

## Il ruolo del laboratorio di coagulazione nel monitoraggio del trattamento eparinico dei pazienti con COVID-19

Barbara Montaruli<sup>1</sup>, Benedetto Morelli<sup>2</sup>, Marina Marchetti<sup>3</sup>, Mario Bazzan<sup>4</sup> \*per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, A.O. Ordine Mauriziano, Torino

<sup>2</sup>Synlab Castenedolo, Castenedolo (BS)

<sup>3</sup>Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>4</sup>CMID, Centro Malattie Rare, San Giovanni Bosco, Torino

### ABSTRACT

#### The role of laboratory monitoring in heparin treatment of COVID-19 patients.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) can be associated with serious clinical complications such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis and multiple organ failure (MOF). A key event in the pathophysiology of ARDS is immunothrombosis, a process initiated by the innate immune system that provides a first line of defense for local control of infection. In its physiological form, immunothrombosis is intended to facilitate the recognition, containment and destruction of pathogens, thus protecting the integrity of the host without inducing significant collateral damage. The cytokine storm that occurs during COVID-19 induces often venous and arterial thrombotic events affecting different organs, not limited to the respiratory system. It is therefore necessary to introduce an anticoagulant treatment in patients with COVID-19 to prevent the onset and the extension of thrombotic events. The low molecular weight heparin (LMWH) is the first-choice drug recommended by the main international scientific societies; alternatively, unfractionated heparin (UFH) or fondaparinux can be used. The dosage of these drugs in patients with COVID-19 is still under discussion. The coagulation testing plays an important role in monitoring the efficacy and safety of UFH treatment; in the case of LMWHs, these usually do not require monitoring but, if alterations of renal function occur, it is important to perform the chromogenic determinations of the anti-Xa activity, paying a particular attention to the timing of sampling, the pre-analytical variables, calibration of the test and reference ranges.

### INTRODUZIONE

La malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) è causata dal virus SARS-CoV2, un patogeno appartenente alla famiglia dei coronavirus (CoV), virus respiratori responsabili di malattie con forme sintomatiche che possono variare da lievi (come il comune raffreddore) a moderate, fino a sindromi respiratorie gravi come la sindrome respiratoria mediorientale (MERS) e la sindrome respiratoria acuta grave (SARS) (1-3).

La maggior parte dei pazienti affetti da COVID-19 presenta sintomi da lievi a moderati come febbre, tosse secca, affaticamento, mal di testa e dolore muscolare; meno frequentemente presenta mal di gola, naso che

cola, diarrea, emottisi e brividi. Tuttavia, il 15% di essi progredisce verso una forma grave di polmonite interstiziale, che richiede ospedalizzazione e supporto d'ossigeno, e circa il 5% alla fine sviluppa una sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), sepsi e shock settico e/o insufficienza multipla d'organo (MOF), a tal punto da richiedere cure intensive. L'acidosi metabolica e la presenza di coagulopatia, inclusa la coagulazione disseminata intravascolare (CID), si associano a queste forme gravi di infezione (1). Gli adulti più anziani, quelli con disturbi immunitari e comorbidità, rappresentano i soggetti più a rischio di sviluppare ARDS, così come le altre complicanze potenzialmente fatali; tuttavia anche i pazienti giovani e altrimenti sani non ne sono completamente esenti.

Corrispondenza a: Barbara Montaruli, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, A.O. Ordine Mauriziano, Largo Turati 62, 10124 Torino, Tel 3409877153, E-mail bmontaruli@mauriziano.it

Ricevuto: 08.06.2020

Revisionato: 08.06.2020

Accettato: 18.06.2020

Publicato on-line: 13.07.2020

DOI: 10.19186/BC\_2020.072

Anche il sistema cardiovascolare viene interessato dall'infezione virale, con complicanze quali miocardite, infarto acuto del miocardio, insufficienza cardiaca, disritmia ed eventi tromboembolici venosi (2,3). Il rischio di eventi trombotici è particolarmente elevato nei pazienti COVID-19 ricoverati in terapia intensiva, con stime che vanno dal 25% delle casistiche cinesi, al 31% di un recente studio olandese, in pazienti già in profilassi eparinica (4). L'attivazione della coagulazione e/o della fibrinolisi si verificano come parte della risposta infiammatoria acuta ad una infezione, e la forma grave di COVID-19 è comunemente complicata da una grave coagulopatia, nella quale livelli di D-dimero marcatamente elevati si associano ad una prognosi infausta (5).

L'ARDS è caratterizzata da una interruzione dell'integrità della barriera endoteliale e da danno polmonare diffuso. Lo squilibrio tra coagulazione e infiammazione è una caratteristica predominante dell'ARDS, che porta ad un'estrema risposta infiammatoria e alla deposizione diffusa di fibrina nel letto capillare vascolare e negli alveoli. È stato osservato che la maggior parte dei pazienti affetti da una forma grave di COVID-19 presentano livelli sierici particolarmente elevati di citochine pro-infiammatorie tra cui IL-6 e IL-1 $\beta$ , nonché di IL-2, IL-8, IL-17, Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) ed altre (6,7).

Questa è una fase molto critica della malattia, caratterizzata da una "tempesta citochinica", ovvero da una infiammazione fuori controllo indotta dal sistema immunitario disregolato (7-9). Alti livelli di citochine pro-infiammatorie possono causare shock e danni ai tessuti nel cuore, nel fegato e nei reni, nonché insufficienza respiratoria e MOF; inoltre, stimolano una massiccia infiltrazione di neutrofilii e macrofagi nei polmoni, causando danno alveolare e formazione di membrane ialine ed ispessimento della parete alveolare.

### **PATOGENESI DELLA IMMUNOTROMBOSI NEL PAZIENTE COVID-19**

Un evento chiave nella fisiopatologia dell'ARDS è l'immunotrombosi, un processo avviato dal sistema immunitario innato che fornisce una prima linea di difesa per il controllo localizzato dell'infezione (10). La fibrina costituisce la base strutturale, l'impalcatura (scaffold) dei coaguli immunotrombotici e il suo assemblaggio prevede l'azione concertata di fattori della coagulazione, piastrine e leucociti, all'interno dei vasi sanguigni e in particolare nei microvasi.

L'immunotrombosi nella sua forma fisiologica è deputata a facilitare il riconoscimento, il contenimento e la distruzione dei patogeni, proteggendo così l'integrità dell'ospite senza indurre danni collaterali importanti all'ospite. Tuttavia, se non controllata, l'immunotrombosi è un processo biologico che favorisce le patologie associate alla trombosi.

Sebbene la capacità di formare trombi di fronte a una lesione dei vasi sia nota da tempo come essenziale per il mantenimento dell'emostasi, fino a poco tempo fa non era stata riconosciuta come un meccanismo intravascolare di difesa immunitaria. Il termine immunotrombosi è stato coniato da Engelmann e Massberg, che lo hanno descritto come un potenziale ausilio biologico per contenere la diffusione dell'infezione (11).

Le tappe fondamentali attraverso le quali l'immunotrombosi previene la diffusione dell'infezione sono quattro ed includono:

- la cattura dei patogeni nel microcircolo e il blocco della loro diffusione
- il blocco dell'invasione dei tessuti anche lontani attraverso la formazione di microtrombi
- la concentrazione di battericidi per l'eliminazione dei patogeni da parte delle cellule immunitarie innate
- il reclutamento di altre cellule immunitarie nel sito dell'infiammazione per eliminare i restanti patogeni.

In questo processo un ruolo fondamentale è svolto dai "Neutrophil Extracellular Traps" (NETs). I NETs sono costituiti da reti extracellulari di cromatina, proteine microbicide ed enzimi ossidanti rilasciati dai neutrofilii attivati per contenere le infezioni (12). Tuttavia, se non adeguatamente regolati, i NETs hanno il potenziale di propagare l'infiammazione e indurre trombosi microvascolare (13). È infatti stato dimostrato che i vari costituenti dei NETs sono in grado di agire sul processo coagulativo mediante attivazione della via da contatto, contribuire all'attivazione piastrinica, modulare la fibrinolisi e indurre l'espressione di Fattore Tissutale (14) (Figura 1). Il ruolo dei NETs in pazienti con COVID-19 è stato recentemente esplorato da Zuo et al. (15). In particolare, gli autori hanno osservato che i sieri di pazienti con COVID-19 (50 pazienti, 84 campioni) presentano elevati livelli di DNA libero (cell-free DNA, cfDNA), mieloperossidasi associata a DNA (MPO-DNA) e di istone citrullinato H3 (Cit-H3); gli ultimi due sono marcatori altamente specifici dei NET. I livelli di cfDNA correlavano con le molecole di fase acuta tra cui la proteina C-reattiva, il D-dimero e la lattato deidrogenasi (LDH), nonché con la conta assoluta dei neutrofilii. Gli autori hanno mostrato inoltre che sia i livelli di cfDNA che di MPO-DNA sono più elevati nei pazienti ospedalizzati che ricevevano ventilazione meccanica rispetto ai pazienti ospedalizzati che respiravano aria nella stanza.

Non solo i NETs hanno un ruolo nel processo dell'immunotrombosi. Un altro attore molto importante in questo fenomeno è l'endotelio vascolare (16). Nell'emostasi fisiologica, la coagulazione e la fibrinolisi sono strettamente regolate e mantenute in equilibrio dall'endotelio, in modo tale da consentire al sangue di fluire liberamente senza sanguinamento sistemico o coagulazione. Il TF è una glicoproteina



verifica più frequentemente in seguito a infezione da agenti patogeni) potrebbe avere un ruolo importante nella lesione delle cellule endoteliali nei pazienti con COVID-19.

Non bisogna dimenticare che all'interno delle cellule endoteliali si trovano dei granuli, i cosiddetti Weibel Palade Bodies (WPB), contenenti sostanze proinfiammatorie e procoagulanti, come il fattore di von Willebrand (vWF), la P-selettina e l'angiotensina 2, che hanno il potenziale di regolare l'immunotrombosi. È stato infatti dimostrato da vari studi *in vitro* ed *in vivo* che gli istoni associati ai NETs sono in grado di stimolare attivamente la secrezione dei WPB dalle cellule endoteliali, con liberazione dei multimeri ad altissimo peso molecolare di vWF sulla superficie endoteliale, che possono così legare le piastrine in condizioni di flusso (18).

L'endotelite COVID-19 potrebbe spiegare la funzione microcircolatoria compromessa sistemica in diversi letti vascolari nonché le sequele cliniche in questi pazienti. Questa ipotesi fornisce una logica per le terapie mirate a stabilizzare l'endotelio mentre si affronta la replicazione virale, in particolare con farmaci anti-infiammatori anti-citochine, ACE-inibitori e statine. Questa strategia potrebbe essere particolarmente rilevante per i pazienti vulnerabili con disfunzione endoteliale preesistente, che è associata a sesso maschile, abitudine al fumo, ipertensione, diabete, obesità e malattie cardiovascolari accertate, tutte associate a esiti avversi nel COVID-19.

In conclusione, l'attivazione incontrollata dell'infiammazione e la concomitante attivazione della coagulazione e dell'endotelio vascolare possono esitare nel fenomeno patologico dell'immunotrombosi anche nei pazienti con COVID-19. A causa delle chiare somiglianze tra la presentazione clinica di COVID-19 grave e le NETopatie note - ARDS e microtrombosi - è verosimile che un eccesso di NETs possa svolgere un ruolo importante nella malattia, e l'obiettivo terapeutico diretto e / o indiretto verso i NETs con i farmaci disponibili potrebbe rappresentare un presidio importante per ridurre la grave sintomatologia clinica di COVID-19 (19).

## LE TERAPIE ANTICOAGULANTI NEL PAZIENTE CON COVID-19

Pur essendo disponibili studi preliminari e raccomandazioni da parte di gruppi di lavoro e Società Scientifiche, ad oggi non esistono lavori scientifici né linee guida che abbiano dimostrato efficacia nel trattamento della coagulopatia da COVID-2019 (COVID Associated Coagulopathy, CAC). Non sono ancora disponibili, in quanto ancora in corso, i risultati di studi clinici adeguati (prospettici, randomizzati) che possano definire chiare strategie terapeutiche. Sono state pubblicate serie di casi clinici o riscontri aneddotici su numeri esigui di pazienti. Ciò è dovuto al fatto che la pandemia da COVID-19 ha costituito, per la prima volta nella storia moderna, una

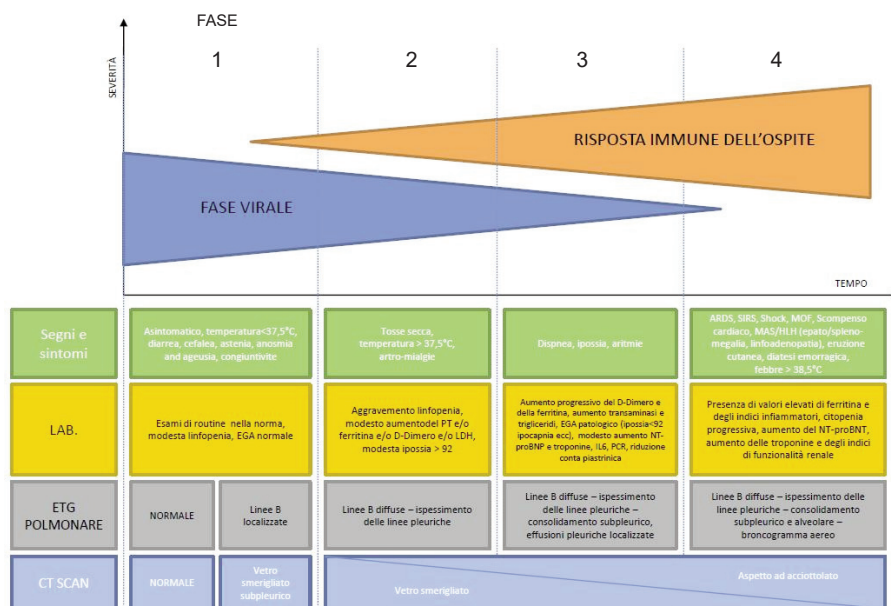
terribile emergenza che nei drammatici momenti iniziali ha travolto i Sistemi Sanitari Nazionali, non consentendo una immediata programmazione di studi clinici.

In questa fase iniziale della pandemia sono state segnalate ed utilizzate numerose strategie terapeutiche, basate sull' utilizzo di farmaci attivi sull'emostasi e di farmaci di altra natura, in grado di generare un miglioramento della mortalità o della sintomatologia della sindrome associata a COVID-19 ed alla CAC, complicanza avanzata della sindrome stessa, descritta nelle fasi 3-4 della malattia (Figura 2).

È opportuno ricordare anche il ricorso ad alcune molecole in grado di evitare o ridurre la "tempesta citochinica", correlata all'enorme aumento dei livelli circolanti di IL-1, IL-6 ed IL-8, TNF-alfa ed altre, virus-indotte, che precedono e possono indurre la CAC.

Clorochina ed idrossiclorochina sono farmaci antimalarici ed antireumatici, che hanno dimostrato avere *in vitro* attività anti SARS-CoV2, ritardando o impedendo al virus la penetrazione attraverso la membrana cellulare; se somministrati in fase precoce, sono in grado di migliorare la prognosi e spesso di evitare la necessità del trattamento in terapia intensiva (ventilazione assistita). È stato anche riportato che alcuni antivirali (lopinavir/ritonavir, darunavir/ritonavir, darunavir/cabicitat, remdesivir) già utilizzati per il virus ebola o per altri coronavirus mostrano una scarsa attività nel frenare il COVID-19 (20). La validità dei corticosteroidi è ancora discussa in tale contesto, mentre pare favorevole l'azione di un antibiotico, l'azitromicina, in associazione con l'idrossiclorochina; tolicizumab, sarilumab e saltixumab sono anticorpi monoclonali anti-IL-6. Baricitinib, ruxolitinib ed imatinib sono molecole utilizzate nelle forme mieloproliferative croniche, ed hanno una attività anti JAK1/JAK2. Anakinra ha attività anti IL-1, mentre eculizumab agisce contro la cascata complementare, in particolare contro la C5-convertasi. Questi farmaci, da soli o in associazione, sono stati utilizzati con risultati non sempre univoci, e non sono privi di effetti collaterali. Una caratteristica comune a molte di queste molecole è comunque quella di contenere la "tempesta citochinica", di fatto riducendo la possibilità di evoluzione clinica verso una fase più grave di malattia, e verso una CAC. Bisogna ricordare che nei protocolli terapeutici e negli studi clinici queste molecole sono state utilizzate con modalità "off-label", cioè al di fuori dell'indicazione ministeriale contenuta nella scheda tecnica.

La recentissima letteratura scientifica inoltre ha cercato di definire la CAC da un punto di vista fisiopatologico e laboratoristico, differenziandola dalla CID e dalla coagulopatia indotta da sepsi (SIC) (21). Per quanto queste ultime due entità nosologiche siano note da tempo, non esiste un trattamento consolidato e sicuramente efficace se non il rimuovere la causa scatenante; la stessa definizione



**Figura 2**  
 Algoritmo per la diagnosi e l'evoluzione clinica della malattia da COVID-19.

Modificata dal sito: <http://www.rheumapainacademy.com/wp-content/uploads/2020/03/algoritmo-28.03.pdf>.

EGA, emogasanalisi; PT, Tempo di protrombina; LDH, Lattico Deidrogenasi; PCR, Proteina C reattiva; IL6, Intereleuchina 6; ETG, Ecografia toracica polmonare; CT-SCAN, Tomografia computerizzata.

di CID/SIC vede differenze fra diverse Società Scientifiche (22). Dal punto di vista delle analisi di laboratorio le caratteristiche differenziali sono riportate nella Tabella 1.

I parametri di laboratorio utilizzati nella diagnosi differenziale sono: conteggio piastrinico, FDP o D-dimero, fibrinogeno e tempo di protrombina. Che si tratti di CID o di SIC, le indicazioni terapeutiche e i risultati di studi clinici non sono concordanti. Mentre vi è un certo consenso nell'utilizzo di eparine a basso peso molecolare (EBPM) a dosi di profilassi (4 000 U/die), come suggerito dalle principali Società Scientifiche del settore [la International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH), la Società Italiana per lo Studio dell'Emostasi e della Trombosi (SISST), Federazione dei Centri per la Diagnosi della Trombosi e la Sorveglianza delle terapie Antitrombotiche (FCSA)], l'antitrombina (AT), la trombomodulina, e la proteina S sono state utilizzate negli studi clinici che hanno incluso un limitato numero di pazienti e non hanno fornito risultati univoci. Di fatto questi farmaci non sono ancora entrati a far parte della comune terapia in tale contesto. Vi è però un certo accordo nell'utilizzo di AT se i valori circolanti di AT sono inferiori al 70%, ed è stata proposta un trattamento con AT ad alte dosi nelle CID/SIC ad elevato rischio emorragico, nelle quali si preferisce evitare l'uso delle EBPM.

Pur non essendo facile distinguere la CID o SIC dalla CAC, alcune caratteristiche peculiari sono

emerse dai primi resoconti sulla CAC, prevalentemente dall'esperienza cinese di Wuhan. Nella CAC, il D-dimero è generalmente molto elevato, ed i suoi livelli correlano con aumentata mortalità (23). AT e piastrine sono raramente ridotte in modo significativo ed il tempo di protrombina (PT) è di poco alterato. Il fibrinogeno è normale, elevato o molto elevato, la proteina C reattiva (PCR) e l'IL-6 sono molto elevati. A fronte di una non risposta alla terapia, questi parametri possono poi peggiorare evolvendo verso una forma di CID conclamata, con allungamento di PT e tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), riduzione significativa del numero delle piastrine e del fibrinogeno (fase 4 della Tabella 1).

L'ISTH ha prodotto una "Interim Guidance" definendo alcune caratteristiche della CAC, già riscontrate nell'esperienza cinese (24). Il D-dimero elevato, il PT solo lievemente allungato e le piastrine nella norma o lievemente ridotte costituivano la caratteristica comune alla maggior parte dei pazienti con sindrome COVID-19 correlata (25). In particolare, per quanto riguarda il D-dimero, Tang et al. (26) hanno osservato che gli elevati livelli (>3,0 mg/L) correlavano direttamente con una cattiva prognosi. Questa linea guida raccomanda la terapia con EBPM in tutti i pazienti sintomatici ricoverati, a dosi profilattiche, escludendo solo i pazienti con grave piastrinopenia (<25 x 10<sup>9</sup>/L) o con sanguinamenti in atto.

Tabella 1

Diagnosi differenziale della Coagulazione Intravascolare Disseminata (DIC) e della Coagulopatia Indotta da Sepsis (SIC).

	JMHW	ISTH	ISTH modificato	JAAM	SIC
Sintomi clinici	Patologia sottostante: 1 p Sanguinamento: 1 p Insufficienza d'organo: 1 p	0 p 0 p 0 p	0 p 0 p 0 p	0 p SIRS score >3:1 p 0 p	0 p SOFA 4 elementi*: 1:1 p >2:2 p
Conta Piastrinica	80-120:1 p 50-<80: 2 p <50:3 p	50-100:1 p <50:2 p	50-100:1 p <50: 2 p	80-120 o ↓ >30% 24h: 1 p 50-<80 o ↓50% 24h :2 p	100-150: 1 p <100:2 p
Markers associati alla Fibrina	FDP 10-20:1 p 20-40:2 p >40:3 p	FDP, D-Dimero, SF Aumento moderato:2 p Aumento forte: 3 p	FDP, D-Dimero, SF Aumento moderato: 2 p Aumento forte: 3 p	FDP 10-25:1 p >25:3 p	Nessuno
Fibrinogeno (mg/dL)	100-150:1 p <100:2 p	<100:1 p	Nessuno	Nessuno	Nessuno
PT	PT ratio 1.25-1.67:1 p >1.67: 2 p	PT prolungato (s) 3-6:1 p >6:2 p	PT prolungato (s) 3-6:1 p >6:2 p	PT ratio 1.2:1 p	PT ratio 1.2-1.4:1 p >1.4: 2 p
Diagnosi di CID	≥7 p	≥5 p	≥4p	≥4 p	≥4 p (coagulopatia)

JMHW, Japanese Ministry of Health and Welfare; ISTH, International Society of Thrombosis and Haemostasis; JAAM, Japanese Association for Acute Medicine; SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; FDP, Prodotti di Degradazione e della Fibrina; SF, Fibrina Solubile; PT, Tempo di Protrombina.

\*SOFA 4 elementi include valutazione cardiovascolare, respiratoria, epatica e renale.

Modificata da "Haemostasis disseminated intravascular coagulation score in critically ill patients with sepsis 3.0: a retrospective study." Ding R, et al (22).

I pazienti ricoverati per polmonite COVID-19 correlata hanno generalmente una degenza di circa 4-6 settimane, in condizioni spesso febbrili, con ridotta mobilità o immobilità, che richiederebbe comunque una rigorosa prevenzione antitrombotica. Inoltre è stato dimostrato che la "tempesta citochinica" riscontrata nei pazienti più gravi induce una condizione importante di ipercoagulabilità (26). L'evidenza che elevati livelli di D-dimero in pazienti con COVID-19 correlano con la mortalità indica un ruolo preminente della trombosi nella morbilità e mortalità di tali pazienti. Gli eventi trombotici sono generalmente rappresentati da trombosi venose profonde o embolie polmonari, ma anche da eventi arteriosi come stroke o infarto miocardico acuto. Inoltre, un'analisi di sottogruppo condotta in uno studio osservazionale a Wuhan (25,26) ha dimostrato una miglior prognosi nei pazienti più gravi se trattati con una EBPM (enoxaparina). Referti autoptici hanno poi evidenziato un quadro di trombosi del microcircolo polmonare (non embolia polmonare) in numerosi pazienti studiati.

L'insieme di queste osservazioni ha indotto ad utilizzare EBPM in tutti questi pazienti. Non è ancora ben definita la dose di EBPM da utilizzare, anche se questa generalmente varia a seconda che vi sia indicazione a prevenzione (profilassi) o terapia del tromboembolismo venoso.

Il protocollo proposto dal Policlinico di Milano - Regione Lombardia (27) stratifica i pazienti COVID-19 in 3 fasce basate sulla criticità clinica. L'aumento del numero di complicanze trombotiche osservato in pazienti COVID-19 è alla base della scelta di incrementare le dosi di EBPM, rispetto a schemi precedentemente pubblicati.

- bassa intensità di cura: enoxaparina 100 U/kg/die. Se il paziente è obeso o è a rischio trombotico elevato: dosaggio sub-terapeutico di 70 U/kg x 2/die
  - intensità intermedia-alta: enoxaparina 70 U/kg x 2/die
  - terapia intensiva: enoxaparina 100 U/kg x 2/die
- Per quanto riguarda la bassa intensità di cura, la scelta fra le due opzioni può essere guidata dallo score Sequential Organ Failure Score (SOFA) (28), utilizzando la dose più elevata se lo score è >6.

La terapia con EBPM deve essere effettuata per tutto il periodo del ricovero ed essere continuata anche dopo la dimissione, per altre 2 settimane.

E' evidente che non tutti i protocolli raccomandano le stesse modalità terapeutiche con l'eparina; ad oggi non esiste una chiara evidenza di quale possa essere il miglior schema terapeutico, in termini di ridotti eventi trombotici, controllo della CAC e ridotti eventi emorragici, oltre all'outcome globale.

Il monitoraggio dell'attività anti-Xa è indicato in condizioni particolari (insufficienza renale, sovra-

sottopeso, complicanze emorragiche, etc). La terapia con EBPM è sconsigliata se l'insufficienza renale è grave (eGFR <30 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) e nel paziente a rischio emorragico o con emorragia in atto; in tali situazioni è indicata la elastocompressione o compressione pneumatica intermittente.

Riassumendo, l'unico farmaco utilizzato, raccomandato e verosimilmente attivo, con azione diretta sull'emostasi nella sindrome COVID-19 correlata e nella CAC è risultata essere l'EBPM. In sostanza la CAC deve essere soprattutto prevenuta, quando possibile, con una terapia basata su associazione di farmaci antivirali, idrossiclorochina, anti IL-1, IL-6, anti JAK 1 ed anti JAK2 in grado di ridurre la tempesta citochinica, mentre l'EBPM deve essere somministrata a tutti i pazienti con COVID-19 ospedalizzati.

## IL TRATTAMENTO EPARINICO IN CORSO DI COVID-19

Mentre le scelte terapeutiche delle prime fasi dell'infezione devono mirare al contenimento della crescita virale, nelle fasi avanzate l'obiettivo è il contenimento dell'iperinfiammazione e delle sue conseguenze, utilizzando farmaci che bloccano la cascata citochinica e l'attivazione della coagulazione ricorrendo alle EBPM o all'eparina non frazionata a dosi terapeutiche, come da raccomandazioni dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) dell'11 aprile 2020 (29), della FCSA (30) e della Siset (31).

Le EBPM sono glicosaminoglicani che derivano dalla eparina non frazionata (ENF) dopo trattamento con depolimerizzazione chimica o enzimatica; hanno un peso molecolare medio tra 4 000 e 5 000 daltons con un intervallo compreso tra 2 000 e 9 000 daltons. La depolimerizzazione dell'ENF produce frammenti a basso peso molecolare che presentano un legame ridotto con le proteine plasmatiche e con le cellule. La ridotta affinità per le proteine plasmatiche e le cellule spiega le differenze anticoagulanti, farmacocinetiche ed altre differenze biologiche tra ENF e EBPM. Pertanto, rispetto all'ENF, le EBPM hanno una ridotta capacità di inattivare la trombina perché i frammenti più piccoli non possono legarsi contemporaneamente all'AT e alla trombina. Il legame ridotto alle proteine plasmatiche diverse dall'AT è responsabile della relazione dose-risposta più prevedibile delle EBPM. La diminuzione del legame con i macrofagi e con le cellule endoteliali spiega la maggiore emivita plasmatica delle EBPM rispetto all'ENF, mentre il legame ridotto con le piastrine e il fattore piastrinico 4 (PF4) spiega la minore incidenza di trombocitopenia indotta da eparina (HIT).

Come l'ENF, anche le EBPM producono il loro principale effetto anticoagulante catalizzando l'inibizione dei fattori attivati della coagulazione attraverso la mediazione dell'AT. Analogamente alla ENF, anche per il legame delle EBPM all'AT è

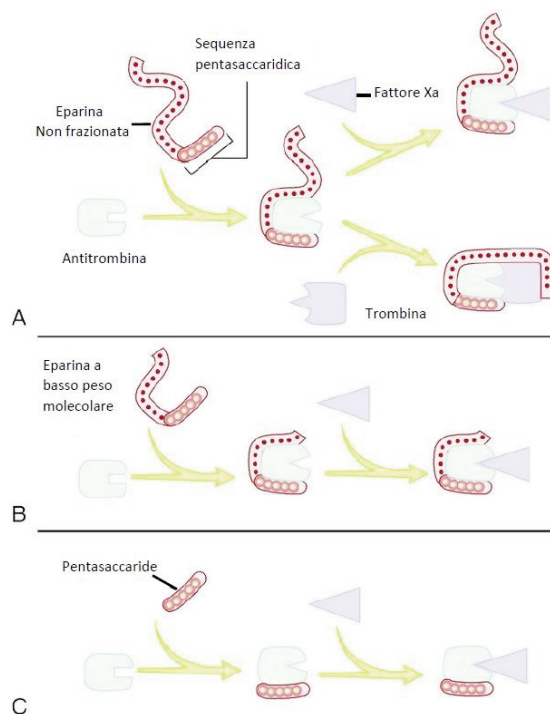
richiesta una sequenza pentasaccaridica; questa sequenza si trova su meno di un terzo delle molecole di EBPM. Poiché solo le catene di eparina contenenti pentasaccaridi, composte da almeno 18 unità saccaridiche, sono di lunghezza sufficiente per collegare l'AT alla trombina, molte molecole di EBPM (dal 50% al 75%) hanno catene troppo corte per catalizzare l'inibizione della trombina (Figura 3). Tuttavia, queste catene sono in grado di promuovere l'inattivazione del fattore Xa da parte dell'AT perché questa reazione non richiede un legame tra l'eparina e il fattore attivato. Poiché praticamente tutte le molecole di ENF contengono almeno 18 unità di saccaride, l'eparina non frazionata ha, per definizione, un rapporto anti-Xa/anti-IIa di 1:1. Al contrario, le EBPM hanno rapporti anti-Xa / anti-IIa tra 2:1 e 4:1 a seconda delle loro dimensioni molecolari (32,33).

Ad oggi sono ormai numerose le società scientifiche che hanno raccomandato la stratificazione del rischio e l'adozione della tromboprolifassi in tutti i pazienti ricoverati con COVID-19 con EBPM, ma anche con ENF o con fondaparinux (farmaco analogo sintetico della catena pentasaccaridica dell'eparina) alle dosi previste nelle rispettive schede tecniche, salvo controindicazioni, come un sanguinamento in atto, insufficienza renale, precedente storia di HIT o un conteggio piastrinico <25 x 10<sup>9</sup>/L (34,35). La Siset, nel raccomandare fortemente la tromboprolifassi, ha preso in considerazione anche la possibilità di una profilassi a dosi intermedie (ad esempio enoxaparina 4.000 U ogni 12 ore) in base alla valutazione individuale, nel caso di coesistenza di multipli fattori di rischio, sottolineando la mancanza di dati a supporto dell'utilizzo di anticoagulanti a dosi terapeutiche (35). In questo ambito, infatti, sono dibattuti possibili effetti benefici dell'eparina, per la sua azione antinfiammatoria (38,39) e, secondo alcuni modelli sperimentali, anche antivirali (40,41).

Le EBPM hanno dimostrato di possedere anche proprietà antinfiammatorie: infatti la frazione non anticoagulante della enoxaparina ha anche mostrato soppressione in vitro del rilascio di IL-6 e IL-8 da parte di cellule epiteliali polmonari umane (42). L'eparina possiede infatti, oltre all'azione anticoagulante, numerose funzioni immunomodulanti:

- inibizione dell'infiammazione
- inibizione del reclutamento dei granulociti neutrofili
- inibizione dei mediatori infiammatori indotti dai lipopolisaccaridi (LPS)
- inibizione della migrazione dei granulociti eosinofili.

Inoltre, studi sperimentali *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che i coronavirus umani utilizzano proteoglicani con eparansolfato per legarsi alle cellule bersaglio (43). In effetti, è stata recentemente dimostrata l'interazione tra il dominio di legame del recettore della proteina Spike S1 SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 S1 RBD) e l'eparina suggerendo un ulteriore ruolo per l'eparina nell'armamentario terapeutico contro il COVID-19 (41).

**Figura 3**

Attività farmacologica dell'eparina non frazionata, dell'eparina a basso peso molecolare e del fondaparinux.

A: Eparina non frazionata

B: Eparina a basso peso molecolare

C: Fondaparinux.

Modificata da: Cronenwett JL, Jonsthorp KW. *Antithrombotic therapy*. In: *Rutherford's Vascular Surgery*. ed. Saunders Elsevier, 2014: capitolo 35.

Va inoltre ricordato che particolare attenzione va posta nei confronti dei pazienti con COVID-19 che al momento dell'infezione erano già in terapia anticoagulante per varie indicazioni, con farmaci anticoagulanti di tipo anti-vitamina K (AVK, coumadin o sintrom) o con i Direct Oral AntiCoagulant (DOAC). In tali casi, l'uso di terapie con antibiotici o con antivirali, interferisce con l'azione anticoagulante di questi farmaci; in questi pazienti è stato quindi suggerito di sospendere i DOAC e gli AVK e di adottare una terapia con eparina (29).

## IL RUOLO DEL LABORATORIO DI COAGULAZIONE NEL MONITORAGGIO DEL TRATTAMENTO EPARINICO

### Metodi Cromogenici per il dosaggio dell'attività anti X attivato

#### Principio del metodo

Il metodo cromogenico per la determinazione dell'attività anti-X attivato nel plasma (attività anti-Xa) introdotto alla fine degli anni 1970 è il metodo di riferimento per la determinazione dell'EBPM e del

fondaparinux e per il controllo degli anticoagulanti orali diretti contro il FXa (denominati cumulativamente xabani) (32,44). Questo metodo misura in maniera indiretta la quantità di EBPM presente nel plasma del paziente attraverso la misura dell'inibizione dell'attività del fattore X attivato della coagulazione.

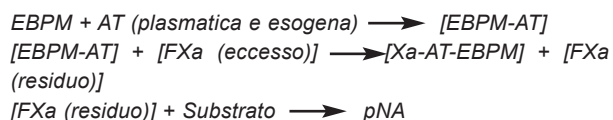
Ci sono diverse tipologie di metodi cromogenici che misurano l'attività anti-Xa: questi includono i test "one-stage", i test "two-stage" ed i test "ibridi".

I test di tipo "one-stage" e di tipo "two-stage" possono misurare sia l'EBPM che l'eparina non frazionata (ENF) attraverso l'uso di una calibrazione appropriata. Esistono inoltre, dei test definiti "ibridi" che utilizzano un'unica curva di calibrazione valida per entrambe le eparine EBPM ed ENF.

Il principio su cui si basano questi metodi è stato descritto da Teien et al. nel 1977: l'EBPM si lega all'AT formando complessi eparina-AT. Questi inibiscono il fattore Xa che viene aggiunto in eccesso. L'attività residua del fattore Xa è misurata attraverso la sua azione su un substrato altamente specifico che determina il rilascio di paranitroanilina (pNA). La pNA rilasciata viene monitorata cinematicamente a 405 nm ed è inversamente proporzionale al livello di EBPM nel

campione (Figura 4) (44-47).

In sintesi:



Le differenze fra i metodi disponibili in commercio sono riferibili ai tempi di incubazione della reazione, al tampone usato per diluire il plasma, al substrato e all'aggiunta di AT esogena. La presenza di destransolfato nel tampone riduce l'influenza degli antagonisti dell'eparina come il fattore piastrinico 4 (PF4) (44).

I metodi "one-stage" non prevedono l'aggiunta di AT esogena e sono stati sviluppati per semplificare il metodo e ridurre il tempo di risposta. Questo metodo si basa sul principio competitivo di inibizione. Il fattore Xa viene aggiunto alla miscela plasma-substrato portando a due reazioni simultanee: l'idrolisi del substrato da parte del fattore Xa e l'inibizione del fattore Xa dal complesso EBPM-AT endogena. Una volta che la reazione raggiunge l'equilibrio, la quantità di pNA rilasciata dal substrato è inversamente proporzionale alla concentrazione di EBPM nel plasma.

In sintesi:



L'aggiunta di AT esogena corregge i valori ridotti di AT presenti nei neonati, nei pazienti con carenza congenita di AT o nei pazienti cardiocirurgici. In tutti gli altri pazienti l'aggiunta di AT esogena può portare ad una sovrastima dell'attività anticoagulante *in vivo* (44).

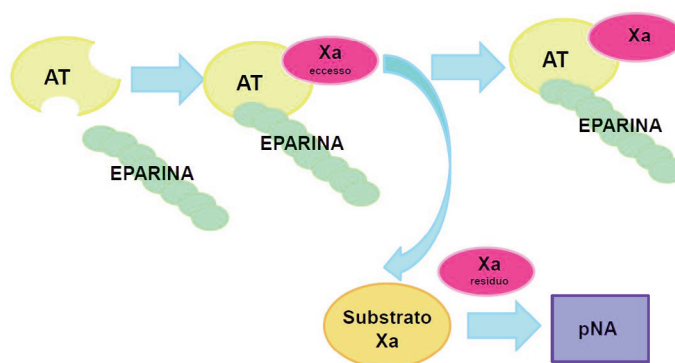
Per la curva di calibrazione, i kit del commercio utilizzano standard secondari che si riferiscono allo standard primario internazionale WHO per l'EBPM (Second International Standard 2003, concentrazione EBPM 1097 IU/ampolla). Dati della letteratura recenti hanno dimostrato che non è necessario ottenere curve specifiche per il tipo di eparina del commercio utilizzata dal paziente. In due diverse pubblicazioni viene dimostrato che le pendenze e le intercette delle curve di calibrazione ottenute con plasma addizionato con le diverse EBPM utilizzate nei pazienti presentavano valori simili a quelli ottenuti con i calibratori del commercio e che le eventuali piccole differenze riscontrate non erano clinicamente significative (48,49).

### Fase preanalitica: raccolta e processamento del campione

Per il prelievo è necessario utilizzare provette in vetro siliconato o polipropilene che contengono sodio citrato alla concentrazione 0,105 mmol/L come anticoagulante. Il prelievo deve essere effettuato mantenendo il laccio emostatico non più di un minuto in modo da evitare l'attivazione delle piastrine. L'attivazione delle piastrine, infatti, determina il rilascio di PF4 che si lega immediatamente all'eparina determinando una sottostima della concentrazione del farmaco presente nel plasma del paziente (50).

Così come per tutti gli altri esami di coagulazione sono accettabili solo i campioni contenenti almeno il 90% del volume previsto (50).

Le provette primarie devono pervenire in laboratorio ed essere processate entro 4 ore dalla raccolta (48). Devono essere trasportate senza subire traumi fisici e conservate a temperatura ambiente (15° - 25°C) fino al momento dell'esecuzione dell'esame. Il trasporto mediante posta pneumatica è consentito



**Figura 4**

Principio del test cromogenico per il dosaggio dell'attività anti-Xa.

AT, antitrombina; Xa, fattore X attivato; pNA, paranitroanilina

purché non induca una eccessiva vibrazione (da verificare sperimentalmente) (50,51).

Allo scopo di assicurare l'eliminazione completa dal plasma delle piastrine e delle microparticelle (MP) è necessario operare una doppia centrifugazione a 1500 g per 15 minuti con decantazione tra una centrifugazione e l'altra (50,52).

Qualora il campione non possa essere analizzato immediatamente dopo la doppia centrifugazione, il plasma deve essere separato e frazionato in aliquote in contenitori di polipropilene e congelato il più velocemente possibile a -70°C; il congelamento e la conservazione a -20°C non sono altrettanto efficaci e si associano a stabilità significativamente inferiore (50-52).

### Tempistica di monitoraggio e valori di riferimento

Grazie al suo effetto anticoagulante altamente predittivo ed alla sua efficacia e sicurezza in migliaia di pazienti trattati, l'EBPM è un farmaco che non richiede un monitoraggio routinario della sua attività. Vi sono tuttavia delle situazioni cliniche particolari in cui è necessario effettuare un controllo della sua attività mediante la valutazione dell'attività anti-Xa:

- pazienti obesi
- pazienti sottopeso
- pazienti con insufficienza renale
- donne nel terzo trimestre di gravidanza
- pazienti pediatrici.

La frequenza e la tempistica dei controlli sono suggerite dalle condizioni cliniche di questi pazienti. Nel monitoraggio dell'attività anti-Xa dell'EBPM si è osservato che le misurazioni e gli aggiustamenti effettuati al picco correlano meglio del nadir con l'efficacia e la sicurezza del farmaco (55).

Per ottenere la misurazione al picco dell'attività anti-Xa dell'EBPM, il prelievo deve essere effettuato 4 ore dopo la somministrazione dell'eparina.

I valori attesi dell'attività anti-Xa devono essere compresi tra 0,2 e 0,4 unità/mL in caso di dose profilattica, e tra 0,6 e 1,0 unità/mL in caso di dose terapeutica (56).

### CONCLUSIONI

L'altissima incidenza cumulativa di complicanze trombotiche nei pazienti COVID-19 positivi con sintomatologia grave suggerisce l'applicazione rigorosa di un trattamento anticoagulante con EBPM per le numerose proprietà non solo anticoagulanti ma anche anti-infiammatorie utili a contrastare la "tempesta citochinica" che si verifica nel corso dell'infezione nei pazienti con sintomatologia grave. La terapia con EBPM viene suggerita dalle principali Società Scientifiche nazionali ed internazionali. Il farmaco non richiede usualmente un monitoraggio di laboratorio ma, in alcune occasioni (alterazione della funzionalità renale, pazienti con estremi di peso) e in

alcuni protocolli è prevista la sua determinazione ad intervalli regolari. E' quindi importante che il Laboratorio di Coagulazione implementi il metodo cromogenico per la determinazione dell'attività anti-Xa, seguendo scrupolosamente tutti i suggerimenti inerenti alla tempistica del prelievo, al rispetto delle condizioni preanalitiche e alla corretta esecuzione dell'esame.

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

### BIBLIOGRAFIA

1. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* 2020;135:2033-40.
2. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implication for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2020;75:2950-73.
3. Zanolla M, Graziani MS. Al "cuore" del quadro clinico del COVID-19. *Biochim Clin* 2020 doi 10.19186/BC\_2020.063
4. Klok FA, Kruip Klok MJHA, van der Meer NJM. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020;191:145-7.
5. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020;18:844-7.
6. Mc Gonagle D, Sharif K, O'Regan A, et al. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev* 2020 doi:10.1016/j.autrev.2020.102537.
7. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect* 2020;80:607-13.
8. Henry BM, Vikse J, Benoit S, et al. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta* 2020;507:67-73.
9. Henry BM, Vikse J, Benoit S et al. Iper-infiammazione e squilibrio del sistema renina-angiotensina-aldosterone in corso di COVID-19: una nuova ipotesi per il sospetto clinico di ipercoagulabilità e immuno-trombosi microvascolare. *Biochim Clin* 2020 doi 10.19186/BC\_2020.067 (traduzione italiana da Clin Chim Acta 2020;507:67-73).
10. Frantzeskaki F, Armaganidis A, Orfanos SE. Immunothrombosis in acute respiratory distress syndrome: cross talks between inflammation and coagulation. *Respiration* 2017;93:212-25.
11. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:34-45.
12. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303(5663):1532-35.
13. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in arterial and venous thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2019;45:86-93.
14. Moschonas IC, Tselepis AD. The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis. *Atherosclerosis* 2019;288:9-16.

15. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 2020 doi:10.1172/jci.insight.138999.
16. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Intern J Biol Sci* 2013;9:1057-69.
17. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020;395(10234):1417-8.
18. Michels A, Albáñez S, Mewburn J, et al. Histones link inflammation and thrombosis through the induction of Weibel-Palade body exocytosis. *J Thromb Haemost* 2016;14:2274-86.
19. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil Extracellular Traps. *J Exp Med* 2020 doi:10.1084/jem.20200652.
20. Cao S, Wang Y, Wen D, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020;382:1787-99.
21. Iba T, Levy JH, Warkentin TE, et al. Diagnosis and management of sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2019;17:1989-94.
22. Ding R, Whang Z, Lin Y, et al. Comparison of a new criteria for sepsis-induced coagulopathy and International Society on Thrombosis and Haemostasis Disseminated Intravascular Coagulation Score in Critically Ill Patients with Sepsis 3.0: a retrospective study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2018;29:551-8.
23. Lippi G, Favaloro E. D-dimer is associated with severity of coronavirus disease 2019: a pooled analysis. *Thromb Haemost* 2020;120:876-8.
24. Tachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy of Covid 19. *J Thromb Haemost* 2020;18:1023-6.
25. Guan W, Ni ZH, Hu T, et al. Clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020;382:1708-20.
26. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020;18:844-7.
27. Ciavarella A, Peyvandi F, Martinelli I. Where do we stand with antithrombotic prophylaxis in patients with COVID-19? *Thromb Res* 2020 doi:10.1016/j.thromres.2020.04.023.
28. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801-10.
29. Eparine a basso peso molecolare nei pazienti adulti con COVID-19. [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1131319/covid-19\\_sperimentazioni\\_in\\_corso\\_27.03.2020.pdf](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1131319/covid-19_sperimentazioni_in_corso_27.03.2020.pdf) (ultimo accesso: giugno 2020)
30. Profilassi del tromboembolismo venoso in pazienti con COVID-19. <http://www.fcsa.it/assets/files/FCSA%20COVID19%203.pdf> (ultimo accesso: giugno 2020).
31. De Candia E. COVID-19 ed Emostasi. [http://www.siset.org/images/sisetonline/SISET\\_online\\_03-2020.pdf](http://www.siset.org/images/sisetonline/SISET_online_03-2020.pdf) (ultimo accesso: giugno 2020)
32. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, et al. Parenteral anticoagulants: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141(2 Suppl):e24S-e43S.
33. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 2008;99:807-18.
34. Hunt B, Retter A, McClintock C. Practical guidance for the prevention of thrombosis and management of coagulopathy and disseminated intravascular coagulation of patients infected with COVID-19. <https://thrombosisuk.org/covid-19-thrombosis.php> (ultimo accesso: giugno 2020).
35. Marietta M, Ageno W, Artoni A, et al. COVID-19 and haemostasis: a position paper from Italian Society on Thrombosis and Haemostasis (SISSET). *Blood Transfus* 2020;18:167-9.
36. Casini A, Alberio L, Angelillo-Scherrer A, et al. Thromboprophylaxis and Laboratory Monitoring for in-Hospital Patients with COVID-19 - a Swiss Consensus Statement by the Working Party Hemostasis. *Swiss Med Wkly* 2020 doi:10.4414/smw.2020.20247.
37. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2020;75:2950-73.
38. Thachil J The versatile heparin in COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020;18:1020-2.
39. Mousavi S, Moradi M, Khorshidahmad T, et al. Anti-inflammatory effects of heparin and its derivatives: a systematic review. *Adv Pharmacol Sci* 2015 doi:10.1155/2015/507151.
40. Ghezzi S, Cooper L, Rubio A, et al. Heparin prevents Zika virus induced-cytopathic effects in human neural progenitor cells. *Antiviral Res* 2017;140:13-7.
41. Mycroft-West C, Su D, Elli S, et al. The 2019 coronavirus (SARS- CoV-2) surface protein (Spike) S1 Receptor Binding Domain undergoes conformational change upon heparin binding. *bioRxiv* 2020 doi.org/10.1101/2020.02.29.971093.
42. Shastri MD, Stewart N, Horne J, et al. In-vitro suppression of IL-6 and IL-8 release from human pulmonary epithelial cells by non-anticoagulant fraction of enoxaparin. *PLoS One* 2015;10(5):e0126763.
43. Milewska A, Zarebski M, Nowak P, et al. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. *J Virol* 2014;88:13221-30.
44. Babin JL, Traylor KL, Witt D.M. Laboratory monitoring of low molecular weight heparin and fondaparinux. *Semin Thromb Hemost* 2017;43:261-9.
45. Teien AN, Lie M. Evaluation of an amidolytic heparin method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III. *Thromb Res* 1977;10:399-410.
46. Lyons SG, Lasser EC, Stein R. Modification of an amidolytic heparin assay to express protein-bound heparin and to correct for the effect of antithrombin III concentration. *Thromb Hemost* 1997;58:884-7.
47. Mith ML, Wheeler KE. Weight-based heparin protocol using anti-factor Xa monitoring. *Am J Health Syst Pharm* 2010;67:371-4.
48. Chan AKC, Black L, Ing C, et al. Do we need different standard curves for measuring different low molecular weight heparins? *J Thromb Hemost* 2007;5(Supplement 2)P-S-128.
49. McGrath J, Jhonston M, Angeloni F, et al. Does monitoring patients on low molecular weight heparin (LMWH) require specific reference lines for anti-factor Xa heparin assays. *J Thromb Hemost* 2001. Supplement, P-S-2239.
50. Morelli B, Montaruli B, Cabodi D, et al. per il GdS Emostasi SIBioC. La variabilità preanalitica in coagulazione. *Biochim Clin* 2019;43:313-26.
51. Toulon P, Appert-Flory A, Fischer F, et al. Monitoring unfractionated heparin therapy. 4 hours stability of anti Xa activity in unspun citrated tubes. *Thromb Res* 2020;186:7-12.

52. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, et al. Clinical and laboratory standards institute. collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; Approved Guideline. 5th ed. CLSI Document H21-A5. CLSI, Wayne, PA, 2008.
53. Laposata M, Green D, Van Cott EM, et al. College of American Pathologist Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy: the clinical use and laboratory monitoring of low molecular weight heparin, danaparoid, hirudin and related compounds, and argatroban. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:799-807.
54. Greaves M. Limitations of the laboratory monitoring of heparin therapy. Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2002;87:163-4.
55. Harenberg J. Is laboratory monitoring of low molecular weight heparin therapy necessary? Yes. *J Thromb Haemost* 2004;2:547-50.
56. Drage S, West J, Phillips B. Venous thromboembolism (VTE) prophylaxis and treatment in COVID-19 patients in critical care areas. <https://www.bsuh.nhs.uk/library/wp-content/uploads/sites/8/2020/04/BSUH-Crit-care-Anticoag-in-COVID-guidelinesv1.4-2170420.pdf> (ultimo accesso: giugno 2020).