

Dificultades y controversias en el diagnóstico biológico de los síndromes antifosfolipídicos del embarazo

Dres. Ana María Otero*, Datevig Attarian†, Enrique Pons‡, Ricardo Pou§, Eduardo Storch§, Elena De Lisa¶, Inés Sevrini††, Cecilia Carrizo††

Centro Especializado en Afecciones de la Hemostasis y Trombosis (CEAHT)

Resumen

Aún existen dificultades y controversias para el diagnóstico biológico de los síndromes antifosfolipídicos. La importancia del diagnóstico en mujeres con historia obstétrica sospechosa de un síndrome antifosfolipídico es de enorme trascendencia por las implicancias que tiene un tratamiento adecuado.

Este estudio tiene dos objetivos:

- 1. Comparar los resultados de diferentes técnicas de laboratorio en una población de mujeres enviadas para confirmar o descartar un síndrome antifosfolipídico del embarazo.*
- 2. Establecer si la determinación de más de una técnica en una misma paciente aumenta las posibilidades de llegar al diagnóstico.*

Material y método: en 607 pacientes enviadas al Centro Especializado en Afecciones de la Hemostasis y Trombosis (CEAHT) por diferentes complicaciones obstétricas se realizó la determinación de anticuerpos antifosfolipídicos por dos técnicas inmunológicas empleando reactivos comerciales disponibles en el medio (ACA y APA). En 407 de estas pacientes se determinó, además, el anticoagulante lúpico (AL).

Resultados: 102 (16%) presentaron por lo menos un test positivo confirmado en más de dos oportunidades. Los ACA (anticuerpos anticardiolipinas) fueron positivos en 78,4% seguidos por los APA, 29,4% (anticuerpos contra una mezcla de fosfolípidos) y con mucho menor frecuencia el AL, 8%. Sólo en 18,4% de los casos se observó la concomitancia de dos o más técnicas positivas.

Conclusión: es recomendable, de acuerdo con estos datos, realizar por lo menos dos técnicas inmunológicas además del AL antes de descartar un síndrome antifosfolipídico del embarazo.

Palabras clave: SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO – diagnóstico.
COMPLICACIONES DEL EMBARAZO.

* Ex Profesor Agregado de Hematología.

† Licenciada en Laboratorio Clínico.

‡ Profesora de Ginecología y Obstetricia.

§ Ex Profesor Agregado de Ginecología y Obstetricia.

¶ Especialista en Hematología.

†† Profesora Adjunta de Medicina.

Correspondencia: Dra. Ana María Otero
Chucarro 1277 Ap. 402. Montevideo, Uruguay
E-mail: amob@netgate.com.uy

Recibido: 2/9/05.

Aceptado: 10/3/06.

ACA: anticuerpos anticardiolipinas

AL: anticoagulante lúpico

aPL: anticuerpos antifosfolipídicos

DP: decolamiento placentario

GPU: unidades de isotipo IGG

IL: inhibidor de tipo lúpico

MPU: unidades de isotipo IGM

RCFIU: restricción del crecimiento fetal intrauterino

UGPU: unidades de isotipo IGA

Introducción

Una de las manifestaciones clínicas más frecuentes de los síndromes antifosfolípidicos es la pérdida recurrente de embarazo⁽¹⁻³⁾. Actualmente no se espera la pérdida del embarazo o el óbito fetal para estudiar a las pacientes, sino que es necesario pensar en el síndrome antifosfolípido frente a complicaciones obstétricas que sugieran la posibilidad de su presencia.

Frente a una complicación obstétrica como la restricción del crecimiento fetal intrauterino (RCFIU), el decolamiento placentario (DP), la aparición de una mala hemodinamia placentaria a través del estudio Doppler, el óbito fetal o la pérdida de embarazo, el obstetra pide la determinación de los anticuerpos antifosfolípidicos (aPL) a fin de instituir un tratamiento o vigilancia más cercana en caso que los anticuerpos sean positivos.

El estudio biológico es pues muy importante para un diagnóstico correcto y la implementación de las medidas terapéuticas que cada caso amerite. Lamentablemente existen varias dificultades en el diagnóstico biológico que aún no han sido resueltas.

Si analizamos los hechos a través de la historia, el primer anticuerpo antifosfolípido se detectó en la década de 1950 cuando se reportaron varios resultados falso positivo para la reacción de Wasserman, técnica empleada en esos tiempos para el diagnóstico de sífilis. El antígeno presente en la reacción de Wasserman es una cardiolipina presente en las mitocondrias de la membrana. Pacientes sin sífilis pero con anticuerpos contra la cardiolipina daban un resultado falso positivo. También en la década de 1950 se describió la existencia de lo que inicialmente se interpretó como un inhibidor de la coagulación, actualmente denominado anticoagulante lúpico (AL), pues las primeras pacientes estudiadas tenían lupus sistémico.

Pocos años después se asoció el AL con la reacción falso positiva de Wasserman y la presencia de trombosis clínicas. En la década de 1980 se desarrollaron técnicas mucho más sensibles para el hallazgo de aPL, empleando cardiolipinas en fase sólida para la búsqueda de los anticuerpos.

Los fosfolípidos son lípidos iónicos polares compuestos de 1,2-diacilglicerol y un enlace fosfodiéster que une el esqueleto del glicerol a alguna base, generalmente nitrogenada, tal como la colina, serina o etanolamina.

La cardiolipina es un fosfolípido muy ácido (carga -2); está compuesto por dos moléculas de ácido fosfatídico unidas covalentemente a través de una molécula de glicerol. Se encuentra fundamentalmente en la membrana interna de la mitocondria y en las membranas bacterianas.

En 1990 se determinó que los anticuerpos antifosfolípidos son en realidad anticuerpos que reaccionan con fosfolípidos unidos a proteínas plasmáticas como la beta²

glicoproteína I y otras proteínas como la prostaciclina, la protrombina, la proteína C, la anexina V, y el factor tisular. Por el contrario, la reacción de Wasserman para el diagnóstico de sífilis no necesita la unión de la cardiolipina con proteínas para dar positiva.

Sabemos actualmente que los anticuerpos antifosfolípidicos son una familia de anticuerpos que pueden fijarse sólo a fosfolípidos de carga negativa o a fosfolípidos unidos a proteínas, o bien pueden coexistir ambos tipos de anticuerpos⁽⁴⁾.

En los últimos años se ha prestado especial interés a los fosfolípidos unidos a proteínas (particularmente la beta² glicoproteína I) aunque también otras proteínas pueden estar involucradas⁽⁵⁾.

Los aPL pueden ser identificados por diferentes técnicas de laboratorio: las técnicas inmunológicas y las técnicas coagulométricas. Referente al AL, las técnicas coagulométricas miden la capacidad del anticuerpo de prolongar los tests fosfolípidos dependientes y ya existen pautas internacionales sobre los pasos a seguir para el diagnóstico correcto. Estas pautas han sido fijadas por el Subcomité Científico de Estandarización del AL de la Sociedad Internacional de Hemostasis y Trombosis (SSC-ISTH)⁽⁶⁾.

En relación con las técnicas inmunológicas existen problemas no resueltos^(7,8). Hay una gran variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad de las mismas a pesar de los numerosos esfuerzos realizados en el ámbito internacional para encontrar la o las técnicas más adecuadas y seguras para el diagnóstico. Cuando se usan "kits homemade" se obtienen a menudo resultados no satisfactorios por falta de reproducibilidad y precisión debido a la falta de estandarización^(9,10).

Objetivo

Este estudio tiene dos objetivos:

1. Comparar los resultados de diferentes técnicas de laboratorio en una población de mujeres enviadas para confirmar o descartar un síndrome antifosfolípido del embarazo.
2. Establecer si la determinación de más de una técnica en una misma paciente aumenta las posibilidades de llegar al diagnóstico.

Material y método

Población

Se estudiaron 637 muestras de sangre pertenecientes a otras tantas mujeres con historia de pérdida de embarazo, óbito fetal, RCFIU, DP o trastornos de la hemodinamia placentarios determinados por Doppler y que fueron enviadas por obstetra para buscar la presencia de aPL.

Tests biológicos

En todas las pacientes se realizaron dos técnicas inmunológicas para el diagnóstico de aPL [anticuerpos anticardiolipinas (ACA) y anticuerpos anti mezcla de fosfolípidos (APA)] y en 407 de la misma población se realizó además el anticoagulante lúpico (AL).

1. *Anticuerpos anticardiolipinas*. Reactivo comercial: ACA (EL-aCL, Theratest Labs). Ensayo inmunoenzimático en fase sólida para detección y medida de auto anticuerpos dirigidos contra cardiolipinas en suero. Se realizó primero un screening mediante el uso de un anticuerpo polivalente. Screening positivo > 8%. Frente a un test *borderline* o positivo se determinó el isotipo correspondiente utilizando anticuerpos específicos de clase IgM, IgG o IgA. El control de calidad interno se realizó utilizando sueros positivos y negativos para los ACA provistos por “kits”. Valor de corte para isotipo, IgG < 15 GPU, valor de corte para isotipo IgM < 10 MPU, valor de corte para isotipo IgA < 7 UGPU.

2. *Anticuerpos antifosfolipídicos*. Reactivo comercial: APA, Asserachrom Diagnostica Stago. Determinación semicuantitativa de anticuerpos antifosfolipídicos por enzoinmunoanálisis (EIA). Control de calidad interno positivo y negativo provistos por el “kit”. Resultado positivo > 15 unidades PI/ml. A diferencia del test anterior, aquí el reactivo con el cual se enfrenta el plasma a estudiar contiene una “mezcla” de fosfolípidos: cardiolipinas, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamida, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, y ácido fosfatídico.

3. *Anticoagulante lúpico*. Se siguieron los criterios recomendados por el Subcomité para la Estandarización del AL /APA del Comité Científico y de Estandarización (SSC) de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis (ISTH) consistentes en:

- a) Dos técnicas de screening para AL:
 - PTT-LA (Diagnostica Stago).
 - LAC Screen (Instrumentation Laboratory). Tiempo de veneno de víbora Rusel diluido (dRVVT).
- b) Estudio de mezclas con plasma normal. Se utilizó el índice de Rosner para definir presencia o ausencia de inhibidor.
- c) Método confirmatorio con fosfolípidos hexagonales. Reactivo comercial: Staclot LA, Diagnostica Stago. Se consideró positivo un acortamiento del tiempo de coagulación ≥ 8 segundos de la mezcla con fosfolípidos respecto a la mezcla sin fosfolípidos. Se utilizaron como control de calidad interno plasmas normales y plasmas positivos para AL.

Resultados

De las muestras, 102/637 (16%) dieron resultados positivos para por lo menos una de las técnicas empleadas.

De los 102 resultados positivos:
Fueron positivos 19/102 (18,6%) para ambas técnicas inmunológicas APA y ACA.

Fueron positivas 11/102 (10,3%) sólo para el APA.

Fueron positivas 76/102 (74,5%) sólo para ACA.

En las pacientes con ACA positivo se estudió el isotipo del anticuerpo observando un predominio discreto de IgG de acuerdo a los siguientes valores: 56 isotipos IgG y 46 isotipos IgM. En ocho pacientes se asociaron ambos isotipos.

El anticoagulante lúpico sólo se determinó en 407 de las muestras y fue positivo en nueve, siguiendo los criterios de SSC de la ISTH. Si consideramos las 102 pacientes que fueron positivas para alguna de las técnicas inmunológicas, el AL fue positivo en 8,8%.

En las nueve pacientes con AL se observó la concomitancia con otro test positivo: cinco asociaban AL+ACA+ y APA+, dos asociaban AL+ACA+ y dos tenían AL+APA+.

En ningún caso se vio un AL positivo en ausencia de ACA o APA positivos.

Tabla 1. Distribución de resultados en 102 pacientes con por lo menos uno de los tests positivo

Resultados	Positivo	Negativo
ACA (n = 102)	74,5%	25,5%
APA (n = 102)	29,4%	70,6%
ACA + APA + (n = 102)	18,0%	
IL (n = 102)	8,8%	

ACA: anticuerpos anticardiolipinas; APA: anticuerpos contra una mezcla de fosfolípidos; IL: inhibidor lúpico

Comentarios

El diagnóstico de síndrome antifosfolipídico requiere criterios clínicos y criterios biológicos. En el meeting internacional SAPPORO⁽¹¹⁾ se establecieron criterios para el diagnóstico clínico y de laboratorio de los síndromes antifosfolipídicos. De acuerdo con el mismo, los criterios clínicos sólo incluyen las trombosis arteriales o venosas y las complicaciones obstétricas. Fue excluida la plaquetopenia. Los criterios biológicos aceptados fueron el AL o las anticardiolipinas isotipo IgG, que persisten con seis semanas de diferencia.

Los criterios biológicos de SAPPORO fueron criticados por varios grupos científicos sobre la base de distintos argumentos. Por un lado, las técnicas propuestas, si bien son de fácil realización, generan a veces resultados confusos, quizá por una pobre estandarización de las mis-

mas. Por otro lado, no todos los anticuerpos antifosfolípidicos son diagnosticados por AL o ACA.

En nuestros resultados debemos resaltar:

1. El porcentaje de confirmación biológica de un SAFE sospechado por diferentes complicaciones obstétricas, como las señaladas anteriormente, es de 16%, menor que cuando estudiamos poblaciones de mujeres con pérdida recurrente de embarazo –40%– pero no es despreciable⁽¹²⁾.
2. Existe un alto porcentaje de diagnósticos positivos en base a una de las técnicas (ACA), pero 10,3% de pacientes quedarían sin diagnóstico si no se realizara una segunda técnica inmunológica (APA).
3. Es curioso que teniendo los dos reactivos (ACA y APA) cardiolipinas como sustrato, algunas pacientes son negativas para el ACA y positivas para el APA. En estos casos se podría interpretar que los anticuerpos hallados por el APA son positivos frente a otro fosfolípido aniónico, que no es cardiolipina.
4. Pero más curioso es el hecho de que pacientes con ACA positivo (74,5%) sean negativas al APA, reactivo que contiene una mezcla de fosfolípidos, incluyendo la cardiolipina. Esto podría explicarse sobre la base de que no todos los anticuerpos detectan los mismos epítopes de la cardiolipina o bien que tienen una afinidad que varía en los diferentes sistemas de los tests⁽¹³⁾. Es decir que sigue siendo complejo el diagnóstico biológico.
5. Sobre la base de los resultados encontrados en nuestra población, la realización de por lo menos dos técnicas inmunológicas diferentes aumenta la posibilidad del diagnóstico. Otros autores han mostrado resultados similares^(14,15). Es decir que haciendo sólo una de las técnicas quedará un número importante de pacientes sin diagnóstico.
6. La presencia de AL es baja y no cambia el porcentaje de diagnóstico pues siempre se acompaña de resultados positivos por alguna de las técnicas inmunológicas. Sin embargo, es importante porque indica un compromiso inmunológico complejo con asociación de varios anticuerpos y un pronóstico más comprometido hacia una colagenopatía.

En los criterios de SAPPORO, nuevas técnicas como la determinación de antibeta2glicoproteína I (abeta2-GPI) no es mencionada y tampoco se menciona el isotipo IgM de anticardiolipinas, cuando en nuestra experiencia es un isotipo frecuente en las complicaciones obstétricas.

Posteriormente al meeting de SAPPORO se realizó en Boston un encuentro de la ISTH, donde se establecieron cuatro criterios biológicos para el diagnóstico de un síndrome antifosfolípidico⁽¹⁶⁾.

- 1) AL y antibeta2-GPI.

- 2) AL solamente.

- 3) Antibeta2-GPI solamente.

- 4) Positivos hacia otros fosfolípidos (anticardiolipinas, antiprotrombina, etcétera).

Los criterios de la ISTH son también polémicos por varias razones. En las complicaciones obstétricas aún no es seguro el valor de los anticuerpos antibeta2-GPI y, por otra parte, esta técnica hasta ahora sólo está disponible para laboratorios de alta complejidad.

Numerosos trabajos internacionales muestran que existe una gran variación de resultados frente a diferentes técnicas inmunológicas en la determinación de anticuerpos antifosfolípidicos⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Incluso empleando una misma técnica puede haber variaciones entre diferentes laboratorios^(20,21).

El debate continúa sobre la confiabilidad de los diferentes métodos. Esto ha llevado a varios autores a promover la realización de más de una técnica cuando se trata de identificar anticuerpos antifosfolípidicos en mujeres con pérdida recurrente de embarazo^(22,23).

Esta metodología de dos técnicas diferentes encarece el diagnóstico pero es un gasto justificado por la importancia del hallazgo de anticuerpos antifosfolípidicos en mujeres con complicaciones obstétricas⁽²⁴⁾.

Recordemos que el diagnóstico se sospecha por la clínica pero se confirma sólo con el diagnóstico biológico.

Por lo tanto, confuso es el diagnóstico y confusos son los resultados del test, lo cual lleva a recomendar que cada laboratorio realice su experiencia con su metodología y su población.

La identificación de anticardiolipinas y del AL sigue siendo útil y aceptada por la comunidad internacional⁽²⁵⁾.

En el futuro sería deseable, cuando un ACA o un APA sea positivo, realizar la determinación de la antibeta2-GPI. Actualmente estamos usando un nuevo “kit” que utiliza como sustrato la beta2glicoproteína I, lo cual podrá aclarar muchas dudas y ofrecer una especificidad mayor en los estudios, y que será motivo de una nueva comunicación.

Summary

There are difficulties and controversies in biological diagnosis of antiphospholipidic syndromes of pregnancy. Diagnosis in women with a history of suspicious antiphospholipidic syndromes is of great importance in order to indicate an adequate treatment.

The aims of this study were:

1. To compare the results of different laboratory techniques in a population of women referred for confirmation or rejection of a pregnancy antiphospholipidic syndrome;
2. To establish if the performance of more than one technique in a same patient increases the chance to achieve

an accurate diagnosis.

Materials and methods: In 607 patients referred to the Specialized Center on Hemostasis Disorders and Thrombosis (CEAHT) that presented different obstetric complications, antiphospholipidic antibodies were measured using available commercial reagents (ACA and APA). In 407 of these patients the lupus anticoagulant (AL) was also determined.

Results: 102 (16%) patients showed at least one positive test confirmed by more than two different ways. The ACA (anticardiolipin antibodies) resulted positive in 78.4% followed by the APA, 29.4% (antibodies against a mixture of phospholipids) and the AL, showing a very low frequency of 8%. Only in 18.4% of the cases the coincidence of two or more techniques was observed.

Conclusion: It is advisable, according to these data, to perform at least two immunological techniques apart from AL, before confirming the absence of occurrence of an antiphospholipidic syndrome of pregnancy.

Résumé

Il existe encore des difficultés et de controverses pour le diagnostic biologique des syndromes antiphospholipidiques. L'importance du diagnostic chez les femmes ayant une histoire obstétrique soupçonnée de ce syndrome est d'une énorme valeur pour un traitement correct.

Ce travail-ci a deux buts:

1. Comparer les résultats de différentes techniques de laboratoire chez une population de femmes étudiées pour confirmer ou rejeter un syndrome antiphospholipidique de la grossesse.

2. Établir si la détermination de plus d'une technique chez une même patiente augmente les possibilités d'ajuster le diagnostic.

Matériel et méthode: chez 607 patientes traitées au Centre Spécialisé en Affections de l'Hémostase et Thrombose (CEAHT) à cause de différents troubles obstétriques, on a fait le repérage d'anticorps antiphospholipidiques au moyen de deux techniques immunologiques tout en utilisant des réactifs commerciaux disponibles (ACA et APA). Chez 407 de ces patientes, on a repéré aussi l'anticoagulant lupique (AL).

Résultats: 102 (16%) ont présenté au moins un test positif confirmé à deux reprises. Les ACA (anticorps anticardiolipines) ont été positifs chez 78,4% suivis des APA, 29,4% (anticorps contre un mélange de phospholipides) et très au-dessous, le AL 8%. Seulement chez 18,4% des cas on a repéré la concomitance de deux ou techniques positives ou plus.

Conclusion: il est conseillable, selon ces résultats, de réaliser au moins deux techniques immunologiques à part le AL avant d'écarter un syndrome antiphospholipidique à la grossesse.

Bibliografía

1. **Kutteh WH, Rote NS, Silver R.** Antiphospholipid antibodies and reproduction: the antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41(2): 133-52.
2. **Yetman DL, Kutteh WH.** Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertil Steril* 1996; 66(4): 540-6.
3. **Branch DW, Silver RM, Pierangeli SS, van Leeuwen I, Harris EN.** Antiphospholipid antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol* 1997; 89(4): 549-55.
4. **Roubey RA.** Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" antibodies. *Blood* 1994; 84(9): 2854-67.
5. **Levine JS, Branch DW, Rauch J.** The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346(10): 752-63.
6. **International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Subcommittee Lupus Anticoagulant Phospholipid dependent antibodies.** Boston: International Society of Thrombosis and Haemostasis, 2002.
7. **Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al.** Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations. A cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost* 2001; 86(2): 575-83.
8. **Kutteh WH, Wester R, Kutteh CC.** Multiplies of the median: alternate methods for reporting antiphospholipid antibodies in women with recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 1994; 84(5): 811-5.
9. **Peaceman AM, Silver RK, MacGregor SN, Socol ML.** Interlaboratory variations in antiphospholipid antibody testing. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166(6 Pt 1): 1780-4.
10. **Favaloro EJ, Silvestrini R.** Assessing the usefulness of anticardiolipin antibody assays: a cautious approach is suggested by high variation and limited consensus in multilaboratory testing. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(4): 548-57.
11. **Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al.** Intentional consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7): 1309-11.
12. **Otero AM, Pou Ferrari R, Pons E, Lens D, De Lisa E, Dellepiane M, et al.** Trombofilia y pérdida recurrente de embarazo. *Rev Med Urug* 2004; 20(2): 106-13.
13. **Horkko S, Miller E, Dudl E, Reaven P, Curtiss LK, Zvaifler NJ, et al.** Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids: Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1996; 98(3): 815-25.
14. **Rand JH.** The antiphospholipid syndrome. *Annu Rev Med* 2003; 54: 409-24.
15. **Viard JP, Amoura Z, Bach JF.** Association of anti-beta 2 glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992; 93(2): 181-6.
16. **Levine JS, Branch DW, Rauch J.** Antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346(10): 752-63.
17. **Schlame M, Haller I, Sammaritano LR, Blanck TJ.** Effect of cardiolipin oxidation on solid-phase immunoassay for antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2001; 86(6): 1475-82.
18. **Roberts JM, Macara LM, Chalmers EA, Smith GC.** In-

- ter-assay variation in antiphospholipid antibody testing. *BJOG* 2002; 109(3): 348-9.
19. **Nash MJ, Camilleri RS, Kunka S, Mackie IJ, Machin SJ, Cohen H.** The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2(7): 1077-81.
 20. **Derksen RH, de Groot PG.** Clinical consequences of antiphospholipid antibodies. *Neth J Med* 2004; 62(8): 273-8.
 21. **Kutteh WH, Franklin RD.** Assessing the variation in antiphospholipid antibody (APA) assays: comparison of results from 10 centers. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(2): 440-8.
 22. **Ben Hadj Slama F, Nagara M, Slama A, Braham Jmili N, Monastiri K, Laouani-Kechrid C, et al.** Antiphospholipid antibodies in 146 women with repeated pregnancy losses. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004; 62(2): 217-21.
 23. **Carp, HJ.** Antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16(2): 129-35.
 24. **Harris EN, Pierangeli SS.** Revisiting the anticardiolipin test and its standardization. *Lupus* 2002; 11(5): 269-75.
 25. **Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al.** Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations. A cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost* 2001; 86(2): 575-83.