

Valutazione di un esame funzionale basato sul tempo di protrombina nello studio della resistenza alla proteina C attivata

Sara Valverde¹, Gianluca Gessoni¹, Rosa Canistro², Daniela Basso³, Filippo Navaglia³, Francesco Antico¹, Ernesto Trabuio¹, Fabio Manoni⁴

¹Servizio di Medicina di Laboratorio e ²Servizio di Ematologia, A-ULS 14 Chioggia

³Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

⁴Servizio di Medicina di Laboratorio, A-ULS 17 Monselice

ABSTRACT

Evaluation of a prothrombin time (PT)-based functional test to study the activated protein C resistance. In clinical laboratories the first approach for diagnosis of Factor V Leiden (FVL) mutation is based upon functional tests revealing an activated protein C resistance (APCr). In this study we evaluated the efficiency of a new PT-based APCr test to detect FVL (Pefakit FVL). We studied 150 consecutive patients sent to our laboratory to investigate the presence of thrombophilia risk factors after an episode of deep venous thrombosis. The genetic study identified 66 (44%) FVL carriers (60 heterozygotes and 6 homozygotes). The Pefakit FVL allowed a perfect discrimination between normal subjects and FVL carriers, with a correct classification of 6/6 homozygotes and 59/60 heterozygotes. One heterozygous subject, classified as homozygous, showed a FV deficiency and was finally considered as a "pseudo-homozygote". By using the Pefakit FVL we did not observe interferences by heparin, oral contraceptives, oral anticoagulant therapy, protein C, protein S, D-dimer, plasma homocysteine, presence of MTHFR mutations and antiphospholipid autoantibodies. In our experience, this PT-based APCr assay provided improved discrimination between healthy subjects and FVL carriers when compared with classical activated partial thromboplastin time (aPTT)-based methods; moreover, this new assay allowed a good discrimination between homozygous and heterozygous FVL patients.

INTRODUZIONE

Il termine trombofilia definisce la tendenza a sviluppare trombosi a seguito di disturbi congeniti o acquisiti dei meccanismi coagulativi o fibrinolitici che provocano uno stato protrombotico (1). Inizialmente, quali cause di trombofilia familiare furono identificati i deficit di inibitori della coagulazione, quali antitrombina III (AT), proteina C (PC) e proteina S (PS) (2). Più recentemente, alcuni polimorfismi genici sono stati associati ad alcune comuni forme di trombofilia familiare: il fattore V Leiden (FVL) G1691V, che causa ipercoagulabilità in quanto resistente alla azione anti-coagulante della PC, la mutazione G20210A della protrombina che causa ipercoagulabilità generando una iperprotrombinemia e la mutazione G677A del gene della metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR) che può causare trombofilia inducendo iperomocisteinemia (3). Attualmente la malattia tromboembolica è valutata secondo una modalità multifattoriale in cui l'evento morboso è ricondotto ad una interazione tra fattori genetici ed ambientali (4).

Il FVL è presente quasi esclusivamente negli individui di ascendenza caucasica, con una prevalenza del 5% nella popolazione generale in Europa e del 18% nei soggetti con trombosi venosa profonda (TVP). Il rischio di sviluppare TVP è aumentato di 2-7 volte per i soggetti eterozigoti e di 40-80 volte per gli omozigoti. Il FVL sembra quindi essere il più importante fattore genetico di trombofilia nei paesi dell'Europa occidentale (5).

Nel soggetto sano, la PC attivata (APC) degrada il fattore Va (ed il fattore VIIIa) mediante idrolisi in corrispondenza dei residui di arginina in posizione 306, 506 e 679. La mutazione G1691V fa sì che in posizione 506 un glutammato vada a sostituire l'arginina. Questo comporta un decremento di 10 volte nella velocità di inattivazione del fattore Va da parte della APC.

L'approccio diagnostico al FVL prevede l'utilizzo di esami funzionali seguiti dalla conferma mediante esami genetici. Nei soggetti sani la APC degrada rapidamente e completamente il fattore Va (ed il fattore VIIIa) presenti nel plasma e quindi si ha un allungamento del tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) nella determinazione eseguita in presenza di APC esogena. Nel soggetto con FVL la APC non è in grado di degradare il fattore V mutato e quindi non si ha un allungamento dell'aPTT. Rapportando i risultati espressi in secondi dell'aPTT eseguito in presenza ed in assenza di APC esogena, si ottiene un rapporto che solitamente nei soggetti sani è superiore a 2,2. I risultati di questo metodo presentano abitualmente una certa sovrapposizione nei valori del rapporto osservati nei soggetti sani e nei portatori eterozigoti di FVL. I metodi per lo studio della resistenza alla APC (APCr) basati sull'aPTT mostrano inoltre numerose interferenze, ad esempio da presenza di anticorpi anti-fosfolipidi o da terapia eparinica (4,6).

Nel presente studio è stato valutato un nuovo metodo funzionale per la ricerca della APCr basato sulla determinazione di un rapporto derivato dalla esecuzione

di due tempi di protrombina (PT), con particolare riguardo alla sensibilità ad alcuni possibili fattori interferenti.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati valutati 150 pazienti pervenuti consecutivamente al nostro Servizio di Medicina di Laboratorio tra il Maggio 2004 ed il Giugno 2006 per valutare la presenza di eventuali fattori di rischio trombotico dopo un episodio di TVP. Tutti i pazienti erano di nazionalità Italiana, l'età era compresa tra 19 e 78 anni (media 63,4 anni), 96 (64%) erano donne e 54 (36%) uomini. Lo studio è stato autorizzato da Comitato Etico della A-ULS 14 della Regione Veneto; da tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso per l'ottenimento dei campioni biologici. Gli esami per la determinazione di AT, PC e PS sono stati eseguiti su di un campione ottenuto alla diagnosi, prima di iniziare eventuali terapie.

Esami funzionali

Reagenti e strumenti sono descritti nella Tabella 1. Per la ricerca della APCr è stato utilizzato un metodo basato sul rapporto dell'aPTT valutato con un metodo commerciale (Diagen APC ratio test (DAPCr) - Dasit). Questo metodo utilizza il valore soglia di 2,2 per la distinzione dei soggetti normali dai portatori di FVL.

Il metodo Pefakit FVL (Pentapharm) è un esame funzionale di nuova concezione, basato sul rapporto di due

PT; questo metodo è stato eseguito su analizzatore Sysmex CA 7000 seguendo le istruzioni del produttore. In breve, 30 μ L di plasma del paziente vengono diluiti con 20 μ L di un primo reagente contenente polibrene, del plasma depleto di fattore V ed un veleno di serpente in grado di attivare in maniera rapida e completa il fattore V presente nel plasma in esame ("russel viper venom" (RVV), ottenuto da Daboia russelii). Il campione così diluito viene posto in una cuvetta e vengono aggiunti 50 μ L di un secondo reagente contenente APC. Durante un periodo di incubazione (180 s a 37 °C) il fattore Va viene progressivamente inattivato dalla APC: la cinetica di tale inattivazione è notevolmente più lenta nel caso di FVL. Successivamente vengono aggiunti 50 μ L di un terzo reagente contenente EDTA ed un secondo veleno di serpente (noscarina, ottenuto da Notechis scutatus). La noscarina, in presenza di fattore Va, è in grado di attivare la protrombina convertendola in trombina causando la coagulazione del campione rilevata mediante determinazione del PT. Se il fattore Va è stato tutto degradato dall'APC esogena, come avviene nei soggetti sani, la coagulazione avverrà lentamente ed il PT apparirà assai prolungato. Se il fattore Va non è stato tutto degradato dall'APC, come avviene nei soggetti con FVL, la coagulazione avverrà rapidamente ed il PT rimarrà invariato. Eseguendo due determinazioni, una in presenza ed una in assenza di APC esogena, è possibile determinare il rapporto dei due PT così ottenuti (espressi in secondi). Nei soggetti sani il rapporto è compreso tra 4,2 e 6,9, nei

Tabella 1

Descrizione delle indagini utilizzate nel presente studio

Esame	Strumento		Reagente
Tempo di protrombina	Sysmex	CA 7000	Diagen Tromboplastina S
aPTT	Sysmex	CA 7000	Biopool APTT-P
Fibrinogeno	Sysmex	CA 7000	Biopool Bovine T thrombin 100 NIH
Tempo di trombina	Sysmex	CA 7000	Biopool Bovine T thrombin 10 NIH
D-dimero	Sysmex	CA 7000	Diagen D-Dimer
Antitrombina III	Sysmex	CA 7000	Biopool AT 3 Xa
Proteina C	Sysmex	CA 7000	Biopool Spectolyse Protein C
Proteina S	Sysmex	CA 7000	Instrumentation Laboratories Hemos IL Free protein S
Fattore V	Sysmex	CA 7000	Biopool FV deficient plasma
<i>Autoanticorpi anti-fosfolipidi</i>			
Ricerca LA	Sysmex	CA 7000	Diagen PTT lupus
Ricerca LA	Sysmex	CA 7000	Biopool DRVVT screening
Anti CL IgG	Alifax	Tek 4	Instrumentation Laboratories Imuclone aPL IgG
Anti CL IgM	Alifax	Tek 4	Instrumentation Laboratories Imuclone aPL IgM
Anti PR IgG	Alifax	Tek 4	Instrumentation Laboratories Imuclone anti prothrombin IgG
Anti PR IgM	Alifax	Tek 4	Instrumentation Laboratories Imuclone anti prothrombin IgM
Anti B2GP1 IgG	Alifax	Tek 4	Instrumentation Laboratories Imuclone anti B2GP1 IgG
Anti B2GP1 IgM	Alifax	Tek 4	Instrumentation Laboratories Imuclone anti B2GP1 IgM

aPTT, tempo di tromboplastina parziale attivato; LA, anticoagulante lupico; CL, cardiolipina; PR, protrombina; B2GP1, beta-2 glicoproteina 1.

soggetti eterozigoti per FVL tra 1,3 ed 1,9 e nei soggetti omozigoti per FVL tra 1,0 ed 1,1 (7).

Esami genetici

Il DNA genomico è stato estratto da 200 µL di sangue intero con un metodo di estrazione basato su particelle di silice paramagnetiche (BioSprint 15 DNA blood kit, Qiagen Italia) automatizzato su strumentazione King Fischer m1 (Thermo LabSystem). La presenza di ciascun polimorfismo è stata valutata mediante reazione PCR e concomitante discriminazione allelica con sonde Taqman. Le sequenze di riferimento dei geni del fattore V, del fattore II e del gene MTHFR sono state ottenute dal "National Center for Biotechnology database" (<http://www.ncbi.nlm.gov>). I "primers" e le sonde utilizzate sono state disegnate mediante il software Primers Express 2.0 (Applied Biosystems). La metodica è stata condotta secondo le indicazioni del produttore. Per la discriminazione genica è stato utilizzato uno strumento ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Le sonde ed i "primers" utilizzati sono riportati nella Tabella 2.

RISULTATI

Dei 150 pazienti esaminati, all'esame genetico 66 soggetti (44%) risultavano portatori di FVL (60 eterozigoti e 6 omozigoti per la mutazione G1691A).

Nei soggetti privi di mutazione, utilizzando DAPCr il rapporto medio era $4,04 \pm 1,22$, mentre utilizzando Pefakit FVL il rapporto medio era $5,11 \pm 1,18$. Nei soggetti eterozigoti per FVL, con DAPCr il rapporto medio era $1,78 \pm 0,16$, mentre utilizzando Pefakit FVL il rapporto medio era $1,49 \pm 0,11$. Nei soggetti omozigoti per FVL, utilizzando DAPCr il rapporto medio era $1,18 \pm 0,08$, mentre utilizzando Pefakit FVL il rapporto medio era $1,01 \pm 0,01$.

Entrambe le indagini permettevano la completa discriminazione tra soggetti normali e soggetti con FVL. Utilizzando DAPCr per distinguere tra portatori di FVL eterozigoti ed omozigoti (cutoff del rapporto, 1,3) abbiamo osservato un falso positivo e due falsi negativi; la sensibilità era 86% e la specificità era 76% con efficienza diagnostica pari al 85%. Utilizzando Pefakit FVL (cutoff del rapporto, 1,1) risultava possibile classificare

correttamente tutti gli omozigoti ed il 98% degli eterozigoti (59/60) (sensibilità 100%, specificità 98% ed efficienza diagnostica 99%).

In 37 soggetti (25%) abbiamo osservato la presenza di autoanticorpi anti-fosfolipidi (APA), definita come positività ad almeno uno degli esami utilizzati a questo scopo. Di questi soggetti, 12 erano normali e 25 erano portatori di FVL (4 omozigoti). 28 soggetti erano in terapia con eparina (non frazionata o a basso peso molecolare), dei quali 23 erano normali e 5 portatori di FVL (1 omozigote). 29 soggetti erano in terapia con anticoagulanti orali, 23 normali e 6 portatori di FVL. 15 soggetti erano in terapia con estro-progestinici, 3 normali e 12 portatori di FVL. 14 presentavano un incremento della concentrazione del D-dimero al momento della esecuzione delle indagini, 6 normali e 8 portatori di FVL (1 omozigote). 70 soggetti (47%) presentavano mutazione del gene MTHFR, 38 erano normali e 32 portatori di FVL (3 omozigoti). Sono stati anche osservati un paziente eterozigote per la mutazione 20210 della protrombina, 2 con deficit di AT, uno con deficit di PC e uno con deficit di PS; in tutti i casi si trattava di soggetti omozigoti "wild-type" per il fattore V. La Tabella 3 riporta i risultati dei valori del rapporto ottenuti con il metodo Pefakit FVL. In nessuno caso, era possibile evidenziare significative differenze nei valori del rapporto forniti da Pefakit FVL tra i soggetti con possibile interferente e quelli senza. Inoltre, i valori di rapporto dei PT ottenuti erano indipendenti dalla concentrazione di PC ($r=0,13$; $P=0,12$) e PS ($r=0,16$, $P=0,05$).

DISCUSSIONE

Il metodo Pefakit FVL presenta alcune caratteristiche che lo rendono estremamente interessante. Il campione da esaminare viene diluito con un reattivo contenente plasma umano fattore V carente, polibrene e RVV. La diluizione in un plasma reso carente di fattore V ha lo scopo di minimizzare le possibili interferenze dovute ad un aumento della concentrazione plasmatica di fattore V e fattore VIII aumentando la specificità dell'esame nell'individuare i soggetti con FVL (1,4,8). La presenza di polibrene ha il compito di ridurre l'effetto dell'eparina

Tabella 2

Primers e sonde utilizzati nel presente studio

Gene	SNP	Primers ^a	Sonde ^b
Fattore V	1691 G>A	5'AGACATCGCCTCTGGGCTAATAG3'	FAM-TATTCCTCGCCTGTCC-MGB
		5'GAAAGGTTACTTCAAGGACAAAATACCT3'	VIC-TATTCCTGCCTGTCCAG-MGB
Fattore II	20210 G>A	5'GTTTCTAAAATATGTTCCCAATAAAAGT3'	FAM-ACTCTCAGCGAGCC-MGB
		5'TGAATAGCACTGGGAGCATTGA3'	VIC-ACTCTCAGCAAGCC-MGB
MTHFR	677 C>T	5'AAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTC3'	FAM-ATGAAATCGACTCCC GC-MGB
		5'CCTCAAAGAAAAGCTGCGTGA3'	VIC-ATGAAATCGCTCCC GC-MGB

^a Linea superiore: "primer forward"; linea inferiore: "primer reverse".

^b Sottolineata è la mutazione puntiforme che è stata ricercata SNP, mutazione puntiforme; MTHFR, metilene tetraidrofolato reductasi.

Tabella 3

Valori del rapporto basato sul tempo di protrombina ottenuti con il metodo Pefakit FVL suddivisi a seconda della presenza o assenza di possibili fattori interferenti

	n	Mediana	95% CI
<i>Soggetti con presenza di autoanticorpi anti-fosfolipidi (APA)</i>			
FVL neg-APA neg	72	5,08	4,65-5,29
FVL neg-APA pos	12	5,29	4,32-6,05
FVL pos-APA neg	41	1,47	1,44-1,51
FVL pos-APA pos	25	1,48	1,41-1,59
<i>Pazienti in terapia con eparina (HEP)</i>			
FVL neg-HEP neg	61	5,23	4,84-5,49
FVL neg-HEP pos	23	4,61	3,71-5,36
FVL pos-HEP neg	61	1,51	1,46-1,52
FVL pos-HEP pos	5	1,49	NV
<i>Pazienti in terapia con anticoagulanti orali (TAO)</i>			
FVL neg-TAO neg	61	5,27	4,67-5,49
FVL neg-TAO pos	23	4,67	1,47-1,52
FVL pos-TAO neg	60	1,50	1,47-1,52
FVL pos-TAO pos	6	1,45	1,33-1,61
<i>Pazienti in terapia con estro-progestinici (EPT)</i>			
FVL neg-EPT neg	81	5,16	4,65-5,32
FVL neg-EPT pos	3	5,74	NV
FVL pos-EPT neg	54	1,48	1,45-1,52
FVL pos-EPT pos	12	1,51	1,47-1,57
<i>Pazienti con elevazione del D-dimero (DD)</i>			
FVL neg-DD neg	78	5,17	4,65-5,43
FVL neg-DD pos	6	4,79	3,91-5,49
FVL pos-DD neg	58	1,49	1,46-1,51
FVL pos-DD pos	8	1,58	1,00-1,78
<i>Pazienti con mutazione del gene metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR)</i>			
FVL neg-MTHFR neg	46	5,48	5,19-5,97
FVL neg-MTHFR pos	38	4,69	4,32-5,29
FVL pos-MTHFR neg	34	1,49	1,40-1,54
FLV pos-MTHFR pos	32	1,51	1,45-1,56

CI, intervallo di confidenza; FVL, fattore V Leiden; NV, non valutato.

eventualmente presente nel campione di plasma, mentre il RVV ha il compito di attivare rapidamente e completamente tutto il fattore V presente nella miscela trasformandolo in fattore Va. Questa miscela viene incubata con aggiunta di APC esogena che procede ad inattivare il fattore Va presente con una velocità che sarà elevata per il fattore Va normale ed assai minore (10 volte più bassa) per il fattore Va Leiden. In questo secondo caso la APC esogena non riuscirà ad idrolizzare tutto il FVL attivato presente nella miscela. A questo punto si aggiunge un altro reattivo contenente EDTA ed un secondo veleno, detto noscarina. La noscarina, in presenza di fattore Va, funge da attivatore della protrombina. In questo modo se nella miscela è presente un resi-

duo di fattore Va (come nei portatori di FVL) il coagulo si formerà con una velocità pressoché normale, mentre se nella miscela non è più presente fattore Va, poiché tutto idrolizzato dalla APC esogena (come avviene nei soggetti omozigoti "wild-type"), il coagulo si formerà assai lentamente. Il metodo non è quindi influenzabile dalle concentrazioni di fattore VII ed anche di fattore II, fattore IX e fattore X (essendo quindi sostanzialmente immune da possibili interferenze dovute alla terapia con anticoagulanti orali). Inoltre l'aggiunta di EDTA e la mancata ricalcificazione del plasma garantiscono che tutte le reazioni avvengano in un ambiente completamente privo di ioni calcio. Questo accorgimento, facendo sì che non si possano formare complessi fosfolipidici che necessitano

di ioni calcio, rende il metodo sostanzialmente immune da interferenze riconducibili alla presenza di APA.

Nella casistica esaminata, abbiamo rilevato 66 portatori della mutazione G1691A del fattore V. La prevalenza osservata (44%) risultava marcatamente più elevata di quanto riportato in letteratura in popolazioni analogamente selezionate, ove sono descritte prevalenze tra il 15% e il 20% (8-11). Oltretutto, sono stati identificati ben 6 pazienti (4%) omozigoti.

Tutti i soggetti omozigoti "wild-type" e tutti i portatori di FVL sono stati correttamente classificati utilizzando sia il kit DAPCr sia il Pefakit FVL. Nel differenziare i soggetti omozigoti per FVL dagli eterozigoti, Pefakit FVL, mostrava tuttavia una migliore efficienza diagnostica (99% vs. 85%).

In un soggetto eterozigote all'esame genetico abbiamo ottenuto, utilizzando il metodo Pefakit FVL, un rapporto dei PT di 1,00, tipico dei soggetti omozigoti. In questo paziente è stato possibile dimostrare un deficit di fattore V, la cui attività risultava <45%. Si trattava di un soggetto con una doppia eterozigosi; uno dei due alleli del fattore V presentava la mutazione G1691A, l'altro era silente (12).

Il fenomeno della APCr è solitamente, anche se non esclusivamente, riconducibile alla presenza del FVL; i soggetti con APCr di alto grado sono solitamente omozigoti. Tuttavia anche altre anomalie genetiche possono modulare la espressione fenotipica del fenomeno della APCr se valutata con metodiche funzionali (13). Una di queste è la doppia eterozigosi sopra descritta: questi pazienti sono definiti "pseudo-omozigoti" e sono caratterizzati da una ridotta concentrazione plasmatica di fattore V, che peraltro è completamente anomalo, cosa che spiega da un lato l'elevato grado di APCr osservato alle indagini funzionali e dall'altro l'elevato rischio trombotico osservato in questi soggetti (14,15).

Gli APA costituiscono un gruppo di autoanticorpi estremamente eterogeneo diretto verso fosfolipoproteine. Nell'ambito degli esami per la valutazione degli APA abbiamo utilizzato due metodiche coagulative per la ricerca dell'anticoagulante di tipo lupico ed inoltre abbiamo ricercato, con metodica immunoenzimatica, gli autoanticorpi (IgG ed IgM) diretti verso la cardiolipina, la protrombina, la β 2-glicoproteina 1. Nel 24% dei soggetti era possibile rilevare una positività ad almeno uno degli esami eseguiti. La presenza di APA costituisce quindi la più rilevante causa di trombofilia acquisita nella nostra casistica. La capacità degli APA di indurre APCr è ben nota ed è riconducibile a due meccanismi di azione sinergici. Da un lato gli APA mantengono basso il livello globale di risposta alla APC, dall'altro prevengono l'interazione delle proteine implicate nella cascata coagulativa con le superfici dei fosfolipidi (16). La presenza di APA è considerata un importante fattore interferente nello studio della APCr tanto da portare alcuni autori a consigliare per questi pazienti di utilizzare direttamente l'indagine genetica (17,18). In questo studio, utilizzando il metodo Pefakit FVL, non abbiamo rilevato alcuna interferenza derivante dalla presenza degli APA, confermando che tale metodo è in grado di fornire dei risultati affidabili pur in presenza di APA (19).

Uno dei maggiori problemi nell'approccio allo studio dei fattori di rischio trombofilico mediante esami di tipo funzionale in pazienti con TVP risiede nel fatto che tali pazienti sono spesso in trattamento con farmaci anticoagulanti. In effetti nella nostra casistica ben 57 pazienti (38%) erano in trattamento con farmaci anticoagulanti: 28 con eparina e 29 con anticoagulanti orali. La terapia con eparina va ad allungare il tempo di coagulazione rilevato dall'aPTT e quindi ad interferire con i metodi basati sul rapporto aPTT. La terapia con anticoagulanti orali deprime la sintesi dei fattori vitamina K-dipendenti (fattore II, fattore VII, fattore IX, fattore X, PC, PS) e quindi anch'essa può interferire con le indagini per la rilevazione della APCr. Il metodo Pefakit FVL non presentava tuttavia fenomeni di interferenza da parte della terapia anticoagulante. I nostri dati vanno quindi a confortare quanto riportato in letteratura circa la capacità di tale metodo di fornire dei dati affidabili nella valutazione della APCr con metodica funzionale pur in presenza di terapia anticoagulante (7,19).

In donne trattate con contraccettivi orali di terza generazione il rischio di sviluppare una TVP è circa 35 volte superiore nelle portatrici di FVL che nelle omozigoti "wild-type" (20). Gli estrogeni, così come la gravidanza, inducono una diminuzione della sensibilità alla azione anticoagulante della APC, dovuta, in via prevalente anche se non esclusiva, a modificazioni delle concentrazioni dei fattori della coagulazione (aumento di fattore II e fattore VIII, riduzione di AT, PC e PS) che spostano il bilancio emostatico in senso trombofilico (21,22). Nella nostra casistica, anche nel caso della assunzione di estrogeni, non si evidenziava alcuna interferenza con la determinazione della APCr mediante il rapporto dei PT.

Il ruolo delle mutazioni a carico del gene MTHFR e della iperomocisteinemia conseguente quali fattori di rischio trombofilico non è ancora completamente chiarito (23,24). Nella nostra casistica queste mutazioni sono state il polimorfismo di più frequente osservazione, riscontrato in 70 soggetti (46%) di cui 8 (5%) omozigoti. Come evidenziato nella Tabella 2, la presenza di polimorfismi a carico del gene MTHFR non sembra interferire con la valutazione della APCr mediante il metodo valutato.

La formazione di D-dimero è dovuta alla azione della plasmina sui polimeri stabilizzati di fibrina: un aumento della concentrazione si osserva in tutti i casi caratterizzati da una attivazione dei meccanismi di fibrinolisi. Tuttavia la plasmina possiede la capacità di idrolizzare anche altre proteine coinvolte nel processo emostatico come il fibrinogeno, il fattore V ed il fattore VIII. Quindi da un lato l'aumento della concentrazione del D-dimero è spia della attivazione della fibrinolisi, dall'altro può essere correlato alla inibizione di alcuni momenti della cascata coagulativa (25). Assai critica ci è sembrata quindi la valutazione dell'effetto del D-dimero sui risultati ottenuti con il kit Pefakit FVL. Anche in questo caso, tuttavia, non si osservava alcuna differenza significativa nei risultati ottenuti in presenza o in assenza di un suo aumento e si riteneva quindi di poter escludere interferenze attribuili

ad un'elevazione del D-dimero.

In conclusione, il metodo Pefakit FVL si è dimostrato di facile esecuzione su strumentazione automatica anche in un laboratorio di piccole dimensioni e senza particolare specializzazione in emostaseologia. L'efficienza diagnostica si è dimostrata soddisfacente anche in una casistica composta da soggetti con pregressa TVP ed in presenza di possibili fattori interferenti. Di particolare interesse sembra la possibilità di discriminare tra i portatori di FVL, i soggetti a rischio intermedio (eterozigoti) dai soggetti ad alto rischio (omozigoti o pseudo-omozigoti).

BIBLIOGRAFIA

1. Tripodi A, Mannucci P. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001;47:1597-606.
2. Somma J, Sussman I, Rand J. An evaluation of thrombophilia screening in an urban tertiary care medical center: a "real world" experience. *Am J Clin Pathol* 2006;126:1-8.
3. League S, Hooper W. Molecular diagnosis of inherited thrombosis. *Clin Lab Sci* 2005;18:271-9.
4. Saynalp N, Haznedaroglu I, Aksu S, et al. The predictability of factor V Leiden (FV:Q506) gene mutation via clotting based diagnosis of activated protein C resistance. *Clin Appl Thromb Haemost* 2004;10:265-70.
5. Heit J. The epidemiology of venous thromboembolism in the community: implications for prevention and management. *J Thromb Thrombolysis* 2006;21:23-9.
6. De Visser M, van Hylckama V, Tans G, et al. Determinants of APTT and ETP based APC sensitivity tests. *J Thromb Haemost* 2005;3:1488-94.
7. 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 Pathol* 2004;122:836-42.
8. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, et al. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica* 2002;87:1095-108.
9. Moll S. Thrombophilias – Practical implications and testing caveat. *J Thromb Thrombolysis* 2006;21:7-15.
10. Paschoa A, Guillaumon A. Impact of screening on thrombophilia for patients with venous thrombosis. *Int Angiol* 2006;25:52-9.
11. Franchini M, Veneri D, Salvagno G, et al. Inherited thrombophilia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43:249-50.
12. Castoldi E, Kalafatis M, Lunghi B, et al. Molecular bases of pseudo-homozygous APC resistance: the compound heterozygosity for FV R506Q and FV null mutation results in the exclusive presence of FV Leiden molecules in plasma. *Thromb Haemost* 1998;9:403-6.
13. Guerrero F, Arnaud C, Nguyen F, et al. Comparison of three activated protein C test in the risk assessment of venous thrombosis in non carriers of the factor V Leiden mutation. *Thromb Haemost* 2006;4:728-34.
14. Brugge J, Simioni P, Bernardi F, et al. Expression of the normal factor V allele modulates the APC resistance phenotype in heterozygous carriers of the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost* 2005;12:2695-702.
15. Delahousse B, lochmann S, Pouplard C, et al. Pseudo homozygous activated protein C resistance due to coinheritance of heterozygous factor V Leiden mutation and type I factor V deficiency. Variable expression when analyzed by different activated protein C resistance functional assays. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997;8:503-9.
16. Nojima J, Kuratsume H, Suehisa E, et al. Acquired activated protein C resistance associated with IgG antibodies against β 2-glycoprotein I and prothrombin as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Clin Chem* 2005;51:545-52.
17. Bokarewa M, Blombak M. Combination of activated protein C resistance and antibodies to phospholipids in the development of thrombosis. *Semin Haematol* 1997;4:235-43.
18. Ragland B, Reed C, Eiland B, et al. The effect of lupus anticoagulant in the second generation assay for activated protein C resistance. *Am J Clin Pathol* 2003;119:66-71.
19. Schöni R, Quehenberger P, Wu JR, et al. Clinical evaluation of a new functional test for detection of activated protein C resistance (Pefakit APC-R Factor V Leiden) at two centers in Europe and the USA. *Thromb Res* 2007;119:17-26.
20. Kemmeren J, Algra A, Meijiers J, et al. Effect of second and third generation oral contraceptives on the protein C system in absence or presence of the factor V Leiden mutation: a randomized trial. *Blood* 2004;103:927-33.
21. Dentali F, Crowther M, Ageno W. Thrombophilic abnormalities, oral contraceptives and risk of cerebral vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 2006;107:2766-73.
22. Rosendaal F, Helmerhost F, Vandenbroucke J. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost* 2002;116:851-4.
23. Zarychanski R, Houston D. Plasma homocysteine concentration is not associated with activated protein C resistance in patients investigated for hypercoagulability. *Thromb Haemost* 2004;91:1115-22.
24. Bauduer F, Iacombe D. Factor V Leiden, prothrombin 20210A, methylene tetra hydrofolate reductase 677T and population genetics. *Mol Genet Metab* 2005;86:91-9.
25. Weitz J, Leslie B, Hudoba M. Thrombin binds soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin independent inhibitors. *Circulation* 1998;97:544-52.