

Semeiotica di laboratorio delle malattie emorragiche e trombotiche

RIASSUNTO

La conoscenza della fisiopatologia dell'emostasi e dei test di laboratorio atti ad esplorare tutte le fasi del processo emostatico costituisce la base imprescindibile per approcciarsi correttamente al paziente con segni e/o sintomi suggestivi delle malattie emorragiche o trombotiche e per formulare una diagnosi corretta. Sono qui descritti i principali segni e sintomi del paziente con problematiche dell'emostasi e i più significativi test di laboratorio utilizzati nella diagnostica di primo e secondo livello dei disordini della coagulazione. La prima parte riguarda le malattie emorragiche e la seconda quelle trombotiche. In ciascuna parte, sono richiamati cenni di fisiopatologia e descritti più in dettaglio i test di laboratorio, suddivisi per livello di complessità, utili per la diagnostica delle malattie trombotiche o emorragiche. Sono inoltre descritti i sintomi da indagare con l'anamnesi e i segni da valutare con l'esame obiettivo che caratterizzano i disturbi dell'emostasi, e infine la metodologia clinica da applicare al paziente con sospetta malattia emorragica o trombotica.

Saper raccogliere una storia clinica familiare e personale suggestiva per malattia emorragica o trombotica, oggettivarne i segni ed applicare i corretti algoritmi di diagnostica di laboratorio delle patologie dell'emostasi rientra tra le nozioni essenziali per lo svolgimento della pratica clinica quotidiana.

CENNI DI FISIOLOGIA DELL'EMOSTASI

In condizioni di normalità il sistema coagulativo è quiescente, e la fluidità del sangue viene mantenuta dall'azione anticoagulante e antiaggregante delle cellule endoteliali che delimitano il lume del sistema vascolare. Nella sede di un danno vascolare, le fisiologiche proprietà anticoagulanti dell'endotelio vengono perse e le componenti procoagulanti sotto-endoteliali, in particolare il collagene, vengono esposte alla circolazione sanguigna. Il risultato è la rapida formazione di un coagulo emostatico costituito da piastrine e fibrina e localizzato nell'esatta sede del danno. L'attivazione delle piastrine e la formazione di fibrina avvengono simultaneamente e sono processi reciprocamente interconnessi, anche se per comodità vengono divisi in 2 fasi: emostasi primaria e secondaria. Successivamente, la riparazione del vaso è determinata dal processo fibrinolitico che ne favorisce la ricanalizzazione.

Emostasi primaria: l'emostasi primaria inizia subito dopo il danno della parete vasale e comprende la vasostrizione locale e il processo di adesione, attivazione e aggregazione piastrinica che formano un "tappo" piastrinico sul sito della lesione. L'attivazione piastrinica in un sito di lesione vascolare inizia con l'adesione delle piastrine alla superficie intimale de-endotelizzata localmente (interazione piastrina-parete vasale). L'*adesione* è mediata dal fattore von Willebrand (VWF), che "fissa" le piastrine circolanti alla parete del vaso danneggiato legandosi alla glicoproteina della membrana piastrinica Ib (GPIb). Le piastrine adese subiscono

quindi una reazione di *attivazione*, durante la quale vanno incontro ad un cambiamento di forma e rilasciano il contenuto dei loro granuli di stoccaggio, in particolare l'adenosina difosfato (ADP), e contemporaneamente formano il trombossano A2 dall'acido arachidonico attraverso la reazione cicloossigenasi mediata (inibita dall'aspirina). L'ADP, il trombossano A2 e altri componenti della reazione di attivazione agiscono di concerto per reclutare e attivare piastrine aggiuntive dalla circolazione al sito della lesione vascolare. Le piastrine attivate espongono i siti di legame del fibrinogeno attraverso il complesso glicoproteico di membrana IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) della famiglia delle integrine (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$). Nel processo di *aggregazione* piastrinica (interazione piastrina-piastrina), il fibrinogeno (o il VWF in condizioni di shear stress elevato- *i.e. stress da taglio*) media la formazione finale di un tappo piastrinico occlusivo. Lesione vascolare e attivazione piastrinica liberano localmente e in circolo anche un fattore tissutale (TF) che rappresenta l'evento principale per l'attivazione dell'emostasi secondaria.

Emostasi secondaria: l'emostasi secondaria, caratterizzata da una serie di reazioni enzimatiche a cascata finalizzate alla generazione di fibrina, consolida il "tappo" piastrinico e contribuisce alla formazione e al consolidamento del coagulo emostatico. La fibrina è formata dal fibrinogeno plasmatico solubile per azione della potente proteasi enzimatica trombina. La fibrina solubile polimerizza spontaneamente e viene a sua volta stabilizzata attraverso la formazione di legami covalenti mediata dal fattore (F)XIII attivato. Questo processo è stato storicamente definito la "*cascata della coagulazione*" e, per comodità didattica, viene arbitrariamente "distinto" in via intrinseca, estrinseca e comune (**Figura QR 37.1**). In realtà tali processi possono avvenire contemporaneamente senza una netta distinzione tra le varie fasi. Il processo coagulativo è fisiologicamente limitato al sito del danno vascolare, infatti, i fattori della coagulazione sono in grado di legarsi in maniera reversibile alle cellule endoteliali danneggiate, al sotto-endotelio leso e alle piastrine attivate.

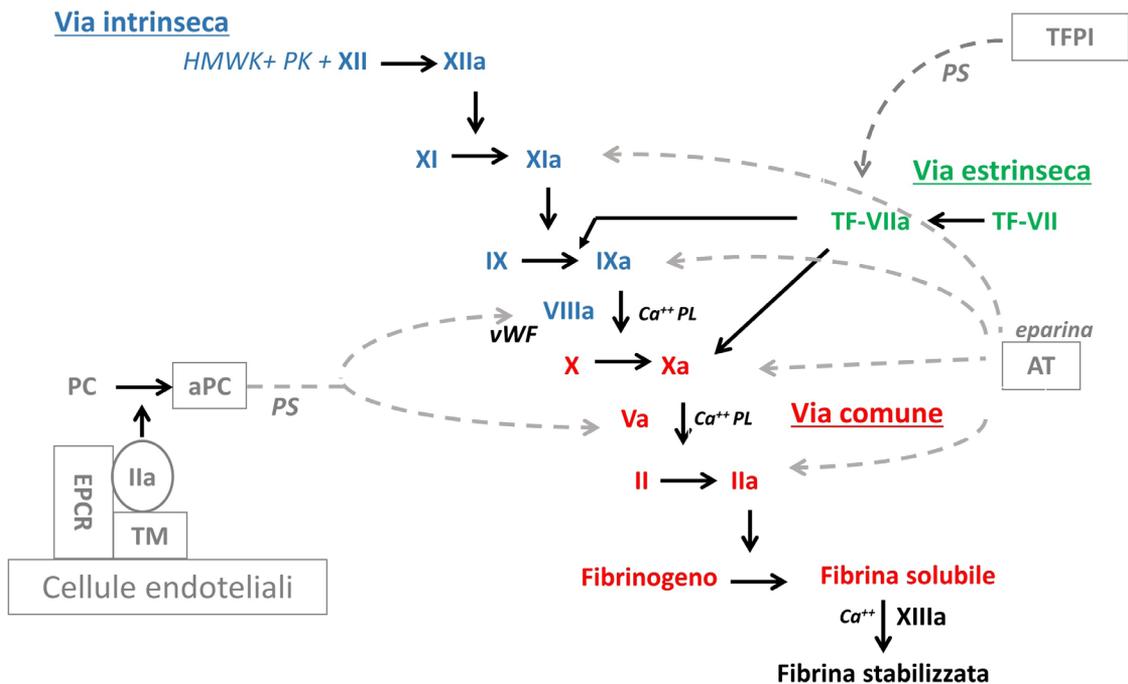
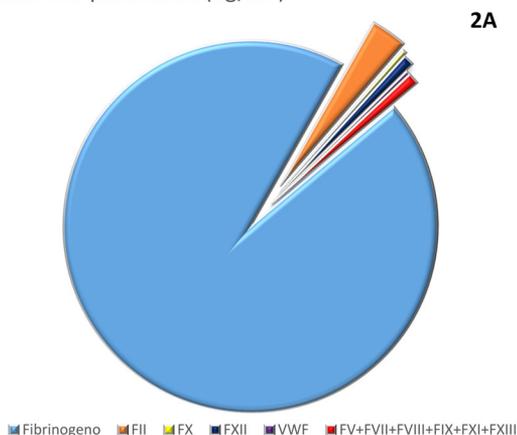


Figura QR 37.1 Sequenza delle reazioni che costituiscono la cascata coagulativa. Sono rappresentate schematicamente con diversi colori le reazioni della via intrinseca (azzurro), estrinseca (verde) e comune (rosso) della coagulazione che costituiscono l'emostasi secondaria. In grigio, il sistema degli anticoagulanti naturali.

Legenda figura: HMWK chininogeno ad alto peso molecolare; PK precallieina; TFPI tissue factor pathway inhibitor; vWF fattore di von Willebrand; AT antitrombina; PC proteina C; aPC proteina C attivata; PS proteina S; PL fosfolipidi; Ca^{++} calcio; TM trombomodulina; EPCR recettore endoteliale della proteina C.

La maggior parte dei fattori della coagulazione circola nel plasma come proenzimi inattivi (zimogeni) a singola catena e le reazioni coagulative avvengono in modo concatenato così che la forma attivata (enzima) di ciascun fattore catalizza l'attivazione (mediante taglio proteolitico parziale) del fattore successivo. Le principali caratteristiche dei fattori della coagulazione sono riassunte nella **Figura QR 37.2**.

Concentrazione plasmatica (ug/mL)



2B

Nome	Sede sintesi	Emivita (h)	Concentrazione (ug/mL)	Vitamina k-dipendenza
Fibrinogeno	Fegato	90	15000-450000	-
Protrombina FII	Fegato	60	100	+
Fattore V	Fegato, megacariociti	20	10	-
Fattore VII	Fegato	5	0,5	+
Fattore VIII	Sinusoidi epatici	12	0,1	-
FIX	Fegato	20	5	+
FX	Fegato	30	10	+
FXI	Fegato	45	5	-
FXII	Fegato	50	30	-
FXIII	Fegato, megacariociti	90-150	10	-
VWF	Cellule endoteliali, megacariociti	10	10	-

Figura QR 37.2 Principali caratteristiche dei fattori della coagulazione. 2A) Il grafico a torta mostra le concentrazioni plasmatiche dei fattori della coagulazione, si noti come il fibrinogeno sia il fattore a maggior concentrazione nel plasma e costituisca il 94% delle proteine della coagulazione circolanti. 2B) La tabella sintetizza le principali caratteristiche dei fattori della coagulazione e del fattore di von Willebrand (VWF).

La cascata coagulativa è fisiologicamente controllata dai sistemi anticoagulanti naturali che contro-regolano i fattori pro-coagulanti, permettendo di mantenere in equilibrio il sistema emostatico ed evitando la formazione di fibrina non necessaria. Tali sistemi di “inibizione” fisiologica della cascata coagulativa sono costituiti da:

- antitrombina (AT): appartiene alla famiglia delle “serpine” in grado di inibire la trombina ed i fattori Xa, IXa, XIa che sono tra i più importanti enzimi della cascata coagulativa.
- il sistema della proteina C e della proteina S: i suoi componenti sono la proteina C (PC), la proteina S (PS), la trombina, la trombomodulina (TM) e il recettore endoteliale della PC (EPCR). La PC attivata (APC) dal complesso trombina-TM-EPCR insieme al suo cofattore PS inattiva specificamente il FVa e il FVIIIa, due dei principali cofattori della cascata coagulativa.
- *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI): è l’inibitore della via estrinseca della cascata coagulativa che impedisce l’attivazione diretta del FX da parte del complesso FVIIa/AT. La PS è cofattore anche di questa attività inibitoria TFPI mediata.

I fattori II, VII, IX e X, proteina C e proteina S sono definiti “vitamina K–dipendenti” poiché necessitano della vitamina K per svolgere la loro azione biologica; la vitamina K è infatti indispensabile per il processo di carbosilazione a livello del fegato che rende i fattori suddetti in grado di legare il calcio e di ancorarsi ai fosfolipidi di membrana carichi negativamente. Gli anticoagulanti orali antagonisti della vitamina K (warfarin, acenocumarolo) inibiscono la riconversione della vitamina K ossidata in forma ridotta e quindi la reazione di γ -carbossilazione portando alla formazione di fattori ipo- o acarbossilati, parzialmente o totalmente inattivi.

Fibrinolisi. Consiste nel processo di degradazione della fibrina e agisce lisando enzimaticamente il coagulo nella sede di formazione. In sintesi, il danno vascolare, nel determinare l’intervento delle piastrine e l’attivazione della coagulazione con la formazione del trombo emostatico, causa anche la liberazione di attivatori della fibrinolisi con generazione di plasmina, potente enzima che agisce sul coagulo cercando di ristabilire la pervietà del lume vasale opponendosi anche alla deposizione di nuova fibrina. Il componente centrale del sistema fibrinolitico è il plasminogeno, una beta globulina I plasmatica, che viene trasformato in plasmina, responsabile della progressiva degradazione della fibrina stabilizzata in frammenti a peso molecolare via via decrescente. Il processo fibrinolitico è innescato da attivatori fisiologici (come l’attivatore tissutale del plasminogeno o tPA) e modulato da inibitori (come l’inibitore dell’attivatore del plasminogeno o PAI) (**Figura QR 37.3**). I principali substrati della plasmina sono il fibrinogeno e la fibrina con produzione di specifici frammenti chiamati, nel loro complesso, prodotti di degradazione del fibrinogeno e della fibrina (FDP = *fibrinogen/fibrin degradation products*). La degradazione del fibrinogeno conduce alla produzione dei frammenti X, Y, D ed E; la lisi della fibrina produce frammenti in parte diversi rispetto a quelli derivati dal fibrinogeno. Infatti, la stabilizzazione della fibrina da parte del FXIII (attivato dalla trombina) comporta la formazione di legami covalenti crociati fra monomeri di fibrina su cui la plasmina non è in grado di agire. Per azione plasminica si producono così prodotti di degradazione specifici della fibrina stabilizzata, il più piccolo dei quali, il D-Dimero (formato da due frammenti D provenienti da due diverse molecole di fibrinogeno uniti con legami crociati), è utilizzato in diagnostica come indice di lisi di fibrina stabilizzata.

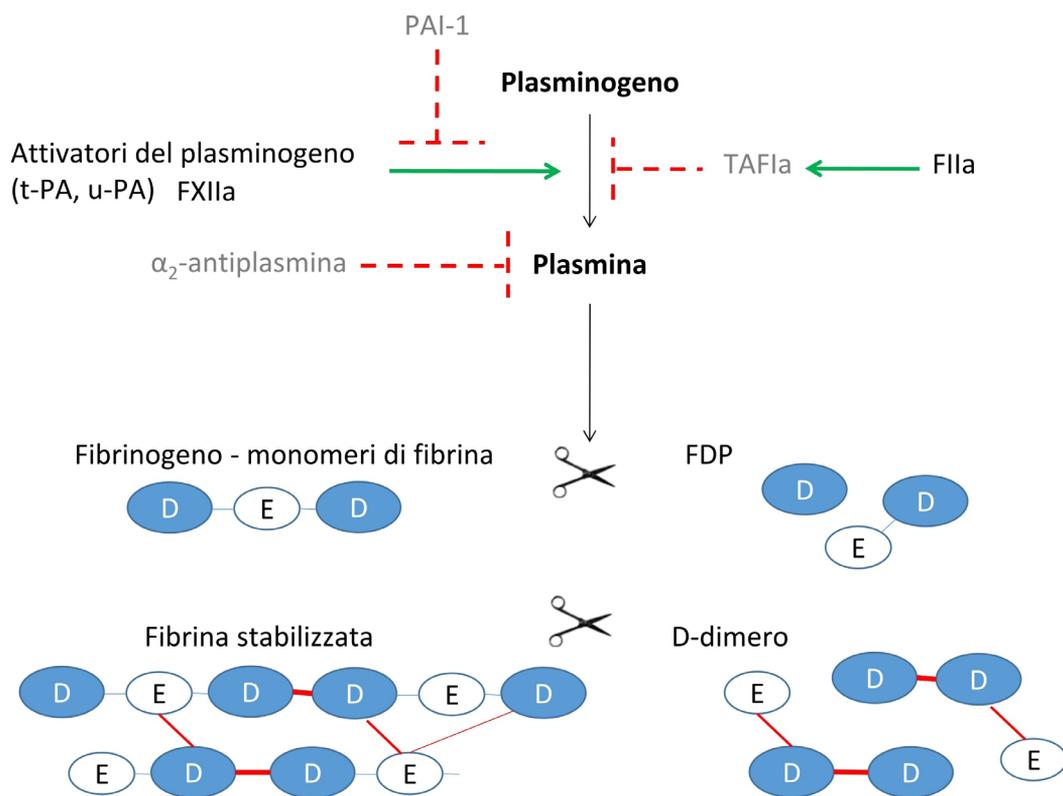


Figura QR 37.3 Sequenza delle reazioni che costituiscono il sistema fibrinolitico. È rappresentata schematicamente la fibrinolisi. In verde gli attivatori, in grigio gli inibitori del sistema fibrinolitico. Nella fibrinolisi intravascolare il principale attivatore del plasminogeno è il t-PA. L'u-PA agisce prevalentemente a livello extravascolare (coinvolto nella migrazione cellulare e nel rimodellamento tissutale). Il PAI-1 è il più importante inibitore di t-PA e u-PA. L'α₂-antiplasmina neutralizza la plasmina all'interno delle fibre di fibrina, impedendone l'azione sulla fibrina stessa. Il TAFI impedisce il legame del plasminogeno alla fibrina bloccando la generazione di plasmina.

Legenda figura: PAI-1 Inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno; t-PA attivatore tissutale del plasminogeno; u-PA attivatore del plasminogeno urochinasi; TAFIa inibitore della fibrinolisi attivabile dalla trombina; FDP prodotti di degradazione del fibrinogeno.

Difetto congenito di FXI (Emofilia C), Emofilia, Emartro, difetto congenito di fattore V, difetti congeniti di FX e FII

Il *difetto congenito di FXI (Emofilia C)* è uno dei difetti emorragici rari della coagulazione, ereditato prevalentemente come tratto autosomico recessivo. Tipicamente, si accompagna ad un fenotipo emorragico che non correla in modo lineare con i livelli di FXI. I portatori di difetto di fattore XI con livelli <20% spesso presentano solo sanguinamenti dopo chirurgia o traumi e talvolta non manifestano alcun episodio emorragico nel corso della loro vita. Inaspettatamente, portatori con livelli di FXI del 20-50% possono presentare emorragie muco-cutanee spontanee o provocate. I pazienti che vanno incontro a tonsillectomia, prostatectomia, estrazione dentaria sono particolarmente a rischio di sanguinamento post-procedura e le donne possono presentare menorragia.

L'*Emofilia* è una malattia emorragica ereditaria trasmessa attraverso il cromosoma X e causata dalla carenza di FVIII (A) e FIX (B). L'Emofilia A è più frequente e comprende l'80% dei casi di Emofilia, mentre l'Emofilia B è causa del restante 20%. I geni dei fattori VIII e IX sono localizzati sul cromosoma X: la malattia (X-linked) viene trasmessa come carattere recessivo e si manifesta nei maschi, mentre le femmine sono generalmente portatrici e possono trasmetterla ai figli.

La classificazione della malattia dal punto di vista clinico si basa sui livelli di attività del fattore:

- emofilia severa: attività fattore <1% (<1 IU/dL) → i pazienti hanno spesso sanguinamenti spontanei
- emofilia moderata: attività fattore 1-5% → i pazienti hanno spesso sanguinamenti provocati da traumi anche lievi
- emofilia lieve: attività fattore >5% → i pazienti hanno sanguinamento solo dopo trauma severo/chirurgia/procedure invasive/estrazioni dentarie.

L'*emartro* è la manifestazione emorragica più frequente e tipica; si manifesta principalmente al ginocchio, al gomito, alla caviglia e, meno frequentemente, alla spalla, al polso e all'anca. Gli emartri cominciano a manifestarsi sin dalla prima infanzia. Emartri ripetuti e non adeguatamente trattati, possono a lungo termine condurre ad una artropatia cronica che causa rigidità e deformazione dell'articolazione (artropatia emofilica). I regimi di profilassi con concentrati di fattore a breve o a lunga emivita hanno ampiamente ridotto o quasi annullato le evoluzioni più severe dell'artropatia emofilica. Le emorragie maggiori come le emorragie cerebrali e le emorragie che si manifestano a livello degli organi interni (per esempio a livello dell'apparato digerente, delle vie urinarie o del muscolo "ileo psoas") possono manifestarsi nei pazienti emofilici, con una frequenza associata alla gravità della malattia, ma comunque meno frequentemente rispetto alle emorragie articolari e muscolari.

L'allungamento combinato di PT e aPTT indica generalmente la carenza congenita dei fattori della via comune ovvero fattore X, V o II (**Tabella 30.2** nel manuale).

Il *difetto congenito di fattore V* è una malattia emorragica rara ereditata come autosomica recessiva. La severità del fenotipo clinico emorragico non correla con i livelli di fattori, anche perché il FV esiste anche all'interno degli α -granuli piastrinici e può sopperire alla carenza del fattore plasmatico riducendo il rischio di sanguinamento. Livelli di FV >25% garantiscono l'emostasi in condizioni normali.

I *difetti congeniti di FX e FII* sono malattie emorragiche rare ereditate come autosomiche dominanti con comportamento simile al difetto di FVII. Livelli >20% garantiscono una emostasi normale con sanguinamenti solo provocati da interventi chirurgici/traumi maggiori, mentre livelli <10% si associano ad emorragie variabili per gravità che vanno dal sanguinamento dal cordone ombelicale, ai sanguinamenti mucosi, emartri o ematomi muscolari o emorragie cerebrali.

Test di Secondo Livello

Test di mixing

È il test che si esegue nella diagnosi differenziale dell'allungamento dell'aPTT (o del PT) per avere un orientamento verso una causa congenita o acquisita della coagulopatia. Si esegue preparando un mixing di plasma del paziente con un pool di plasma normale in rapporto 1:1, incubando la miscela a 37 °C e misurando l'aPTT della stessa al tempo 0, dopo 60 min e 120 min di incubazione.

1. Un aPTT inizialmente allungato che diventa normale al tempo 0 del mixing (quindi subito dopo l'aggiunta di pool di plasma normale) e che rimane normale alle successive determinazioni orienta verso la presenza di un difetto congenito di fattori della coagulazione.

2. Un aPTT inizialmente allungato che si corregge solo parzialmente o non corregge al tempo 0 e rimane allungato in tutte le altre determinazioni, o addirittura si allunga ulteriormente con l'incubazione a 60 min o 120 min, indica la presenza di un inibitore (verosimilmente un LAC o anticorpo contro altro fattore, per esempio, FVIII). Anche un aPTT inizialmente allungato che si corregge completamente al tempo 0 ma poi si allunga di nuovo con l'incubazione a 60 min e 120 min indica la presenza di un inibitore (anticorpo diretto contro un fattore, per esempio, FVIII o LAC).

La diagnosi differenziale tra anticoagulante tipo lupus e inibitore diretto contro i fattori della coagulazione non è semplice ma la storia clinica del paziente (trombotica nel primo caso, emorragica nel secondo caso) aiuta a scegliere la via più ovvia per continuare lo studio. I test specifici di conferma per la ricerca del LAC piuttosto che il dosaggio dei singoli fattori verso cui un inibitore può essere diretto o il dosaggio del titolo dell'inibitore specifico, potranno consentire la diagnosi definitiva che dovrà sempre tenere conto anche del contesto clinico.

Il test di mixing si può eseguire anche in caso di allungamento del PT nella diagnosi differenziale tra carenza congenita dei fattori della coagulazione (soprattutto il FVII) o presenza di inibitore acquisito.

Con il termine "inibitori acquisiti" della coagulazione si intende un gruppo eterogeneo di autoanticorpi che si sviluppano in pazienti non affetti da malattie emorragiche congenite ed inibiscono la normale attività di uno o più fattori, o ne aumentano la clearance, causando di conseguenza quadri emorragici gravi e a volte fatali. Gli inibitori acquisiti più frequenti sono quelli diretti contro il fattore VIII che danno origine al quadro di Emofilia A acquisita. Ma possono svilupparsi anche anticorpi contro il VWF (malattia di von Willebrand acquisita) e, meno frequentemente, autoanticorpi diretti contro qualsiasi dei fattori della coagulazione (FII, FXIII etc). Gli inibitori acquisiti possono manifestarsi in associazione a patologie autoimmuni (LES, artrite reumatoide, sclerosi multipla, anemia emolitica autoimmune, Sindrome di Sjögren, miastenia gravis) o neoplastiche solide o ematologiche, oppure essere secondari alla gravidanza; nel 50% dei casi si tratta di forme idiopatiche che non si accompagnano a patologie sottostanti. Gli inibitori acquisiti sono solitamente IgG4 policlonali (di rado IgM o IgA).

Tempo di trombina

Il tempo di trombina (TT) si esegue aggiungendo trombina al plasma povero di piastrine. La trombina aggiunta determina direttamente la formazione di fibrina polimerizzata dal fibrinogeno. I valori normali sono in genere fra i 18 ed i 25 secondi, con ampia variabilità a seconda del metodo utilizzato e della popolazione di riferimento. Può essere anche espresso come rapporto semplice (TT paziente/TT normale). Il tempo di trombina sarà allungato nei difetti quantitativi e qualitativi congeniti o acquisiti di fibrinogeno e in presenza di terapia anticoagulante (eparina [0,2-0,5 U/mL] o inibitori diretti della trombina). Da ricordare che il TT si allunga anche in presenza di proteine anomale (mieloma multiplo) e prodotti di degradazione del fibrinogeno/fibrina (>50 µg/mL) che interferiscono sia con il distacco dei fibrinopeptidi A e B dalla molecola del fibrinogeno che con la polimerizzazione dei fibrino-monomeri.

Tempo di Reptilase

Il Tempo di Reptilase (TR) è simile come test al tempo di trombina, ma utilizza un veleno di serpente (*Bothrops Atrax*) che cliva direttamente il fibrinogeno consentendo il distacco del solo fibrino-peptide A ed è insensibile alla presenza di eparina. Il tempo di Reptilase si allunga nelle stesse condizioni del tempo di trombina, ma non in presenza di eparina. I valori normali sono espressi in secondi e sono variabili in rapporto alle caratteristiche del reagente impiegato.

Tempo di trombina e di reptilase sono soprattutto utilizzati nella diagnosi delle disfibrinogenemie.

I *difetti congeniti del fibrinogeno* sono disordini coagulativi rari di tipo quantitativo (ipofibrinogenemia o afibrinogenemia), di tipo qualitativo (disfibrinogenemia) o di tipo quali-quantitativo (ipo-disfibrinogenemia). Nel primo gruppo i livelli di fibrinogeno circolante sono ridotti (<1,5 g/L) o assenti; nel secondo e terzo gruppo vi è una discrepanza tra i livelli di attività procoagulante e di proteina circolante (antigene), dovuta alla presenza di una molecola qualitativamente alterata. L'afibrinogenemia si accompagna a sanguinamenti anche in epoca neonatale (dal moncone ombelicale) o in età più adulta sottoforma di sanguinamento cutaneo e mucoso (orale, gastro-intestinale, genito-urinario), possono verificarsi anche emorragie cerebrali che sono la causa principale di morte. Gli ematriti sono descritti come pure sanguinamento prolungato dopo veno-puntura, difficoltà nella guarigione delle ferite e suscettibilità alla rottura spontanea della milza. Le donne possono andare incontro a complicanze ginecologico-ostetriche, quali meno-metrorragie, aborti spontanei ricorrenti, emorragie durante la gravidanza e nel post-partum. L'ipofibrinogenemia è invece una patologia solitamente asintomatica poiché livelli di fibrinogeno >1 g/L sono solitamente sufficienti dal punto di vista emostatico e anche per evitare problematiche durante la gravidanza. Tuttavia, si possono verificare sanguinamenti post-traumatici o in corso di chirurgia. È importante ricordare che in alcuni casi i pazienti con difetti quantitativi di fibrinogeno possono andare incontro ad episodi di trombosi venosa e/o arteriosa. La spiegazione fisiopatologica sembra essere dovuta al fatto che, pur in assenza di fibrinogeno, si ha comunque la formazione di trombina. Normalmente la fibrina, risultante dal clivaggio del fibrinogeno da parte della trombina, lega a sua volta la trombina riducendone l'attività pro-coagulante. Pertanto, nei difetti quantitativi di fibrinogeno la trombina generata non verrebbe adeguatamente inibita, dando luogo ad uno stato di ipercoagulabilità paradossa.

La disfibrinogenemia e ipodisfibrinogenemia sono più frequenti dei difetti quantitativi e generalmente causati da una mutazione missenso [*i.e. mutazione puntiforme che comporta lo scambio tra due aminoacidi del DNA; dà origine ad un codone codificante per un diverso aminoacido. In genere lo scambio avviene tra le due purine o tra le due pirimidine*] in uno dei 3 geni del fibrinogeno. Le manifestazioni cliniche sono eterogenee; infatti, i portatori possono essere asintomatici o presentare un fenotipo trombotico e/o emorragico.

Dosaggio dei singoli fattori

Per tutti i fattori della coagulazione è possibile valutare sia la funzione con misura della attività pro-coagulante che la concentrazione della proteina (antigene) con metodi immunologici.

L'attività pro-coagulante è determinata dalla capacità del plasma diluito del paziente di modificare il tempo di coagulazione di specifici plasma carenti del fattore da testare. L'attività coagulante dei fattori XII, XI, IX e VIII si determina mediante modificazioni dell'aPTT con uso di plasmidi carenti del fattore in esame; l'attività pro-coagulante dei fattori VII, II, X e V mediante PT e rispettivi plasmidi carenti. Il tempo di coagulazione è quindi direttamente proporzionale all'attività del fattore testato. Il risultato è generalmente espresso come percentuale dell'attività dei fattori nel plasma di controllo, ma può anche essere espresso in UI/dl; essendo presente un'unità di attività in 1 ml di plasma normale con attività al 100%, il 100% corrisponde a 100 UI/dl o a 1UI/ml. La misurazione dell'attività dei fattori è un passaggio essenziale nel determinare la causa di un PT o aPTT prolungato.

Sono disponibili anche antisieri specifici per i singoli fattori che permettono la determinazione della concentrazione plasmatica dei fattori della coagulazione (antigeni) con metodi immuno-elettroforetici o con metodi ELISA.

Dosaggio del fibrinogeno

Il metodo raccomandato per il dosaggio del fibrinogeno è un metodo qualitativo funzionale (test cronometrico di von Clauss); quando un'alta concentrazione di trombina viene aggiunta al plasma diluito, il tempo di coagulazione è proporzionale al livello di fibrinogeno. I valori normali sono 150-450 mg/dL. I livelli di attività del fibrinogeno possono anche essere stimati utilizzando un test cinetico basato sul PT, che è un test rapido, economico e automatizzato, sebbene meno specifico dell'attività del fibrinogeno (fibrinogeno derivato). Sono disponibili anche test immunologici per la quantificazione dell'antigene (test di immunodiffusione), ma non vengono utilizzati per i test di screening. Questi saggi immunologici misurano la concentrazione proteica piuttosto che l'attività funzionale del fibrinogeno. La misurazione del fibrinogeno è indicata nei casi di sintomi emorragici manifesti o nel sospetto di coagulazione intravascolare disseminata, insufficienza epatica o iperfibrinolisi. Il fibrinogeno è una proteina della fase acuta e quindi elevati livelli plasmatici accompagnano gli stati flogistici, i traumi e le neoplasie.

Tromboelastografia e tromboelastometria

La tromboelastografia è stata sviluppata dal Dr. Hellmut Hartert nel 1948 per descrivere i cambiamenti viscoelastici osservati in un campione usando la polimerizzazione della fibrina. Le recenti innovazioni tecniche e informatiche hanno migliorato la sua utilità per la valutazione clinica perioperatoria e la gestione acuta delle coagulopatie emorragiche. Si tratta di metodiche point-of-care, bed-side ("al letto del paziente") che misurano in maniera globale i cambiamenti viscoelastici del coagulo che si forma da sangue intero dopo l'aggiunta di un attivatore specifico della coagulazione. Ci sono vari strumenti attualmente in commercio (TEG®, ROTEM®, Quantra®) che misurano le variazioni viscoelastiche del coagulo che si forma per effetto della interazione dinamica di fattori di coagulazione, inibitori e componenti cellulari del sangue intero una volta attivata la coagulazione e nella successiva lisi. Nel maggior numero di strumenti i test si basano sul rilevamento attraverso un sensore dell'impedenza al movimento di un perno all'interno di un cilindro contenente il sangue intero una volta attivate le vie intrinseca o estrinseca. In sintesi, dopo l'incubazione di circa 300 µl di sangue intero citrato in una cuvetta cilindrica di plastica riscaldata a 37 °C, viene aggiunto calcio e un attivatore specifico. I filamenti di fibrina che si formano tra cuvetta e perno, limitano la rotazione di quest'ultimo che si traduce in un aumento dell'impedenza trasformata dal sensore nella traccia tromboelastometrica. Questi cambiamenti vengono rilevati meccanicamente o otticamente, quindi trasmessi elettronicamente e trasformati in letture numeriche e grafiche. In base agli attivatori che si aggiungono si possono esplorare la via intrinseca, la via estrinseca e la quantità/funzione del fibrinogeno. Si può inoltre esplorare la fibrinolisi e la presenza di eparina nel sangue. Queste metodiche sono utilizzate nelle emergenze emorragiche e nella gestione coagulopatie acquisite, in particolare nella chirurgia dei trapianti di fegato, nella cardiocirurgia, nei traumi e nelle emergenze ostetriche (emorragia post-partum). Il contributo dei POC nella gestione delle emorragie severe è stato rilevante negli ultimi anni consentendo la definizione di protocolli specifici per la supplementazione di emoderivati o concentrati di fattori della coagulazione in modo più appropriato (così detto "approccio teragnostico", terapeutico-diagnostico combinato).

Test di Secondo Livello per lo studio delle piastrine

Fattore di von Willebrand

La malattia di von Willebrand (vWD) è la malattia emorragica congenita più frequente ed è causata dalla carenza o disfunzione del vWF. Anche i livelli del fattore VIII possono essere alterati in presenza di vWD. Il vWF è costituito da unità proteiche multimeriche di dimensioni eterogenee. Di norma, i multimeri di vWF a più alto peso molecolare mostrano una maggiore efficacia emostatica rispetto a quelli di dimensioni più piccole. Va ricordato che il vWF ha due funzioni chiave: oltre a mediare l'adesione piastrinica al collagene sub-endoteliale nel sito di danno vasale (legandosi al complesso GP Ib/V/IX sulla superficie piastrinica), il vWF è la proteina che veicola il fattore VIII circolante e ne impedisce la rapida proteolisi. La presentazione

clinica della vWD è principalmente il sanguinamento muco-cutaneo, come ecchimosi, epistassi, sanguinamento dopo estrazione dentaria o altri interventi chirurgici, e menorragia.

La malattia è stata classificata in tre tipi.

Il tipo I è il più comune e rappresenta il 60-80% dei casi. È un difetto quantitativo globale causato dalla carenza di vWF in cui si rileva solo il 5-40% dei livelli normali di vWF oltre ad una riduzione dei livelli del FVIII. I pazienti con vWD di tipo I possono presentare lievi sintomi clinici come una propensione alle ecchimosi, sanguinamento delle mucose o menorragia. La vWD di tipo 2 è meno comune, rappresentando circa il 17% dei casi ed è caratterizzata da un vWF qualitativamente anormale che può anche essere associato a trombocitopenia e diminuzione del fattore VIII. Esistono quattro sottotipi. Il tipo 2A manca dei normali multimeri del vWF (ad alto e intermedio peso molecolare) a causa di proteolisi anomala o ridotta secrezione del fattore. Il tipo 2B è caratterizzato dall'iperattività del vWF e ha una maggiore affinità di legame con le piastrine causando la creazione di complessi che vengono rapidamente eliminati dalla circolazione, con conseguente trombocitopenia. Nel tipo 2M vi è una ridotta capacità di legame piastrinico al vWF non dovuta a mancanza dei multimeri ad alto peso molecolare e il tipo 2N mostra una diminuzione del legame del VWF al fattore VIII. Il tipo 3 è la forma più rara e più grave della malattia che rappresenta circa il 3% dei casi, in cui vi sono livelli notevolmente ridotti di vWF e FVIII.

La storia emorragica del paziente, in particolare la storia familiare e il PFA-100 sono di fondamentale importanza per la diagnosi. È poi disponibile un panel di analisi di secondo livello per puntualizzare la diagnosi (**Tabella QR 30.1**):

- l'antigene vWF misura la quantità di vWF; i livelli plasmatici di vWF variano in base al gruppo sanguigno: i pazienti con gruppo sanguigno 0 hanno livelli di VWF più bassi (fino al 40%) rispetto a individui di altri gruppi sanguigni.
- l'attività pro-coagulante del fattore VIII misura l'attività funzionale del fattore VIII;
- l'attività vWF-cofattore della ristocetina e l'attività vWF-legante il collagene misurano l'attività funzionale del VWF.

Ulteriori test sono necessari per la diagnosi dei sottotipi:

- il saggio di legame al FVIII misura l'affinità di vWF per il fattore VIII (utile nella dd della vWD di tipo 2N).
- l'analisi dei multimeri di vWF mostra come il monomero vWF è multimerizzato (unito in catene, utile nella diagnosi differenziale della vWD di tipo 2A e 2B).
- l'aggregazione piastrinica indotta dalla ristocetina misura la sensibilità della vWF alla ristocetina (utile nella diagnosi differenziale della vWD di tipo 2B e 2M).

Tabella QR 37.1 Diagnosi di laboratorio dei diversi sottotipi di Malattia di von Willebrand (VWD).

VWD	VWF antigene	VWF attività-cofattore alla ristocetina	FVIII	Multimeri ad alto peso molecolare	Aggregazione piastrinica indotta dalla ristocetina
Tipo 1	↓	↓	↓	Normali	↓
Tipo 2A	↓/Normale	↓	↓/ Normale	↓	↓↓
Tipo 2B	↓/Normale	↓	↓/ Normale	↓	↑
Tipo 2N	↓/Normale	↓/Normale	↓	Normali	Normale
Tipo 2M	↓/Normale	↓/Normale	↓/ Normale	Normali	↓
Tipo 3	<5%	<10%	<10%	Assenti	Assente

Test di aggregazione piastrinica

I test di aggregazione piastrinica sono prevalentemente indicati per lo studio dei disturbi piastrinici qualitativi ereditati o acquisiti (piastrinopatie). Questi test sono utili in pazienti con sospetta malattia dell'emostasi primaria (porpora, sanguinamento cutaneo-mucoso) con una normale conta piastrinica e dopo aver escluso la malattia di von Willebrand. Dopo centrifugazione, il plasma ricco di piastrine viene incubato con vari attivatori dell'aggregazione mediante apparecchio fotometrico di Born. Gli attivatori comunemente usati per esplorare le diverse vie di attivazione delle piastrine sono acido arachidonico (0,5-5 mM), ADP (0,5-10 μ M), collagene (2-4 mg/L), trombina (100-500 U/L), epinefrina (1-10 μ M) e ristocetina (1,5 g/L). La trasmissione della luce attraverso il plasma ricco di piastrine aumenta quando le piastrine sono ammassate in aggregati. Viene quindi studiata la modifica della densità ottica (OD) legata alla differente trasmissione della luce dovuta all'aggregazione piastrinica indotta dall'agonista. Il risultato viene espresso come % di variazione della trasmissione della luce o come concentrazione minima di agente induttore in grado di ridurre la trasmissione della luce del 50% e registrato su un grafico (tracciato aggregometrico). La secrezione piastrinica può anche essere studiata dopo l'attivazione piastrinica con diversi agonisti. L'aggregometria piastrinica a trasmissione della luce (LTA) è un esame del sangue che serve a verificare la funzionalità delle piastrine e quindi a valutare il processo della coagulazione, viene solitamente eseguita in laboratori qualificati.

L'aggregazione alla ristocetina è ridotta nella malattia di von Willebrand e nella malattia di Bernard-Soulier, in cui le piastrine che sono di volume aumentato, hanno una ridotta espressione di glicoproteina Ib e quindi non sono in grado di aderire all'endotelio.

L'aggregazione mediata dai diversi induttori, eccetto quella da ristocetina, è assente nella tromboastenia di Glanzmann per riduzione della glicoproteina IIb/IIIa e ridotta nelle piastrinopatie da storage-pool disease, difetti di secrezione, o da alterazione del metabolismo dell'acido arachidonico.

Cito-fluorimetria

L'uso della citofluorimetria è diventato importante nella diagnosi delle patologie piastriniche. Può essere utilizzata per misurare con specifici anticorpi la presenza delle glicoproteine di membrana (come GP IIb/IIIa o Ib) e quindi diagnosticare le piastrinopatie ereditarie da difetto della membrana piastrinica sulla base della mancanza dei recettori di membrana (come tromboastenia di Glanzmann o Sindrome di Bernard-Soulier) oppure analizzare i granuli piastrinici con determinati anticorpi e quindi diagnosticare le piastrinopatie da deficit dei granuli piastrinici.

Test per lo studio della fibrinolisi – Test di Secondo Livello

Disordini del sistema fibrinolitico possono essere sia congeniti che acquisiti e possono essere associati a sintomi emorragici. Le cause più frequenti di iperfibrinolisi sono acquisite ed in particolare la coagulazione intravascolare disseminata (CID) e i traumi possono costituire vere e proprie emergenze emorragiche.

Nella pratica clinica non c'è un test di laboratorio standardizzato che sia in grado di "misurare" l'attività del sistema fibrinolitico in toto. La fibrinolisi viene valutata attraverso l'analisi dei livelli di fibrinogeno e dai livelli dei prodotti di degradazione del fibrinogeno-fibrina e della fibrina stabilizzata.

Prodotti di degradazione del fibrinogeno e della fibrina (FDP)

Si tratta della misura nel plasma dei prodotti di degradazione della molecola fibrinogeno-fibrina che avviene ad opera della plasmina. Il test si esegue mettendo a contatto con il siero del paziente particelle di lattice su cui sono adsorbiti anticorpi policlonali o monoclonali che reagiscono con antigeni del fibrinogeno (per lo più frammenti D e E). Nel siero non vi è fibrinogeno per cui, in caso di reazione di agglutinazione, questa è dovuta a prodotti di degradazione del fibrinogeno e della fibrina.

I livelli di FDP sono aumentati nelle situazioni di aumentata lisi del fibrinogeno-fibrina, come CID, iperfibrinolisi, terapia trombolitica.

Prodotti di degradazione della fibrina stabilizzata (D-dimero)

Quando i monomeri di fibrina si legano per formare il coagulo, il fattore XIII agisce legando in maniera covalente i domini D e formando la fibrina stabilizzata. Questi legami covalenti sono resistenti all'azione della plasmina che non può scinderli e pertanto vengono misurati in circolo (D-dimero). Pertanto, elevati livelli di D-dimero indicano che 1) è avvenuta la generazione di trombina che ha agito sul fibrinogeno a formare monomeri di fibrina che si sono legati in maniera covalente ad altri monomeri per azione del fattore XIII e 2) il coagulo stabile così formato è stato lisato dall'azione della plasmina. In altre parole, i livelli di D-dimero documentano la formazione di fibrina in vivo e quindi una fibrinolisi secondaria all'attivazione della coagulazione.

Ci sono diversi metodi per la misura del D-dimero:

- metodi semi-quantitativi: utilizzano per lo più particelle di lattice di polistirolo rivestite con un anticorpo monoclonale anti-D-dimero. Il legame di diverse particelle di lattice con diverse molecole di D-dimero determina la formazione di un reticolo con agglutinazione del lattice visibile a occhio nudo. Conoscendo la sensibilità del sistema è possibile avere una misura semi-quantitativa del D-dimero.
- metodi ELISA quantitativi.

I valori normali dei metodi semi-quantitativi sono inferiori alla sensibilità del metodo (200-500 ng/mL), mentre quelli del metodo ELISA sono inferiori a 60 ng/mL.

I livelli di D-dimero sono elevati in caso di iperfibrinolisi (CID), ma anche tromboembolia (embolia polmonare, trombosi venosa, trombosi arteriosa), neoplasia, gravidanza, sepsi, cirrosi, e nel periodo postoperatorio. I livelli di D-dimero sono ampiamente utilizzati per escludere un evento tromboembolico venoso poiché un risultato normale ha un alto valore predittivo negativo (95-98%) (vedi testo scritto).

Altri test del sistema fibrinolitico

Il tempo di lisi delle euglobuline (ELT) è un test globale di studio della iperfibrinolisi che valuta la dissoluzione della fibrina in un ambiente in cui è pressoché assente ogni attività antiplasminica. Il plasma citratato viene diluito e acidificato per ottenere la precipitazione della frazione euglobulinica che contiene fibrinogeno, plasminogeno, gli attivatori della fibrinolisi e, solo una parte degli inibitori della fibrinolisi (il PAI-1). Il precipitato euglobulinico viene disciolto e il fibrinogeno in esso contenuto viene trasformato in fibrina dopo aggiunta di trombina. Da questo momento viene misurato il tempo necessario per ottenere la completa lisi del coagulo a 37 °C. Il sistema utilizza quindi la fibrina del paziente stesso come substrato. Un accorciamento dell'ELT indica un'attivazione della fibrinolisi. In condizioni basali l'ELT è normale fra 120 e 300 minuti.

Ci sono poi saggi specifici per lo studio degli inibitori della fibrinolisi, PAI-1 e 2-antiplasmina. Difetti di queste proteine possono essere congeniti o acquisiti e possono essere la causa di rare coagulopatie emorragiche.

AUTOVALUTAZIONE

1. **La malattia emorragica congenita più frequente nella popolazione generale è:**
 - a. l'emofilia A
 - b. il difetto di fattore VII
 - c. la malattia di Von Willebrand
 - d. le malattie da difetto piastrinico

2. **I test di laboratorio di Primo Livello per lo studio dell'emostasi comprendono:**
 - a. PT, APTT, conta piastrinica e tempo di emorragia (o equivalente)
 - b. il dosaggio del fattore di Von Willebrand
 - c. PT, aPTT, TT e test di mixing
 - d. lo studio della fibrinolisi

3. **Un allungamento isolato dell'aPTT:**
 - a. è sempre causa di una malattia emorragica
 - b. può essere causato da un difetto ereditario dei fattori VIII, IX o XI
 - c. non determina mai trombosi
 - d. può essere causato da un difetto di fattori VIII, IX, V e VII

4. **Una anamnesi significativa per sanguinamento muco-cutaneo che influisce sulla qualità di vita:**
 - a. orienta verso la malattia di Von Willebrand
 - b. è fortemente suggestiva per una malattia dell'emostasi primaria
 - c. potrebbe essere dovuta da una malattia piastrinica
 - d. tutte le precedenti sono corrette

5. **Quali delle seguenti caratteristiche NON è suggestiva della presenza di una trombofilia ereditaria?**
 - a. trombosi in età giovanile
 - b. trombosi in sede inusuale
 - c. trombosi nell'anziano sottoposto ad artroprotesi d'anca
 - d. storia familiare di trombosi in età giovanile

Risposte esatte: 1/c – 2/a – 3/b – 4/d – 5/c

BIBLIOGRAFIA

- DeLoughery TG. Tests of hemostasis and thrombosis. In: Hemostasis and Thrombosis. DeLoughery TG (Ed), Springer International Publishing Switzerland, 2, 9-14, 2015
- Ma A. Evaluation of the bleeding patient. In: Practical Hemostasis and Thrombosis. Key N, Makris M, O'Shaughnessy D, Lillicrap D (Eds), Wiley-Blackwell, 6, 48-60, 2009
- Rodeghiero F, Castaman G. Patologia della coagulazione. In: malattie del sangue e degli organi emopoietici. Castoldi G, Lisio V (Eds), McGraw-Hill, 18, 513-569, 2004
- Testa S, Tripodi A. Il laboratorio nella diagnosi e monitoraggio terapeutico della malattia trombotica. In: Castaman G, Falanga A (Eds), Piccin, 31, 391-413, 2018
- Campello et al. Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Rev Hematol*; 12:147-58, 2019
- Simioni et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *NEJM*; 361:1671-5, 2009