



15.06.2024:

**Stellungnahme zu den ACR/EULAR-Klassifikationskriterien 2023
für das Antiphospholipid-Syndrom**

Die aktuellen ACR/EULAR-Klassifikationskriterien 2023 für das Antiphospholipid-Syndrom (APS) wurden vor kurzem veröffentlicht [1]. Sie ersetzen die vorherigen Kriterien aus dem Jahr 2006. Diese neuen Kriterien wurden in erster Linie für die Anwendung in klinischen Beobachtungsstudien und Studien entwickelt und umfassen sowohl die klinischen wie auch die labordiagnostischen Aspekte des APS. Für den Laborbereich wurden hier erstmals spezifische Empfehlungen für den „Antiphospholipid-Antikörper-Test unter Verwendung der Festphasenmethode“ ausgesprochen. Empfohlen wird, ausschließlich ELISA-Methoden für Anticardiolipin-IgG und -IgM und Anti-Beta-2-Glykoprotein-1-IgG und -IgM einzusetzen. Zudem werden feste Schwellenwerte für „mäßig positiv“ (40-79 U/ml) und „hoch positiv“ (≥ 80 U/ml) vorgeschlagen. Alternative Methoden, wie etwa automatisierte Messplattformen, werden ausdrücklich ausgeschlossen.

Unter Berücksichtigung der verfügbaren Literatur kann sich die Ständige Kommission Labor der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung diesen Empfehlungen für den Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern (APA) nicht anschließen.

Die STAEKOLA stellt vielmehr fest:

Jede CE/FDA-zertifizierte Nachweismethode kann zur Diagnostik von APA im Labor eingesetzt werden. Es gibt keine Evidenz, die für die bevorzugte Verwendung von ELISA-Verfahren spricht.

Jedes Labor sollte die 99. Perzentile einer Normalpopulation verwenden, um Entscheidungswerte (*cut-off*-Werte, Trennwert für die Entscheidung negativ versus positiv) für alle APA (Anticardiolipin-IgG und -IgM und Anti-Beta-2-Glykoprotein-1-IgG und -IgM) festzulegen. Diese kann auch den Validierungsunterlagen des Herstellers entnommen werden.

Die vorgeschlagenen, feststehenden Werte nach ACR/EULAR sollen nicht als medizinische Entscheidungsgrenzen verwendet werden. Von einer semiquantitativen Einteilung in „moderat positiv“ und „hoch positiv“ soll abgesehen werden. Diese Kategorien, ebenso wie die arbiträren Grenzwerte „40 U/ml“ und „80 U/ml“, sollen keine Verwendung finden.



Begründung:

Empfehlungen für die Untersuchung von APA mit ELISA- und Nicht-ELISA-Festphasentests sind in einem Leitfaden des LA/APA-Unterausschusses des ISTH-SSC zusammengefasst [2]. In vielen Laboratorien sind ELISA-Tests durch andere Methoden ersetzt worden, etwa den Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay (FEIA), Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) und Multiplex-Flow-Immunoassay (MFI). Diese automatisierten Systeme bieten den Vorteil, dass die Protokolle harmonisiert sind, was Unterschiede zwischen den Laboren verringert [3,4]. Auch zeigt eine Auswertung von Ringversuchsergebnissen, dass Ergebnisse automatisierter Plattformen durchweg eine bessere Präzision aufweisen als ELISA-Teste (der Variationskoeffizient liegt im Durchschnitt bei 13 % statt bei 25 %) [5].

Es gibt grundsätzlich eine breite Variabilität bei Ergebnissen immunologischer Tests, sowohl von ELISA- als auch von Nicht-ELISA-Testverfahren. Ursächlich dafür sind die Antigenquelle und die Art der Antigenpräparation und -fixierung. Diese kann zwischen den Methoden und Herstellern, aber auch zwischen den Chargen ein und desselben Testsystems, Unterschiede aufweisen. Diese immunologische Variabilität beeinflusst sowohl die Einstufung einer Probe als positiv oder negativ wie auch die Antikörperkonzentration, die in der Probe gemessen wurde. Klinische Studien, Vergleiche externer Qualitätskontrollen und Experimente mit monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlicher Reaktivität gegenüber β 2GPI zeigen Unterschiede sowohl in ELISA- wie auch in Nicht-ELISA-Methoden [4,6-11].

Die mangelnde Standardisierung bleibt die wichtigste Einschränkung der APA-Diagnostik, da für die Methodenkalibration kein universelles internationales Referenzmaterial für die Messung von APA zur Verfügung steht. Verschiedene Referenzmaterialien wurden entwickelt, aber keines davon wurde allgemein akzeptiert [12]. Vom Patienten stammendes Material kann in seiner Reaktivität von Charge zu Charge variieren, und monoklonale Antikörper sind möglicherweise nicht repräsentativ für die Reaktivität der polyklonalen Antikörper des Patienten und auch nicht in allen Methoden immer nachweisbar. Von Patienten stammendes Referenzmaterial (für Anti-Beta-2-Glykoprotein-1) zeigte kürzlich eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen, die mit sieben verschiedenen ELISAs untersucht wurden [13]. Eine Auswertung von Ringversuchsmaterial ergab aber hingegen, dass die verschiedenen ELISA-Verfahren keine vergleichbaren Resultate lieferten [5]. Es bleibt festzuhalten, dass die qualitative Übereinstimmung (positiv/negativ) zwischen den Testverfahren suboptimal ist [6], und die tägliche Praxis zeigt, dass eine Probe, die in einer Methode oder einem Test positiv ist, nicht auch in einer anderen Methode oder einem anderen Test (oder in einem anderen Labor unter Verwendung derselben Methode) positiv getestet werden



muss. So zeigt auch der Vergleich der Ringversuchsergebnisse [5], dass verschiedenen ELISA-Tests keine vergleichbaren Ergebnisse für dieselbe Probe liefern. Vielmehr zeigen sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Herstellern.

Die verwendeten Festphasen und die eingesetzten Reportersysteme (etwa Kunststoff, Latex- oder magnetische Partikel; Enzyme und Substrate; sowie Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz) könnten neben den verwendeten Antigenen zusätzlich zur hohen Variabilität beitragen.

Diese grundsätzlichen Probleme (also Antigenpräparation, fehlendes universelles Referenzmaterial und Testaufbau) gelten dabei für ELISA- und Nicht-ELISA-Methoden gleichermaßen und rechtfertigen es keinesfalls, dass die Verwendung einer bestimmten Methode besonders empfohlen wird.

Die 2023 ACR/EULAR-Klassifikationskriterien betrachten Werte unter 40 U/ml, aber über dem Entscheidungswert als „niedrig positiv“ oder „schwach positiv“. Sie sind deshalb nach diesen Kriterien als unzureichend für eine APS-Klassifizierung (selbst bei entsprechendem klinischem Profil) anzusehen. Dieses Vorgehen entspricht nicht mehr den klassischen APS-Kriterien. Wir empfehlen dringend, dass jedes Labor die 99. Perzentile einer Normalpopulation verwendet, um den Entscheidungswert für Anticardiolipin-IgG und -IgM und Anti-Beta-2-Glykoprotein-1-IgG und -IgM zu bestimmen [2]. Diese kann auch den Validierungsunterlagen des Herstellers entnommen werden, wenn es dafür keine wesentlichen Hinderungsgründe gibt (wie etwa eine stark abweichende Populationszusammensetzung zwischen der Validierungskohorte und der vom Labor versorgten Patientenkohorte; davon ist in Deutschland, Österreich und der Schweiz in der Regel nicht auszugehen).

Wir weisen darauf hin, dass Hochrisikopatienten mit definitivem APS in der Regel APA haben, die weit über 40 U/ml liegen. Wir weisen aber auch darauf hin, dass niedrigere Werte von APA (>95. und <99. Perzentile) bei Patientinnen mit Schwangerschaftsmorbidität berichtet wurden [14], und dass eine klinische Relevanz dieser Antikörper nicht ausgeschlossen werden kann.

Antikörperkonzentrationen werden aus den Kalibrationskurven der einzelnen Methoden und Testverfahren abgeleitet und unterscheiden sich zwischen den Methoden und zwischen den Testverfahren [2]. Dies führt zu unterschiedlichen Resultaten, die mit verschiedenen Testsystemen erzielt werden, wobei die Antikörperkonzentrationen bei neueren automatischen Testsystemen im Vergleich zu den Resultaten im ELISA meist deutlich höher ausfallen [6,15]. Schon die ISTH-Leitlinie von 2018 rät von der semiquantitativen Gruppierung bei der Bewertung von APA-Ergebnissen aus diagnostischen Gründen ab, da ein

numerischer Wert nicht als allgemeines Kriterium für mittel- oder hochpositiv empfohlen werden kann, wenn dieser Wert von der verwendeten Methode (oder dem verwendeten Test) abhängig ist [16]. Auch der Vergleich von Ringversuchsergebnissen zeigt, dass eine Unterscheidung in semiquantitative Gruppen angesichts der beobachteten Schwankungen, selbst innerhalb der Gruppe der ELISAs, nicht vertretbar ist. In den ausgewerteten ECAT-Ringversuchen wurden mit einer einzigen Probe von Laboratorien, die denselben ELISA-Test verwendeten, Ergebnisse über eine große Spannweite erzielt, die sowohl zu negativen Ergebnissen als auch zu „moderat positiven“ oder sogar „hoch positiven“ Ergebnissen führten [5]. Neben der Tatsache, dass diese Kategorisierung methodisch falsch ist, täuscht sie auch eine Befundvalidität vor, die aufgrund der Intraassay- und Interassay-Variabilität gar nicht gegeben ist.

Literatur

- [1] Barbhaiya M, Zully S, Naden R, Hendry A, Manneville F, Amigo MC, Amoura Z, Andrade D, Andreoli L, Artim-Esen B, Atsumi T, Avcin T, Belmont HM, Bertolaccini ML, Branch DW, Carvalho G, Casini A, Cervera R, Cohen H, Costedoat-Chalumeau N, Crowther M, de Jesus G, Delluc A, Desai S, Sancho M, Devreese KM, Diz-Kucukaya R, Duarte-Garcia A, Frances C, Garcia D, Gris JC, Jordan N, Leaf RK, Kello N, Knight JS, Laskin C, Lee AI, Legault K, Levine SR, Lew RA, Limper M, Lockshin MD, Mayer-Pickel K, Musial J, Meroni PL, Orsolini G, Ortel TL, Pengo V, Petri M, Pons-Estel G, Gomez-Puerta JA, Raimboug Q, Roubey R, Sanna G, Seshan SV, Sciascia S, Tektonidou MG, Tincani A, Wahl D, Willis R, Yelnik C, Zully C, Guillemin F, Costenbader K, Erkan D, Collaborators AEACC. 2023 ACR/EULAR antiphospholipid syndrome classification criteria. *Ann Rheum Dis*. 2023;82(10):1258-1270.
- [2] Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL, Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/D dependent A. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2014;12(5):792-795.
- [3] Devreese KM, Poncet A, Lindhoff-Last E, Musial J, de Moerloose P, Fontana P. A multicenter study to assess the reproducibility of antiphospholipid antibody results produced by an automated system. *J Thromb Haemost*. 2017;15(1):91-95.
- [4] Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A, Italian Federation of Anticoagulation C. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res*. 2007;120(1):127-133.
- [5] Huisman A, Urbanus RT, Meijer P. Antiphospholipid antibody solid phase-based assays: problems and proposed solutions for the 2023 ACR/EULAR classification criteria for antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2024;22(3):874-876.
- [6] Chayoua W, Kelchtermans H, Moore GW, Gris JC, Musial J, Wahl D, Zully S, Gianniello F, Fontana P, Remijn J, Urbanus RT, de Laat B, Devreese KMJ. Detection of Anti-Cardiolipin and Anti-beta2glycoprotein I Antibodies Differs between Platforms without Influence on Association with Clinical Symptoms. *Thromb Haemost*. 2019;119(5):797-806.
- [7] Chayoua W, Kelchtermans H, Moore GW, Musial J, Wahl D, de Laat B, Devreese KMJ. Identification of high thrombotic risk triple-positive antiphospholipid syndrome patients is dependent on anti-cardiolipin and anti-beta2glycoprotein I antibody detection assays. *J Thromb Haemost*. 2018;16(10):2016-2023.
- [8] Devreese K, Kelchtermans H, de Laat B. Differences in sensitivity of two automated panels for anticardiolipin and anti-beta2glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome due to the exposure of the domain I epitope of beta2glycoprotein I on the solid phase. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2014;12:55.
- [9] Pelkmans L, Kelchtermans H, de Groot PG, Zully S, Regnault V, Wahl D, Pengo V, de Laat B. Variability in exposure of epitope G40-R43 of domain I in commercial anti-beta2-glycoprotein I IgG ELISAs. *PLoS One*. 2013;8(8):e71402.
- [10] Favaloro EJ, Wheatland L, Jovanovich S, Roberts-Thomson P, Wong RC. Internal quality control and external quality assurance in testing for antiphospholipid antibodies: Part I-- Anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(4):390-403
- [11] Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A, Italian Federation of Anticoagulation C. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res*. 2007;120(1):127-133.
- [12] Devreese KMJ, Zully S, Meroni PL. Role of antiphospholipid antibodies in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J Transl Autoimmun*. 2021;4:100134.
- [13] Monogioudi E, Martos G, Sheldon J, Meroni PL, Trapmann S, Zegers I. Development of a certified reference material for anti-beta2-glycoprotein I IgG - commutability studies. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2021;59(2):325-332.
- [14] Pregnolato F, Gerosa M, Raimondo MG, Comerio C, Bartoli F, Lonati PA, Borghi MO, Acaia B, Ossola MW, Ferrazzi E, Trespidi L, Meroni PL, Chighizola CB. EUREKA algorithm predicts obstetric risk and response to treatment in women with different subsets of anti-phospholipid antibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2021;60(3):1114-1124.
- [15] Montaruli B, De Luna E, Erroi L, Marchese C, Mengozzi G, Napoli P, Nicolo C, Romito A, Bertero MT, Sivera P, Migliardi M. Analytical and clinical comparison of different immunoassay systems for the detection of antiphospholipid antibodies. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(2):172-182.
- [16] Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B, Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid A. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2018;16(4):809-813.

Autoren der Stellungnahme:

Ulrich J. Sachs (Gießen/Marburg), Ingvild Birschmann (Bad Oeynhausen), Dirk Peetz (Berlin), Ute Scholz (Leipzig), Thomas Siegemund (Magdeburg), Jens Müller (Bonn).