

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Autoreferát disertační práce

Antifosfolipidové protilátky a jejich

význam

u tromboembolické nemoci



Plzeň 2009

Doktorský studijní program na Lékařské fakultě

Univerzity Karlovy v Plzni

Forma studia: kombinovaná

Obor: vnitřní nemoci

Předseda komise pro obhajobu disertačních prací v oboru vnitřní nemoci: prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

Doktorand: MUDr. Jana Hirmerová

Školitelé:

Prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc., II.interní klinika LF UK Plzeň

Doc. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, CSc.,
Gynekologicko-porodnická klinika LF UK Plzeň

Pracoviště: II.interní klinika Lékařské fakulty University Karlovy a Fakultní nemocnice v Plzni

Oponenti:

Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, 2. interní klinika LFUK a FN v Hradci Králové

MUDr. Karel Roztočil, CSc.

Klinika kardiologie IKEM, Praha

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba disertace před komisí pro obhajoby
disertačních prací v oboru vnitřní lékařství se koná

.....
Místo obhajoby:

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu LF
UK v Plzni, Husova 3

Obsah

Souhrn.....	5
Summary.....	7
Příloha č.1. Hirmerová J. Optimální délka antikoagulační léčby po žilní tromboembolické příhodě: obecný či individualizovaný přístup? Vnitř Lék 2007;53:662-668.....	9
Příloha č. 2. Hirmerová J. Antifosfolipidový syndrom a jeho projevy v tepenném a žilním systému. Cor Vasa 2005;47(5):187-194.....	11
Příloha č. 3. Hirmerova J, Ulcova-Gallova Z, Seidlerova J, Filipovsky J, Bibkova K, Micanova Z, Mayer O Jr. Laboratory evaluation of antiphospholipid antibodies in patients with venous thromboembolism. Clin Appl Thromb Hemost – přijato k publikaci.....	12
Vlastní výsledky - rozbor provedené studie výskytu antifosfolipidových protilátek u nemocných s tromboembolickou nemocí.....	14
Literatura.....	19

Souhrn

Vyšetřovací proces po žilní tromboembolické příhodě zahrnuje zobrazovací i laboratorní metody, jeho cílem je nejen diagnostika a sledování vývoje onemocnění, ale i pokud možno objasnění příčiny. Není-li zřejmý klinický vyvolávající faktor, je vhodné pátrat jednak po skryté malignitě, jednak po trombofilii. Z praktického hlediska jsou významné zejména ty trombofilní stavy, které zvyšují riziko recidivy, a mohou tedy hrát roli při rozhodování o délce antikoagulační léčby (obvykle warfarinem) po příhodě. Nejčastější z vrozených trombofilních stavů však zvyšují riziko recidivy jen mírně a jejich průkaz většinou není indikací k prodloužení warfarinizace (1-3).

Antifosfolipidový syndrom (APS) je získaným trombofilním stavem a je spojen s významně vyšším rizikem recidivy tromboembolické nemoci, a to zejména po vynechání antikoagulační léčby (4-8). Laboratorní diagnostika APS je založena jednak na koagulačním vyšetření tzv. lupus antikoagulans, jednak na sérologickém průkazu antifosfolipidových protilátek (APA) (9-10). APA jsou velmi heterogenní, za diagnostické jsou považovány antikardiolipinové protilátky (ACA) a nově též protilátky proti β 2-glykoproteinu I (anti- β 2-GPI) (11). Někteří autoři však považují za důležité i další podskupiny APA (12-22).

Naše práce byla zaměřena na prevalenci nejen ACA, anti- β 2-GPI, ale i dalších, „nediagnostických“ APA - proti fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, fosfatidylinositolu, fosfatidyletanolaminu (anti-phE), kyselině fosfatidové v isotypu IgG a IgM u pacientů po

prodělané žilní tromboembolické příhodě. Prokázali jsme statisticky významně vyšší prevalenci protilátek IgM - ACA, IgG - anti- β 2-GPI, IgM – anti-phE. Naše výsledky tedy jednak podporují začlenění anti- β 2-GPI do nových diagnostických kritérií APS, jednak připouštějí potenciální význam vyšetření anti-phE – zejména u nemocných s klinickým podezřením na APS, avšak s negativním výsledkem testů na „diagnostické“ APA. Tyto výsledky by bylo jistě vhodné ověřit v rozsáhlejší a prospektivní studii.

Summary

The diagnostic workup in patients with venous thromboembolism (VTE) consists of imaging methods as well as laboratory assays and concentrates not only on diagnostic and follow-up procedures but also on the evaluation of the possible cause of VTE event. In the absence of an obvious clinical provoking factor, occult malignancy or thrombophilic disorder should be searched for. From the practical point of view, the most relevant are those thrombophilic states that are associated with an increased risk of recurrence and may therefore play a role in the decision about the length of the anticoagulation therapy (usually with warfarin) following the event. However, the most common inherited thrombophilic disorders are associated with only mildly increased risk of VTE recurrence and their detection does not usually warrant prolonged warfarin therapy.

Antiphospholipid syndrome (APS) is an acquired thrombophilic state with a significantly higher risk of VTE recurrence, especially after warfarin withdrawal. The laboratory diagnostics of APS consists of coagulation assays (detection of lupus anticoagulans) as well as serologic tests of antiphospholipid antibodies (APA). APAs are very heterogeneous and only some of them are considered “diagnostic” – anticardiolipin antibodies (ACA) and newly also antibodies against β 2-glycoprotein I (anti- β 2-GPI). Some authors, however, consider some other subgroups of APAs significant, too.

The aim of our study was to assess the prevalence of not only ACA and anti- β 2-GPI but also “nondiagnostic” APA - antibodies against

phosphatidylserine, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine (anti-phE), phosphatidic acid - in both IgG and IgM isotypes in patients after a VTE event. We have confirmed statistically higher prevalence of IgM - ACA, IgG - anti- β 2-GPI and also IgM - anti-phE. Our results thus support the inclusion of anti- β 2-GPI assays into the newly revised APS diagnostic criteria and suggest the potential utility of anti-phE testing, especially in the case of strong clinical suspicion of APS with the absence of “diagnostic” APA. Nevertheless, these results deserve further evaluation in a larger and prospective study.

Přílohy disertační práce:

Příloha č. 1

Hirmerová J. Optimální délka antikoagulační léčby po žilní tromboembolické příhodě: obecný či individualizovaný přístup? Vnitř Lék 2007;53:662-668 (souhrnný článek)

Souhrn: Po tromboembolické příhodě je indikována dlouhodobá perorální antikoagulační léčba. Délka jejího trvání by měla být výsledkem porovnání rizika recidivy a rizika krvácivých komplikací. Minimální doba léčby jsou 3 měsíce, přičemž v určitých případech ji lze zkrátit, u mnoha pacientů je však na místě léčba delší. Zásadní vliv na rozhodnutí o trvání léčby má přítomnost či absence vyvolávajícího faktoru a jeho povaha. Pacienti s tromboembolickou příhodou vyvolanou přechodným (reverzibilním) rizikovým faktorem (operace, úraz, léčba estrogeny apod.) mají riziko recidivy velmi nízké a je pro ně dostatečná tříměsíční léčba. V ostatních případech je vhodná léčba prodloužená, většinou alespoň 6-12 měsíců. Je nutno posoudit i typ a rozsah příhody a počet eventuálních předchozích epizod. Pacienti s maligním onemocněním mají výrazně vyšší riziko recidivy a nejvýhodnější je pro ně dlouhodobá léčba nízkomolekulárním heparinem. Riziko recidivy zvyšuje i mužské pohlaví, některé trombofilie a podle některých studií i přítomnost reziduálního trombu v žíle. Významnou pomocí při určování délky léčby může být D-dimer test před vynecháním léčby a zejména 1 měsíc po jejím vynechání. Negativní výsledek testu znamená velmi nízké riziko recidivy, při pozitivním výsledku je

riziko recidivy vysoké a je vhodné zvážit eventuální obnovení antikoagulační léčby. Rozhodnutí o délce léčby je složitým procesem, v němž by se měla uplatňovat mezioborová spolupráce.

Příloha č. 2

Hirmerová J. Antifosfolipidový syndrom a jeho projevy v tepenném a žilním systému. *Cor Vasa* 2005;47(5):187-194 (souhrnný článek)

Souhrn: Pojem „antifosfolipidový syndrom“ označuje asociaci mezi přítomností antifosfolipidových protilátek se syndromem hyperkoagulability. Antifosfolipidové protilátky jsou velmi heterogenní skupinou autoproti látek, jejich laboratorní diagnostika je založena jednak na testech ELISA, jednak na koagulačních testech k průkazu tzv. lupus antikoagulans. Základní klinická kritéria antifosfolipidového syndromu jsou trombotické projevy a komplikace gravidity. Klinické manifestace však mohou být různorodé a zasahovat do různých oborů, včetně kardiologie, angiologie a flebologie. Mnohé studie potvrdily souvislost antifosfolipidových protilátek a infarktu myokardu, ischemické cévní mozkové příhody, chlopňových vad a žilního tromboembolizmu. Důležitá je otázka sekundární prevence u nemocných s antifosfolipidovým syndromem po prodělané trombóze. Bylo prokázáno vysoké riziko recidivy trombózy po vynechání antikoagulační léčby. Indikována je dlouhodobá warfarinizace s cílovým INR 2-3, existují však i názory, že někteří pacienti s antifosfolipidovým syndromem by mohli profitovat z intenzivnější antikoagulační léčby. Patofyziologie syndromu zatím nebyla uspokojivě vysvětlena.

Příloha č. 3

Hirmerova J, Ulcova-Gallova Z, Seidlerova J, Filipovsky J, Bibkova K, Micanova Z, Mayer O Jr. Laboratory evaluation of antiphospholipid antibodies in patients with venous thromboembolism. Clin Appl Thromb Hemost – přijato k publikaci. IF 1,008 (původní práce)

Summary: Of antiphospholipid antibodies (APA), only anticardiolipin antibodies (ACA), lupus anticoagulant and newly also anti-beta 2 glycoprotein I (anti-β2-GPI) are established laboratory criteria for antiphospholipid syndrome (APS). The objective of our study was to evaluate the significance of extended antiphospholipid profile in patients with venous thromboembolism (VTE) without systemic lupus erythematosus (SLE) or any other systemic autoimmune disease.

In 140 patients (age 18-69 years; 47.1% men) with VTE and 136 control subjects we tested ACA, anti-β2-GPI and non-criteria APA: anti-phosphatidic acid, anti-phosphatidylethanolamine (anti-pE), anti-phosphatidylglycerol, anti-phosphatidylinositol, anti-phosphatidylserine. Commercial and in-house ELISA assays were used.

The antibodies with significantly higher prevalence in patients (compared to controls) were: IgM - ACA (n=18; 12.9%; p=0.035), IgG - anti-β2-GPI (n=23; 16.4%; p=0.0032), IgM - anti-pE (n=20; 14.3%; p=0.014). In most cases, ACA and anti-β2-GPI antibodies did not overlap. Moreover, 12 of the 20 patients with IgM - anti-pE had neither ACA nor anti-β2-GPI. In conclusion, of non-criteria APA, only anti-pE were significantly more

prevalent in non-SLE patients with VTE, with only minor overlapping with the criteria APA .

Our results suggest the possible utility of searching for anti-pE in the clinical suspicion of APS and the absence of criteria APA. However, the significance of anti-pE should be proved in larger and prospective studies.

Vlastní výsledky - rozbor provedené studie výskytu antifosfolipidových protilátek u nemocných s tromboembolickou nemocí

Cíl studie: Cílem naší studie bylo ověřit význam vyšetření rozšířeného profilu APA u skupiny pacientů s TEN bez systémového lupus erythematoses (SLE) či jiného autoimunitního onemocnění.

Metody: Soubor tvořilo 140 pacientů (věk 18-69 let; 47,1% mužů), vyšetřených v ambulanci pro trombózu po prodělané tromboembolické příhodě. Kromě pečlivé anamnézy, zaměřené především na upřesnění klinického vyvolávajícího momentu TEN, konkomitanti medikaci a onemocnění, jsme stanovili body mass index (BMI) a provedli laboratorní vyšetření – jednak rutinní testy (krevní obraz, jaterní a renální testy, glykémii, celkový cholesterol a triglyceridy), jednak testy na trombofilní stav. Kontrolní soubor zahrnoval 136 osob odpovídajícího věku a pohlaví (zdravých dárců krve či představitelů obecné populace s negativní anamnézou žilní či arteriální příhody, bez autoimunitního či maligního onemocnění). U obou souborů jsme vyšetřili ACA, anti-β2-GPI a „nediagnostické“ APA: proti fosfatidylserinu, fosfatidylglycerolu, fosfatidylinositolu, fosfatidyletanolaminu (anti-phE), kyselině fosfatidové v isotypu IgG a IgM. Použili jsme komerční testy (ACA, anti-β2-GPI) a „in-house“ ELISA testy (ostatní APA). Statistické zpracování bylo provedeno pomocí t-testu a Fisherova testu, dále pak Mann-Whitney U testu, ROC (receiver operator curve) analýzy a výpočtu „poměru šancí“ (odds ratio - OR).

Výsledky: 48,6% nemocných mělo „nevyprovokovanou“ tromboembolickou příhodu (resp. TEN bez jasného provokujícího faktoru), 23,6% nemocných mělo příhodu „nevysvětlenou“, tj. bez jakékoli známé příčiny, resp. bez provokujícího faktoru i bez trombofilie. U 12,1% byla v minulosti dokumentována také arteriální příhoda (akutní koronární syndrom, ischemická cévní mozková příhoda či periferní tepenný uzávěr).

Vyšší prevalence APA (resp. hodnoty nad 95. percentil kontrolního souboru) byla zjištěna pro **IgM - ACA** (n=18; 12.9%; p=0.035), **IgG - anti-β2-GPI** (n=23; 16.4%; p=0.0032), **IgM - anti-phE** (n=20; 14.3%; p=0.014). Ve většině případů nebyla prokázána zkřížená reaktivita ACA a anti-β2-GPI. 12 z 20 pacientů s prokázanými IgM - anti-phE nemělo ani ACA, ani anti-β2-GPI a u 9 z nich byla IgM - anti-phE jedinou nalezenou antifosfolipidovou protilátkou, tedy nebyla u nich zjištěna ani žádná jiná nonkardiolipinová protilátka.

Dále jsme hodnotili význam jednotlivých APA pomocí ROC analýzy. Výsledky byly signifikantní pro protilátky **IgG - anti-β2-GPI** (AUC 0,743) a **IgM - anti-phE** (AUC 0,621), avšak nikoli pro IgM - ACA (AUC 0,486). Také výsledné hodnoty OR byly významné pouze pro **IgG - anti-β2-GPI** (OR 1.271; 95% CI 1.156-1.398) a **IgM - anti-phE** (OR 1.194; 95% CI 1.084-1.315), pro IgM - ACA nedosáhly statistické významnosti (OR 1.082; 95% CI 0.909-1.287).

Nebyly prokázány signifikantní rozdíly v prevalenci APA mezi jednotlivými podskupinami pacientů (muži oproti ženám; TEN s jasným provokujícím faktorem versus TEN „nevyprovokovaná“; pacienti se současnou anamnézou arteriálních příhod

oproti pacientům bez takovéto anamnézy; TEN s identifikovatelnou příčinou versus TEN „nevysvětlená“).

Diskuze: Naše výsledky mohou přispět k debatě o laboratorních kritériích APS ve 2 směrech:

➤ jednak jsme zjistili signifikantně vyšší prevalenci anti-β2-GPI u pacientů s TEN, a to ve většině případů bez současné positivity ACA. V tomto směru tedy naše výsledky podporují začlenění anti-β2-GPI do nových diagnostických kritérií APS (11). Na tuto problematiku stále existují rozporné názory (23-25).

➤ z „nediagnostických“ APA byla v našem souboru zjištěna vyšší prevalence IgM – anti-phE, jen s nevelkou zkříženou reaktivitou s „diagnostickými“ APA. Naše výsledky tedy připouštějí potenciální význam vyšetření anti-phE u nemocných s klinickým podezřením na APS, avšak s negativním výsledkem testů na „diagnostické“ APA. Bylo by jistě vhodné ověřit tyto výsledky ve velké prospektivní studii.

Limitace: naše studie má určité limitace, pro které je třeba výsledky interpretovat s jistou opatrností.

- vzhledem k relativně malé velikosti našeho souboru jsme jako cut-off zvolili 95.percentil hodnot kontrolní skupiny, ačkoli jsme si vědomi, že pro „diagnostické“ APA jsou v kritériích doporučeny jako pozitivní až titry nad 99.percentil. V naší práci jsme se však zabývali hlavně výzkumem „nediagnostických“ APA, pro něž zatím nejsou závazná doporučení ohledně cut-off a v provedených studiích jiných autorů byly použity rozličné hodnoty cut-off.

- Dosud nebylo provedeno opakované testování

na přítomnost APA, proto nelze s jistotou hodnotit jejich pozitivitu jako trvalou. Pozitivita APA může být pouze přechodná, např. v souvislosti s infekčním onemocněním, proto je v diagnostických kritériích stanovena nutnost opakovaného průkazu LA, ACA či anti- β 2-GPI s intervalem mezi náběry alespoň 12 týdnů (11). Plánujeme však opakované vyšetření pacientů s pozitivními ACA, anti- β 2-GPI a antiphE.

- Nepodařilo se nám prokázat rozdíly v prevalenci APA mezi jednotlivými podskupinami pacientů (viz výše), což však může být způsobeno malou velikostí těchto podskupin.

- U většiny pacientů nebylo provedeno vyšetření na LA. LA je považováno za nejsilnější prediktor trombózy (26), a bylo by tedy zajímavé korelovat asociaci LA s jednotlivými APA. Naprostá většina pacientů byla však na warfarinu, a proto by testování LA bylo značně obtížné.

Závěr: ve skupině pacientů s TEN bez SLE jsme prokázali vyšší prevalenci protilátek IgM - ACA, IgG - anti- β 2-GPI a také IgM - anti-phE.

V této souvislosti je třeba si uvědomit, že v nových diagnostických kritériích APS už je doporučováno vyšetření protilátek **anti- β 2-GPI**. V naší studii byla zjištěna významně vyšší prevalence těchto protilátek u nemocných s TEN oproti kontrolnímu souboru. Testy na anti- β 2-GPI však zatím nejsou v našich podmínkách běžnou součástí vyšetření na APS. Je vhodné zvážit jejich zavedení do praxe, alespoň na vybraných pracovištích, např. ve specializovaných centrech.

Pokud jsou výsledky „diagnostických“ APA (tj. ACA, anti- β 2-GPI) negativní a vyšetření na LA je buď také negativní, nebo z důvodů antikoagulační léčby dosud nebylo provedeno a příčina TEN nebyla jinými vyšetřeními (tj. onkologickým screeningem ani jinými testy na trombofilii) objasněna, přichází v úvahu ještě vyšetření „nediagnostických“ APA. Dle našich výsledků se zdá, že ze širokého spektra APA si protilátky *anti-phE* zaslouží další pozornost a jejich význam by měl být zhodnocen ve *větší a prospektivní studii*.

Literatura

1. Schulman S, Ögren M. New concepts in optimal management of anticoagulant therapy for extended treatment of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2006;96:258-66.
2. Lindhoff-Last E, Luxembourg B. Evidence-based indications for thrombophilia screening. *VASA* 2008;37:19-30.
3. Ho WK, Hankey GJ, Quinlan DJ, Eikelboom JW et al. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia. *Arch Intern Med* 2006;166:729-36.
4. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med* 2002;346:752-763
5. Kearon C, Gent M, Hirsch J et al. A comparison of three months of anticoagulation with extended anticoagulation for a first episode of idiopathic venous thromboembolism. *N Engl J Med* 1999;340:901-7.
6. Kearon C, Kahn SR, Agnelli G et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*. 2008 Jun;133(6 Suppl):454S-545S.
7. Schulman S, Svenungsson E, Granqvist S. Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. *Am J Med* 1998;104:332-338.
8. Schulman S, Ögren M. New concepts in optimal management of anticoagulant therapy for extended treatment of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2006;96:258-66.
9. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulans: an update. *Thromb. Haemost.* 1995;74:1185-90
10. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11
11. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.

12. Gilman-Sachs A, Lubinski J, Beer AE et al. Patterns of anti-phospholipid antibody specificities. *J Clin Lab Immunol* 1991;35:83-8.
13. Laroche P, Berard M, Rouquette AM et al. Advantage of using both anionic and zwitterionic phospholipid antigens for the detection of antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol* 1996;106:549-54.
14. López-Soto A, Cervera R, Font J et al. Isotype distribution and clinical significance of antibodies to cardiolipin, phosphatidic acid, phosphatidylinositol and phosphatidylserine in systemic lupus erythematosus; prospective analysis of a series of 92 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:143-9.
15. Toschi V, Motta A, Castelli C, et al. High prevalence of antiphosphatidylinositol antibodies in young patients with cerebral ischemia of undetermined cause. *Stroke* 1998;29:1759-1764.
16. Sanmarco M, Alessi M-C, Harle JR et al. Antibodies to Phosphatidylethanolamine as the only Antiphospholipid Antibodies Found in Patients with Unexplained Thromboses. *Thromb. Haemost* 2001;85:800-5.
17. Biron-Andréani C, Mallol C, Vergnes C et al. Thrombosis and antiphospholipid antibodies in non-SLE patients: predictive value of antiphosphatidylserine antibodies. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:194
18. Desauw C, Hachulla E, Boumbar Y. Syndrome des antiphospholipides avec anticorps antiphosphatidyléthanolamine isolés: á propos de 20 cas. *Rev Méd Interne* 2002;23:357-63.
19. Musial J, Swadzba J, Motyl A, Iwaniec T., et al. Clinical significance of antiphospholipid protein antibodies. Receiver operating characteristics plot analysis. *J Rheumatol* 2003;30:723-30.
20. López-Soto A, Cervera R, Font J et al. Isotype distribution and clinical significance of antibodies to cardiolipin, phosphatidic acid, phosphatidylinositol and phosphatidylserine in systemic lupus erythematosus; prospective analysis of a series of 92 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:143-9.
21. Sahin M, Duzgun N, Tunc SE, Tutkak H. Clinical manifestations and antiphosphatidylserine antibodies in patients

- with systemic lupus erythematosus: is there an association? *Clin Rheumatol* 2007;26:154-60
22. Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. *Thromb Haemost* 2007;97:949-954.
 23. Lackner KJ, Peetz D, von Landenberg P. Revision of the Sapporo criteria for the antiphospholipid syndrome – Coming to grips with evidence and Thomas Bayes? *Thromb Haemost* 2006;95:917-9.
 24. Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, et al. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WAPS (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. *Blood* 2007;110:1178-1183.
 25. Galli M, Reber G, de Moerloose P, de Groot PG. Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008;6:399-401.
 26. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factor of thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 2003;101:1827-32.