

Diagnostika trombofilií ve světle moderních metod

L. Slavík, J. Úlehlová

Úvod

Trombofilie je charakterizována hyperkoagulabilitou a zvýšeným sklonem k trombóze. Tromboembolické příhody¹ spolu s žilní trombózou tvoří třetí nejčastější příčinu úmrtí ve vyspělých zemích po ischemické chorobě srdeční a mozkovém infarktu. Podmínky spojené se zvýšeným rizikem žilní trombózy mohou být buď vrozené nebo získané (viz. tabulka 1).

Tabulka 1.

Dědičné trombofilie	Získané trombofilie
APC rezistence/Mutace FV Leiden ^{2,3}	Antifosfolipidové protilátky
Antitrombin - deficit pod 60 % ⁴	- lupus antikoagulans- pozitivita alespoň 2 fosfolipid dependentních testů
Faktor VIII - zvýšená hladina nad 140 % ⁵	- antikardiolipinové protilátky
Hyperhomocysteinemie ^{6,7}	- protilátky proti beta-2-glykoproteinu I
Protein C deficit pod 60 % ⁸	Zvýšené hladiny faktorů VIII, IX, XI
Protein S deficit pod 63 % u mužů a 54 % u žen ⁷	Získané deficity inhibitorů koagulace
Prothrombinová mutace 20210G>A (faktor II) ^{9,10}	

Jedinci vhodní pro vyšetření

Mezi jedince s vysokým rizikem žilní trombózy patří pacienti s pozitivní osobní nebo rodinnou anamnézou trombózy, manifestací trombembolické nemoci (TEN) do 45 let věku, manifestací TEN v neobvyklé lokalizaci a u žen manifestací v průběhu těhotenství nebo na hormonální léčbě.

Identifikace trombotických rizikových faktorů a diagnostika trombofilie přispívá k péči o pacienta mnoha způsoby. Taková diagnostika je založena na zjištění osobní a rodinné anamnézy trombózy (zejména v období dospívání a u mladých žen před porodem), klinické manifestace trombembolické nemoci a laboratorním testováním.

Specifická vyšetření trombofilních markerů

Rezistence na aktivovaný protein C (APCR)

Snížený poměr koagulačních časů získaných s a bez vnějšího přídatku aktivovaného proteinu C je znakem rezistence na aktivovaný protein C (APC), jejíž příčinou je mutace faktoru V (Leiden), která je spojena se zvýšeným rizikem hluboké žilní trombózy. Citlivost a specifita vyšetření je kolem

100 %, a to i za přítomnosti heparinu^{11,12}. V méně než 5 % případů je APC rezistence nalezena bez přítomnosti mutace faktoru V (Leiden), možná z důvodu jiné neznámé mutace, ale mnohem častěji z důvodu získané APC rezistence v důsledku zvýšené hladiny F VIII a přítomnosti lupoidních antikoagulantů. Tyto případy jsou také spojeny se zvýšeným rizikem žilní trombózy¹³.

Vlastní stanovení je založeno buď na předředění vzorků s faktor V reagenční plazmou pro zvýšení specifity k Leidenské mutaci nebo přímým inkubováním vzorku s APTT reagenční v přítomnosti resp. nepřítomnosti aktivovaného proteinu C (APC). Výsledek je poměrem těchto dvou stanovení, kdy pozitivní pacienti mají poměr pod 2,1^{13,14}.

Alternativní metodou je využití inkubace s FV aktivátorem z hadího jedu Daboia russelli a následné iniciaci koagulační reakce s FV dependentním protrombinovým aktivátorem z hadího jedu Notechis scutatus scutatus v přítomnosti resp. nepřítomnosti APC. Tato metoda poskytuje vyšší specifitu jednak vůči jednotlivým mutačním stavům FV Leiden (homozygot vs. heterozygot) a také vůči negativním vzorkům¹⁵.

Faktor V (Leiden)

Mutace 1691G>A v genu pro faktor V, nazývaná též Leidenská mutace, způsobuje pozitivní nález rezistence na APC. Mutace Faktor V (Leiden) zvyšuje přibližně 7x riziko žilních trombóz u heterozygotních jedinců a 80x zvyšuje riziko u homozygotních jedinců¹⁶.

Stanovení vychází z amplifikace genomického materiálu pomocí polymerázové řetězové reakce^{17,18}. Klíčovými komponentami PCR reakce jsou dva oligonukleotidové primery, deoxyribonukleotidtrifosfáty a teplotně rezistentní DNA polymeráza (Taq).

Stanovení mutace FV:Q506 poprvé popsal Bertina a kol.¹⁹ za využití enzymatického štěpení PCR produktu pomocí restrikčního enzymu Mnl I a následně

separace produktů na agarózovém gelu. Výsledný počet a velikost fragmentů indikuje přítomnost resp. nepřítomnost mutace.

Na základě přesného sekvenování bylo v poslední době odvozeno několik dalších metod pro stanovení mutace faktoru V 1691 G-A. Tyto metody modifikují a vylepšují původní stanovení²⁰ chemiluminiscenční detekcí²¹, umožňují provedení PCR z plné krve²², využívají dvoufázovou PCR s použitím dvou restrikčních enzymů Mnl I a Nla III²³, používají alelicky specifické próby²⁴⁻²⁶, zavádějí rozpoznávací místa Taq I²⁷ a Hind III²⁸, kombinují se s ELISA stanovením²⁹ a kapilární elektroforézou³⁰. Poslední nejnovější metody používají alelické specifické primery bez nutnosti izolace DNA.

Protein C

Protein C je vitamin K dependentní protein, který je v plazmě přítomen ve formě zymogenu. Protein C je aktivován in vivo trombinem v přítomnosti trombomodulinu.

Deficit proteinu C může být detekován chromogenní nebo koagulační metodou. Koagulační metody mohou být na bázi aPTT nebo RVV (Russel Viper Venom), z nichž každý může dávat falešně vysoké výsledky v přítomnosti přímých inhibitorů trombinu, proto se dnes takřka výhradně používá chromogenní metoda. U testů založených na aPTT může lupus antikoagulans způsobit falešně vysoké výsledky, stejně jako zvýšené hladiny faktoru VIII nebo přítomnost mutace F V Leiden může způsobit falešně nízké výsledky. Heterozygotní forma mutace F V Leiden neovlivňuje testy na bázi RVV, ale některé práce udávají částečné snížení PC u homozygotů na FV Leiden²⁹. Lupus antikoagulans hladinu proteinu C neovlivňuje³¹.

Protein S a C4 vazebný protein

Přibližně 65 % proteinu S cirkulujícího v plazmě je vázáno na C4 vazebný protein. Zvýšené hladiny C4 vazebného proteinu mohou způsobit sníženou hladinu volného proteinu S a následně zvýšené riziko trombózy.

Funkční aktivita celkového proteinu S (PS), ko-faktoru aktivovaného proteinu C (PC), je měřena jako míra prodloužení protrombinového času v přítomnosti hovězího tromboplastinu, kalciových iontů a aktivovaného proteinu C. Hladina je pak přímo úměrná prodloužení protrombinového času v přítomnosti protein S deficitní plazmy. Aktivovaný protein C (aPC) je tvořen aktivací PS deficitní plazmy s protein C aktivátorem.

Detekce deficitu proteinu S může být komplikována, protože protein S je v krevním řečišti ve dvou formách - vázaný na C4b protein (60 %) a volný protein S (40 %).

Stanovení volného proteinu S na rozdíl od celkového netrpí žádnou interferencí, jelikož je založeno na imunostanovení pomocí mikrolatexu (latex immunoassay LIA). V první fázi je volný protein S díky vysoké afinitě navázaný na latexové částice s C4b vazebným proteinem. Volný protein S absorbovaný na C4BP latexové mikročástice spouští aglutinační reakci s druhou latexovou reagentií, která obsahuje monoklonální protilátku citlivou na lidský protein S. Akutní fáze různých onemocnění (např. zánět) může snížit protein S in vivo, a to je častou příčinou nízké celkové hladiny proteinu S nebo volného antigenů výsledky. Mechanismus je přičítán C4b-vazebnému proteinu, který se zvyšuje během akutní fáze onemocnění. C4BP se váže na protein S, čímž se snižuje množství volného proteinu S. Pokud je protein S vázán na C4BP je v podstatě inaktivován. Hlavní nevýhodou stanovení volného proteinu S je, že typ II deficitu není možné stanovit³², nicméně většina dědičných deficitů proteinu S je typu I (kvantitativní).

Antitrombin

Deficit antitrombinu je možné detekovat chromogenní nebo koagulační metodou. V současné době se doporučuje chromogenní metoda pro jednodušší provedení. Celkově lze říci, že chromogenní metoda je méně náchylná k interferenci než u stanovení proteinu C nebo proteinu³³. Pro stanovení aktivity antitrombinu jsou chromogenní testy založené na detekci zbytkové aktivity IIa nebo Xa- pomocí chromogenního substrátu, které nejsou ovlivněny heparinem. Testy na bázi detekce trombinu (IIa), mohou být teoreticky falešně ovlivněny zvýšenou hladinou heparin ko-faktoru II. Testy na bázi F Xa mohou být méně citlivé na deficit typu II než testy na bázi IIa³⁴. Přímé inhibitory trombinu mohou falešně zvýšit výsledky testů na bázi IIa, ale ne na bázi Xa³⁵.

Kardiolipinové protilátky a protilátky proti β 2-Glykoproteinu I

Antikardiolipinové protilátky tříd IgA, IgG, IgM jsou spojeny s antifosfolipidovým syndromem. V případě hladin > 40 GPL jednotek zvyšují riziko žilní trombózy 5 až 8násobně. IgG protilátky jsou prediktivním markerem aktivity onemocnění, zatímco IgM protilátky se vyskytují častěji u polékových poruch a infekčních onemocnění (např. syfilis). Vyšší titry protilátek obvykle souvisí s větším rizikem trombózy.

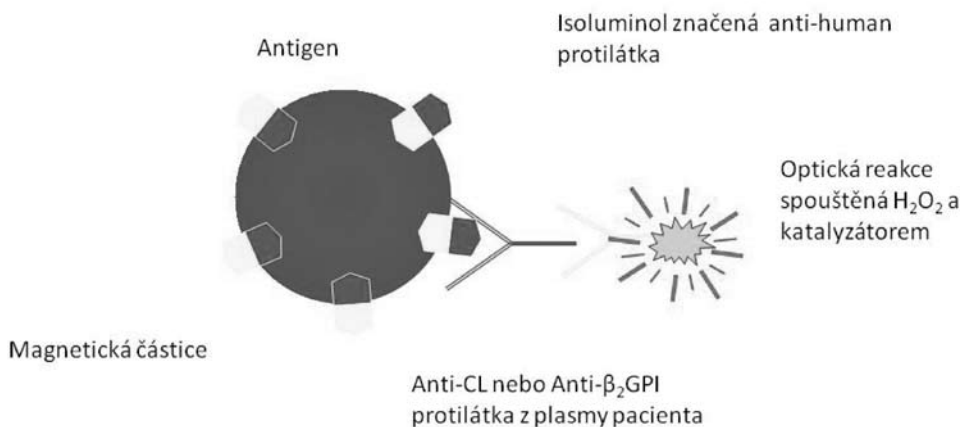
Výskyt protilátek proti β 2-glykoproteinu I tříd IgA, IgG, IgM je spojen s antifosfolipidovým syndromem a jejich přítomnost je více specifická než přítomnost protilátek proti kardiolipinu. Jedinci, kteří jsou

pozitivní pouze na přítomnost protilátek proti kardiolipinu a nikoli na přítomnost protilátek proti β_2 -glykoproteinu I, mají vyšší pravděpodobnost, že tento stav je způsoben infekcí (varicella, zarděnky, adenovirus, HIV) nebo důsledkem léčby (amoxicilin, chlorpromazin, hydralazinu) než samotným antifosfolipidovým syndromem.

Stanovení protilátek je možné provádět ELISA metodikami nebo nověji chemiluminiscenčními stanoveními disponujícími vyšší sensitivitou. ELISA metodiky využívají lokálně standardizované monoklonální protilátky (nejčastěji Louisville reference aCL IgG a IgM dle LAPL-GM-200 G1-G6 a LAPL-GM-200 M1-M6 a tzv. Harrisovy standardy). Chemiluminiscenční stanovení je založeno na přímé chemiluminiscenci, kdy chemiluminiscenční signál je přímo úměrný koncentraci aPL ve vzorku. Standardizace těchto testů je opět na Harrisovy standardy³⁶. Vyšší sensitivity těchto testů může být dána nižším ředěním vzorků (1:10) oproti ELISA metodikám (1:100), což má za následek vyšší koncentraci b2GPI a takto saturovaný veškerý kardiolipin na pevné fázi.

X v koagulačním systému a takto obchází vnitřní cestu koagulace, což vylučuje interferenci způsobenou inhibitory faktorů VIII, IX, XI a XII. Nekorigovaný dRVVT čas ve směsných testech vylučuje deficit faktorů, zejména těch vyvolaných léčbou warfariem. Falešně prodloužené dRVVT časy můžeme pozorovat u pacientů léčených heparinem v dávce $> 1,0 \text{ IU / ml}$. Falešně negativní dRVVT test může být při kontaminaci plazmy zbytkovými destičkami. Vzorky se střední až těžkou hepatitidou nebo lipémií nemohou být vyšetřeny.

Normalizace APTT po přidání hexagonální fáze fosfolipidu je považována za potvrzení přítomnosti lupus antikoagulans a zvýšené riziko trombózy. Senzitivita a specifita tohoto testu je 96 % a $> 95 \%$, resp. falešně pozitivní výsledek může být pozorován u specifických inhibitorů faktorů (faktorů VIII a V) a přímých inhibitorů trombinu. Zatímco falešně negativní nálezy jsou vzácné. Pokud je klinické podezření na LA je vysoké, je navrženo provedení dRVVT screeningu s reflexní dRVVT konfirmací hexagonální strukturou a dRVVT 1:1 směsným testem.



Obr.č. 1 Schéma chemiluminiscenční detekce antifosfolipidových protilátek

Lupus antikoagulans

PTT-LA s reflexní konfirmací hexagonální strukturou fosfolipidů a dRVVT screening a konfirmace

Lupus antikoagulans je skupina nespecifických protilátek, které prodlužují koagulační čas všech fosfolipid dependentních koagulačních testů. Protilátky lupus antikoagulans se z části vážou na hexagonální fázi fosfolipidů.

Screening Lupus antikoagulans pomocí koagulačního testu s diluovaným jedem Russelovy zmije (dRVVT) využívá přímé aktivace faktoru

Faktor VIII

Faktor VIII je reaktant akutní fáze a zvýšení hladiny je pozorováno při zvýšeném stresu, po operaci a u zánětlivých stavů. Zvýšené hladiny jsou také při narození a během těhotenství. Zvýšené hladiny jsou spojeny se zvýšeným rizikem pro žilní trombózy³⁷.

Pro stanovení hladin F VIII můžeme použít klasickou jedнокrokovou analýzu s FVIII deficitní plazmou nebo modernější metodiky. Jednou z nich je dvoukroková analýza. Kdy adsorbovaná plazma pacienta (adsorpce s $\text{Al}(\text{OH})_3$, která odstraňuje faktory II, VII, IX a X)

se smíchá s aktivním sérem (zdroj FIX, FX, FXIa), s faktor V standardní plazmou, vápníkem a fosfolipidy za tvorby faktoru Xa. Následně se vytvořený faktor Xa stanovuje koagulačně. Velmi obdobné je chromogenní stanovení využívající rozkladu chromogenního substrátu vzniklým FXa. Nicméně pro všechny typy analýz platí, že je nutné přizpůsobit kalibraci metody měřenému rozsahu, který se může v případě trombofilního rizika pohybovat od 1 do 8 IU/ml.

Homocystein

Úrovně jsou zvýšeny u následujících stavů: kardiovaskulární onemocnění, deficit vitamínu B₁₂ a folátů, chronické onemocnění ledvin, homocystinurie, hypotyreóza, vybrané malignity, u jednotlivců, jejichž strava je bohatá na metionin (vysoký příjem masa), u kuřáků a u osob léčených kortikosteroidy, metotrexátem, cyklosporinem, antagonisty vitamínu B6 (isoniazid, azaauridine, penicilamin, prokarbazin), antikonvulziva (fenytoin, karbamazepin) a S-adenosyl-methionin. Pokud se vyskytne současně s mutací faktorem V (Leiden), riziko žilní trombózy stoupá synergicky³⁸. Falešně zvýšené hladiny může pozorovat, pokud sérum nebo plazma není oddělena od červených krvinek do 1 hodiny od odběru.

Hladina homocysteinu je snížena v těhotenství (s výjimkou nositelů plodu s vadou neurální trubice) a u žen užívajících antikoncepci nebo hormonální substituční terapii.

Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) DNA Mutation Analysis

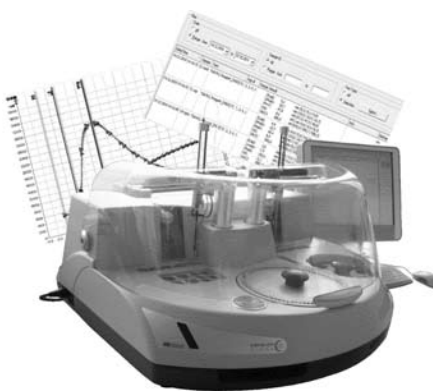
Homozygotní forma mutace MTHFR (677C> T) je u řady případů příčinou hyperhomocysteinémie, a s tím spojeným zvýšeným rizikem arteriální a žilní trombózy, stejně jako se zvýšeným rizikem porodních komplikací (např. preeklampsie, abrupce placenty, zpomalení růstu plodu nebo narození mrtvého plodu)³⁹. Heterozygotní nosiči této mutace, při neexistenci deficitu vitamínu, mají normální plazmatickou hladinu homocysteinu.

Globální testy

Trombin generační test

Trombin generační test (TGT) představuje vyšetření založené na bázi monitorování produkce trombinu fluorogenním substrátem po iniciaci reakce aktivací koagulační kaskády pomocí externě přidaného tkáňového faktoru.

Vlastní stanovení je založeno na odstranění základní překážky měření trombinu, tj. velmi krátkém poločasu života molekuly trombinu, čehož je dosaženo přímou indukcí generace trombinu v měřící kvetě prostřednictvím tkáňového faktoru. Vzniklý trombin je následně detekován pomocí fluorogenního substrátu.



Obr. č. 2 Analyzátor s fluorimetrickou detekcí

Stanovení má široké diagnostické použití, což umožňuje značnou laboratorní variabilitu provedení testu. Je možné modifikovat koncentrace tkáňového faktoru v poměrně velmi širokém rozmezí či přítomnost fosfolipidů. Tyto faktory nám umožňují optimalizovat laboratorní stanovení přesně pro zamýšlený diagnostický účel – stanovení vlivu mikropartikulí na aktivaci koagulačního systému při měření z plné krve, monitoraci vlivu endotelových markerů nebo komplexní vliv jednotlivých trombofilních rizik⁴⁰.

Aspekty odběru vzorků

Stanovení řady trombofilních markerů ovlivňují antikoagulant a také zbytkové destičky, které jsou zdrojem fosfolipidových povrchů. Při klinické indikaci je možné nahradit perorální antikoagulační léčbu heparinem po dobu 7 až 10 dnů s následným vysazením heparinu a odebráním vzorku po 12-24 hodinách od vysazení⁶.



Obr. č. 3 Moderní ultracentrifuga k rychlé separaci bezdestičkové plazmy

Destičky výrazně snižují citlivost testování anti-fosfolipidových protilátek, a tak musí být vzorek centrifugován dvakrát po dobu 15 minut při 1500 g a nebo filtrovány přes 0,22 mikronů pro odstranění destiček před zamražením⁴¹. Dnes se mikrofiltrace už nedoporučuje z důvodu ztráty aktivity některých faktorů krevního srážení. Nicméně konečný počet destiček po dvojnásobné centrifugaci musí být <10000 destiček/μl plazmy (<5.000 destiček / μl ideálně).

Z moderních metod lze použít ultracentrifugace na moderních centrifugách umožňujících separaci až při 7000 ot./min., což odpovídá 4000 g (poloměr rotoru je pouze 7,5 cm). Výhodou této metody separace je výrazné zkrácení času, jelikož pro adekvátní (počet plt pod 10x10⁹/l) separaci postačují 2 - 3 min.

Literatura

1. Heit J. A. Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors. *Thromb Haemost.*2005;3:1611-1617.
2. Ridker P. M., Miletich J. P, Hennekens C. H., et al. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA.* 1997;277:1305-1307.
3. Castoldi E., Rosing J. Factor V Leiden: a disorder of factor V anticoagulant function. *Curr Opin Hematol.*2004;11:176-181.
4. De Stefano V., Finazzi G., Mannucci P. M. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood.* 1996;87:3531-3544.
5. Schambeck C. M., Hinney K., Haubitz B., et al. Familial clustering of high factor VIII levels in patients with venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:289-292.
6. den Heijer M., Koster T., Blom H. K., et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.* 1996;334:759-762.
7. Martinelli I., Battaglioli T., Pedotti P., et al. Hyperhomocysteinemia in cerebral vein thrombosis. *Blood.* 2003;102:1363-1366.
8. Rosendaal F. R., Doggen C. J., Zivelin A., et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998;79:706-708.
9. Poort S. R., Rosendaal F. R., Reitsma P. H., et al: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88:3698-3703.
10. Gallus A. Management options for thrombophilia. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:118-126.
11. Wilmer M., Stocker C., Buhler B., et al. Improved distinction of factor V wild-type and factor V Leiden using a novel prothrombin-based activated protein C resistance assay. *Am J Clin Path.* 2004;122:836-842.
12. Gessoni G., Valverde S., Manoni F. Comparison between two functional assays to detect factor V Leiden. *Int J Lab Hematol.* 2010;32:e188-e189.
13. Dahlbäck B., Carlsson M., Svensson P. J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:1004-8
14. Bertina R. M., Koetemann B. P. C., Koster T., Rosendaal F. R., Dirven R. J., de Ronde H., van der Velden P. A., Reitsma P. H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-7.
15. Wilmer M., Stocker C., Bühler B., Conell B., Calatzis A. Improved distinction of factor V wild-type and factor V Leiden using a novel prothrombin-based activated protein C resistance assay. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:836-42 de Visser M. C., Rosendaal F. R., Bertina R. M. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood.* 1999;93:1271-1276.
16. Rosendaal F. R., Koster T., Vandenbroucke J. P., et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden. *Blood.* 1995;85:1504-1508.
17. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 1988, 487-490.
18. Molecular cloning a laboratory manual 2nd ed. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (eds). Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989.
19. Bertina R. M. Koeleman B. P. C. Koster T. et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to Activated Protein C. *Nature*, 369, 1994, 64-67.
20. Voelkerding K. V., Wu L., Williams E. C. et al. Factor V R506Q gene mutation analysis by PCR-RFLP. *Am J Clin Pathol*, 106:1, 1996, 100-106.
21. Ballering L. A. P., Bon M. A. M., Steffens-Nakken H. M. et al. Chemiluminescent detection of factor V Leiden in a routine laboratory. *Ann Clin Biochem*, 33, 1996, 259-262.

22. Rees D. C., Cox M., Clegg J. B. Detection of the factor V Leiden mutation using whole blood PCR. Letters to the Editor. *Thromb Haemost*, 75, 1996, 521.
23. Beauchamp N. J., Oaly M. E., Cooper P. C. et al. Rapid two-stage PCR for detecting factor V G1691A mutation. *Lancet*, 344, 1994, 694-695.
24. Gandrille S., Alhenc-Gelas M., Aiach M. A rapid screening method for the factor V Arg506 to Gln mutation. *Blood Coag Fibr*, 6, 1995, 245-248.
25. Blasczyk R., Ritter M., Thiede C. et al. Simple and rapid detection of factor V Leiden by Allele-specific PCR amplification. *Thromb Haemost* 75, 1996, 757-759.
26. Kirschbaum N. E., Foster P. A. The polymerase chain reaction with sequence specific primers for the detection of the factor V mutation associated with activated protein C resistance. *Thromb Haemost* 74, 1995, 874-878.
27. Bellissimo D. B., Kirschbaum N. E., Foster P. A. Improved method for factor V Leiden typing by PCR-SSP. Letters to the Editor. *Thromb Haemost*, 75, 1996, 520.
28. Guillerm C., Lellouche F., Oarnige L. et al. Rapid detection of the G1691A mutation of coagulation factor V by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem*, 42, 1996, 329.
29. Zotz R. B., Maruhn-Oebowski B., Scharf R. E. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and resistance to activated protein C: detection of the genetic mutation by oligonucleotide ligation assay using a semiautomated system. *Thromb Haemost*, 76, 1996, 53-55.
30. van der Locht L., Kuypers A., Verbruggen B. et al. Semiautomated detection of the factor V mutation by allele specific amplification and capillary electrophoresis. *Thromb Haemost*, 74, 1995, 1276-1279. Triado I., Mateo J., Soria J. M., et al. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2005;93:468-474.
31. Gessoni G., Valverde S., Manoni F. Comparison between two functional assays to detect factor V Leiden. *Int J Lab Hematol*. 2010;32:e188-e189.
32. Ridker P. M., Hennekens C. H., Selhub J., et al. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation*. 1997;95:1777-1782.
33. Poort S. R., Rosendaal F. R., Reitsma P. H., et al: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88:3698-3703.
34. Gallus A. Management options for thrombophilia. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:118-126.
35. Girling J., de Swiet M. Inherited thrombophilia and pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1998;10:135-144.
36. Van Hoecke F., Persijn L., Decavele A. S., Devreese K. Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int J Lab Hematol*. 2012;34:410-416.
37. Triado I., Mateo J., Soria J. M., et al. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2005;93:468-474.
38. Ridker P. M., Hennekens C. H., Selhub J., et al. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation*. 1997;95:1777-1782.
39. Kupferminc M. J., Eldor A., Steinman N., et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999;340:9-13.
40. Wagenvoort, R., Hemker, P. W., Hemker, H. C. The limits of simulation of the clotting system *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006, 4: 1331-1338.
41. Exner T., Triplett D. A., Taberner D., et al. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. SSC Subcommittee for the Standardization of Lupus Anticoagulants. *Thromb Haemost*. 1991;65:320-322.