società Internazionale di Trombosi ed Emostasi (ISTH) e del Scientific Standardisation Committee (SSC) relativi ai test coagulativi indicano che la diagnosi richiede l'utilizzo di due test basati su due principi differenti.

Il primo raccomandato è basato sull'azione del Veleno Diluito di Vipera di Russel (DRVV) che permette l'attivazione diretta del Fattore X da parte del veleno altamente sensibile alla presenza di LA. Il secondo è un test a base PTT che può impiegare attivatori differenti (silice, caolino, acido ellagico) che si basa sull'attivazione del fattore XII. Vengono utilizzati due tipologie di test, perché vedono la presenza di anticorpi (Ab) in due zone differenti della cascata coagulativa. In particolare, il DRVV agisce sul fattore X che promuove la trasformazione della protrombina in trombina in presenza di Fattore V e di lipidi; mentre il test a base PTT agisce su Fattore XII nella via intrinseca. (25) La combinazione dei due test per lo studio di LA è indicato per la diagnosi secondo le linee guida internazionali comprese quelle del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Lo schema di lavoro per lo studio del LAC prevede lo schema:

1. Test di Screening (APTT-test derivati e dRVVT-, a bassa concentrazione di Plipidi).
2. Test di Mixing (test di screening APTT-test derivato e dRVVT- eseguiti su campione miscelato of 1:1 paziente/normal plasma).
3. Test di Conferma (APTT-test derivati e dRVVT-, ad alta concentrazione di Plipidi).

Inizialmente si esegue il test con un reagente di screening che è considerato sensibile alla presenza di Anticorpi LA e contiene un basso quantitativo di fosfolipidi. Nel momento in cui il test di screening risulta alterato si eseguono i test di miscela, il quale viene usato per verificare se l'allungamento del test di screening possa essere causato da carenza di fattori o dalla presenza di un inibitore. Si ripete il test usando una miscela 1:1 di plasma del paziente e plasma normale PPN (16, 17). Il PPN è un plasma povero di piastrine e con un congruo quantitativo di fattori della coagulazione.

I test di conferma devono essere eseguiti con reagenti che differiscono dal test di screening solo ed esclusivamente per la concentrazione di lipidi, che in quello di conferma deve essere alta per aumentare la

specificità che si evidenzia dalla normalizzazione dei tempi di coagulazione. Nel caso in cui non si ottenga la normalizzazione si può pensare alla presenza di un inibitore non Lipide-dipendente o a una carenza fattoriale.

Dal rapporto che si ottiene fra i valori di ratio del test di screening e quello di conferma si può diagnosticare o meno la presenza di LAC.

La positività al LA viene considerata quando i valori di Ratio Normalizzata (ratio screening/ratio conferma) sono maggiori o uguali (\geq) a 1,20. Il valore di cut-off viene calcolato presso ogni centro utilizzando almeno 100 volontari sani determinando il valore con il 99° percentile.

La positività ai test deve essere confermata dopo almeno 12 settimane per la possibile presenza di positività transitorie legate ad anticorpi transitori.

Nel caso di pazienti che siano in corso di terapia anticoagulante le linee guida indicano la necessità di una sospensione del trattamento farmacologico o, nell'impossibilità di effettuare la sospensione, un

passaggio al trattamento con eparine a basso peso molecolare (LMWH) meno interferenti con i test coagulativi.

Si raccomanda, inoltre, l'esecuzione dei test lontani dall'evento trombotico acuto per ottenere una diagnosi corretta.

6. VIVERE CON LA SINDROME DA ANTI-FOFOLIPIDI

L'APS è una malattia cronica che può durare per tutta la vita ed i pazienti possono occasionalmente presentare episodi trombotici. La profilassi di tali fenomeni viene eseguita mediante trattamento farmacologico con farmaci anticoagulanti per periodi prolungati, talvolta per l'intera vita poiché l'interruzione del trattamento può comportare gravi complicazioni, come ictus o infarti. Il trattamento profilattico di elezione viene eseguito con Warfarin, principio attivo di famiglia di farmaci anticoagulati con azione antagonista della Vitamina K, con somministrazione orale. L'effetto degli anticoagulanti è dipendente dal soggetto e può essere influenzato da numerosi fattori, compresa l'alimentazione. L'assunzione di farmaci anticoagulanti può

presentare effetti collaterali, come una maggiore predisposizione al sanguinamento o disfunzioni epatiche.

Oltre all'assunzione di farmaci anticoagulanti, il soggetto APS positivo, deve evitare altri fattori di rischio trombotico (27):

- non fumare.
- seguire una dieta sana e bilanciata, a basso contenuto di grassi e zuccheri e contenente molta frutta e verdura.
- svolgere un regolare esercizio fisico.
- mantenere un giusto peso corporeo e perdere peso se si è obesi (l'indice di massa corporea superiore a 30). (Fig.7)
- L'uso di contraccettivi orali contenenti estrogeni. (29)

In molti casi, una terapia anticoagulante adeguata ed uno stile di vita adeguato, consente ai pazienti di vivere una vita soddisfacente e priva di gravi complicazioni. (27)

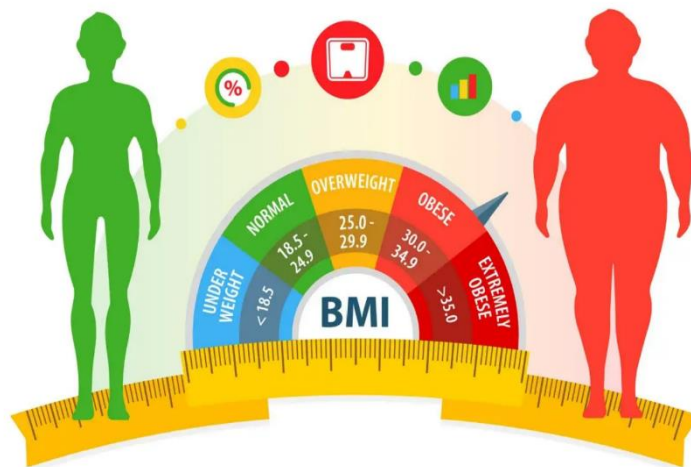


Figura 7. Indice di massa corporea

7. TRATTAMENTO E PREVENZIONE

La prevenzione per la sindrome anti-fosfolipida può essere suddivisa in primaria e secondaria.

La prevenzione primaria della trombosi nei pazienti con sindrome anti-fosfolipidica (APS) si concentra sulla gestione dei fattori di rischio modificabili e sulla profilassi durante i periodi di rischio elevato, come gli interventi chirurgici. È fondamentale gestire le malattie autoimmuni sistemiche associate, ridurre i fattori di rischio per la tromboembolia venosa (TEV) e le malattie cardiovascolari, come l'ipertensione.

L'uso dell'aspirina a basso dosaggio (LDA) per la prevenzione primaria della trombosi non è supportato da studi sufficienti. Tuttavia, alcuni medici la prescrivono basandosi su dati retrospettivi che suggeriscono un potenziale effetto protettivo contro la trombosi, soprattutto nei pazienti con fattori di rischio cardiovascolare e un profilo di anticorpi anti-fosfolipidi (aPL) positivo. (26)

L'idrossiclorochina (HCQ), utilizzata nei pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES), ha mostrato effetti antitrombotici in modelli animali e nei pazienti con LES. Non esistono studi prospettici controllati che confermino l'efficacia dell'HCQ nella prevenzione primaria della trombosi nei pazienti aPL-positivi. Pertanto, l'HCQ viene solitamente impiegata in pazienti APL-positivi che presentano lupus o condizioni simili al lupus.

Il warfarin rimane il farmaco utilizzato per la prevenzione a lungo termine della trombosi ricorrente nei pazienti con APS con un rapporto internazionale normalizzato (INR) target da 2 a 3. Nonostante studi di coorte retrospettivi dimostrino che l'anticoagulazione ad alta intensità (INR 3-4) è più efficace di quella a intensità moderata (INR 2-3). Per la prevenzione secondaria della trombosi nell'APS viene prescritto il

warfarin con un INR target da 2,5 a 3, aggiungendo LDA se i pazienti hanno ulteriori fattori di rischio CVD⁵.

Nei pazienti che hanno una trombosi ricorrente nonostante l'INR nel range terapeutico, le opzioni includono warfarin ad alta intensità (INR 3-4) o il passaggio a eparina a basso peso molecolare (LMWH). Anche LDA, HCQ, una statina o una combinazione di questi farmaci sono comunemente usati.

Gli anticoagulanti orali diretti non sono attualmente raccomandati per la trombosi secondaria nell'APS. Durante il sedicesimo Congresso Internazionale su aPL Task Force on Treatment Trends (2020), è stato indicato che i DOAC (Direct Oral Ancoagulant) dovrebbero essere evitati nei pazienti con APS con trombosi arteriosa e nei pazienti con trombosi ricorrente, ma l'indicazione è l'assunzione di warfarin a intensità standard. Nei pazienti con APS trombotica tripla aPL positiva, se il paziente assume già DOAC dopo la prima TVE, si raccomanda di passare agli antagonisti della vitamina K.

⁵ malattie cardiovascolari.

8. SCOPO DELLA TESI

Il progetto del lavoro svolto presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale San Giovanni Bosco prevedeva la raccolta di campioni sottoposti ai test per la ricerca LA afferenti dal territorio dell'ASL Città di Torino che rispettassero i criteri di positività nei sei mesi di attivazione dello studio.

I campioni sono stati testati utilizzando i test normalmente a disposizione in laboratorio con la scelta del PPN liofilo utilizzato nella pratica quotidiana. I campioni risultati positivi secondo le linee guida internazionali venivano arruolati e i plasmi residui congelati. Lo studio si prefiggeva di testare i plasmi residui conservati congelati in sedute dedicate ed in parallelo utilizzando due differenti PPN liofili, quello in uso ed un secondo che rispettasse le caratteristiche necessarie per l'utilizzo nella diagnostica. Le sedute dedicate ai plasmi per lo studio sono state eseguite in parallelo per ridurre al minimo la variabilità legata ad aliquote diverse e a tempi di lavorazione differenti.

Al termine della raccolta dei dati è stata condotta una analisi statistica al fine di valutare le eventuali differenze ed il peso di due PPN differenti sulla diagnosi di LA. L'analisi statistica utilizzata è il Kappa di Cohen, il quale permette di valutare il grado di accordo tra i due test.

9. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su campioni di pazienti afferenti al Laboratorio Analisi dell'Ospedale San Giovanni Bosco con richiesta di esami per trombofilia nel periodo compreso da Novembre 2023 a Maggio 2024.

Al Laboratorio Analisi afferiscono campioni provenienti dal territorio dell'ASL Città di Torino raccolti in provette contenenti sodio-citrato 0.109M in un rapporto corretto sangue-anticoagulante 9:1 gestite dal punto di vista preanalitico secondo le linee guida (NCCLS)

Lo studio del LAC richiede l'invio in laboratorio di due provette citrate correttamente identificate e riempite. I campioni trasportati a temperatura ambiente, dopo l'accettazione, vengono centrifugati a 3500 rpmx10' in una centrifuga a temperatura ambiente (18-20°C) e ricentrifugati una seconda volta appena prima di eseguire il test al fine di ottenere un plasma povero di piastrine (PPP) con conteggio piastrinico $< 10 \times 10^9/L$ e successivamente congelati in aliquote. Un

conteggio piastrinico differente da quello indicato può interferire fornendo tempi di coagulazione molto più corti (31) e quindi risultati non corretti.

Le aliquote secondarie correttamente identificate con anagrafica del paziente e codice univoco di laboratorio vengono congelate a -20°C per un tempo massimo di due settimane (30, 31).

Una aliquota di plasma processata sul coagulometro ed i campioni che rispettano i criteri di positività sono stati inclusi nello studio.

I test sono eseguiti su strumentazione automatizzata ACLTOP 750^{LAS} della ditta WERFEN interfacciato con il LIS di Laboratorio, in grado di eseguire test coagulativi, immunologici e cromogenici.

La gestione del campione è eseguita in automazione dallo strumento che, sulla base dei cut-off di positività impostati (1.20 ratio), esegue in autonomia la cascata del test (test di screening, test di miscela e test di conferma) o meno.

Lo schema di Laboratorio prevede l'uso di un PTT con attivatore alla silice (Silica Clotting Time - SCT) ed uno che usa come attivatore il Veleno di Vipera Russel Diluito (DRVVT).

La preparazione dei reagenti è stata effettuata seguendo le indicazioni del produttore e prima della seduta analitica sono stati eseguiti i controlli di qualità necessari.

In associazione ai reattivi forniti dal produttore ed in accordo con le linee guida, è necessario l'utilizzo di un pool di plasmi normali per effettuare la valutazione dei test di miscela e per stabilire la ratio dei test e di conseguenza la positività o meno del paziente.

Il pool di plasmi normali (PPN) è utilizzato nel test di miscela e viene preparato da plasmi di pazienti aventi gli esami di coagulazione di base all'interno dei valori di riferimento. Il pool, inoltre, deve avere un basso numero di piastrine residue su ciascun plasma dovrebbe essere documentata l'assenza dell'anticoagulante lupico.

Nello studio condotto sono stati utilizzati due pool liofilizzati disponibili in commercio certificate per l'assenza di LA.

I campioni idonei per entrare nello studio sono stati processati con entrambi i pool contemporaneamente, sulla stessa aliquota di plasma al fine di diminuire le possibili variazioni.

10. RISULTATI

Nel semestre sottoposto ad analisi i campioni analizzati sono stati 877 e campioni risultati positivi sono stati 109 con una percentuale di positività pari al 12%.

In aggiunta ai test LAC, sui campioni risultati positivi, sono stati effettuati anche il Tempo di Trombina (TT) ed il Tempo di Protrombina (PT) per escludere interferenze da farmaci.

La popolazione di pazienti risultati positivi è risultata così composta: 60 Femmine e 49 maschi con età media 65.3 (range 3-94 anni).

Il 6% dei pazienti maschi presenta positività per entrambi i test (SCT e DVVT) con un range di positività per SCT 1.22-3.88 ratio e di 1.26-3.34 ratio per DRVVT. I campioni risultati positivi solo per SCT e solo per DRVVT sono rispettivamente 30.6 e 89.8% del totale.

Il 31.6% delle pazienti femmine presenta positività per entrambi i test (SCT e DVVT) con un range di positività per SCT 1.22-4.78 ratio e di 1.21-2.75 ratio per DRVVT. I campioni risultati positivi solo per SCT e solo per DRVVT sono rispettivamente 40 e 78% del totale.

I risultati con l'utilizzo del secondo pool liofilo hanno confermato le positività ottenute con delle leggere differenze.

Il 6% dei pazienti maschi presenta positività per entrambi i test (SCT e DVVT) con un range di positività per SCT 1.24-3.94 ratio e di 1.21-3.15 ratio per DRVVT. I campioni risultati positivi solo per SCT e solo per DRVVT sono rispettivamente 28.5 e 89.7% del totale.

Il 28.0% delle pazienti femmine presenta positività per entrambi i test (SCT e DVVT) con un range di positività per SCT 1.22-5.10 ratio e di 1.22-2.57 ratio per DRVVT. I campioni risultati positivi solo per SCT e solo per DRVVT sono rispettivamente 33.0 e 68% del totale.

I dati ottenuti dall'analisi sono stati poi analizzati per effettuare il confronto tra i risultati ottenuti con i due pool in esame è stato utilizzato l'indice di concordanza Kappa di Cohen è stato utilizzato il programma Excel Microsoft. (Tabella 3.)

Tabella 3. Tabella dei risultati dei due Pool testati nelle diverse sedute

	Pool A		Pool B	
SCT screening test	Valore medio	37.2	Valore medio	47.7
	Deviazione standard	2.34	Deviazione standard	2.09
	Coefficiente di variazione	5.9%	Coefficiente di variazione	4.1%
SCT confirm test	Valore medio	36.0	Valore medio	45.7
	Deviazione standard	4.11	Deviazione standard	2.6
	Coefficiente di variazione	11%	Coefficiente di variazione	5.6%
DRVVT screening test	Valore medio	32.5	Valore medio	34.1
	Deviazione standard	1.5	Deviazione standard	0.69
	Coefficiente di variazione	4.6%	Coefficiente di variazione	2%
DRVVT confirm test	Valore medio	31.8	Valore medio	32.3
	Deviazione standard	0.63	Deviazione standard	0.69
	Coefficiente di variazione	2%	Coefficiente di variazione	2%
Media geometrica PPN	SCT s	37.1	SCT s	47.7
	SCT c	35.8	SCT c	45.8
	DRVVT s	32.1	DRVVT s	34.1
	DRVVT c	31.8	DRVVT c	32.3

Il kappa di Cohen è un indice statistico che permette di valutare il grado di accordo tra due risposte qualitative o categoriali di due persone (inter-observer variation) oppure della medesima persona in momenti differenti (intra-observer variation), valutando gli stessi oggetti. In

particolar modo permette di verificare la concordanza reale tra i due test, escludendo quella dovuta al caso.

Il Kappa di Cohen viene calcolato:

$$K = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

dove $\text{Pr}(a)$ è data dalla somma della prima diagonale della matrice divisa per il totale dei giudizi e rappresenta la percentuale di giudizio, di fatto, concorde tra i giudici.

Mentre $\text{Pr}(e)$ è il prodotto dei totali positivi sommato a quelli negativi, il tutto diviso per il quadrato del totale dei giudizi $(PP'+NN')/T^2$, e rappresenta la probabilità di accordo casualmente.

L'interpretazione dei valori Kappa si esegue secondo le seguenti linee-guida: (Fig.8) (28)

Valore di Kappa	Livello di accordo
0-.20	Nessuno
.21-.39	Minimo
.40-.59	Debole
.60-.79	Moderare
.80-.90	Forte
Sopra.90	Quasi perfetto

Figura 2. Valori di Kappa secondo le linee-guida

L'affidabilità inter-rater⁶ è stata utilizzata per valutare la concordanza tra le due classificazioni presentate in tabella di frequenza 2x2 (Kappa di Cohen). Nello studio le tabelle sono state usate per calcolare la K di Cohen usando sia le medie aritmetiche dei pool (Tabella 4) sia le medie geometriche (Tabella 5)

⁶ Inter-rater si riferisce all'accordo tra diverse misurazioni effettuate da due o più persone.

Tabella 4. Tabelle 2x2 per il K di Cohen usando le medie aritmetiche dei pool.

		Pool A SCT+	Pool A SCT-	
Pool B	SCT +	28	6	34
	SCT -	10	65	75
		38	71	109
	K=0.66			

		Pool A DRVVT +	Pool A DRVVT -	
Pool B	DRVVT +	81	4	85
	DRVVT -	10	14	24
		91	18	109
	K= 0.58			

Tabella 5. Tabelle 2x2 per il K di Cohen usando le medie geometriche dei pool.

		Pool A SCT+	Pool A SCT-	
Pool B	SCT +	23	4	27
	SCT -	8	74	82
		31	78	109
	K=0.85			

		Pool A DRVVT +	Pool A DRVVT -	
Pool B	DRVVT +	82	3	85
	DRVVT -	5	19	24
		87	22	109
	K= 0.86			

11. CONCLUSIONE

La aPS è una sindrome rara, ma considerata potenzialmente molto grave. Pertanto, ancora oggi in letteratura si auspica a un miglioramento relativo alle conoscenze patogenetiche e ai test di laboratorio per la sua diagnosi.

Il Lupus Anticoagulant (LA) è un indicatore di rischio trombotico e uno dei criteri per diagnosticare la sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (APS). Questo test rileva autoanticorpi che attaccano fosfolipidi o proteine associate, interferendo con i processi coagulativi. Pur essendo stato scoperto in pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico, può essere presente anche in individui senza patologie autoimmuni. LA aumenta il rischio di trombosi, ictus, embolia polmonare e aborti spontanei, ed è uno dei tre principali anticorpi anti-fosfolipidi, insieme all'anticardiolipina e agli anti β 2-glic

In questo studio, svolto presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale San Giovanni Bosco ha valutato campioni di pazienti dell'ASL Torino per testare la presenza di LA, confrontando due differenti plasmi (PPN liofilizzati) per verificare la concordanza nei risultati diagnostici.

A tal fine, è stata condotta un'indagine su 877 campioni sottoposti alla ricerca LA, di cui il 12% è risultato positivo.

I campioni selezionati sono stati sottoposti a doppia analisi, uno basato sul Veleno di Vipera di Russel Diluito (DRVV) e l'altro sul PTT. In seguito, è stato eseguito uno studio statistico che tramite il Coefficiente di Cohen (K) e le tabelle 2x2 di contingenza hanno permesso di ottenere e confrontare i risultati.

I risultati di questa analisi, ottenuti tramite la media geometrica, suggeriscono che vi sia un forte livello di accordanza, secondo le linee-guida, fra il pool A e il pool B. Tuttavia, i risultati ottenuti con le medie aritmetiche mostrano come il livello di accordanza oscilli tra il debole e il moderato. In conclusione, i risultati hanno mostrato un'ottima concordanza tra i due metodi, confermando che entrambi i plasmi possono essere usati per la ricerca di LA nella pratica quotidiana.

Si potrebbero eseguire ulteriori studi su una popolazione numericamente maggiore per confermare il grado di accordanza tra i due PPN liofilizzati.

BIBLIOGRAFIA

1. Marlies Ledford-Kraemer, MBA, BS, MT(ASCP)SH, CLSI H60
Test di laboratorio per l'anticoagulante lupico; linee guida approvate, 2024
2. Khamashta M. A. Hughes syndrome: antiphospholipid syndrome. Second Edition. Editor Publ Springer, London, UK, 2000
3. Marlies Ledford-Kraemer, MBA, BS, MT(ASCP)SH, CLSI H60
Test di laboratorio per l'anticoagulante lupico; linee guida approvate, 2024
4. Tincani A, Balestrieri G, Spatola L, Cinquini M, Meroni PL, Roubey RA. Anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I immunoassays in the diagnosis of anti-phospholipid syndrome. Clin Exp Rheumatol 1998; 16: 396-402.
5. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-

- glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:4120-4.
6. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. International consensus statement 54 on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arthritis Rheum 1999; 42: 1309-1311.
 7. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2006; 4: 295-306.
 8. Oosting JD, Derksen RHWM, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipid with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? Blood 1993; 81: 2618-25.
 9. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG 's (LA) are not directed to phospholipids only,

- but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-32
10. Galli M, Barbui T. Antiphospholipid antibodies and pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16: 211-25
 11. Abou-Nassar K, Carrier M, Ramsay T, Rodger MA. The association between antiphospholipid antibodies and placenta mediated complications: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*. 2011 Jul.
 12. Silver RM, Parker CB, Reddy UM, Goldenberg R, Coustan D, Dudley DJ, Saade GR, Stoll B, Koch MA, Conway D, Bukowski R, Hogue CJ, Pinar H, Moore J, Willinger M, Branch DW. Antiphospholipid antibodies in stillbirth. *Obstet Gynecol*. 2013 Sep
 13. Asherson RA, Cervera R, De Groot PG, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12:530-4.
 14. Jason S Knight, D Ware Branch, Thomas L Ortel Antiphospholipid syndrome: advances in diagnosis, pathogenesis, and management. *BMJ* 2023, 27 February 2023

15. Tripodi A. To mix or not to mix in lupus anticoagulant testing?
That is the question. *Semin Thromb Hemost.* 2012 Jun;38:385-9.
16. Tripodi A., Pengo V. More on: laboratory investigation of lupus anticoagulants: mixing studies are sometimes required
17. Meroni PL, Riboldi P. Pathogenic mechanisms mediating antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13:377-382. doi: 10.1097/00002281-200109000-00006.
18. Gómez-Puerta JA, Cervera R, Espinosa G, Asherson RA, García-Carrasco M, da Costa IP, Andrade DC, Borba EF, Makatsaria A, Bucciarelli S, Ramos-Casals M, Font J. Catastrophic antiphospholipid syndrome during pregnancy and puerperium: maternal and fetal characteristics of 15 cases. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jun;66(6):740-6. doi: 10.1136/ard.2006.061671. Epub 2007 Jan 12.
19. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, Khamashta MA, Shoenfeld Y; Catastrophic Antiphospholipid Syndrome Registry Project Group. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus.* 2003.

20. Knight JS, Branch DW, Ortel TL. Antiphospholipid syndrome: advances in diagnosis, pathogenesis, and management. *BMJ*. 2023 Feb 27.
21. Dabit JY, Valenzuela-Almada MO, Vallejo-Ramos S, Duarte-García A. Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome in the General Population. *Curr Rheumatol Rep*. 2022.
22. Cervera R. Lessons from the "Euro-Phospholipid" project. *Autoimmun Rev*. 2008 Jan.
23. Marlies Ledford-Kraemer, MBA, BS, MT(ASCP)SH, CLSI H60 Test di laboratorio per l'anticoagulante lupico; linee guida approvate, 2024
24. Dabit JY, Valenzuela-Almada MO, Vallejo-Ramos S, Duarte-García A. Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome in the General Population. *Curr Rheumatol Rep*. 2022 Jan
25. Montaruli B, Bairo A, Beltrami E, Cabodi D, Muccini E, Papandrea M, Rolla R, Sampietro S, Valesella P, Sciascia S. Lupus anticoagulant mixing studies and normalization of results how best to proceed. *Int J Lab Hematol*. 2024 Feb.
26. Jason S Knight, D Ware Branch, Thomas L Ortel Antiphospholipid syndrome: advances in diagnosis, pathogenesis, and management. *BMJ* 2023, 27 February 2023

27. Asherson and Cervera. Anticardiolipin antibodies, chronic biologic false positive tests for syphilis and other antiphospholipid antibodies. In Dubois' lupus erythematosus. Fourth edition. Lee and Febiger, Philadelphia, 1993.
28. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22.
29. <https://www.issalute.it/index.php/saluteaz-saz/s/709-sindrome-antifosfolipidica-aps#vivere-con>.
30. Legnani C., Bertini M., Agostini P., Bondanini F., Cozzi M.R., Demicheli M.S.A., Di Felice G., Novembrino C., Paoletti O., Pedrini S., Ruocco L., Steffan A., Terzuoli L, Testa S. La ricerca del lupus anticoagulant: raccomandazioni del gruppo di studio sulla coagulazione di SIPMeL, Aprile 2018.
31. Morelli B., Montaruli B., Cabodi D., Appiani A., Bertone F., Conterio V., Demicheli M.S., Muccini E., Novelli C., Portalupi M.R., Pradella P., Prestigio S. La Variabilità preanalitica in coagulazione, Aprile 2019.

RINGRAZIAMENTI

Concludo questo mio elaborato e percorso di studi ringraziando il mio relatore interno, Dott. Elia Ranzato per aver accettato di seguirmi e per essere sempre stato pronto a rispondere alle mie domande. La sua figura è stata di fondamentale importanza.

Un grazie alla Dott.ssa Daniela Cabodi che mi ha aiutata, seguito e spronata in questi mesi di stage e nella stesura della tesi. Grazie per essere stata la mia guida e per avermi trasmesso la passione del lavoro. Grazie per avermi sempre aiutata nel momento del bisogno e avermi capita.

Grazie alla mia famiglia, al mio fidanzato, alla sua famiglia e agli amici per essermi stati accanto nei periodi di buio e per avermi sempre dato spensieratezza. Questo mio traguardo lo dedico a voi!

Infine, grazie a me per non aver mai mollato.

Al mio angelo custode, *Cleo*.