

La fine specificità degli anticorpi anti- β_2 glicoproteina I nelle malattie autoimmuni sistemiche è prevalentemente diretta verso il dominio 1*

Fine specificity of anti- β_2 glycoprotein I antibodies in systemic autoimmune diseases is mostly directed against domain 1

C. Nalli¹, L. Andreoli¹, M. Motta², G.L. Norman³, Z. Shums³, W.L. Binder³, M. Nuzzo¹, M. Frassi¹, A. Lojaco⁴, A. Meini⁵, V. Medeghini⁵, T. Avcin⁶, P.L. Meroni⁷, A. Tincani¹

¹Reumatologia e Immunologia Clinica, Spedali Civili e Cattedra di Reumatologia, Università degli Studi di Brescia; ²Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, Spedali Civili di Brescia; ³INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA; ⁴Ostetricia e Ginecologia, Spedali Civili di Brescia; ⁵Immunologia e Reumatologia Pediatrica, Clinica Pediatrica, Università degli studi di Brescia; ⁶Allergologia, Reumatologia e Immunologia Clinica, Ospedale Pediatrico, Policlinico Universitario di Lubiana, Slovenia; ⁷Allergologia, Immunologia Clinica e Reumatologia, Istituto Auxologico Italiano, Milano

SUMMARY

Objective: Anti- β_2 GPI are a formal laboratory criterion for the antiphospholipid syndrome (APS). They were demonstrated to be a risk factor for thrombosis and fetal losses but can also be detected in patients with systemic autoimmune disease (SAD), in healthy adults individuals and pre-school children. It has been suggested that different subpopulations of anti- β_2 GPI may carry different pathogenetic potential: autoantibodies against Domain1 seem to be associated with thrombosis; autoantibodies against Domain4/5 have been identified in patients with non-thrombotic conditions.

Methods: We studied 48 patients with SAD (32 systemic lupus erythematosus, 16 undifferentiated connective tissue disease), 64 patients with APS, 57 one-year-old healthy children born to mother with SAD, 33 children with atopic dermatitis. All subjects were IgG anti- β_2 GPI positive. The specificity of anti- β_2 GPI was investigated using ELISA research products containing recombinant β_2 GPI D1 and D4/5 antigens. Cut-off values are calculated as 95th percentile on 100 NHD. IgG anti- β_2 GPI were tested at a validated home-made ELISA routinely performed in our laboratory. No thrombotic events were recorded in patients with SAD and in both groups of children.

Results: Patients with SAD and APS showed prevalent reactivity for D1 while children in both groups preferentially recognize D4/5.

Conclusions: IgG anti- β_2 GPI against D1 seem to cluster in patients with systemic autoimmune conditions. Their pathogenetic potential in determine APS manifestations may be mitigated by adequate prophylaxis.

*Lavoro premiato al XLVII Congresso SIR, Rimini 2010.

Reumatismo, 2011; 63 (2): 91-96

INTRODUZIONE

Gli anticorpi anti- β_2 Glicoproteina I (anti- β_2 GPI) sono un criterio validato di laboratorio per la sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) (1, 2). È stato dimostrato come essi siano coinvolti sia negli eventi trombotici che nelle complicanze

ostetriche, entrambi quadri tipici per APS. È possibile però trovare questi anticorpi in soggetti senza alcuna manifestazione clinica peculiare dell'APS, come ad esempio in pazienti con malattie sistemiche autoimmuni (MSA). In questi pazienti, i fattori che contribuiscono, o prevencono, lo sviluppo di APS sono molteplici e interagi-

Inirizzo per la corrispondenza:
Prof.ssa Angela Tincani
U.O. Reumatologia
e Immunologia Clinica
A.O. Spedali Civili
Piazzale Spedali Civili, 1
25123 Brescia
E-mail: tincani@brescia.reumatologia.it

scono tra loro in maniera differente da caso a caso (3).

Gli anti- β_2 GPI sono stati inoltre descritti in alcune condizioni non-autoimmuni come ad esempio nell'aterosclerosi (4) e nei pazienti con lebbra (5), e anche nei bambini con dermatite atopica (DA) (6). Si è trovato anche come bambini assolutamente sani, afferenti a visite di controllo preventive, possano mostrare positività per gli anti- β_2 GPI (7, 8).

Il fatto che la presenza di anti- β_2 GPI si possa associare ad uno spettro di condizioni così variegato che spazia da bambini assolutamente sani a pazienti con APS, potrebbe essere in parte spiegato dalla variabilità in termini di sensibilità e specificità tra le varie metodiche di laboratorio utilizzate (9). In ogni caso, la presenza di titoli anticorpali medio-elevati nelle condizioni non-APS-correlate ha suggerito l'ipotesi che ci possano essere anticorpi "patogeni" e "innocenti".

La β_2 glicoproteina I è una proteina a singola catena, composta da cinque sequenze ripetute (domini). Il dominio 5 (D5) è essenziale nel legame ai fosfolipidi di membrana, mentre il dominio 1 (D1) si proietta verso l'ambiente extracellulare ed è quindi in grado di interagire con altre proteine (10). Alcuni lavori hanno dimostrato che gli anti- β_2 GPI che si possono trovare nei pazienti con APS riconoscono preferenzialmente il D1 (11, 12). Per questo motivo è stato suggerito come questi possano essere uno specifico sottogruppo di anticorpi anti- β_2 GPI associato alla APS (12).

Specificità anticorpale specifica per il Dominio 5 è stata dimostrata invece essere presente in condizioni non trombotiche. Anti- β_2 GPI di pazienti con aterosclerosi sono in grado di legarsi al dominio 4 (4), mentre anticorpi di pazienti con lebbra (5) o bambini con DA (6), riconoscono il dominio 5.

In linea con questi dati, il nostro gruppo ha dimostrato che la fine specificità degli anti- β_2 GPI nei bambini nati da madri con MAS è diretta prevalentemente verso il D4/5, mentre nei soggetti con APS definita prevalgono gli anti-D1 (13). Al fine di meglio caratterizzare lo spettro patogenetico

degli anti-D1 e anti-D4/5, abbiamo esteso il nostro studio a soggetti adulti con MAS e positività per anticorpi IgG anti- β_2 GPI, ma senza criteri clinici per APS.

■ MATERIALI E METODI

Pazienti

I soggetti sono stati inclusi nello studio in base alla positività per IgG anti- β_2 GPI ottenuta mediante metodica immunoenzimatica in fase solida ELISA utilizzata routinariamente presso il nostro laboratorio (14).

Sono stati considerati:

- Gruppo A: 64 pazienti con APS, rispondenti ai criteri classificativi proposti nell'"XI International Congress Of Antiphospholipid Antibodies" tenutosi a Sydney, nel Novembre 2004 (1). I pazienti erano affetti nel 43,8% dei casi da patologia trombotica, nel 37,5% da patologia ostetrica e nel 18,8% da entrambe. Erano 58 femmine (91%) e 6 maschi (9%), età media di 50 anni con un range compreso tra 28 e 78 anni.

- Gruppo B: 48 adulti affetti da Malattie Sistemiche Autoimmuni diverse dall'APS, senza quindi alcun pregresso episodio trombotico o alcuna patologia ostetrica. Nello specifico: 32 pazienti con LES e 16 pazienti con UCTD.

- Gruppo C: 57 bambini sani ad un anno di età figli di madri seguite presso l'Unità di Reumatologia e Immunologia Clinica degli "Spedali Civili" di Brescia perché affette da malattie autoimmuni (12 APS, 16 connettivite indifferenziata, 11 lupus eritematoso sistemico, 7 sindrome di Sjögren primaria, 4 artrite reumatoide e 7 con alterazioni sierologiche). Le pazienti gravide vengono seguite da un team multispecialistico formato da reumatologi, ginecologi e neonatologi.

Previo consenso informato sottoposto ai genitori, i bambini vengono prelevati alla nascita per la ricerca di autoanticorpi, con lo scopo di valutare il passaggio transplacentare degli anticorpi materni. Vengono poi prelevati a un anno di vita per controllare la *clearance* di questi stessi anticorpi. Diciotto madri (33%) mostravano IgG

anti- β_2 GPI prima e durante la gravidanza; i loro figli, ad un anno di età, non mostravano differenze significative di titolo anticorpale rispetto ai bambini nati da madri negative per IgG anti- β_2 GPI.

- Gruppo D: 33 bambini con DA seguiti presso l'Ospedale Pediatrico Universitario di Lubiana, Slovenia (età media 2 anni, range 1-4).

Nessun evento trombotico è stato registrato a carico dei soggetti nei gruppi C e D.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Locale.

Metodi

Gli anticorpi anti- β_2 GPI vengono evidenziati con metodica ELISA routinariamente utilizzata nel nostro laboratorio (14); sono considerati come positivi i valori superiori a 0,130 O.D. per IgG (corrispondente al 99° percentile su una popolazione di 100 donatori sani). I valori compresi tra il cut-off e 0,500 O.D. sono stati considerati come bassi positivi, quelli tra 0,500 e 1.000 O.D. come positivi a medio titolo, e quelli maggiori di 1.000 O.D. come positivi ad alto titolo.

La fine specificità di questi anticorpi è stata indagata utilizzando un kit ELISA sperimentale prodotto dalla ditta INOVA Diagnostics. Sono state analizzate due diverse parti della β_2 GPI: il dominio 1 (D1) e il dominio 4/5 (D4/5).

Antigeni ricombinanti equivalenti al D1 e al D4/5 sono stati utilizzati per copulare i pozzetti delle piastre ELISA; i pozzetti sono stati incubati prima con i sieri dei soggetti in esame diluiti (1:100), poi con coniugato anti-IgG e infine è stato utiliz-

zata la tetrametilbenzidina cromogeno e la soluzione di stop, utilizzando i reagenti presenti nel kit e seguendo le istruzioni fornite. I controlli (positivo alto, medio e basso) erano forniti nel kit per le IgG anti-D1, mentre come controllo per le IgG D4/5 è stato utilizzato il siero di un paziente fortemente positivo per le IgG anti-D4/5 diluito rispettivamente 1:50, 1:100 e 1:200. I risultati sono stati espressi in unità di densità ottica (O.D.).

Sono stati anche testati 100 sieri di soggetti sani (68 maschi, 32 femmine, età media 38 anni, range 18-64) per il calcolo del cut-off relativo a ciascun dominio. I risultati del cut-off al 95° percentile sono risultati essere 0,235 OD per le IgG anti-D1 e 0,405 OD per le IgG anti-D4/5.

Analisi statistica

Le caratteristiche sierologiche di ciascun gruppo di soggetti sono state descritte tramite mediana, 10° e 90° percentile.

I titoli anticorpali di IgG anti- β_2 GPI totali, anti-D1 e anti-D4/5 sono stati confrontati tra i diversi gruppi di soggetti e all'interno di ciascun singolo gruppo utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. È stata considerata significativa una $p < 0,05$.

■ RISULTATI

Applicando i valori di cut-off calcolati su una popolazione di 100 adulti donatori sani, abbiamo valutato la prevalenza di soggetti positivi in ciascun gruppo (Tab. I). Gli anticorpi presenti nei soggetti dei gruppi A e B risultano nella maggior parte dei

Tabella I - Differenti pattern di positività per le IgG anti-D1 e anti-D4/5 nei diversi gruppi.

| | D1+ D4/5- n (%) | D1- D4/5+ n (%) | D1+ D4/5+ n (%) | D1- D4/5- n (%) |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| A) APS (n=64) | 43 (67,2%) | 3 (4,7%) | 5 (7,8%) | 13 (20,3%) |
| B) MAS, non APS (n=48) | 27 (56,2%) | 1 (2%) | 11 (23%) | 9 (18,8%) |
| C) Bambini a un anno (n=57) | 4 (7%) | 16 (28%) | 5 (8,8%) | 32 (56,2%) |
| D) Bambini con DA (n=33) | 7 (21,2%) | 9 (27,3%) | 2 (6,1%) | 15 (45,5%) |

Tabella II - Distribuzione dei valori di anticorpi nei 3 gruppi di pazienti. I valori sono espressi in unità di Densità Ottiche (O.D.).

| | Anti- β_2 GPI IgG totali | | | Anti-D1 IgG | | | Anti-D4/5 IgG | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| | Mediana | 10° | 90° | Mediana | 10° | 90° | Mediana | 10° | 90° |
| A) APS (n=64) | 1,256 | 0,484 | 1,913 | 0,536* | 0,160 | 1,928 | 0,150* | 0,040 | 0,440 |
| B) MAS, non APS (n=48) | 0,995 | 0,196 | 1,656 | 0,497§ | 0,171 | 1,229 | 0,200§ | 0,115 | 0,571 |
| C) Bambini 1 anno (n=57) | 0,655 | 0,181 | 1,365 | 0,140# | 0,066 | 0,283 | 0,311# | 0,128 | 0,719 |
| D) Bambini Dermatite Atopica (n=33) | 0,726 | 0,205 | 1,519 | 0,141^ | 0,064 | 0,368 | 0,233^ | 0,099 | 0,694 |

Test di Mann-Whitney per confrontare i titoli del dominio 1 e del dominio 4/5 nei seguenti gruppi di soggetti: * $p < 0,0001$; § $p < 0,005$; # $p < 0,0001$; ^ $p = 0,03$.

casi specifici per il dominio 1, mentre nei gruppi C e D gli anticorpi più rappresentati sono quelli rivolti verso il Dominio 4/5.

Inoltre, solo 3 pazienti adulti con APS sono risultati positivi per gli anti-D4/5 e nessuno di essi aveva in anamnesi eventi trombotici ma erano tutte donne con esperienze di perdite fetali.

Gli anticorpi IgG anti- β_2 GPI totali avevano in tutti e quattro i gruppi una distribuzione simile, mentre andando a studiare la specificità anticorpale verso i Domini, questa omogeneità si perde, mostrando titoli di anti-D1 e anti-D4/5 significativamente diversi nei quattro gruppi (Tab. II). Gli anti-D1 erano prevalenti nei gruppi A e B, mentre gli anti-D4/5 erano più elevati nei gruppi C e D.

■ DISCUSSIONE

Il riscontro di positività per anticorpi antifosfolipidi rimane di difficile interpretazione, in particolar modo in quei soggetti che non soddisfano i criteri diagnostici per l'APS.

Il riscontro di anti- β_2 GPI in bambini assolutamente sani (8) e in bambini con patologie non correlate all'APS come ad esempio la DA (6), suggerisce la presenza di anticorpi anti- β_2 GPI "innocenti".

Il nostro gruppo ha precedentemente osservato la presenza di anticorpi anti- β_2 GPI in bambini sani di un anno d'età figli di madri con MAS (7); la maggior parte di queste

donne era negativa per anti- β_2 GPI sia prima che durante la gravidanza.

Quindi, il riscontro di anti- β_2 GPI in questi bambini suggerisce una produzione *de novo* di anticorpi, non correlati al background materno ma piuttosto a fattori ambientali che agiscono a livello del sistema immunitario del bambino. La β_2 GPI è una proteina a struttura altamente conservata ed è ubiquitaria nel cibo (10). È quindi possibile che l'ingestione di β_2 GPI alimentare possa indurre nel bambino un'immunizzazione e quindi la produzione di anticorpi anti- β_2 GPI. Inoltre anche le infezioni virali e le vaccinazioni cui viene sottoposto il bambino durante il primo anno di vita possono indurre una risposta immune più o meno specifica, inclusa la produzione di anti- β_2 GPI (7, 8).

Per meglio definire le caratteristiche di anticorpi anti- β_2 GPI riscontrati in situazioni cliniche molto diverse tra loro, abbiamo valutato la fine specificità di questi anticorpi mediante l'utilizzo di kit ELISA sperimentali per la ricerca di anticorpi anti-D1 e anti-D4/5.

Per quanto riguarda i gruppi A e B (APS e MAS) abbiamo trovato che la popolazione anticorpale maggiormente rappresentata è costituita da anti-D1 (circa 70% dei soggetti).

Questo è in linea con quanto trovato in un recente studio internazionale multicentrico: in pazienti con APS il 55% mostrava positività per anticorpi anti-D1, a conferma di una significativa prevalenza di questi

anticorpi in soggetti che hanno manifestato eventi clinici correlati all'APS (15).

Il dato interessante riguarda i pazienti con LES e UCTD. Questi soggetti possiedono prevalentemente anticorpi anti-D1 proprio come i pazienti con APS, ma, a differenza di questi non hanno sviluppato durante la loro storia clinica eventi trombotici e/o ostetrici.

Probabilmente la spiegazione sta nel fatto che nei pazienti con MAS il potenziale patogeno di questi anticorpi potrebbe non essersi manifestato o per assenza di un "secondo stimolo" (*"The two hits hypothesis"*) (16) o per effetto di un'adeguata profilassi farmacologica nell'ambito della patologia di base.

Bisogna anche notare come circa il 20% dei pazienti di entrambi i gruppi siano risultati negativi per entrambi i domini.

Questo non deve sorprendere: dobbiamo infatti considerare che possano esistere anticorpi verso porzioni diverse della β_2 GPI (11, 17, 18).

Questa osservazione pone l'attenzione anche su un altro punto, infatti eventi clinici correlati con l'APS possono accadere anche in assenza di anticorpi anti-D1. Un riscontro di negatività per anticorpi anti-D1 può essere notevolmente influenzato dalla sensibilità della metodica di laboratorio utilizzata; inoltre, la clinica dell'APS, caratterizzata da eventi trombotici e/o ostetrici, è determinata da svariati fattori tra i quali, ma non solo, gli anti-D1.

Nel nostro precedente lavoro avevamo osservato una prevalenza di anti-D4/5 sia nei bambini ad un anno d'età nati da madri con MAS (13). Implementando la casistica, tale dato si riconferma: gli anti-D4/5 risultano presenti in circa il 30% dei soggetti. I titoli di anti-D4/5 erano inoltre significativamente maggiori degli anti-D1 in entrambi i gruppi. Bisogna comunque sottolineare che circa la metà dei soggetti erano negativi per entrambi i domini, probabilmente per un problema di cut-off calcolato su una popolazione adulta.

Questo studio dimostra come nelle MAS il pattern anticorpale sia prevalentemente rivolto verso il D1, senza che questa positività si manifesti dal punto di vista clini-

co. Inoltre, siamo in grado di confermare i nostri dati precedenti sia nei confronti dei bambini, dove si conferma una prevalente positività per gli anticorpi anti-D4/5 in entrambi i gruppi (bimbi ad un anno d'età e bimbi con DA), sia nei pazienti con APS, dove il dominio maggiormente rappresentato risulta essere il D1.

Sebbene il prevalente riscontro di anti-D4/5 nei bambini possa suggerire un loro profilo "innocente", i dati nelle APS non ci permettono nemmeno di escludere a priori una certa patogenicità degli anti-D4/5. Abbiamo infatti riscontrato anti-D4/5 isolati in tre pazienti con APS ad esclusivo interessamento ostetrico.

Dobbiamo infatti pensare alla possibilità che anche gli anti-D4/5, in presenza di adeguati "stimoli", possano mostrare una propria patogenicità e configurare un quadro patologico simile a quello mediato dagli anti-D1.

In conclusione, gli anticorpi anti-D1 sembrano essere tipici di condizioni sistemiche autoimmuni in generale, non solo dunque in eventi clinici APS correlati, in particolare le trombosi, come già descritto. Possiamo ipotizzare che nei pazienti con MAS il potenziale patogenetico di questi anticorpi possa essere mitigato o da un'adeguata profilassi farmacologica eseguita per altri motivi inerenti la malattia di base, o dall'assenza di agenti favorenti l'evento trombotico.

Nelle condizioni non autoimmuni, invece, il target principale per gli anticorpi anti- β_2 GPI sembra essere il D4/5.

L'utilità di studiare la fine specificità di anticorpi anti- β_2 GPI in termini di dominio 1 e dominio 4/5 potrebbe quindi consistere nell'inquadramento di una positività per anti- β_2 GPI nell'ambito di autoimmunità sistemica in quei soggetti che non abbiano una clinica tipica per APS.

Ringraziamenti

Vogliamo ringraziare tutti i genitori che hanno permesso ai loro figli di partecipare allo studio; un ringraziamento particolare al Dr. Filippo Sarra (IL, Milano, Italia) per la costante collaborazione nella consegna dei kit sperimentali anti-D1 e anti-D4/5.

RIASSUNTO

Gli anti- β_2 glicoproteina I sono criterio diagnostico per sindrome da antifosfolipidi (APS). Sono presenti anche in soggetti asintomatici, pazienti con malattie autoimmuni sistemiche (MAS) e bambini in età prescolare. Abbiamo arruolato soggetti positivi per IgG anti- β_2 GPI: 57 bambini di un anno, 33 bambini con dermatite atopica, 64 pazienti con APS e 34 pazienti con MAS, non APS. In condizioni di autoimmunità prevalgono soprattutto gli anti-D1: nelle MAS la patogenicità di questi anticorpi potrebbe non manifestarsi per assenza di un "secondo stimolo" o per effetto della profilassi farmacologica. Nei bambini invece troviamo prevalentemente anti-D4/5, anticorpi dal possibile profilo "innocente" reperibili in condizioni non-trombotiche.

Parole chiave: anticorpi anti- β_2 glicoproteina I; domini della β_2 glicoproteina I; malattie autoimmuni sistemiche.
Keywords: anti- β_2 glycoprotein I antibodies; domains of β_2 glycoprotein I; systemic autoimmune diseases.

■ BIBLIOGRAFIA

- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Tincani A, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
- Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanism. *Semin Thromb Haemost* 2008; 34: 236-50.
- Biggioggero M, Meroni PL. The geoepidemiology of the Antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Rev* 2010; 9: A299-304.
- Iverson MG, von Mühlen CA, Staub HL, Lassen AJ, Binder W, Norman GL. Patients with atherosclerotic syndrome, negative in anticardiolipin assays, make IgA autoantibodies that preferentially target domain 4 of β_2 GPI. *J Autoimm* 2006; 27: 266-71.
- Arvieux J, Renaudineau Y, Mane I, Perraut R, Krilis SA, Youinou P. Distinguishing features of anti-beta2 glycoprotein I antibodies between patients with leprosy and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2002; 87: 599-605.
- Ambrozic A, Avcin T, Ichikawa K, Kveder T, Matsuura E, Hojnik M, et al. Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Intern Immunol* 2002; 14: 823-30.
- Motta M, Chirico G, Biasini-Rebaioli C, Faden D, Lojaco A, Allegri F, et al. Anticardiolipin and Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in infants born to mothers with antiphospholipid antibody-positive autoimmune disease: a follow up study. *Am J Perinatol* 2006; 23: 247-51.
- Avcin T, Ambrozic A, Kuhar M, Kveder T, Rozman B. Anticardiolipin and anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in sera of 61 apparently healthy children at regular preventive visit. *Rheumatology* 2001; 40: 565-73.
- Tincani A, Filippini M, Scarsi M, Galli M, Meroni PL. European attempts for the standardisation of the antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2009; 18: 913-9.
- Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I - function in health and disease. *Thromb Res* 2004; 114: 335-46.
- Iverson GM, Victoria JE, Marquis DM. Anti- β_2 -glycoprotein I (beta₂GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta₂GPI. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15542-46.
- De Laat B, Derksen R, Urbanus R, De Groot P. IgG antibodies that recognize epitope gly40-arg43 in domain I of β_2 -glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005; 105: 1540-45.
- Andreoli L, Nalli C, Motta M, Norman GL, Shums Z, Encabo S, et al. Anti- β_2 -glycoprotein I IgG antibodies from 1-year-old healthy children born to mothers with systemic autoimmune diseases preferentially target domain 4/5: might it be the reason for their 'innocent' profile? *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 380-3.
- Balestrieri G, Tincani A, Spatola L, Allegri F, Prati E, Cattaneo R, et al. Anti-beta2 glycoprotein I antibodies. A marker of antiphospholipid syndrome? *Lupus* 1995; 4: 122-30.
- De Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IE, et al. The association between circulating antibodies against Domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1767-73.
- Shoenfeld Y, Meroni PL, Cervera R. Antiphospholipid syndrome dilemmas still to be solved: 2008 status. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 438-42.
- Shoenfeld Y, Krause I, Kvapil F, Sulkes J, Lev S, von Landenberg P, et al. Prevalence and clinical correlations of antibodies against six β_2 glycoprotein-I-related peptides in the Antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol* 2003; 23: 377-83.
- Blank M, Shoenfeld Y, Cabilly S, Heldman Y, Fridkin M, Katchalski-Katzir E. Prevention of experimental Antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5164-8.