

## „NON-CRITERIA” АНТИФОСФОЛИПИДНИ АНТИТЕЛА И „NON-CRITERIA” КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ЗА ДИАГНОЗАТА АНТИФОСФОЛИПИДЕН СИНДРОМ

М. Николова-Влахова<sup>1</sup> и М. Балева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска”, Катедра по вътрешни болести, Медицински университет – София

<sup>2</sup>Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска” – София

## „NON-CRITERIA” ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES AND „NON-CRITERIA” CLINICAL SYMPTOMS FOR THE DIAGNOSIS OF ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

M. Nikolova-Vlahova<sup>1</sup> and M. Baleva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, University Hospital “Alexandrovska”, Department of Internal Diseases, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Clinic of Clinical Immunology, University Hospital “Alexandrovska” – Sofia

<b>Резюме:</b>	През последните години се обсъжда въпросът за т.нар. “non-criteria” антифосфолипидни антитела (aPL) и “non-criteria” клинични симптоми на антифосфолипидния синдром (APS). Натрупаха се много данни, които показват че aPL са хетерогенна група антитела, различни от тези срещу кардиолипин (aCL), бета-2-гликопротеин I (aB2GPI) и лупусен антикоагулант (LA). Въведе се терминът „серонегативен APS” (SN-APS). Обсъдени са аргументите „за” и „против” тази диагноза.
<b>Ключови думи:</b>	антифосфолипиден синдром, серонегативен антифосфолипиден синдром
<b>Адрес за кореспонденция:</b>	Милена Николова-Влахова, Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска”, ул. Св. Г. Софийски 1, 1431 София; e-mail: milena_i_dani@abv.bg
<b>Summary:</b>	In the last years the question about the so called “non-criteria” antiphospholipid antibodies (aPL) and “non-criteria” clinical symptoms of Antiphospholipid syndrome (APS) has been discussed. Many data show that aPL are a heterogeneous group of antibodies, different from antibodies to cardiolipin (aCL), beta-2-glycoprotein I (aB2GPI) and lupus anticoagulant (LA). The diagnosis of “seronegative APS” (SN-APS) has been introduced. The arguments “for” and “against” this diagnosis have been discussed.
<b>Key words:</b>	antiphospholipid syndrome, seronegative antiphospholipid syndrome
<b>Address for correspondence:</b>	Milena Nikolova-Vlahova, Department of Nephrology, University Hospital “Aleksandrovska”, 1. Sv. G. Sofiyski st., Sofia 1431. e-mail: milena_i_dani@abv.bg

Консенсусните лабораторни критерии за поставяне на диагнозата антифосфолипиден синдром (APS) изискват определянето на следните антитела: срещу кардиолипин (aCL), срещу бета-2-гликопротеин I (aB2GPI) и лупусен антикоагулант (LA). Позитивирането на едно от тези 3 антитела самостоятелно или едновременно с някое от другите две е критерий за поставянето на тази диагноза [1, 2]. Възприетите клинични симптоми за диагноза на APS в настоящия момент са: ве-

нозни и артериални тромбози и/или проблемна бременност при наличие на някое от посочените по-горе 3 антитела [1]. Най-често това са: дълбоки венозни тромбози, белодробен тромбоемболизъм, исхемични мозъчни атаки, ранни и късни загуби на плода [1, 3]. При катастрофалния APS тромбозите са на различни места, като са придружени от системен инфламаторен синдром [4]. Към тази първоначална дефиниция редица автори добавят и други симптоми [5]. Тромбози-

топенията, нефропатията, ливедо ретикуларис, кожните язви са чести симптоми на APS, но до този момент не са включени в класификационните критерии поради по-малката им специфичност [6-10]. Към тази група на „non criteria APS“ могат да се включат и нелекуваното главоболие, мигрената, епилепсията, хорейата, амаврозис фугакс и тромбозата на ретината [11, 12]. Случаите на мултиплена склероза и положителни aPL трябва да се диференцират с помощта на ядрено-магнитен резонанс [11].

### “NON-CRITERIA” АНТИФОСФОЛИПИДНИ АНТИТЕЛА И “NON-CRITERIA” КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ЗА APS

През последните години се обсъжда и въпросът за т. нар. “non-criteria” антифосфолипидни антитела (aPL) [13] и “non-criteria” клинични симптоми на APS [6]. Натрупана са много данни, сочещи, че антифосфолипидните антитела (aPL) са хетерогенна група, които реагират с фосфолипид-свързани кофакторни протеини, включващи не само B2GPI [14, 15], но и фосфолипиди, различни от кардиолипина, протеини, комплекси от фосфолипиди и протеини като протромбин, протеин S, протеин C, анексини V и II, oxidized low-density lipoprotein, lysobisphosphatidic acid (LBPA), sulfatides, витамин, aB2GPI-домен I и др. [1, 16-28]. Заговори се за т.нар. „серонегативен APS (SN-APS)“. Още през 2003 г. G. R. Hughes и M. A. Khamashta [29] по аналогия със „серонегативния ревматоиден артрит“ (ревматоиден артрит без ревматоиден фактор) и „серонегативния системен лупус еритематозус“ (системен лупус без антинуклеарни антитела) въвеждат и термина „серонегативен APS“. Основание за това са наблюденията, че много често има несъответствие между титъра на aPL и клиничната изява на синдрома [29, 30]. Според G. R. Hughes и M. A. Khamashta [29] зад диагнозата SN-APS могат да се крият следните състояния: друга коагулопатия, лабораторен проблем (не винаги се определят подходящите антитела или не се използват подходящи методи за изследване), възможност предишни положителни антитела да се променят и да се негативират. Според G. R. Hughes [31] диагнозата SN-APS представлява една нова група пациенти, които трябва да бъдат диагностицирани и лекувани.

### АНТИТЕЛА СРЕЩУ ДРУГИ ФОСФОЛИПИДИ И КЛИНИЧНОТО ИМ ЗНАЧЕНИЕ

Най-много са проучванията върху антителата срещу фосфатидилетаноламин (aPE), протромбин (aPT), фосфатидилсерин (aPS) и анексин V (aAnV) при пациентки с неуспешна бременност и различни тромботични състояния. Данните за участието на тези антитела в патогенезата и диагнозата на APS често са противоречиви.

За пръв път през 1959 г. A. Loeliger [32] изказва становището, че протромбинът (PT) може да е кофактор на LA при болни от системен лупус еритематозус (SLE). В края на 80-те и началото на 90-те години на миналия век няколко авторски колектива изказват становището че PT е антиген за aPL при болни с хипопротромбинемия [33, 34, 35], както и при пациенти с LA и абнормна имуоелектрофореза на протромбин [33, 36]. Антителата срещу протромбин се свързват с PT, претромбин I и фрагмент I, но не и с тромбин [37]. LA изглежда разпознава липид-свързания PT и така инхибира фосфолипид-зависимата коагулация [38]. Разнопосочните резултати при изследването на aPT при болни с акушерски проблеми и тромбози, докладвани от различните автори, вероятно се дължат на различните ELISA китове, използвани за определянето им – плаки, буфери, детергенти, блокиращи субстанции [39]. Обсъжда се и значението на едновременното определяне на aPT и aPS. По данни на S. Donohoe и сътр. [36] LA, aCL (IgG/IgM), IgG aB2GPI и IgM aPT сигнификантно са асоциирани с тромбоза и/или fetal loss, а IgG aPT не се асоциират. При малка група болни с проблемна бременност L.R. Lopez и сътр. [40] намират положителни aPS само в 6% от случаите, но предиктивната стойност на позитивните aB2GPI и aPS достига 87-95% при болните с артериални тромбози и 80-92% при тези с венозни тромбози. Според T. Atsumi & T. Koike [41] клиничните симптоми на APS, вкл. и тези със спонтанни аборти, са еднакви при болни с aCL и при болните с IgG aPS/PT. A. Vlaga и сътр. [42] намират антитела срещу комплекса PT/PS при голяма част от болните. Според M. L. Bertolaccini и сътр. [43], въпреки че aPT се установяват при 28% от болните със SLE, те не са статистически значимо по-чести при пациентките с фетална загуба. WASP study [44] установява, че няма сигнификантна асоциация между IgM и IgG aPS антителата и акушерските усложнения.

В редица статии се подчертава, че aPE са свързани с главните клинични симптоми на APS – тромбоза и загуба на плода, при липса на лабораторни критерии за това (отрицателни aCL, aB2GPI и LA). Многоцентровото проучване по този проблем при болни с венозни и артериални тромбози показва че 15% от тях са положителни за aPE, докато при здравите този процент е 3% [45]. Въпреки че тези антитела все още не са включени в класификационните критерии на APS, не трябва да се negliжира ролята им за диагнозата „SN-APS“ [46]. От друга страна, остава отворен въпросът за лечението на болните с този синдром и положителни aPE. Все пак редица автори подчертават, че aPE са важен рисков фактор при идиопатичните загуби на плода [47, 48], като J. C. Gris и сътр. [47] изтъкват, че важни ретроспективни маркери за тази диагноза са IgM aPE, IgG aAnV, IgG aB2GPI и LA.

През 90-те години на миналия век J. Matsuda и сътр. при болни с повтарящи се аборти и при лупусно болни подчертават значението на aAnV за APS [49, 50]. На следващата година N. Nakamura и сътр. [51] установяват припокриване между aAnV и LA, а C. Kuragaki и сътр. [52] предполагат, че тези антитела са насочени към антиген, различен от този, срещу който е насочен LA. Както и при другите антитела, така при проучванията върху aAnV, данните са противоречиви. Някои автори считат, че тези антитела не са сигнификантно увеличени при пациентки с APS и спонтанни аборти [53, 54], а други, въпреки че ги намират при значителна част от пациентките със спонтанни аборти, не подкрепят важността им като рисков фактор при тези болни [55]. N. Bizzaro и сътр. [56], изследвайки 1038 бременни жени, обръщат внимание на aAnV като предиктивен фактор за загуба на плода. W. Zammiti и сътр. [57] намират, че позитивните aAnV и aB2GPI са независими рискови фактори за повтарящи се аборти.

Участието на aAnV в тромбообразуването при болни с лупус се подчертава от много автори [50, 58, 59]. J. Nojima и сътр. [60] изтъкват, че при болните от лупус aAnV са единственият рисков фактор за загуба на плода. Според M. Galli и T. Barbui [61] несъответствията между отделните проучвания се дължат на различията в диагностичните критерии, различните стадии на болестта и на различия в използваните методи за определяне на антителата.

По наши данни само 1/3 от пациентките със спонтанни аборти в първия триместър на бременността имат положителни антитела срещу

кардиолипин и/или бета-2-гликопротеин I [62]. При голяма част от останалите 2/3 жени с този проблем, както и при жените с APS, установихме други антитела: срещу PS, PE, PT, AnV. По наше мнение наличието на тези антитела в серума на тези пациентки може и да не е свързано с APS, но във всички случаи присъствието им показва патология и изисква изясняване. Y. Schoenfeld и M. Blank [62] също считат, че освен aCL и aB2GPI и други антитела, като aPS, aPE, aPT, aAnV и пр., имат връзка с репродуктивните неуспехи.

Дефиницията „позитивни aPL“ се поставя на обсъждане, тъй като има проблеми със специфичността на методите за определяне на антителата с ELISA и появата на фалшиво положителни резултати, от една страна, а от друга – позитивирането на aPL при болни с инфекциозни, злокачествени и други аутоимунни болести (клинично фалшиво положителни) без клинични симптоми за APS. Антифосфолипидните антитела са хетерогенна група както по отношение на специфичността си, така и по своята функция и още няма категорично становище кое от тях е патогенно. Ситуацията се усложнява още повече в случаите, когато пациентите изпълняват клиничните критерии, но никога не са имали положителни aPL (лабораторно и/или клинично фалшиво положителни). Всички тези факти са в подкрепа на хипотезата за наличието на SN-APS и затрудняват изследователите в идентифицирането на „истинските aPL“.

### СЪЩЕСТВУВА ЛИ SN-APS?

Диагнозата SN-APS се подкрепя от редица автори [29, 64], но други са скептични спрямо това твърдение [65, 66]. C. Miret и сътр. [65] предлагат термина „транзиторен SN-APS“, тъй като класическите антитела могат да се позитивират по-късно. Не трябва да забравяме, че отначало съчетанието тромбоза и/или загуба на плода е било възприемано като лабораторна грешка или „black swan“ [67, 68]. J.-Ch. Piette предлага случаите с APS, негативен LA и ниски нива на aCL да се обозначат като „grey swan“ синдром, като се предприеме съответно лечение [по 69].

През 2000 г. E. N. Harris и сътр. [69] въвеждат термина „Equivocal“ Antiphospholipid syndrome, за да обозначават случаите, при които не са налице „класическите“ клинични и лабораторни критерии за APS, използвани към момента [1, 70]. Според тях тези пациенти също могат да бъдат причислени към диагнозата APS. От друга страна,

неправилната диагноза APS може да доведе до продължително и неправилно антикоагулантно и антиагрегантно лечение с всички последващи рискове.

В статията "Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist?" R. Cervera и сътр. [71] привеждат аргументи за и против наличието на **SN-APS**:

**А) Аргументи за SN-APS:** 1. Наличие на антитела, различни от „класическите“ 3 антитела, с които се поставя диагнозата APS – aCL, aB2GP I и LA. Такива са aPS, aPE, антифосфатидилинозитол (aPI), aAnV, aPT, срещу виментин и много други при пациенти с тромбози или неблагоприятна бременност. 2. Използване на нови техники като immunostaining on thin layer chromatography plates. 3. Сериозни заболявания като миокарден инфаркт, мозъчен инсулт, неблагоприятна бременност без данни за APS трябва да бъдат изследвани по-обширно.

**Б) Аргументи против SN-APS:** 1. Неподходящ избор на метод за определяне на антителата. 2. Възможност за положителни IgA антитела. 3. Загуба на антителата с урината (нефротичен синдром); повишен катаболизъм или намалено производство на антителата; консумация на антителата по време на тромботичния инцидент. 4. Понижена серумна концентрация след лечение с кортикостероиди. 5. Сероконверсия.

Авторите препоръчват да се направят следните стъпки, преди да се реши, че един пациент има SN-APS:

- Определянето на LA трябва да става само след цялостното отстраняване на тромбоцитите от плазмата чрез ултрацентрифугиране и филтрация на плазмата.

- Определяне на IgA aCL.
- Определяне на aPE, aPI и антителата срещу фосфатидилова киселина.
- Определяне на aPT, антителата срещу протеин С, протеин S и тези срещу плацентарен антикоагулант.

- Да се вземат под внимание ефектите от нефротичния синдром.

- Да се вземе под внимание ефектът от приложението на кортикостероидите.

- Да се повтарят тестовете за aPL след тромботичния инцидент за период от 3-6 месеца.

Изглежда, че SN-APS представлява мозайка от антитела и клинични симптоми. Възможно е определянето на други антитела освен „класическите“ aCL, aB2GP I и LA да спомогнат за по-ранното доказване на APS, но са необходими още мно-

гоцентрови, интерлабораторни, лонгитудинални проучвания при голям брой пациенти и здрави лица, както и стандартизиране на лабораторните методи за определяне на новите антитела, за да може със сигурност да се постави тази диагноза.

## Библиография

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Hemost* 2006; 4: 295-306.
2. Gomez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity* 2014; 48-49: 20-25.
3. Cervera R, Khamashta MA, Shoenfeld Y, et al. Euro-Phospholipid Project Group (European Forum on Antiphospholipid Antibodies). Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1428-1432.
4. Cervera R, Espinosa G: Update on the catastrophic antiphospholipid syndrome and the „CAPS Registry“. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38: 333-338.
5. Shoenfeld Y, Meroni PL, Toubi E. Antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: are they separate entities or just clinical presentations on the same scale? *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21: 495-500.
6. Erkan D, Lockshin MD: Non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010; 19: 424-427.
7. Atsumi T, Furukawa S, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* 2005; 14: 499-504.
8. Frances C. Dermatological manifestations of Hughes' antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus* 2010; 19: 1071-1077.
9. Zuilly S, Huttin O, Mohamed S, et al. Valvular heart disease in antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15: 320.
10. Tektonidou MG. Renal involvement in the antiphospholipid syndrome (APS)-APS nephropathy. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36: 131-140.
11. Brey RL, Muscal E, Chapman J. Antiphospholipid antibodies and the brain: a consensus report. *Lupus* 2011; 20: 153-157.
12. Hanly JG, Urowitz MB, Su L, et al. Seizure disorders in systemic lupus erythematosus results from an international, prospective, inception cohort study. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:1502-1509.
13. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, et al. "Non criteria" aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International congress on antiphospholipid antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2010; 20: 191-205.
14. Galli M, Barbui T, Zwaal FA, et al. Antiphospholipid antibodies: involvement of protein cofactors, *Haematologica* 1993; 78: 1-4.
15. de Laat HB, Derksen RHWM, de Groot PG.  $\beta$ 2-Glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome. *Clinical Immunology* 2004; 112: 161-168.
16. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y et al. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 113: 985-94.

17. Cervera R, Boffa MC, Khamashta MA et al. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus* 2009; 18: 889-93.
18. Arvieux J, Darnige L, Caron C, et al. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1120-1125.
19. Sorice M, Arcieri P, Griggi T, et al. Inhibition of protein S by autoantibodies in patients with acquired protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 1996; 75: 555-559.
20. Sorice M, Griggi T, Circella A, et al. Protein S antibodies in acquired protein S deficiencies. *Blood* 1994; 83: 2383-2384.
21. Oosting JD, Derksen RHW, Bobbink IWG, et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81: 2618-2625.
22. Kaburaki J, Kuwana M, Yamamoto M, et al. Clinical significance of anti-annexin V antibodies in patient with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 1997; vol. 54: 209-213.
23. Sallie V, Maziere JC, Smail A, et al. Anti-annexin II antibodies in systemic autoimmune diseases and antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol* 2008; 28: 291-297.
24. Kobayashi T, Stang E, Fang KS, et al. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 1998; 392: 193-197.
25. Alessandri C, Bombardieri M, Di Prospero L, et al. Antilyso-bisphosphatidic acid antibodies in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 173-180.
26. Valesini G, Alessandri C. New facet of antiphospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 487-497.
27. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, et al. Vimentin/cardioli-pin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116: 2960-2967.
28. Meroni PL, Chighizola CB, Rovelli F, Gerosa M. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis Research & Therapy* 2014; 16: 209.
29. Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1127.
30. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hughes GRV. Hughes syndrome crosses boundaries. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 43-48.
31. Hughes GR. Antiphospholipid syndrome (Hughes syndrome): 10 clinical topics. *Lupus* 2010; 19: 343-346.
32. Loeliger A. Prothrombin as co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus? *Thromb Diathes Haemorrhag* 1959; 3: 237-256.
33. Bajaj SP, Rapaport SI, Barclay S, Herbst KD. Acquired hypoprothrombinemia due to non-neutralizing antibodies to prothrombin: mechanism and management. *Blood* 1985; 65: 1538-1543.
34. Fleck RA, Rapaport SI, Rao LV. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72: 512-519.
35. Bernini JC, Buchanan GR, Ashcraft J. Hypoprothrombinemia and severe hemorrhage associated with a lupus anticoagulant. *J Ped* 1993; 123: 937-939.
36. Edson JR, Vogt JM, Hasegawa DK. Abnormal prothrombin crossed-immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood* 1984; 64: 807-816.
37. Triplett DA. Antiphospholipid antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1424-1429.
38. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 1995; 86: 617-623.
39. Donohoe S, Mackie IJ, Isenberg D, Machin SJ. Anti-prothrombin antibodies: assay conditions and clinical associations in the anti-phospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2001; 113: 544-549.
40. Lopez LR, Dier KJ, Lopez D, et al. Anti-beta-2-glycoprotein-I and antiphosphatidylserine antibodies are predictors of arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 142-149.
41. Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: Why do we need more assay? *Lupus* 2010; 19: 436-439.
42. Vlagea A, Gil A, Cuesta MV et al. Antiphosphatidyl-serine/prothrombin antibodies (APS/PT) as potential markers of antiphospholipid syndrome. *Clin Appl thrombosis/hemostasis* 2013; 19: 289-296.
43. Bertolaccini ML, Atsumi T, Khamashta M, et al. Autoantibodies to human prothrombin and clinical manifestations in 207 patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998; 25: 1104-1108.
44. Galli M, Borrelli G, Jacobson EM, et al. Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in WASP (warfarin in the antiphospholipid syndrome) study. Hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Blood* 2007; 110: 1178-1183.
45. Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-Ch, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis – A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2007; 97: 949-954.
46. Sanmarco M. Clinical significance of antiphosphatidylethanolamine antibodies in the so-called 'seronegative antiphospholipid syndrome'. *Autoimmun Rev* 2009; 9: 90-92.
47. Gris JC, Quéré I, Sanmarco M, et al. Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nimes Obstetricians and haematologists study – NOHA. *Thromb Haemost* 2000; 84: 228-236.
48. Sugi T, Matsubayashi H, Inomo A, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies in recurrent early pregnancy loss and mid-to-late pregnancy loss. *J Obstet Gynecol Res* 2004; 30: 326-332.
49. Matsuda J, Gotoh M, Saitoh N, et al. Anti-annexin V antibody in the sera of patients with habitual fetal loss or pre-eclampsia. *Thromb Res* 1994; 75: 105-106.
50. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Tsukamoto M. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardioli-pin antibody. *Am J Hematol* 1994; 47: 56-58.
51. Nakamura N, Kuragaki C, Shidara Y, et al. Antibody to annexin V has anti-phospholipid and lupus anticoagulant properties. *Am J Hematol* 1995; 49: 347-348.
52. Kuragaki C, Kidoguchi K, Nakamura N, Wada Y. Anti-annexin V antibodies in plasma and serum from patients with lupus anticoagulant. *Am J Hematol* 1995; 50: 68.
53. Siaka C, Lambert M, Caron C, et al. Low prevalence of anti-annexin V antibodies in antiphospholipid syndrome with fetal loss. *Rev Med Intern* 1999; 20: 762-765.
54. Arai T, Matsubayashi H, Sugi T, et al. Anti-annexin A5 antibodies in reproductive failures in relation to antiphospholipid antibodies and phosphatidylserine. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 202-208.
55. Arnold J, Holmes Z, Pickering, et al. Anti-beta 2 glycoprotein 1 and anti-annexin V antibodies in women with recurrent miscarriage. *Br J Haematol* 2001; 113: 911-914.

