



Università degli Studi di Udine  
Facoltà di Medicina e Chirurgia

XXIV ciclo di dottorato di ricerca  
in scienze e tecnologie cliniche

tesi di dottorato di ricerca

Considerazioni in merito alle metodiche  
di determinazione della Proteina S  
e loro impatto clinico

dottorando  
dott.ssa Nina Prisca Boukanga Nkoulou

relatore  
prof. Francesco Curcio

correlatore  
dott.ssa Roberta Giacomello

Anno Accademico 2011/2012

<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 3
1.TROMBOFILIA	pag. 3
2.MECCANISMI EMOSTATICI	pag. 6
3.INIBITORI FISIOLGICI	pag. 8
3.1CARATTERISTICHE	pag. 8
3.2 DIFETTI CONGENICI	pag. 13
3.3 METODICHE A DISPOSIZIONE	pag. 13
3.4 VARIABILI ANALITICHE	pag. 16
3.4 a. Scelta delle metodiche	pag. 16
3.4 b. Riproducibilità dei test	pag. 18
<b>PROBLEMATICHE CLINICHE</b>	pag. 22
<b>OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>	pag. 24
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag. 25
4.1 Selezione e raccolta dei campioni	pag. 25
4.2 Test a disposizione	pag. 26
4.3 Analisi statistica	pag. 28
<b>RISULTATI</b>	pag. 29
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 35
<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 37
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 39

# INTRODUZIONE

## 1. TROMBOFILIA

La conoscenza sempre più vasta dei meccanismi patogenetici della malattia tromboembolica e l'affinarsi delle metodologie di laboratorio ha portato ad un moltiplicarsi di test diagnostici al fine di identificare possibili fattori predisponenti.

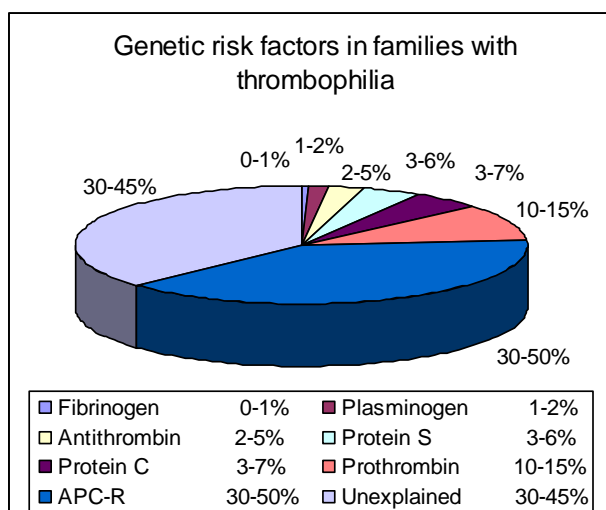
Anche se negli ultimi 20 anni si è focalizzata l'attenzione su adeguate misure di prevenzione della malattia tromboembolica, purtroppo l'incidenza media rimane tuttora di circa 1 caso/1000/anno, di circa 10 casi/1000/anno se calcolata su di una popolazione di età > 50 anni a dimostrazione della necessità di sviluppare una ricerca adeguata e non discriminata di indici di rischio di malattia..

La condizione di rischio di sviluppare un evento trombotico venoso e/o arterioso, per lo più in giovane età(<50 anni), non facilmente riconducibile a fattori di rischio evidenti e con tendenza a recidivare è chiamata trombofilia<sup>1</sup>.

Tale rischio può perdurare tutta la vita per la presenza di mutazioni nei geni che codificano per proteine emostatiche e/o fibrinolitiche, ma può essere di durata limitata per fattori acquisiti o ambientali.

Le condizioni ereditarie ragionevolmente associate a trombofilia sono le carenze congenite degli inibitori fisiologici della coagulazione tra i quali i più importanti sono antitrombina, proteina C e proteina S, la condizione di resistenza alla proteina C attivata, oppure aumentati livelli di fattore VIII o la mutazione G20210A che crea una iperprotrombinemia (fig. 1). Assai meno frequentemente la disfibrinogenemia e l'iperomocisteinemia possono essere ritrovati tra gli indici di rischio trombotico

fig 1



La prevalenza sulla popolazione e la loro percentuale in caso di sviluppo di trombosi venosa profonda o embolia polmonare è elevata per la condizione di resistenza alla proteina C attivata/fattore V Leiden<sup>2</sup>, mentre è rara, ma con quadro clinico più severo, per gli inibitori fisiologici del complesso protrombinasico come la Proteina C e soprattutto il suo cofattore la proteina S. (Tabella 1)

Difetto	Popolazione generale (%)	Incidenza TVP (%)	Rischio trombotico relativo	Rischio ricorrenza TVP(%)*
AT	0.02- 0.04	1-2	5	2-5
PC	0.2-0.5	2-5	6-10	5-10
PS	0.1-1	1-3	2	5-10
Activated Protein C resistance (Factor V Leiden)	3-7	20	3-7 eterozigoti 50-100 omozigoti	40-50
Prothrombin G20210A	1-3	3-8	2-8 eterozigoti	15-20

Tabella 1. Prevalenza dei principali stati trombofilici ereditari<sup>3</sup>

\*rischio di ricorrenza della TVP in assenza di terapia anticoagulante

Accanto alle cause ereditarie esistono condizioni “acquisite” (tabella 2); tra queste le neoplasie, le sindromi mieloproliferative, la sindrome nefrosica, l’immobilizzazione, i traumi, gli interventi chirurgici, l’assunzione di estroprogestinici e la gravidanza.

Frattura del femore o della tibia	80%
Chirurgia dell’anca, ginocchio e prostata	50%
Adenocarcinoma	20 volte
Fattore VIII elevato	6 volte
Contraccettivi orali	4-6 volte
Trattamento ormonale sostitutivo	2-4 volte
Omocisteinemia (deficienza vitaminica)	2-7 volte

Tabella 2. Trombofilia acquisita: rischio relativo per T V P o Embolia Polmonare<sup>4</sup>

In linea generale i test a disposizione per le indagini di laboratorio di patologia dell'emostasi sono o di tipo funzionale, in quanto in grado di misurare l'attività dell'analita ricercato o sono misure antigeniche, indicativamente utilizzate, per caratterizzare ulteriormente, il difetto funzionale. Non sempre è possibile eseguire l'analisi del DNA per l'identificazione delle mutazioni sia per problemi di ordine gestionale che economico e questo comporta una impossibilità di avere sicuri test di conferma dell'eventuale difetto genetico. Spesso ad ogni marcatore di trombofilia si associano numerose mutazioni /polimorfismi ad oggi individuati creando così una rete di numerosi test da ricercare.<sup>5</sup>

Da qui si rende necessario eseguire metodiche diverse per la ricerca di proteine coinvolte nella risposta emostatica, utilizzando test con specificità e sensibilità elevate.

Tipo di difetto	Numero di mutazioni
■ Deficit di antitrombina	> 79
■ Deficit di proteina C	>160
■ Deficit di proteina S	>140
■ ACP Resistance	1 G1961 esone 10
■ Aumentato incremento APCr	1 Fattore v leiden, HR2 aplotipo
■ Iperprotrombinemia	1 G20210A regione non trascritta del gene

Tabella 3 Mutazioni delle principali condizioni genetiche coinvolte nel rischio trombotico<sup>6</sup>

L'anamnesi del paziente sia personale, che familiare, potrebbe aiutare ad individuare correttamente l'assetto genetico dell'individuo studiato e apportare una valutazione del rischio trombotico rendendo non strettamente indispensabile una analisi genetica.

## 2. MECCANISMI EMOSTATICI

### *Fase coagulativa*

L'azione sui fattori rientra nel complesso meccanismo della cascata coagulativa integrato nel sistema emostatico a risposta ed in sinergia con i meccanismi vasale e piastrinico (fig. 2).

La fase coagulativa è il fenomeno che coinvolge una serie di molecole sotto forma di zimogeni tra di loro interagenti con processi di attivazione enzimatica ed è finalizzata alla trasformazione del fibrinogeno (una proteina solubile presente in grandi quantità nel circolo sanguigno) in un coagulo di fibrina, una trama densa di natura proteica che occlude completamente il sito di rottura del vaso. Naturalmente parte importante del fenomeno è rappresentata, a riparazione del vaso avvenuta, dalla successiva rimozione del tappo di fibrina, fenomeno noto come fibrinolisi, che si conclude con il ripristino della situazione iniziale (*restitutio ad integrum*).

### *Cascata coagulativa*

Si caratterizza per il suo funzionamento "a cascata": una proteina viene attivata e la sua attivazione determina la trasformazione di una seconda proteina dalla forma inattiva alla forma attiva, a sua volta in grado di attivare una terza proteina e così via. La successione degli eventi è estremamente specifica, per cui la prima proteina non può attivare la terza. La catena di reazioni non avviene in soluzione ma solo su una superficie, come quella del vaso danneggiato che fornisce la base di appoggio necessaria per l'incontro di queste proteine e la loro attivazione a cascata.

L'attivazione avviene in presenza di molecole coadiuvanti, dette cofattori come il Tissue Factor (TF) il quale in condizioni normali il TF si trova nella parete dei vasi ma, esposto in seguito a lesione, svolge il suo ruolo di attivatore di un importante passaggio della cascata coagulativa, l'attivazione del fattore VII.

E' prassi comune individuare due cascate di eventi che possono portare alla coagulazione, dette via "intrinseca" e via "estrinseca" che convergono poi in una via "comune", quella che dal fattore X attivato porta alla trasformazione della protrombina in trombina la quale è l'effettore finale della trasformazione del fibrinogeno in fibrina.. Nella via intrinseca il fattore XII attivato attiva il fattore XI, il quale attiva il fattore IX il quale attiva infine il fattore X per confluire nella via comune. La via estrinseca sarebbe invece la cascata coagulativa che si verifica in vivo. In condizioni fisiologiche dunque il Tissue Factor attiva il fattore VII il quale, attivato, provvede all'attivazione del fattore IX, il quale attiva il fattore X che, in presenza di fattore V trasforma la protrombina in trombina; l'amplificazione avviene anche grazie al fatto che il fattore VII è in grado di attivare il fattore X e

che la trombina è in grado di attivare il fattore VIII (cofattore del IX), il fattore V (cofattore del X) ed il fattore XI che attiva anch'esso il fattore X. La repentina disponibilità di elevate quantità di trombina rendono quindi possibile la trasformazione del fibrinogeno in fibrina.

*Meccanismi di controllo della coagulazione*

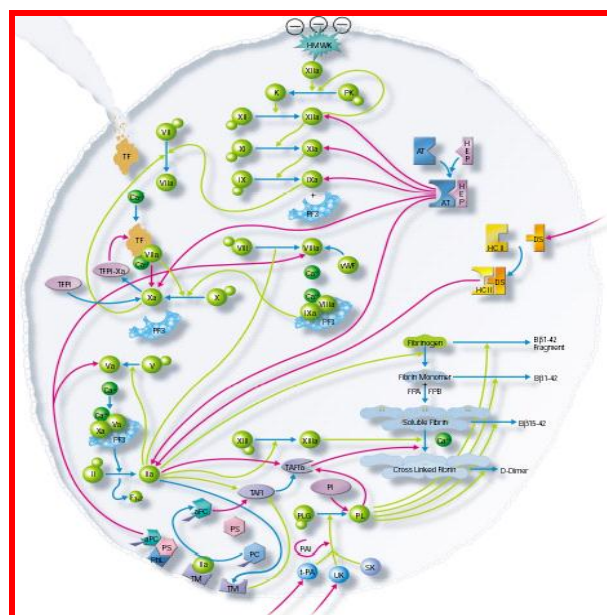
Diverse molecole svolgono un ruolo anticoagulante. Innanzitutto la stessa fibrina svolge un ruolo di inattivatore della trombina, quindi man mano che il tappo coagulativo si forma aumenta anche lo stimolo allo spegnimento della cascata coagulativa.

Sono inoltre riconosciute una serie di proteine inibitrici direttamente la cascata indicate come inibitori fisiologici della coagulazione: antitrombina, proteina C e proteina S . L'antitrombina è in grado di inibire la trombina ma anche il fattore X attivato. Ancora, la proteina C della coagulazione, grazie anche all'intervento della proteina S della coagulazione, è in grado di operare un'inibizione sia sul fattore V attivato che sul fattore VIII. Infine, il TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) è in grado, legando il fattore X attivato e portandosi nel sito di legame del Tissue Factor per il fattore X, di bloccare il complesso TF-fattore X.

*Fibrinolisi.*

Una volta fermata l'emorragia attraverso la cascata coagulativa il vaso danneggiato viene riparato; in questa fase un'altra proteina, il plasminogeno, viene trasformato in plasmina per mezzo del cosiddetto fattore tissutale del plasminogeno t-PA. La plasmina è la proteina che degrada il coagulo di fibrina, provvedendo infine al completo ripristino della situazione precedente alla lesione vascolare.

Fig. 2



### 3. INIBITORI FISIOLGICI DELLA COAGULAZIONE

#### 3.1 CARATTERISTICHE

Le sostanze che esercitano direttamente attività inibitoria nei riguardi di uno o più fattori della coagulazione sono numerose ma per rilevanza fisiologica ed importanza clinica si possono identificare in: antitrombina (AT), proteina C della coagulazione (PC) e la proteina S (PS). (tabella 4)

Inibitore	Fattore inibito
Antitrombina	<i>XIIa , XIa , Xa , IXa , IIa, callicreina</i>
Proteina C	<i>VIII , V</i>
Proteina S (cofattore proteina C)	<i>VIII , V</i>

Tabella 4. Principali inibitori fisiologici dell'emostasi

#### Antitrombina

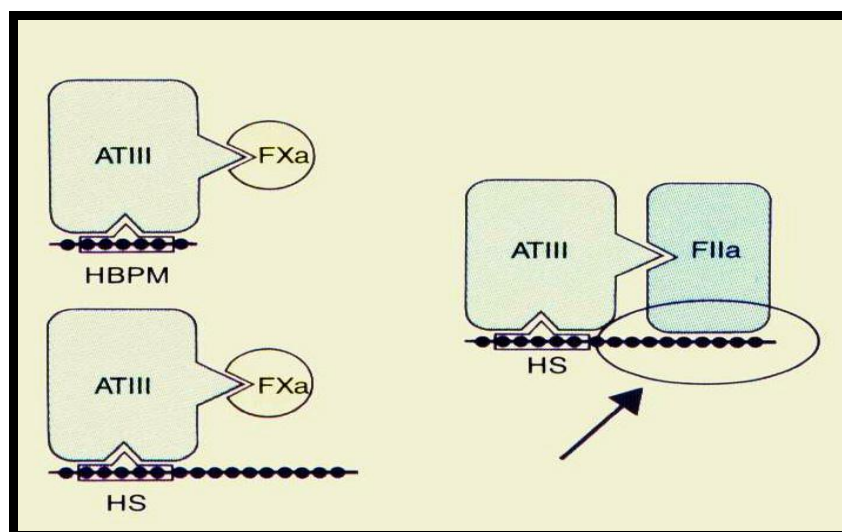
L'AT è una proteina plasmatica a catena singola di p.m. 58 kD e concentrazione media normale di 20 mg/dL. Nel neonato a termine la concentrazione di AT è di circa il 45% della norma e raggiunge i livelli dell'adulto all'incirca dopo 6 mesi. La sintesi dell'AT avviene nell'epatocita e nelle cellule endoteliali. L'AT è uno dei principali inibitori fisiologici della coagulazione, la sua azione si estrinseca attraverso l'inattivazione di tutte le proteasi seriniche ad azione procoagulante (fig. 3): trombina, fattori XIIa, XIa, IXa e Xa, con i quali forma un complesso stabile, equimolare, privo di attività residua. L'azione inibitoria dell'AT è di per sé lenta (antitrombina progressiva), ma è notevolmente accelerata in vitro dall'eparina (cofattore eparinico I). In vivo l'azione dell'AT è probabilmente mediata ed accelerata dal suo legame con i glicosoaminoglicani ad attività eparino-simile, che si trovano sulla parete vascolare. La carenza congenita (e a volte anche acquisita) di AT può determinare un aumentato rischio di insorgenza di manifestazioni tromboemboliche.

Le cause più frequenti di carenza acquisita della proteina sono riportate qui di seguito:



Ridotta sintesi	Aumentato consumo
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Epatopatie ( Si raggiungono in questi casi valori di AT anche inferiori al 50% della norma.)</li> <li>* Malnutrizione</li> <li>* Estese ustione</li> <li>* Malattie infiammatorie intestinali</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Fase acuta di un processo trombotico</li> <li>* Reazione emolitica da trasfusione</li> <li>* Tumori</li> <li>* Terapia con L-Asparaginasi</li> <li>* Terapia eparinica</li> <li>* Sindrome nefrosica dove raggiunge livelli proporzionali al danno e correlati all'albuminuria. La ridotta attività dell'inibitore nel plasma potrebbe spiegare l'alta frequenza di manifestazioni tromboemboliche nei pazienti con sindrome nefrosica.</li> <li>* Coagulazione intravascolare disseminata si ha una massiva attivazione della coagulazione in seguito a stimoli di varia origine (danno tissutale, endoteliale, ecc.), che portano ad una massiva attivazione delle proteasi seriniche con conseguente consumo di AT.</li> </ul>

Il deficit congenito di AT, trasmesso ereditariamente come carattere autosomico dominante, è stato determinato per la prima volta nel 1965. Sono state descritte più di 50 famiglie i cui membri con attività di AT pari al 50% circa della norma sviluppavano con maggior frequenza complicazioni tromboemboliche<sup>7</sup>



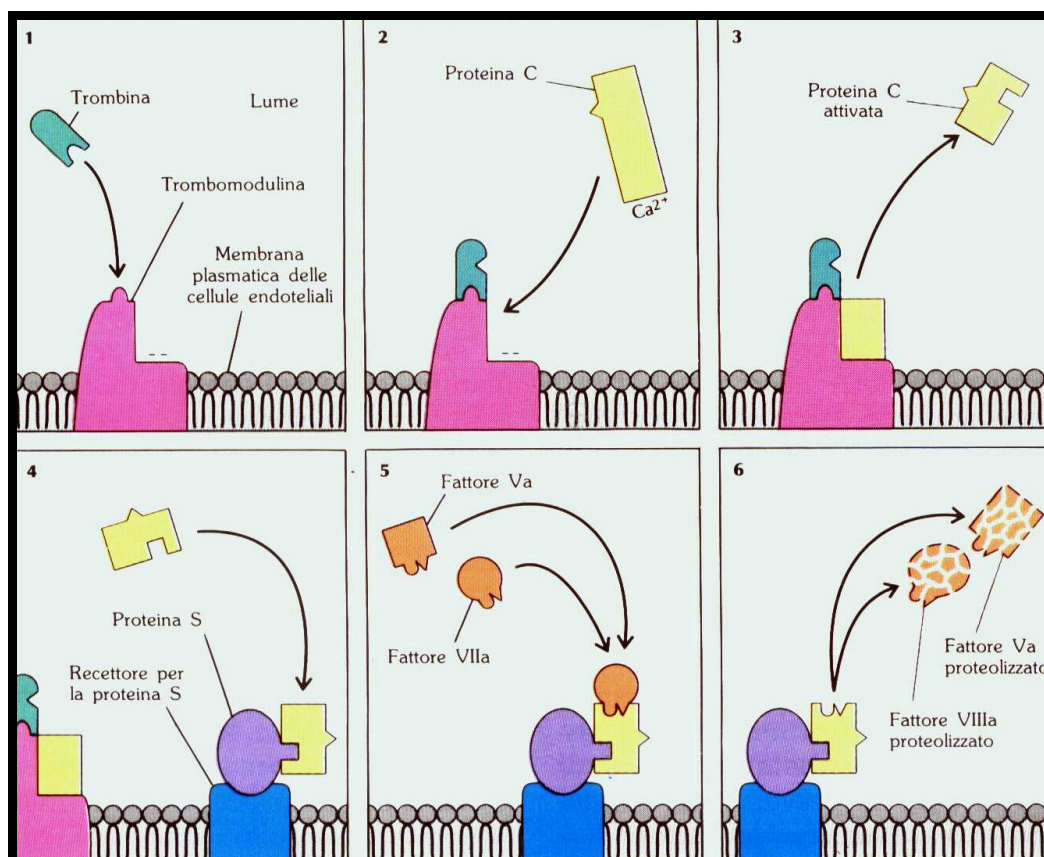
**Fig. 3** Meccanismo d'azione dell'antitrombina III.

### Proteina C

La PC è una proteina plasmatica a doppia catena di p. m. 62.000 e concentrazione plasmatica media pari a 4 mg/L. Nel neonato a termine la PC è circa il 30% della norma. La sintesi della PC avviene probabilmente a livello degli epatociti. La sintesi di PC funzionalmente attiva necessita dell'apporto di vitamina K e si comporta quindi come tutte le altre proteine della coagulazione ad attività procoagulante (fattori IX, X, VII e II) la cui sintesi è ridotta dai farmaci che antagonizzano la vitamina K (dicumarolici). La PC circola nel plasma in forma inattiva (zimogeno), la sua attivazione avviene ad opera della trombina mediante una proteolisi limitata alla catena pesante; il distacco di un peptide di 12 aminoacidi espone il sito attivo della PC attivata, che acquista così proprietà di serinproteasi. L'attivazione della PC ad opera della trombina è fortemente accelerata in vivo ed in vitro da un cofattore presente sulle cellule endoteliali (trombomodulina). Le funzioni biologiche della PC attivata sono quelle di inibire, selettivamente e mediante proteolisi, le forme attivate del fattore V e VIII (fig. 4). La PC attivata inibisce anche l'attività procoagulante delle piastrine e stimola la fibrinolisi, attraverso la neutralizzazione dell'inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI). Dal plasma è stato isolato anche un inibitore specifico per la PC attivata, ma il suo ruolo nella regolazione dell'attività inibitoria della PC attivata è a tutt'oggi ancora da definire. Le cause più frequenti di carenza acquisita sono dovute o ad una ridotta sintesi o al consumo.

Ridotti livelli		Aumentati livelli
Ridotta sintesi	Aumentato consumo	
*Epatopatie in questi casi si raggiungono valori di PC anche inferiori al 50% della norma e correlati all'entità del danno protidosintetico dell'epatocita. * Terapia anticoagulante *Ridotto assorbimento/ assunzione vitamina K	*Coagulazione intravascolare disseminata con meccanismo simile a quello che porta alla deplezione di ATIII. *Insufficienza renale *Fase acuta di un processo trombotico/ post operatorio *Plasma Exchange *Emorragia massiva *Sindrome da distress respiratorio dell'adulto (ARDS)	*Gravidanza *Trattamento ormonale *Sindrome nefrosica *Diabete *Cardiopatia ischemica

Come per l'AT anche la carenza congenita di PC può determinare un aumentato rischio di insorgenza di manifestazioni tromboemboliche. Nel 1981 è stata descritta la prima famiglia i cui membri affetti da carenza congenita di PC a livelli di circa il 50% della norma svilupparono con maggiore frequenza sintomi trombotici<sup>8</sup>. La pubblicazione relativa ai casi di numerose altre famiglie ha reso possibile la caratterizzazione del difetto che viene trasmesso con tratto autosomico dominante.



*Fig. 4* - Il complesso formato dalla proteina C e dalla proteina S esercita un effetto anticoagulante in presenza di trombina libera a monte. La trombina si lega alla trombomodulina presente alla superficie delle cellule endoteliali (1). Questo legame produce un mutamento di configurazione che facilita il clivaggio della proteina C da parte della trombina (2). La proteina C si lega al complesso costituito dalla trombina e dalla trombomodulina per effetto di un'attrazione fra ioni calcio (situati alla superficie della proteina) ed una regione a carica negativa (situata alla superficie della trombomodulina). Una volta liberata ed attivata (3), la proteina C si lega alla proteina S (4), che può interagire con la superficie delle cellule endoteliali attraverso uno specifico recettore. La proteina C attivata, contenuta nel complesso S/C (5 e 6), è in grado di operare la proteolisi delle forme attivate dei fattori emocoagulativi VIII e V.

### Proteina S

La PS, così come la PC, è una proteina plasmatica vitamina K-dipendente di p.m. 64 kD, a catena singola e concentrazione media di 25 mg/L. Essa è il cofattore necessario all'azione anticoagulante e profibrinolitica della PC attivata della quale favorisce l'interazione con i fosfolipidi dove hanno luogo le reazioni di inattivazione dei fattori V e VIII. La PS circola nel plasma in parte libera ed in parte legata ad una proteina regolatrice del complemento (C4bBP). All'equilibrio il 60% della proteina è complessato, e solo il restante 40%, che circola libero, è biologicamente attivo. Le cause più frequenti di carenza acquisita della PS:

Ridotta sintesi	Aumentata escrezione	Aumentato consumo
<ul style="list-style-type: none"><li>* Epatopatie croniche (diminuzione di lieve entità, inferiore a quello riscontrato per la PC)</li><li>* Neonato (significativamente inferiori sino a sei mesi di età)</li><li>* Leucemia mieloblastica, policitemia vera, trombocitemia essenziale</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>* Sindrome nefrosica</li><li>* Insufficienza renale cronica</li><li>* Morbo di Crohn</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>* Coagulazione intravascolare disseminata</li><li>* Drepanocitosi e talassemia</li><li>* Sindrome da distress respiratorio dell'adulto (ARDS)</li><li>* Periodo post-operatorio, circolazione extracorporea, ictus ischemico acuto</li></ul>

Sono state descritte numerose famiglie i cui membri affetti da carenza congenita, presentavano sintomi trombotici simili a quelli con carenza di PC. Come per la PC, anche la carenza congenita di PS si trasmette con tratto autosomico dominante.<sup>9</sup>

### 3.2 DIFETTI CONGENITI

I difetti o le anomalie degli inibitori sopramenzionati facenti parte di sistemi di anticoagulazione fisiologica sono associati ad un elevato rischio di sviluppare manifestazioni trombotiche e sono in linea generale di due tipi. Essi possono interessare singole componenti di questi sistemi. Esistono difetti di sintesi (o difetti di Tipo I) in cui c'è una ridotta sintesi della proteina ed anomalie (o difetti Tipo II) in cui viene sintetizzata una normale quantità di molecola che risulta però mal funzionante. Esiste peraltro la possibilità di difetti caratterizzati da una ridotta sintesi di proteina che funziona anche male, configurando così la situazione peculiare definita come difetto "ipo-dis".

La modalità di trasmissione di questi difetti è classicamente autosomica dominante. In linea generale la diagnostica di laboratorio di queste anomalie prevede la esecuzione di test funzionali ed immunologici destinati ad esplorare il fenotipo (la proteina).

Le conoscenze attuali di biologia molecolare consentono di identificare in un gran numero di casi la corrispettiva lesione genetica anche se non coprono interamente le numerose mutazioni ad oggi conosciute

### 3.3 METODICHE A DISPOSIZIONE

Per gli inibitori descritti esistono metodiche immunochimiche in grado di determinare la quantità di proteina circolante attraverso sistemi rivelatori differenti come: elettroimmunodiffusione, RIA, ELISA, immunoelettroforesi bidimensionale, latex .

La valutazione antigenica può però risultare inadeguata in un corretto screening trombofilico per la loro possibile disfunzionalità delle proteine interessate.

I metodi funzionali utilizzati per verificare l'attività degli inibitori sono diversi a seconda che il metodo sia coagulante o cromogenico (amidolitico): nel primo caso l'attività misurata è quella inibitoria rivolta contro i fattori della coagulazione, coinvolti nei complessi tenasico e protrombinasico, attraverso la valutazione globale della via intrinseca ( misura dell'aPTT) o estrinseca ( misura del PT) all'aggiunta di PC attivata, mentre nel secondo si misura l'attività enzimatica esercitata a contatto con un substrato cromogenico.

I metodi cromogenici, sono chiamati anche amidolitici perché rompono specificatamente il legame carboamidico tra il substrato cromogenico ed il colorante specifico

Si basano sull'uso di un substrato sintetico che non è altro che il modello ridotto del corrispondente substrato naturale. Il substrato sintetico è costituito da un piccolo oligopeptide con sequenza amminoacidica riprodotte il sito attivo di un determinato fattore della coagulazione. Nella parte carbossi terminale di arginino o lisina è legato il cromoforo para nitro aniline (pNA)

La luce è assorbita dalla soluzione contenuta nelle cuvette in diretta proporzione con la concentrazione di pNA. La reazione è monitorata a 405 nm attraverso il continuo rilascio di pNA dal substrato sintetico.

E' quindi misurata la velocità di formazione del colore che è leggibile nel tempo riportato nell'asse delle ascisse, mentre lo sviluppo di colore misurato in D.O. è riportato nell'asse delle ordinate. La pendenza della retta indica la percentuale dell'enzima presente calcolata secondo una curva di taratura.

#### Dosaggio funzionale dell'Antitrombina

I metodi utilizzati impiegano substrati cromogenici che misurano l'attività dell'AT come cofattore dell'eparina.

Questi metodi possono utilizzare come enzima target il FXa o la trombina. E' stato osservato che i test che impiegano il FXa consentono una più agevole discriminazione tra portatori di difetti e non portatori di difetti ereditari rispetto a quelli basati sull'uso della trombina e molto probabilmente non risentono dell'interferenza di cofattore eparinico II

Il plasma da analizzare è incubato con reattivo Fattore Xa – in presenza di eccesso di Eparina. L' AT presente nel plasma si lega al Fattore X e si determina l'attività residua del fattore Xa con un substrato cromogenico. Il suo rilascio è monitorato cineticamente a 405 nm ed è inversamente proporzionale al livello di AT presente nel campione.

#### Dosaggi funzionali della Proteina C

Riguardano sia una metodica coagulativa che una metodica cromogenica. In ogni caso per ognuno di questi è necessario una fase per l'aggiunta di un attivatore della proteina C e la diluizione con plasma carente o con tampone.

Il metodo coagulativo si basa sulla attivazione diretta della proteina C per mezzo di una glicoproteina estratta dal veleno di Agkistrodon Contortrix e presente in commercio con il nome di

Protac. In presenza di ioni  $Ca^{2+}$ , fosfolipidi ed il cofattore proteina S, la proteina C attivata inibisce i fattori Va e VIIIa prolungando il test APTT che viene appunto utilizzato per valutare l'effetto anticoagulante e quindi la funzionalità della proteina.

Analogamente al metodo precedente la Proteina C viene inizialmente sottoposta ad un processo di attivazione mediante l'azione enzimatica di un veleno di serpente, quindi si valuta l'azione inibitrice misurando l'attività amidolitica del substrato cromogenico.

Quindi esiste inizialmente una prima fase in cui è incubato il plasma con l'attivatore della Proteina C e successivamente la determinazione diretta della determinazione della proteina C attivata con un substrato cromo genico. a paranitroanilina rilasciata è monitorata cineticamente a 405 nm ed è direttamente proporzionale al livello di proteina C nel campione.

### Dosaggio della Proteina S

- Metodi funzionali

Sono basati o sull'attivazione del tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) o sul tempo di protrombina (PT) o su metodiche che sfruttano l'attivazione del fattore X attivato

Il metodo attualmente in uso, si basa sulla determinazione dell'allungamento del PT, in presenza di tromboplastina, ioni Ca, Proteina C attivata e di un plasma carente di proteina S a cui viene aggiunto il campione in esame. L'attività funzionale della proteina S nel legarsi alla proteina C è proporzionale all'allungamento del tempo di coagulazione.

- Metodo immunologico

Il test utilizza due lattici uno legato al C4bBP, l'altro con legato anticorpi anti-PS

Il plasma è incubato con lattice sensibilizzato con C4bBP purificato; in presenza di ioni calcio, questo lattice cattura la PS libera presente nel plasma del campione. E' successivamente aggiunto un secondo lattice sensibilizzato con anticorpo monoclonale anti-PS; in presenza di ioni calcio, questo lattice reagirà con la PS libera che si è legata al lattice C4bBP. Si ottiene una produzione di agglutinati per la formazione di ponti formati dalla PS libera con i due lattici utilizzati nel test

### 3.4 VARIABILI ANALITICHE

#### 3.4 a - Scelta della metodiche

Nel lavoro di Tripodi del 2001 comparso su *Chimical Chemistry*<sup>10</sup> è indicato una possibile scelta tra i test di questi inibitori, da utilizzarsi per lo studio dei marcatori di rischio trombofilico riportando vantaggi e svantaggi dei singoli test. Nel 2008, tra le relazioni degli esperti presenti alla conferenza di consenso “Prevenzione delle complicanze trombotiche associate all’uso di estro progestinici in età riproduttiva” ancora una volta si ribadiscono alcune indicazioni precedenti e si offrono indicazioni specifiche su metodiche e modalità di utilizzo di queste, da attivare per i vari test, fissando per alcuni di analiti scelte obbligate in base all’accuratezza e la precisione dell’uso di nuove tecnologie, ed alla maggior conoscenza del funzionamento biochimico dei marcatori di rischio.<sup>11</sup>

In dettaglio per quanto riguarda l’antitrombina la proposta si orienta chiaramente nel preferire il **metodo cromogenico anti FXa con eparina** perché:

- non risente dell’azione del cofattore eparinico II e quindi minore probabilità di falsi negativi in caso di suoi elevati livelli
- non risente delle alterazioni sul sito reattivo della trombina
- il test che esplora l’attività anti -FXa è in grado di rivelare un maggior numero di anomalie.
- L'esecuzione di una elettroforesi bidimensionale in presenza di eparina nel gel di agarosio durante la prima corsa, è in grado di chiarire la presenza di un difetto di legame con l'eparina.

Si ritiene quindi che il test indicato possa essere utilmente impiegato nello screening di routine dei pazienti trombofilici e coprire così tutte i sospetti clinici di trombofilia causa deficit di antitrombina

Per il test indicato per il dosaggio della proteina C è da preferirsi una metodica cromogenica in quanto:

- non risente di lievi carenze fattoriali
- non risente di fattori interferenti
- migliore standardizzazione
- altamente specifici
- evidenziano solo alterazioni del sito reattivo e del sito coinvolto nell’attivazione con Protac



E' quindi possibile che i due metodi funzionali siano equivalenti nella identificazione dei difetti di tipo I mentre al metodo cromogenico sfuggano falsi valori normali rilasciati riguardo un raro difetto di tipo II, caratterizzato da una alterazione nell'interazione con Ca<sup>2+</sup> e fosfolipi, anomalia molto esigua che non supera il 5-10% delle molecole di PC disfunzionale finora identificata.

Di contro i metodi coagulativi sono sensibili alla gran parte delle possibili alterazioni della PC (interazione PC/Ca<sup>2+</sup>, fosfolipidi, PS, FV e FVIII) anche se alterati valori di VIII, o presenza di positività al lupus anticoagulant possono refertare valori falsamente normali per i soggetti analizzati. A rovescio si possono refertare falsi valori patologici di proteina C ' E' possibile infatti che per il 30% dei pazienti con mutazione del fattore V tipo Leiden, i livelli di proteina C determinati con questo metodo possono risultare diminuiti a causa dell'interferenza provocata dalla presenza del fattore V mutante e non per una reale carenza di PC.

Le tecniche di valutazione della concentrazione antigenica e dello studio della proteina mediante immunoblotting completano la diagnostica consentendo nella maggior parte dei casi l'inquadramento del difetto in uno dei tre tipi.

Per il test della proteina S la situazione si fa più articolata e meno definita secondo le indicazioni degli esperti del settore, in quanto essa è fisiologicamente attiva come proteina non legata al C4BP e per approfondire la sua funzionalità si rende necessario dividere le due forme

Metodi immunochimici come l'immuno-elettroforesi secondo Laurell, danno sicurezza nella separazione e isolamento della proteina libera ma la metodica oltre che indagativa e non facilmente diffusibile come screening, può dare problemi di interpretazione nella differenziazione dei picchi. D'altra parte anche i metodi ELISA o RIA utilizzando anticorpi mono o policlonali si sono rivelati altrettanto indagativi e non facilmente standardizzabili. Inoltre, entrambe le tecniche non permettono di evidenziare difetti qualitativi dell'inibitore.

In teoria, per il dosaggio della PS dovrebbero essere utilizzati metodi funzionali che misurano l'attività della PS libera come cofattore della PC attivata nella degradazione dei fattori Va e VIIIa. Questi metodi però, di tipo coagulativo, si sono dimostrati poco specifici soprattutto a causa della importante interferenza dovuta alla presenza della mutazione R506Q FV Leiden [30, 31], ma anche in caso di presenza di LAC e aumento del FVIII (metodi coagulativi basati sull'aPTT) o presenza di Fattore VII attivato (metodi coagulativi basati sul PT). Per questa ragione ad oggi e fino a quando non saranno disponibili metodi funzionali più specifici, si preferisce come test di screening l'uso di

metodi immunologici che misurano i livelli della PS libera e non risentono delle suddette interferenze ed hanno una migliore interpretazione<sup>12</sup>

Ogni scelta metodologica deve comunque aver presente la variabile analitica legata alla conoscenza dei reattivi utilizzati. Per esempio ci possono essere risposte diverse su stessi campioni se si utilizzano attivatori di Proteina C estratti con diversi percorsi chimici (adsorbimento con sali insolubili, o su anticorpi monoclonali immobilizzati); oppure l'attivazione di questa proteina può avvenire attraverso sostanze fisiologicamente funzionanti come la trombina o i complessi trombina-trombomodulina o potenti attivatori organici come il veleno di rettile.

### 3.4 b - Riproducibilità dei test

Requisito necessario per una precisione analitica è il conseguimento della qualità totale, target che si ottiene applicando una rigorosa metodologia: ovvero in fase preanalitica, una corretta processazione del campione (secondo procedure e linee guida accreditate) e la valutazione del dato analitico alla luce delle differenti specificità professionali.

Pertanto tra le variabili si annovera:

#### i. fase preanalitica

Complessivamente la frequenza degli errori preanalitici identificati in campioni destinati a analisi emocoagulative è prossima al 5-6%. I problemi osservati più di frequente riguardano campioni non pervenuti (49%), emolisi in vitro (20%), campioni coagulati (14%) o con inappropriato rapporto tra sangue e plasma (14%) con criticità schematizzate come segue<sup>13</sup>

Prelevamento del campione	Trasferimento del campione	Trattamento del campione
Stasi venosa	Mezzo di trasporto	Condizioni di centrifugazioni
Dispositivi per il prelievo	temperatura	Stratificazione del plasma
Dimensioni dell'ago	umidità	conservazione
Tubo primario	tempo	
Rapporto sangue - anticoagulante		

ii. riproducibilità analitica

- per i dosaggi di antitrombina

I risultati dei diversi programmi di valutazione esterna di qualità attualmente disponibili hanno dimostrato che tra i test per la trombofilia il dosaggio della AT è il meno problematico e il più riproducibile. I coefficienti di variazione (CV) inter-laboratorio sono in genere compresi tra il 5% e il 10%, con una percentuale (%) di errori diagnostici (ED, falsi positivi o falsi-negativi), inferiore al 5%. Come atteso, i CV più alti e la più alta probabilità di ED sono stati registrati per i campioni con livello di AT ai limiti inferiori della norma<sup>14-17</sup>.

- Per i dosaggi di proteina C

I risultati dei programmi di valutazione esterna di qualità hanno dimostrato, per il dosaggio della PC, CV inter-laboratorio intermedi, in genere inferiori al 10%, con un ED inferiore al 10%. CV ed ED sono risultati significativamente più alti per i metodi coagulativi, specialmente in campioni con mutazione R506Q FV Leiden<sup>14-17</sup>

Anche in questo caso, i più alti CV e la più alta probabilità di ED sono stati registrati per i campioni con livello di PC ai limiti inferiori della norma.<sup>17</sup>

- Per i dosaggi di proteina S

I risultati dei programmi di valutazione esterna di qualità hanno dimostrato che il dosaggio della PS è il più problematico tra quelli per la trombofilia, con CV inter-laboratorio che possono arrivare al 40-50%, e con un'alta % di ED (fino al 20%).<sup>14-17,18</sup>

Come per il dosaggio della PC, CV e ED sono risultati significativamente più alti per i metodi coagulativi, specialmente in campioni con mutazione R506Q FV Leiden<sup>15-16,18</sup> I CV più alti e la più alta probabilità di ED sono stati registrati per i campioni con livello di PS ai limiti inferiori della norma ma anche per campioni con basso livello di PS, specialmente con l'uso di metodi coagulativi.<sup>17</sup> (Tabella n. 5)

	CV %	Errore diagnostico (% falsi positivi)
AT	5-10	<5
PC	<10	<10
PS	20-25 (test coagulativi) <15 (frazione libera)	<20

Tabella n. 5 - Riproducibilità dei metodi per gli inibitori fisiologici

A riprova dell'importanza del lavoro di controllo delle procedure e delle metodiche si sottolinea che la misura degli inibitori è gravata da una serie di incertezze legati a alta variabilità biologica intra /interindividuale. Quest' aspetto è particolarmente evidente per il dosaggio della proteina S con variabilità intra individuale 5.8% ed interindividuale del 63.4%, confermandosi anche nel lavoro di Lippi come il paramento con la massima oscillazione interindividuale tra una rosa di test che studiano il processo emostatico<sup>13</sup>

Analita	Variabilità biologica	
	CVw	CVg
Antitrombina	5,2	15,3
Conta piastrinica	9,1	21,9
Fattore di Von Willebrand	5,0	18,0
Fattore V	3,6	–
Fattore VII	6,8	19,4
Fattore VIII	4,8	19,1
Fattore X	5,9	–
Fibrinogeno	10,7	15,8
Plasminogeno	7,7	–
Proteina C	5,8	55,2
Proteina S	5,8	63,4
Tempo di Prohrombina (PT)	4,0	6,8
Tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT)	2,7	8,6

Tabella n. 6 - Variabilità biologica intra-individuale ed inter-individuale  
CV w = intraindividuale; CV g = interindividuale

### iii. interpretazione dei risultati

Gli intervalli di riferimento rimangono il sistema maggiormente utilizzato nella categorizzazione della condizione clinica dei pazienti. Essi rappresentano comunque un' espressione matematico statistica della distribuzione dei valori in una popolazione di riferimento.( e non sono sempre e comunque identificabili con limiti decisionali).

- Intervalli di riferimento dell'antitrombina

Nell'adulto l'intervallo di riferimento dell'AT è abbastanza stretto (generalmente compreso tra 80 e 120%)<sup>19</sup>.

Non sono state evidenziate differenze significative rispetto al sesso anche se i livelli di AT sono leggermente più bassi nelle donne in pre-menopausa rispetto agli uomini di pari età<sup>19</sup>. I livelli sono invece significativamente più bassi nel neonato, raggiungendo il livello dell'adulto solo dopo 1 anno di età; i livelli sono inoltre generalmente più alti rispetto all'adulto fino a 16 anni di età<sup>20</sup>. I livelli diminuiscono invece dopo la menopausa, ma non sembra che questo influisca in modo significativo sull'intervallo di riferimento<sup>19</sup>.

- Intervalli di riferimento della proteina C

E' stata dimostrata un'importante sovrapposizione tra i livelli di PC misurati in soggetti portatori e non portatori di difetto ereditario<sup>21</sup>; di conseguenza l'intervallo di riferimento risulta piuttosto ampio (60-140%). Sono state dimostrate differenze significative dei livelli di PC in relazione all'età (valori più bassi nei giovani) e al sesso<sup>19</sup>, in parte dovuti ai livelli dei trigliceridi<sup>22</sup>. I livelli di PC sono sensibilmente ridotti nel neonato e nei bambini (20-30%) e aumentano con l'età, raggiungendo valori simili a quelli dell'adulto nell'adolescenza<sup>20</sup>. Valori significativamente aumentati si osservano nelle donne dopo la menopausa.

- Intervalli di riferimento della proteina S

L'intervallo di riferimento della PS risulta piuttosto ampio, con limite inferiore intorno al 60%. I livelli sono lievemente più alti negli uomini rispetto alle donne in età fertile. I livelli aumentano invece dopo la menopausa; nell'uomo invece non state evidenziate variazioni con l'età. I livelli sono significativamente ridotti nei neonati (intorno al 30%) ma aumentano a livello di quelli dell'adulto dopo 1 anno di età.

## PROBLEMATICHE CLINICHE

I soggetti proponibili per il controllo del rischio di TVP o EP sono inquadrabili nei seguenti ambiti:

Soggetti sintomatici per:

- Uno o più precedenti episodi di TEV idiopatica (dopo stimoli di modesta entità, con storia familiare positiva per TEV)
- Trombosi venose superficiali recidivanti su vena sana
- Trombosi venose in sedi non usuali (escluse le occlusioni venose retiniche)
- Necrosi cutanea indotta da anticoagulanti orali
- Porpora fulminante neonatale
- Patologia arteriosa in età giovanile (< 55 anni)
- Pregressa patologia della gravidanza<sup>1</sup>.

Oppure per soggetti asintomatici :

- Non indicato in soggetti non selezionati per prevenire episodi tromboembolici e/o complicanze della gravidanza
- Indicato prima dell'esposizione a situazioni a rischio trombotico particolare (terapia ormonale, gravidanza, ecc) in soggetti: con storia familiare chiaramente positiva per tromboembolia venosa (ma non per complicanze della gravidanza), familiari di 1° grado di portatori di trombofilia

Il corretto timing per l'esecuzione del test è:

- senza restrizioni di tempo e condizione riguardo l'esecuzione di test genetici
- assolutamente non consigliata durante un evento acuto
- Non durante un trattamento eparinico
- Non durante terapia anticoagulante orale
- Non in gravidanza , contraccezione orale o terapia ormonale sostitutiva
- a due mesi dalla sospensione del contraccettivo orale

### Condizioni cliniche particolari

- Gravidanza e puerperio

La gravidanza "normale" è associata a un aumento dei fattori procoagulanti e riduzione dei livelli degli inibitori fisiologici della coagulazione. Pertanto le concentrazioni di PS totale e FPS

diminuiscono, in confronto i livelli di PC e AT rimangono generalmente non modificati o solamente leggermente aumentati per la proteina C negli ultimi trimestri.<sup>23</sup>

Tutto ciò predispone a incremento degli eventi trombotici (aborti ricorrenti, morte endouterina fetale, pre-eclampsia, HELLP syndrome, pre-eclampsia, ritardo di accrescimento intrauterino, abrupio placentare), ed il rischio è stimato di circa 4 volte rispetto alla non gestante aumentando il rischio di 14 volte durante il puerperio<sup>24</sup> Nonostante ciò non esistono intervalli di riferimento da associare a gravidanze fisiologiche per cui risulta complesso utilizzare gli indici di rischio trombotico durante questa condizione<sup>25</sup>.

- contraccezione orale e terapia sostitutiva

Il rischio trombotico di una donna in età fertile è basso (1:10 000-1:1000) tale rischio però sale a 3-4 volte in donne che assumono contraccettivi orali e a 6-9 volte se si tratta di progestinici di terza generazione<sup>26</sup>.

Donne portatrice di difetto degli inibitori naturali della coagulazione hanno rischio 6 volte superiore di sviluppare trombosi durante assunzione di terapia contraccettiva<sup>27</sup>

Studi randomizzati valutano un incremento del rischio di sviluppare TEV di circa 2-4 volte in donne che usano terapia ormonale sostitutiva. Tale rischio è notevole per i preparati orali e sembra più rilevante all'inizio della terapia e in donne portatrice di difetto trombofilico<sup>28</sup>.

- Età pediatrica

In età pediatrica la valutazione dei test dell'emostasi è di difficile interpretazione perché la sintesi delle proteine coinvolte è in continua evoluzione dalla nascita all'età adolescenziale ed inoltre perché non esistono studi prospettici in grado di determinare cut off di normalità per questi parametri<sup>29</sup>.

Le complicanze trombotiche in età pediatrica hanno una valenza di minor entità rispetto all'età adulta ma sono penalizzate dal fatto che non esistendo studi solidi ai quali appoggiarsi la valutazione attendibile dei marcatori di trombofilia può essere esclusivamente eseguita con indagini genetiche sottostimando le problematiche acquisite che comunque si possono manifestare in questo arco di età<sup>30</sup>.

## OBIETTIVO dello STUDIO

Tra gli inibitori fisiologici della coagulazione, la diagnosi di difetto di proteina S, è maggiormente articolata data la sua struttura di legame con il C4BP ed il suo potere anticoagulante associato solamente nella sua forma libera. Dal punto di vista genetico la carenza identifica deficit quantitativi ( tipo 1 e 3 in relazione alla frazione di proteina coinvolta) o qualitativi ( tipo 2 in relazione alla sua attività sulla proteina C attivata) individuando un rischio relativo per problematiche trombotiche tra 2 e 8, oscillazione che risente del fatto che non è ancora stata definita una stima accurata dei difetti, ulteriormente complicata dai problemi di diagnostica di laboratorio<sup>31</sup>

La valutazione del rischio è difficile anche perchè i livelli circolanti di proteina S possono essere largamente influenzati da molti fattori esogeni come l'età, farmaci o lo stato ormonale soprattutto legato ai livelli degli estrogeni.

Questa variabilità biologica della proteina S, richiede quindi un'appropriata scelta dei test a disposizione ed una corretta valutazione dei risultati, per definire opportuni intervalli di riferimento in relazione ai test utilizzati.

In questo lavoro sono stati selezionati donatori sani al fine di individuare una popolazione di soggetti da valutare nella loro normalità, divisi per classi di età e per sesso confrontando la metodiche ad oggi definita di screening e definire valori soglia ai quali associare il test funzionale coagulativo, identificato come test di conferma possibile per suggerire eventuali carenze sia genetiche che acquisite.

Il confronto tra metodiche può dare indicazioni per ridurre zone borderline per la soglia di patologicità ed orientare verso limiti decisionali. L'accuratezza e la precisione di intervalli possibili può quindi creare un flusso dei test da utilizzare al fine di evitare inappropriati test genetici di conferma in soggetti a rischio trombotico.



## MATERIALI E METODI

### 4.1 Selezione del campione

Sono stati selezionati 313 soggetti normali, tra soggetti esterni che afferivano al centro prelievi e donatori del centro trasfusionale. E' stato ottenuto il loro consenso in accordo con la legge italiana sulla privacy,rispettando i seguenti criteri di inclusione: età compresa tra 15 e 56 anni, sia maschi che femmine. I criteri di esclusione sono stati: parametri biochimici anormali; presenza di terapia estro-progestinica o sostitutiva; infezioni, allergie, tiroiditi, patologie autoimmunitarie se note e uso di antiipertensivi.

Per i test di coagulazione sono stati esclusi i campioni con test di routine al di fuori dell'intervallo di normalità dei seguenti parametri: PT (tempo di protrombina), APTT (tempo di tromboplastina parziale attivata) e Fibrinogeno. I soggetti sono stati considerati normali e, quindi, inclusi nello studio, con valori di PT, APTT e Fibrinogeno inclusi,(tabella n. 7) rispettivamente, nell'intervallo di 0.85 – 1.15 in Ratio, 0.85 – 1.15 in Ratio e 1.5 – 4.5 in g/L.

Tabella n. 7 - Criteri di inclusione basati sui test di routine.

TEST	INTERVALLO DI NORMALITÀ	UNITÀ
PT	0.85 – 1.15	Ratio
APTT	0.85 – 1.15	Ratio
Fibrinogeno	1.5 – 4.5	g/L

### 4.1 (bBis) Raccolta del campione

I campioni da analizzare sono stati ottenuti mediante prelievo di sangue venoso fresco in provetta BD vacutainer® (BD Diagnostic) con volume di 2.7 mL, e con anticoagulante citrato di sodio 0.129 M, in quantità tale da assicurare un rapporto sangue:anticoagulante di 9:1. La provetta è corredata di un indicatore, apposto sull'intera circonferenza, che indica il livello esatto di riempimento. Ogni provetta è stata centrifugata a 3500 rpm (rotazioni per minuto, corrispondenti a 2000 g) per 10 minuti in centrifuga Heraeus Megafuge 1.0 (Kendro Laboratory Products GmbH); il campione così preparato è stato ali quotato e conservato a -80 C e successivamente processato entro tre mesi dal congelamento.

## 4.2 Test a disposizione

I test sono stati eseguiti su plasma congelato in aliquote a -80°C e scongelato a 37°C al momento dell'uso ed eseguiti su più sedute analitiche per una più adeguata valutazione della variabilità analitica.

### Dosaaggio PS coagulativo

Il test coagulativo funzionale per la determinazione quantitativa della PS libera è stato realizzato su coagulometro ACL TOP 500 della ditta Instrumentation Laboratory ( IL)

Si utilizza il kit ProS ditta IL (composto da Protein S reagent, Protein S deficient plasma e Protein S control plasma) per determinare l'attività funzionale della proteina S libera eseguendo un tempo di protrombina (PT) modificato in presenza di fattore tissutale ricombinante di coniglio, fosfolipidi ioni calcio e proteina C attivata.

L'attività della PS è proporzionale all'allungamento del tempo di coagulazione del plasma carente di PS a cui è stato addizionato il plasma diluito del campione in esame.

I valori di ProS dei campioni sono stati riportati in attività (%) plottando il tempo contro una curva di taratura ottenuta con pool o plasma calibrante liofilo (fig. 5).

Inerferenze: emoglobina > 2 g/L, bilirubina >15 mg/dL, trigliceridi >1000 mg/dL, eparina > 1.6U/mL,

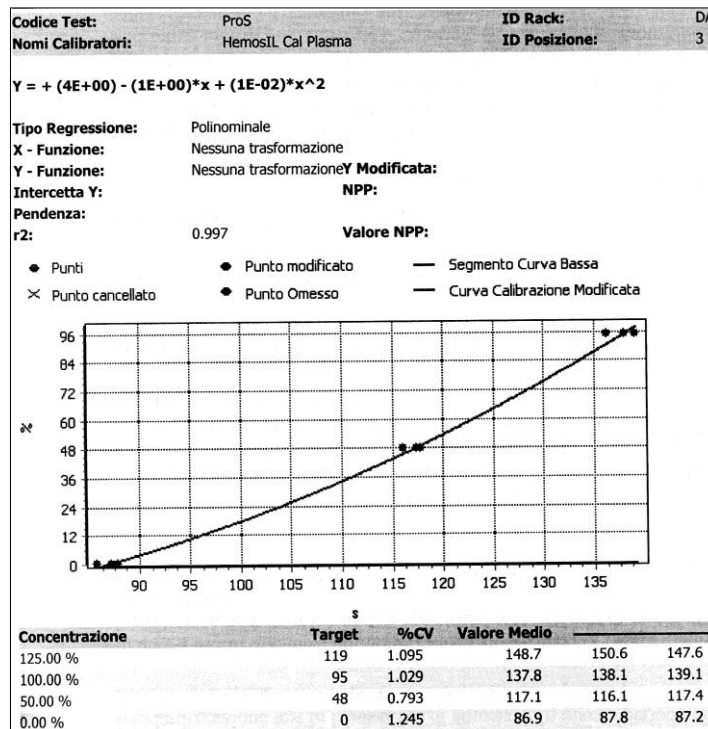


Fig. 5: curva di calibrazione proteina S coagulativa

### Dosaggio PS immunoturbidimetrica

Il test immunoturbidimetrico per la determinazione della proteina S Libera è stato realizzato su coagulometro ACL TOP 700 della ditta IL.

IL kit Free Protein S ditta IL è composto da particelle di latex alle quali è adeso il C4BP purificato (C4BP latex) e un monoclonale verso la proteina S libera adeso a particelle di lattice (monoclonal latex). I due reattivi sono due latex ,uno pronto all'uso ed uno allo stato liofilo.

La presenza di PS libera è determinata misurando l'incremento di torbidità prodotta dalla agglutinazione dei due reagenti al lattice. Il C4BP purificato adsorbito al primo reagente al lattice si lega con una elevata affinità alla PS libera nel campione in esame in presenza di ioni calcio. La PS libera adsorbita al lattice C4BP, legandosi al secondo reagente al lattice coniugato con un anticorpo monoclonale diretto contro la PS umana, dà l'avvio alla reazione di agglutinazione (fig. 6). Il grado di agglutinazione sarà direttamente proporzionale alla concentrazione della PS libera nel campione in esame (fig. 7).

I risultati del test sono poi riportati in percentuale (%) verso una curva di taratura.

Interferenze : emoglobina > 2g/L, bilirubina > 25mg/dL, trigliceridi >1500 mg/dL, eparina > 1.5U/mL, fattore reumatoide >900UI/mL piastrine >10<sup>10</sup>/L

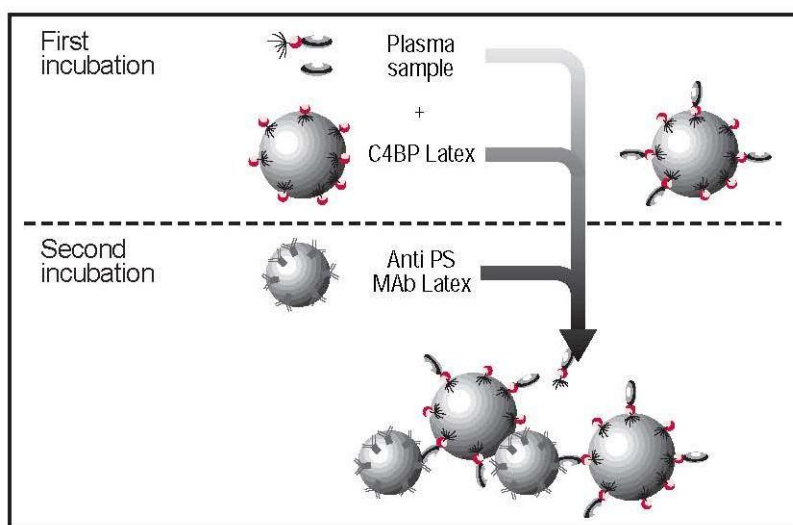


Fig. 6. - sequenza di reazioni

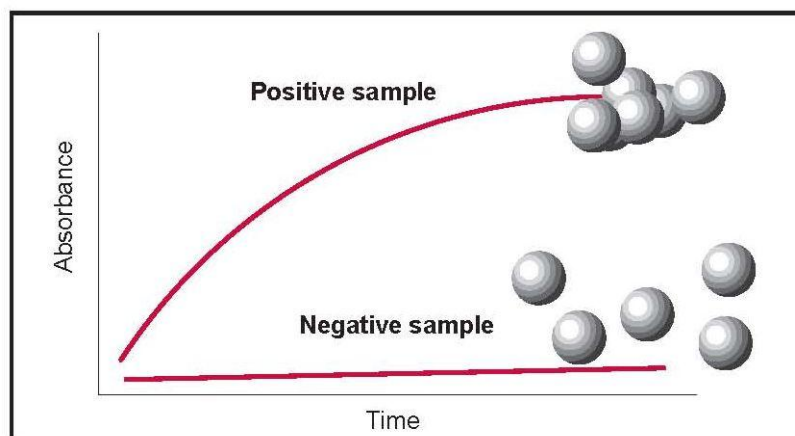


Fig. 7 - schema di curve di risposta

#### 4.3 Analisi Statistica

Tutti i dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando metodi statistici descritti per mezzo di un programma di elaborazione PRISM GraphPad 4.1.

La normalità della distribuzione dei dati è stata valutata con il test di Shapiro-Wilk (SW).

I risultati sono stati presentati come media  $\pm$  deviazione standard (SD)

Per l'elaborazione statistica le classi di età scelte sono tre: 15-20 anni ; 20- 45 e > di 46. La scelta è stata fatta in relazione alle richieste di valutazione di intervalli di normalità da parte dei pediatri, ginecologi e neurologi che maggiormente interpellano la struttura del laboratorio in appoggio al loro quesito clinico.

Il confronto tra le classi è stato ottenuto con il test parametrico ANOVA ( analisi della varianza).

Dividendo i campioni per sesso, i due gruppi, sono stati comparati con il t test per dati parametrici.

La relazione tra le due metodiche analizzate è stata ottenuta con il test parametrico di Pearson che misura la correlazione possibile tra due gruppi di dati.

## RISULTATI

### 1. PROTEINA S LIBERA

I risultati ottenuti con la metodica immunologica per la determinazione della proteina S in forma libera sono stati suddivisi per classi di età identificando tre gruppi di persone in base agli interessi dei clinici per la fascia adolescenti, la fascia in età giovanile e riconoscendo nella fascia oltre l'età di 45 anni il cut off per definire le trombosi in età adulta.

Per il sesso femminile la distribuzione (tabella n. 8) tra i diversi campioni è gaussiana (SW) e ciò autorizza l'eliminazione di campioni con valori al di sopra o al di sotto della seconda deviazione standard. Successivamente il test parametrico, ANOVA, ha permesso di verificare che tra le tre classi non esiste differenza significativa anche con il variare dell'età ( $p = 0,6867$ ).

L'elevata deviazione standard, nonostante l'accurata selezione del campione, riporta una dispersione di dati con  $CV > 15\%$  indipendentemente dalla classe di età considerata

	PROTEINA S LIBERA - FEMMINE		
CLASSI D'ETA'	15-20	21-45	> 46
N°	64	126	32
SW test	YES	YES	YES
Media	86,92	85,00	85,69
S.D.	16,07	13,84	13,20
CV%	18,48	16,28	15,41
ANOVA	$p = 0,6867$		

Tabella n. 8 - La tabella riporta la distribuzione normale dei dati (yes) calcolati con il test di normalità Shapiro-Wilk (SW), la media e la deviazione standard (SD), il coefficiente di variazione (CV%) ed il valore di differenza significativa (p-value) per la popolazione di femmine raggruppate in tre classi in base all'età (fig. 8).

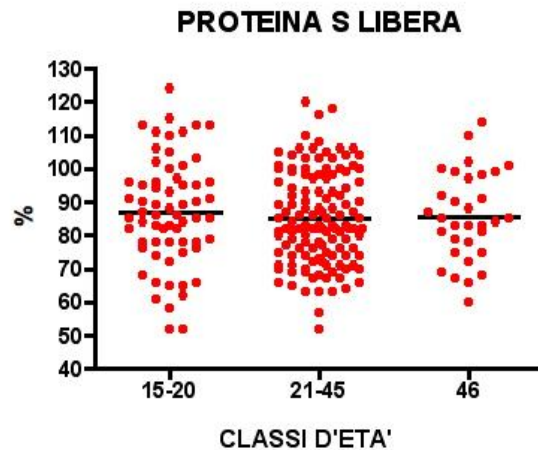


Fig. 8 - valori proteina S femmine divisi per classi d'età

Per il sesso maschile la statistica dei dati è analoga alla popolazione femminile (tabella n. 9). La distribuzione tra i diversi campioni è gaussiana (SW) e permette l'eliminazione di campioni con valori al di sopra o al di sotto della seconda deviazione standard. Il test parametrico, ANOVA, stabilisce che tra le tre classi non esiste differenza significativa nonostante l'età. ( $p = 0,6399$ ) Tuttavia anche se è avvenuta una accurata selezione del campione, l'elevata deviazione standard riporta una dispersione di dati con  $CV > 15\%$ . indipendentemente dalla classe di età considerata

	PROTEINA S LIBERA - MASCHI		
CLASSI D'ETA'	15-20	21-45	> 46
N°	18	41	32
SW test	YES	YES	YES
Media	108,4	105,5	103,8
S.D.	17,67	16,15	16,87
CV%	16,30	15,32	16,25
ANOVA	$p = 0,6399$		

Tabella n. 9 - La tabella riporta la distribuzione normale dei dati (yes) calcolati con il test di normalità Shapiro-Wilk (SW), la media e la deviazione standard (SD), il coefficiente di variazione (CV%) ed il valore di differenza significativa (p-value) per la popolazione di maschi raggruppate in tre classi in base all'età (fig. 9).

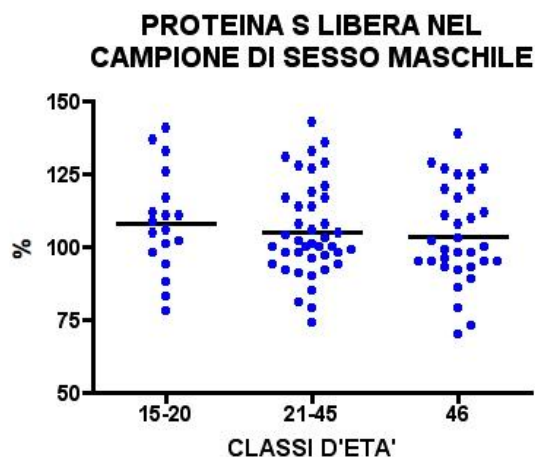


Fig. 9 - valori proteina S maschi divisi per classi d'età

In generale raggruppando le classi di età e lasciando la divisione dei dati per sesso la distribuzione dei due gruppi continua a rimanere gaussiana (SW) con una maggiore SD dei maschi rispetto alle femmine ed una dispersione leggermente diminuita rispetto alla divisione per classi di età, mentre applicando il t-test parametrico a due code per dati non appaiati si evidenzia una differenza fortemente significativa  $p < 0.0001$ . (tabella n. 10).

	<b>PROTEINA S LIBERA – MASCHI vs FEMMINE</b>	
<b>SESSO</b>	Maschi	Femmine
<b>N°</b>	91	222
<b>SW test</b>	YES	YES
<b>Media</b>	105,5	85,65
<b>S.D.</b>	16,62	14,39
<b>CV%</b>	15,76	16,80
<b>t-test</b>	$p < 0.0001$	

Tabella n. 10 - La tabella riporta la distribuzione normale dei dati (yes) calcolati con il test di normalità Shapiro-Wilk (SW), la media e la deviazione standard (SD), il coefficiente di variazione (CV%) ed il valore di differenza significativa (p-value) tra le due popolazioni (fig. 10).

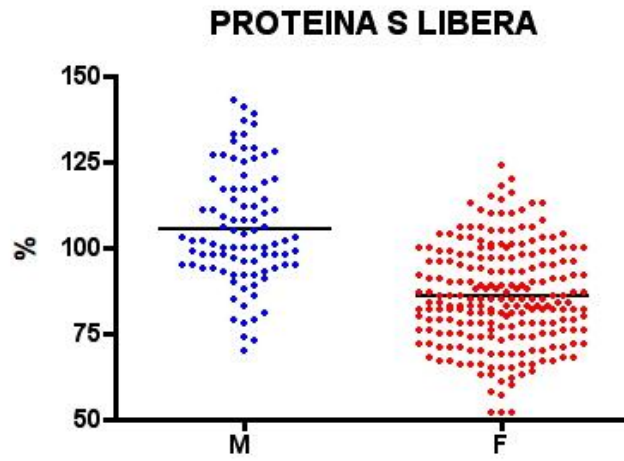


Fig. 10 - valori proteina S totali distribuiti per sesso



## 2. PS COAGULATIVA

Successivamente sul una seconda aliquota, di plasma congelato dei soggetti per i quali è stata dosata la proteina S frazione libera con metodo immunologico, è stata determinata la metodica coagulativa. I campioni valutati con questa metodica sono stati in totale 142 e di questi, data la distribuzione gaussiana (SW) si sono utilizzati nella rielaborazione statistica, solo i campioni che rientrano nell'intervallo tra la media e la +/- 2SD. Dalla tabella che segue si nota che la dispersione dei dati è leggermente maggiore per la popolazione maschile rispetto a quella femminile ( CV%) ad ancora una volta, la variabilità tra i sessi è confermata da una differenza statisticamente significativa (  $p < 0,0001$ ) (tabella e fig. 11).

	PROTEINA S COAGULATIVA	
Sesso	MASCHI	FEMMINE
N°	86	56
SW test	YES	YES
Media	109,8	92,46
s.d.	16,13	12,19
CV%	14,69	13,69
t test	$p < 0,0001$	

Tabella n. 11 - La tabella riporta la distribuzione normale dei dati (yes) calcolati con i test di normalità Shapiro-Wilk (SW), la media e la deviazione standard (SD), la dispersione dei dati (CV%) ed il valore di differenza significativa (p-value) della popolazione maschile e femminile

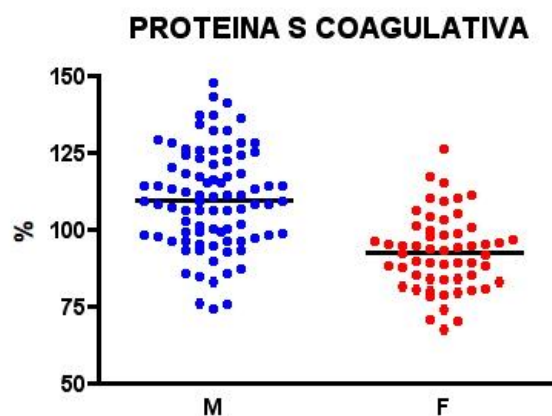
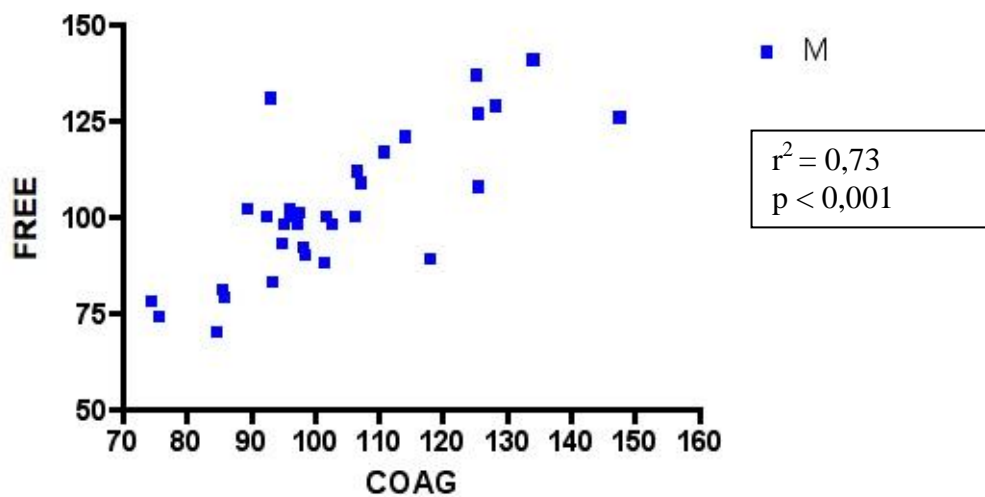


Fig. 11 - distribuzione dei valori di proteina S coagulativa tra i due sessi

### 3. PROTEINA S LIBERA versus PROTEINA S COAGULATIVA

Il confronto tra le metodiche è stato fatto applicando il test parametrico di correlazione di Pearson in quanto i calcoli sono basati sul fatto che sia i valori plottati sull'asse x che quelli sull'asse y sono campioni che derivano da popolazioni che seguono un andamento gaussiano. L'  $r^2$  che si ricava è il coefficiente di correlazione che esprime la linearità tra la loro covarianza e il prodotto delle rispettive deviazioni standard. Oscilla tra lo 0 e 1 e tutte e due le popolazioni, pur lontana dalla condizione ottimale, rientra tra 0.50 e 0.75 ad indicare un discreto grado di associazione, più forte per la popolazione maschile come indicato nella figura 12 a-b.

#### CORRELAZIONE PROTEINA S COAGULATIVA ED S LIBERA



#### CORRELAZIONE PROTEINA S COAGULATIVA ED S LIBERA

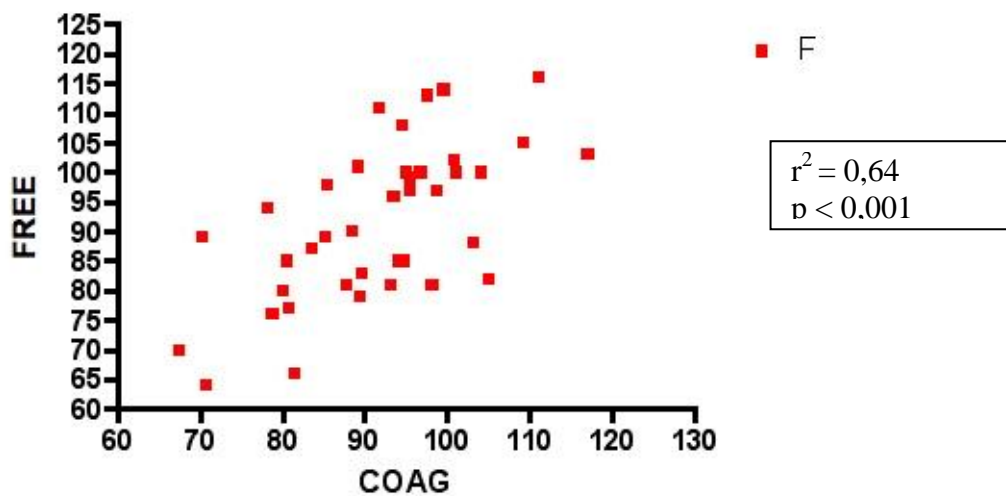


Fig. 12. correlazioni tra metodica coagulativa e immunologica sia nella popolazione maschile (a) che femminile (b).

## DISCUSSIONE

Tra gli inibitori della cascata coagulativa la determinazione della proteina S è il marcatore di trombofilia che maggiormente impegna sia nella scelta del test da utilizzare che nella riespressione del risultato per avviare follow-up osservazionali o scelte terapeutiche atte a ridurre il rischio trombotico

Dal momento che la determinazione della proteina S ha una chiara ripercussione in ambito clinico, emerge la necessità di avere intervalli di riferimento che sono univoci e che consentano, in base al loro cut off, scelte univoche.

Tra le variabili il sesso è una condizione ben nota<sup>32</sup> ma non è altresì chiaro quale sia il suo meccanismo sotteso. Ovviamente la diversa costellazione ormonale potrebbe essere alla base degli sbilanciamenti in senso negativo che si hanno nella popolazione femminile. Purtroppo a tutt'oggi non vi è un consenso tra gli esperti su quale possa essere il valore del singolo fattore chiaramente correlabile a tale variabile.

Un aspetto degno di nota è dato dalla possibilità di avere risultati descritti da uno studio con campione numeroso, randomizzato e con adeguato follow –up temporale. Il follow-up alla base di uno studio prospettico, permetterebbe di considerare le varie fasi ormonali della donna (prepubertà, maturità sessuale, menopausa) consentendo di effettuare meta-analisi per poter avere dati affidabili.

Allo stato attuale non pare esistano dei dati in cui è riportata la più bassa concentrazione di inibitori da considerare nella norma, in soggetti in età adolescenziale. Rimangono a disposizione lavori con intervalli di riferimento rielaborati con metodiche ad oggi non consigliate per eseguire dosaggi di proteina S e quindi difficilmente affidabili<sup>33</sup> In questo lavoro emerge un preconcetto originato dalla numerosità non elevata del campione. Inoltre, un altro aspetto di cui tener conto è la bassa omogeneità tra le classi di età. Questi aspetti determinano una particolare difficoltà nel recuperare ed applicare cut off solidi dal punto di vista operativo

Analizzando i risultati si evince che, tutte le popolazioni analizzate, rientrano nei criteri di normalità assumendo un andamento gaussiano dei dati della popolazione e, di conseguenza, si potrebbe stabilire un intervallo di riferimento calcolato sulle due SD dalla media. Da precisare che è stato applicato un solo il test SW, quello più indicato per le popolazioni in ambito medico ma per esempio, analizzando con altre tipologie di test statistici, la normalità non viene confermata per le classi con campioni più numerosi rispetto alle altre.

Nella valutazione della distribuzione dei dati, la tabella n. 13 ci consente di confrontare i vari CV rivisti sia con il punto di vista delle indicazioni generiche per questo test, sia con quello specifico del lavoro argomento della presente tesi evidenziando come non vi sia una qualità analitica uniforme, soprattutto guardando il risultato del controllo di qualità inter-regionale (VEQ).

	Controllo normale	Controllo Patologico medio – basso	Controllo globale (normali / patologici)
coagulativo	-----	-----	15.8
immunosensibilizzante			17.3
ProS (valore dichiarato dalla ditta)	5.6	11.2	
PS free(valore dichiarato dalla ditta)	3.4	3.2	
Strumentale PS	7	2	
Strumentale PS libera	8	6	
CQ VEQ PS	40.6	50.9	
CQ VEQ PS libera	10.1	12.4	

Tabella n. 13 - confronto dei CV%: analitici, strumentale e dei controlli di qualità inter-laboratorio<sup>34</sup>

Nella selezione dei pazienti è stato volutamente scelto di valutare alcuni parametri laboratoristici classici per evitare di introdurre variabili che avrebbero reso più complesso il processo di rielaborazione dei dati.

E' ben noto per esempio che un parametro come l'omocisteina, quando presente in valori elevati, può determinare l'incremento dei fenomeni trombotici a carico dell'apparato trombotico arterioso e venoso. Introdurre anche un solo parametro, peraltro importante, come l'omocisteina, avrebbe causato difficoltà in merito ad aspetti come i range di età, la terapia pregressa o in atto, lo stato di omo o eterozigosi.

A corollario di quanto è stato detto è auspicabile che, nell'ambito dei test di laboratorio la conoscenza, da parte degli operatori ad ogni livello, delle condizioni preanalitiche sia rispettata affinché non venga inficiato tutto ciò che avviene a valle. Le proteina della coagulazione sono particolarmente sensibili alla terapia, agli stati patologici +/- correlati a coagulopatie e soprattutto al timing esatto del prelievo.

## CONCLUSIONI

Alla luce problema relativo alla bassa numerosità del campione e delle variabili che andrebbero necessariamente approfondite, associati alla multifattorialità della malattia, sarebbe opportuno creare uno punteggio tra i parametri acquisiti per dare rilevanza alle determinazioni degli indici di rischio ( una condizione di trombofilia ereditaria è presente nel 5-10% della popolazione sana occidentale, percentuale che raggiunge il 40% in pazienti affetti da tromboembolismo venoso). Sebbene uno stato trombofilico eredo-familiare sia di per sé caratterizzato da un più alto rischio di TEV, va considerato come l'evento trombotico sia scatenato in più del 40% dei casi dall'interazione tra fattori congeniti ed acquisiti, a conferma della genesi multifattoriale della malattia.

Un approccio razionale consentirebbe di definire un processo analitico omogeneo mediante l'adozione di una modulistica opportuna in cui, in modo sintetico fosse esplicito il quesito diagnostico e l'eventuale trattamento terapeutico in atto, al fine di controllare dati nettamente fuori contesto da verificare con solidi metodi statistici.

Ad oggi abbiamo utilizzato operativamente gli intervalli di riferimento annessi alla brochure dei kit come base di partenza. Ciò non esclude che, ultimata la casistica, in un prossimo futuro, saranno proponibili tabelle operative come quelle elaborate in seguito al presente lavoro (tabella n. 14) gestite secondo l'immagine della fig. 13

### INTERVALLI DI RIFERIMENTO PER PROTEINA S

Campione	N°	Media	SD	INTERVALLO (media $\pm$ 2SD)	INTERVALLO Kit di base
Totale M (età:18-54)	91	105.1	16.67	71.8 - 138.4	74 - 146
Totale F (età: 15-56)	222	86.26	14,43	57.4 - 115.12	54.7 - 123.7

### INTERVALLI DI RIFERIMENTO PER PROTEINA COAGULATIVA

Campione	N°	Media	SD	INTERVALLO (media $\pm$ 2SD)	INTERVALLO Kit di base
Totale M (età:18-54)	86	109.8	16.13	77.5 - 142.1	NON DICHIARATO
Totale F (età: 15-56)	56	92.46	12.19	68.1 - 116.8	76-135

Tabella n. 14 – Intervallo di riferimento per le due metodiche di dosaggi proteina S.

Le prospettive future in questo ambito di patologie coagulative saranno la valutazione di nuovi kit in fase di avanzata sperimentazione che potranno consentire una determinazione reale della proteina S coagulativa in grado di esplicitare il reale controllo sulla cascata (fig.13)

## DIAGRAMMA DIAGNOSTICO TERAPEUTICO

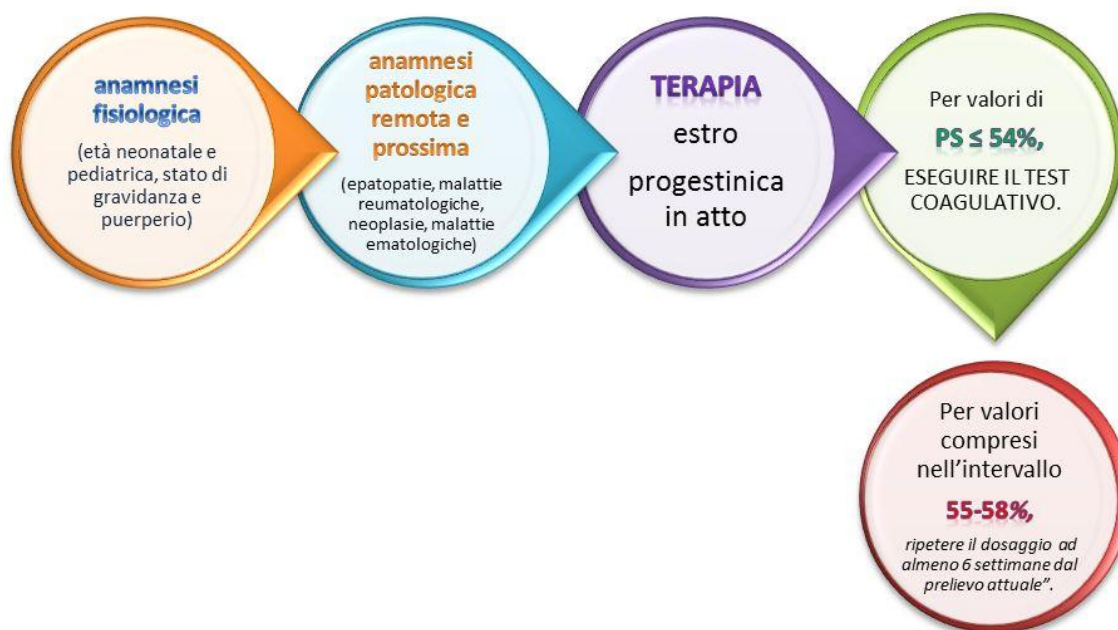


Fig. 13 Schema per un flusso applicativo con metodica di reflex per il dosaggio proteina

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Linee Guida Siset per la Diagnosi, la Profilassi e la Terapia del Tromboembolismo Venoso ha ematologica 2003; 88: 28-46
- <sup>2</sup> Antonucci G., Testa S., et al – Il Counselling per le trombofilie – Riv med lab – JLM, vol 5, suppl. al n.3, 2004: 157-159
- <sup>3</sup> Khan and Dickerman – Hereditary thrombophilia – *Thrombosis Journal* 2006 4.15:1-17
- <sup>4</sup> Giansante C. Appunti di lezione: la trombofilia. 2010
- <sup>5</sup> U. Seligsohn, A. Lubetsky – Genetic Susceptibility to Venous Thrombosis – *N Engl J of Med*, vol 344, n. 16 april, 19- 2001 :1222-1231
- <sup>6</sup> B. Morelli corso SIBIOC giugno- Bari- 2001
- <sup>7</sup> Finazzi G, Caccia R, Barbui T. Different prevalence of thromboembolism in the subtypes of congenital antithrombin III deficiency: review of 404 cases. *Thromb haemost* 1987; 58:1094
- <sup>8</sup> Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68:1370-3.
- <sup>9</sup> Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984;311:1525-8.
- <sup>10</sup> Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001; 47: 1597-606
- <sup>11</sup> Relazione Cristina Lignani e al: Ruolo e limiti della diagnostica di laboratorio routinaria per il rischio trombotico ( test funzionali e genetici): predittività e affidabilità dei test. Conferenza di consenso “Prevenzione delle complicanze trombotiche associate all’uso di estroprogestinici in età riproduttiva” Roma 18-19 settembre 2008 – Documento di consenso del 19 febbraio 2009.
- <sup>12</sup> Tripodi A. A review of the clinical and diagnostic utility of laboratory tests for the detection of congenital thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 25-32.
- <sup>13</sup> Lippi G, Salvagno G, Adcock DM, Franchini M, Favoloro EJ. La variabilità preanalitica dei test coagulativi. *RIMel/IJLaM* 2009; 5: 91-98
- <sup>14</sup> Meijer P, Kluft C, Haverkate F, De Maat MP. The long-term within- and between laboratory variability for assay of antithrombin, and proteins C and S: results derived from the external

quality assessment program for thrombophilia screening of the ECAT Foundation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 748-53.

<sup>15</sup> Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J, Wheeler M, Low J, Aboud M, Duncan E, Smith J, Exner T, Lloyd J, Marsden K. Multilaboratory testing of thrombophilia: Current and past practice in Australasia as assessed through the Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Program for Hematology. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 49-58.

<sup>16</sup> Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Multilaboratory testing in thrombophilia through the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (Blood coagulation) Quality Assurance Program. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 66-72.

<sup>17</sup> Meijer P, Haverkate F. External quality assessment and the laboratory diagnosis of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 59-65.

<sup>18</sup> Jennings I, Kitchen S, Cooper P, Makris M, Preston FE. Sensitivity of functional protein S assays to protein S deficiency: a comparative study of three commercial kits. *J. Thromb Haemost* 2003; 1: 1112-4.

<sup>19</sup> Tait RC, Walker ID, Islam SIAM, McCall F, Conkie JA, Mitchell R, Davidson JF. Influence of demographic factors on antithrombin-III activity in a healthy population. *Br J Haematol* 1993; 84: 476-80

<sup>20</sup> Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofori F, Mitchell L. Maturation of the Hemostatic System During Childhood. *Blood* 1992; 80: 1998-2005.

<sup>21</sup> Allaart CF, Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM, Briet E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein-C deficiency defect. *Lancet* 1993; 341: 134-8.

<sup>22</sup> Rodeghiero F, Tosetto A. The epidemiology of inherited thrombophilia: the VITA project. *Thromb Haemost* 1997; 78: 636-40.

<sup>23</sup> Winkler UH: Hemostatic effects of third- and second-generation oral contraceptives: Absence of a causal mechanism for a difference in risk of venous thromboembolism. *Contraception* 2000; 62:S-20S

<sup>24</sup> Rosendaal FR. risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999;82:610-619.



- <sup>25</sup>Said JM, Ignjatovic V, Monagle PT, Walker SP, Higgins JR, Brennecke SP. Altered reference ranges for protein C and protein S during early pregnancy: Implications for the diagnosis of protein C and protein S deficiency during pregnancy. *Thromb Haemost*. 2010 May;103(5):984-8.
- <sup>26</sup> Blickstein D, Blickstein I. Oral contraception and thrombophilia. *Curr Opin Obst Gynecol* 2007; 19:370-6.
- <sup>27</sup> Simioni P, Sansom BJ, Prandoni P, *et al*. The incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1999;81:198-198
- <sup>28</sup> Wu O, Robertson L, Langhorne P, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M, Walker ID, Brenkel I, Regan L, Greer IA. Oral contraceptives, hormone replacement therapy, thrombophilias and risk of venous thromboembolism: a systematic review. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. *Thromb Haemost* 2005 Jul 94(1): 17-25
- <sup>29</sup> M. Righini, G. Le Gal, J.P. Laroche. *Diagnostic et traitement de la maladie thromboembolique veineuse en pédiatrie* *J Mal Vasc* 2006; 31: 135-142
- <sup>30</sup> Kenet G, Lütkehoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, Chabrier S, Chan A, deVeber G, Fiedler B, Fullerton HJ, Goldenberg NA, Grabowski E, Günther G, Heller C, Holzhauser S, Iorio A, Journeycake J, Junker R, Kirkham FJ, Kurnik K, Lynch JK, Male C, Manco-Johnson M, Mesters R, Monagle P, van Ommen CH, Raffini L, Rostásy K, Simioni P, Sträter RD, Young G, Nowak-Göttl U - Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation*. 2010 Apr 27;121(16):1838-47.
- <sup>31</sup> Finazzi G, Zaninotti C., Marziali S, Barbui T *Genetica molecolare della malattia trombo embolica venosa :aspetti clinici progressi in Ematologia Clinica*. 2001 vol 20, 13-22,
- <sup>32</sup> Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SIAM, Tait RC. A study of protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency status. *BJ Haematol* 2001; 113:636-41
- <sup>33</sup> Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A, De Rosa L, Hamilton S, Ragg P, Robinson S, Auldish A, Crock C, Roy N, Rowlands S. -Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* feb 95 (2). 362-72 - 2006

<sup>34</sup> Tripodi A., Chantarangkul-Misura della proteina S e della resistenza alla proteina C attivata. Risultati della valutazione Esterna di Qualità (VEQ)-CISMEEL –Riv Med Lab – JLM, vol 5, n. 4,2004: 283-288