



**Diagnosi Molecolare di Trombofilia  
Ereditaria mediante Analisi di Mutazione  
dei Geni del Fattore V, Fattore II e MTHFR  
AGT, ACE, Fattore XIII, PAI-1, HPA, HFE,  
Beta Fibrinogeno, ATR-1**

**Relazione Tecnica**

## Sommario

<b>TROMBOFILIA: ASPETTI MOLECOLARI</b> .....	2
FATTORE V variante di Leiden (G1691A) e mutazioni Y1702C, R306T (Cambridge), H1299R .....	3
PROTROMBINA – FATTORE II MUTAZIONE G20210A.....	3
MTHFR – GENE DELLA METILENETETRAIDROFOLATOREDDUTTASI. MUTAZIONI C677T E A1299C .....	4
APOLIPOPROTEINA B (APO B): MUTAZIONE R3500Q.....	5
FATTORE XIII: POLIMORFISMO VAL34LEU (V34L) .....	5
BETA FIBRINOGENO (FGB): POLIMORFISMO -455G-A .....	5
HUMAN PLATELET ALLOANTIGENS (HPA): POLIMORFISMO LEU33PRO .....	6
INIBITORE DELL'ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO DI TIPO 1 (PAI-1): POLIMORFISMO 1 BP DEL/INS 4G/5G .....	6
ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE): POLIMORFISMO I/D .....	6
ANGIOTENSINOGENO (AGT): VARIANTE M235T .....	7
ATR-1 (Recettore dell'angiotensina II) .....	8
<b>ANALISI DELLE MUTAZIONI: TECNOLOGIA UTILIZZATA</b> .....	8
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	9

## TROMBOFILIA: ASPETTI MOLECOLARI

Per trombofilia ereditaria si intendono quelle condizioni predisponenti ad un aumentato rischio di malattia tromboembolica venosa (TEV) e, in alcune condizioni, anche di trombosi arteriosa. Sebbene l'introduzione sistematica di misure di prevenzione del tromboembolismo venoso abbia ridotto negli ultimi anni l'incidenza degli eventi post-operatori, tuttavia rimangono comunque alti l'incidenza totale, la prevalenza e la mortalità per tromboembolismo venoso. Attualmente si stima che l'incidenza nella popolazione occidentale sia di 1 caso su 1000 abitanti all'anno mentre la mortalità nei pazienti con EP si attesta intorno al 15%. Tali eventi si verificano principalmente a causa della natura silente di tale complicanza e alla scarsa specificità nella presentazione clinica. Diventa pertanto di fondamentale importanza la possibilità di individuare i soggetti a rischio definendo le migliori indicazioni per uno screening di popolazione che tengano conto contemporaneamente dell'efficacia dello screening ma anche dei suoi costi e della sua sostenibilità.

Dagli anni '90 sono stati osservati dei difetti genetici definiti polimorfismi predisponenti alla trombosi. Quando è presente una mutazione severa, il fenotipo emergente è fortemente diverso dal wild type e facilmente identificabile. Nella pratica clinica si possono osservare varianti genetiche che esprimono un fenotipo solo leggermente diverso dal normale, tanto da non essere clinicamente riconoscibile. La presenza contemporanea di altre varianti nell'ambito della medesima via metabolica e/o di fattori ambientali può determinare il superamento di una soglia, con la comparsa del fenotipo "malattia". La trombofilia è da considerare come un complesso multifattoriale nel quale interagiscono diverse componenti genetiche e ambientali.

Alcune di queste componenti genetiche polimorfiche sono state identificate e ancora oggi ne vengono descritte diverse e possono essere raggruppate in 3 principali categorie di rischio: alto, moderato e basso.

Un rischio alto è associato ad alcune mutazioni che portano ad un deficit di anticoagulanti naturali (Es. deficit di antitrombina III, proteina C e proteina S) ma sono condizioni estremamente rare nella popolazione generale con una prevalenza dello 0,02-0,5%.

Altre mutazioni, invece, considerate come fattori di rischio moderati, si riscontrano nella popolazione generale con una prevalenza maggiore.

Tra i fattori di rischio moderato troviamo:

## FATTORE V variante di Leiden (G1691A) e mutazioni Y1702C, R306T (Cambridge), H1299R

L'osservazione che alcuni plasmi resistevano all'azione della proteina C attivata (activated protein C resistance, APCr), ha portato alla scoperta del FV Leiden, un fattore V anomalo caratterizzato da resistenza all'inattivazione indotta dalla proteina C attivata. La mutazione causa la sostituzione di un'adenina con una guanina nel nucleotide 1691 del gene del fattore V, che induce la sostituzione di un'arginina con una glicina in posizione 506 della molecola del fattore V (cioè in uno dei tre siti del fattore V che vengono clivati dalla proteina C attivata). Tale fattore V anomalo (definito fattore V Leiden, dalla città dove è stato scoperto) è pertanto in gran parte insensibile all'azione inibitrice della proteina C e costituisce un fattore ad attività protrombotica. **Il fattore V di Leiden ha una prevalenza del 5% nella popolazione generale mentre si riscontra nel 20% dei pazienti con un evento di trombosi venosa e nel 50% dei pazienti con trombofilia familiare.** In Italia la frequenza di portatori della mutazione in eterozigosi è pari al 2-3%, mentre in omozigosi la mutazione ha un'incidenza di 1:5000. I soggetti eterozigoti hanno un rischio 8 volte superiore di sviluppare una trombosi venosa, mentre gli omozigoti hanno un rischio pari ad 80 volte. Tale evento trombotico è favorito in presenza di altre condizioni predisponenti quali la gravidanza, l'assunzione di contraccettivi orali (rischio aumentato di 30 volte negli eterozigoti e di alcune centinaia negli omozigoti), gli interventi chirurgici. In gravidanza una condizione genetica di eterozigosi per il Fattore Leiden è considerata predisponente all'aborto spontaneo, alla eclampsia, ai difetti placentari, alla Sindrome HELLP (emolisi, elevazione enzimi epatici, piastrinopenia). La mutazione del FV di Leiden è associata a trombosi venosa profonda usualmente alle gambe, altri siti sono più insoliti. Le manifestazioni cliniche possono essere influenzate dal numero degli alleli interessati (le mutazioni in omozigosi portano ad un rischio molto maggiore), da altre varianti polimorfiche predisponenti, fattori di trombofilia acquisita come la presenza di anticorpi antifosfolipidi, alti livelli di fattore VIII, neoplasie nonché dalla presenza di fattori circostanziali di rischio: viaggi, cateteri venosi centrali, gravidanza, uso di contraccettivi orali, terapia sostitutiva (HRT) e chirurgia maggiore.

**Oltre che come test di conferma nei casi di test coagulativi alterati, c'è un consenso generale nel raccomandare il test molecolare nei casi di:**

- una TEV senza altre cause ad ogni età ma soprattutto se <50 anni;
- una storia di tromboembolia venosa ricorrente;
- trombosi venosa in siti inusuali (ad esempio, le vene cerebrali, mesenteriche, portale ed epatica);
- una TEV durante la gravidanza o il puerperio;
- una TEV venosa associata all'uso di contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva
- una TEV in un individuo con un familiare di primo grado con TEV prima dell'età di 50 anni

## PROTROMBINA – FATTORE II MUTAZIONE G20210A

La protrombina o fattore II della coagulazione svolge un ruolo fondamentale nella cascata coagulativa in quanto la sua attivazione in trombina porta alla trasformazione del fibrinogeno in fibrina e quindi alla formazione del coagulo. È stata descritta una variante genetica comune nella regione non trascritta al 3' del gene che è associata ad elevati livelli di protrombina nel plasma con conseguente sbilanciamento in senso pro-trombotico. Il polimorfismo in questo caso è una sostituzione di un nucleotide G con una A nella regione 3' non tradotta (20210G>A o c.\*97G>A). In questo caso anche se non c'è cambiamento amminoacidico la mutazione interessa una regione che è sicuramente coinvolta nella regolazione post-trascrizionale e agisce aumentando la stabilità dell'RNA messaggero o con una maggiore efficienza di trascrizione. La trasmissione

è autosomico dominante a penetranza incompleta. L'espressione clinica della trombofilia legata alla mutazione della protrombina è variabile; molti individui eterozigoti o omozigoti per la 20210 G>A non sviluppano mai trombosi mentre alcuni eterozigoti rimangono asintomatici fino all'età adulta e alcuni hanno tromboembolia ricorrente prima dei 30 anni. Il rischio relativo di TVP negli adulti eterozigoti per l'allele 20210 G>A è da 2 a 5 volte aumentato; nei bambini, il rischio relativo di trombosi è di 3-4 volte maggiore.

Nella popolazione generale la frequenza della mutazione 20210G>A è di circa il 2-5% mentre si riscontra nel 5-15% dei pazienti con trombosi venosa profonda.

C'è un generale consenso nel raccomandare l'esecuzione del test nei seguenti casi:

- prima TEV esitata prima dei 50 anni
- una storia di tromboembolia venosa ricorrente
- trombosi venosa in siti inusuali come vene cerebrali, mesenterica, portale o delle vene epatiche
- TEV durante la gravidanza o il puerperio;
- TEV associata con l'uso di contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva
- un primo episodio di TEV a tutte le età in un individuo con un membro di primo grado della famiglia che ha avuto un TEV prima di 50 anni.

Tra i fattori di rischio più bassi:

## MTHFR – GENE DELLA METILENETETRAIDROFOLATOREDUCTASI. MUTAZIONI C677T E A1299C

Questo enzima è uno dei 4 enzimi che intervengono nella trasformazione dell' omocisteina in metionina, reazione che si verifica durante la sintesi del DNA e a cui partecipano la vitamina B12, la vitamina B6 e l'acido folico. Tale reazione impedisce l'aumento della concentrazione plasmatica dell' omocisteina, che se presente ad elevate concentrazioni, determina un grave danno endoteliale, condizione predisponente lo sviluppo di trombosi arteriose. L'omocisteina è un aminoacido solforato, intermedio metabolico del metabolismo della metionina e della cisteina. La conversione dell' omocisteina a metionina (processo di rimetilazione) o la sua conversione a cisteina (transulfurazione) rappresentano le principali vie metaboliche in grado di mantenerne l'omeostasi. Il rilascio controllato nel circolo ematico, d'altra parte, consente di misurarne le concentrazioni plasmatiche, che rappresentano un accurato indice dello stato dell'omocisteina tissutale. Un marcato incremento di questo aminoacido è presente in una malattia genetica autosomica recessiva causata dal deficit dell'enzima Cistationina-beta-sintetasi; le concentrazioni plasmatiche in questo caso sono molto elevate (> 100 µM) tanto da superare la soglia di escrezione renale e causare la presenza di questo aminoacido nelle urine.

Alcuni polimorfismi genetici sono stati descritti in associazione all'iperomocistinemia nel gene MTHFR: c.677C> T, se presente in omozigosi, e in eterozigosi composta con 1298 A>G . Il primo polimorfismo è stato associato alla così detta "variante termolabile" del gene cioè una proteina con attività enzimatica diminuita se esposta al calore. Questo enzima fa parte del ciclo dei folati, cofattori dell' enzima MS (metionina sintetasi) che catalizza la conversione da Omocisteina a Metionina.

Anche se non c'è ancora concordanza tra gli autori su se e quando eseguire il test genetico, bisogna tener presente che:

- è utile sapere se un'iperomocisteinemia può essere dovuta alle modulazioni non genetiche ed essere, quindi, in alcuni casi transitoria, oppure a una predisposizione genetica.
- può essere utile per il clinico, in alcuni casi selezionati, sapere se quel paziente, con una omocisteinemia normale, ha un rischio di sviluppare una iperomocisteinemia nell'arco della vita (correlazione con l'età) a causa della predisposizione genetica.

### APOLIPOPROTEINA B (APO B): MUTAZIONE R3500Q

Le apolipoproteine sono delle proteine appartenenti ai complessi VLDL e LDL (Very Low Density Lipoproteins e Low Density Lipoproteins) e sono responsabili della solubilità dei lipidi nel sangue e del loro riassorbimento nelle cellule. In particolare, l'apolipoproteina B-100 (Apo B-100) è necessaria per la solubilità e il riassorbimento del colesterolo. Il complesso Apo B-100- colesterolo viene riconosciuto dai recettori di membrana LDL e quindi riassorbito nelle cellule. Il gene che codifica l'Apo B-100 è soggetto a polimorfismi di cui, il più frequente (R3500Q), provoca una diminuzione dell'affinità del legame Apo B-100-“recettore LDL di membrana”. L' Apo B-100 mutata resta libera nel sangue, causando un'ipercolesterolemia ed un aumento del rischio di formazione di placche ostruttive. Inoltre la mutazione di questa proteina è un importante fattore di rischio per lo sviluppo dell'arteriosclerosi precoce e delle deficienze coronariche arteriose (coronary artery disease, CAD). È stato dimostrato che il 3.5% dei casi di ipercolesterolemia ha come causa primaria una mutazione sul gene dell'Apo B-100. Questo tipo di mutazione è conosciuta clinicamente anche come Familial Defective apolipoprotein B-100 (FDB). Studi su pazienti con FDB hanno dimostrato che il loro livello di colesterolo è mediamente di 8 mmol/l, mentre il valore normale è minore di 5.2 mmol/l. La mutazione di questo gene, che si trova sul cromosoma 2, provoca nella proteina una sostituzione dell'aminoacido Arginina con una Glutamina in posizione 3500 (R3500Q); questo scambio fra aminoacidi ha come conseguenza un cambiamento della conformazione della struttura terziaria dell' Apo B-100, nella zona di riconoscimento per il recettore LDL. La diminuzione di affinità fra Apo B-100 e recettore LDL può essere superiore al 20% nei pazienti omozigoti. La prevalenza di questa mutazione nella popolazione caucasica varia da 1:700 a 1:500.

### FATTORE XIII: POLIMORFISMO VAL34LEU (V34L)

Uno stato di omozigosi per un particolare polimorfismo del gene del Fattore XIII (F13A1), consistente in transizione G->T a livello dell'esone 2 del gene, con conseguente variazione aminoacidica leucina -> valina a livello del codone 34, che è molto prossimo al sito di attivazione della trombina, è stata associata a un aumento elevato dell'attività di questo enzima. La presenza di tale mutazione in omozigosi, quindi, rappresenterebbe un fattore protettivo contro trombosi venose.

### BETA FIBRINOGENO (FGB): POLIMORFISMO -455G-A

Un polimorfismo presente nella regione promotore del gene del beta Fibrinogeno (FGB), consistente in una transizione G->A in posizione nucleotidica -455, è associato con livelli plasmatici elevati di Fibrinogeno. van't Hooft (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 3063

## HUMAN PLATELET ALLOANTIGENS (HPA): POLIMORFISMO LEU33PRO

La glicoproteina IIIa (GPIIIa) o Human Platelet Alloantigens (HPA), appartiene alla famiglia delle integrine ed è una proteina di membrana, presente sui trombociti. Durante il processo di coagulazione del sangue la GPIIIa, forma un complesso con la subunità GPIIb, viene attivata e si lega al fibrinogeno e al fattore von Willebrand (vWF). Questo meccanismo permette ai trombociti adiacenti di legarsi fra loro per formare un coagulo. La genotipizzazione gene che codifica la GPIIIa, ITGB3, permette di distinguere le due forme alleliche PI(A1) o HPA1a e PI(A2) o HPA1b determinate dal polimorfismo Leu33Pro, consistente in una variazione nucleotidica da T(A1) a C (A2) in posizione 1565, esone 2 del gene ITGB3, con conseguente variazione aminoacidica Leu->Pro a livello del codone 33.

La variante PIA2 da origine a una proteina che presenta una conformazione diversa rispetto alla proteina non mutata (wild-type). Questo cambiamento della struttura della proteina, ha come conseguenza un aumento dell'affinità fra il fibrinogeno e la GPIIIa predisponendo ad un incremento del rischio di formazione di trombi. È stato pure dimostrato che questo polimorfismo è associato ad un aumentato rischio di contrarre determinate patologie cardiache, come l'infarto del miocardio, eventi coronarici acuti e trombosi coronariche. Recenti studi mostrano come vi sia un'interferenza dell'allele mutato (PIA2 o HPA1b) sulla GPIIIa con alcuni medicinali sia agonisti che antagonisti della GPIIIa. In particolare le piastrine di individui portatori dell'allele mutato PIA2 o HPA1b risultano meno inibite dall'anticorpo monoclonale Abciximab (ReoPro®) con una conseguente aggregazione piastrinica aumentata. Questo porta ad una variabilità interindividuale nella funzione piastrinica, considerata un fattore predittivo indipendente per il rischio di effetti secondari maggiori dopo Percutaneous Coronary Intervention.

In terapia con Aspirina, i portatori della mutazione PIA2 o HPA1b necessitano di un dosaggio di 10 volte inferiore rispetto agli individui normali (wild-type). La mutazione (PIA2 o HPA1b) ha una prevalenza del 15% in Europa e raggiunge valori del 25% negli Stati Uniti.

## INIBITORE DELL'ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO DI TIPO 1 (PAI-1): POLIMORFISMO 1 BP DEL/INS 4G/5G

L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) rappresenta il principale inibitore del processo di attivazione del plasminogeno nel sangue. È noto che esso contribuisce alla formazione del trombo e, conseguentemente, all'insorgenza e allo sviluppo di patologie cardiovascolari sia acute che croniche. I livelli plasmatici di PAI-1 sono regolati geneticamente ma, soprattutto, sono correlati ad una serie di fattori di rischio per l'aterosclerosi quali, ipertrigliceridemia, diabete, ed insulino-resistenza.

A livello della regione promotore del gene PAI-1 è presente un polimorfismo del tipo inserzione/delezione di una G (4G/5G). Alcuni studi hanno dimostrato che il genotipo 4G/4G è associato a livelli plasmatici elevati di PAI-1, con conseguente rischio di malattie coronariche, e nelle donne in gravidanza aumentato rischio di preeclampsia.

## ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE): POLIMORFISMO I/D

L'enzima Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) gioca un ruolo chiave nella regolazione del tono dei vasi sanguigni, trasformando l'Angiotensina I nel potente vasocostrittore Angiotensina II e inattivando il vasodilatatore bradichinina. A livello dell'introne 16 del gene ACE è presente un polimorfismo del tipo Inserzione/Delezione (I/D). Tale polimorfismo è dovuto alla presenza (allele I - Insertion) o assenza (allele D-Deletion) di una sequenza ripetuta Alu di 287 bp, e può produrre tre differenti genotipi:

II = Inserzione in omozigosi

ID = Eterozigosi per Inserzione/Delezione DD = Delezione in omozigosi.

Differenti studi hanno dimostrato come pazienti con genotipo DD avessero una concentrazione doppia dell'enzima rispetto ai pazienti con genotipo II. Inoltre è stato dimostrato che l'allele D ha una frequenza molto più alta nei pazienti con malattie coronariche come infarti, stenosi coronaria e ipertrofia ventricolare sinistra rispetto ai gruppi di controllo. Inoltre il rischio dovuto alla forma DD è indipendente dai rischi classici come ipertonia, iperlipidemia, diabete e fumo.

La concentrazione dell'ACE nel plasma viene determinata principalmente nei sospetti di sarcoidosi (Morbus Besnier, Boeck e Schaumann) dove il tasso è elevato. Si è pure consigliato di correlare la concentrazione dell'enzima con il genotipo del paziente (che è associato a concentrazioni diverse dell'enzima), per poter determinare degli intervalli di riferimento genotipo-specifici. I valori normali sono definiti così in maniera più stringente e di conseguenza la sensibilità diagnostica della concentrazione plasmatica dell'ACE per la sarcoidosi aumenta notevolmente.

## ANGIOTENSINOGENO (AGT): VARIANTE M235T

Il gene AGT controlla la produzione di angiotensinogeno, una proteina che svolge un ruolo determinante nel sistema renina-angiotensina (RAS), sistema questo che regola la pressione arteriosa e quindi la funzionalità cardiaca. In alcune persone il RAS è iperattivo, provocando quindi problemi al cuore e pressione arteriosa alta. L'alterazione (mutazione) di una regione specifica del gene AGT è associata ad un elevato rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari e di alcune forme di ipertensione.

Il gene AGT, in una determinata regione, presenta due varianti (polimorfismo), denominate T ed M. Quando è presente la variante T, l'aminoacido metionina è sostituito dall'aminoacido treonina nella posizione 235 del polipeptide angiotensinogeno, da cui la designazione M235T. Poiché ciascun individuo eredita una copia del gene da ciascun genitore, egli potrà presentare due copie della variante T (individuo T/T omozigote); una copia di ciascuna delle due varianti (individuo T/M eterozigote); oppure due copie della variante M (individuo M/M omozigote).

La forma T235 del gene (cioè la presenza dell'aminoacido treonina a posto dell'aminoacido metionina in posizione 235) è associata con un incremento del rischio di patologie a carico delle arterie cardiache e con alcune forme di ipertensione.

Il test molecolare assume un'importanza fondamentale nella diagnosi precoce delle CVD. Il polimorfismo T235, in particolare, si è rivelato un importante fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiache e di alcune forme di ipertensione.

Diversi studi hanno, infatti, dimostrato che il rischio in pazienti che presentano una forma alterata del gene AGT (genotipo T/T) hanno un rischio circa 3 volte maggiore di sviluppare patologie cardiovascolari, quali coronopatie, infarti miocardici, arteriosclerosi e cardiomiopatie ipertrofiche, rispetto ai pazienti con gene normale. Il test molecolare, inoltre, identifica i soggetti che presentano una forma di ipertensione sodio-sensibile (pazienti con genotipo T/T). Questi pazienti possono quindi trarre notevoli benefici dall'applicazione



di una strategia terapeutica che riduce l'apporto di sodio nella dieta, raggiungendo una significativa diminuzione della pressione arteriosa senza la necessità di ricorrere ad una terapia farmacologica.

L'analisi del gene AGT può inoltre aiutare i medici ad individuare una adeguata terapia da adottare prevedendo la risposta dei pazienti ai trattamenti terapeutici con agenti antiipertensivi. Nei pazienti che presentano un genotipo T/T e T/M, a differenza di quelli con genotipo M/M, si osserva, infatti, un'evidente riduzione della pressione del sangue, sia sistolica che diastolica, in risposta all'uso di ACE -inibitori (Angiotensin Converting Enzyme).

### ATR-1 (Recettore dell'angiotensina II)

ATR-t insieme ad AGT e ACE è coinvolto nel sistema renina-angiotensina aldosterone e quindi nella regolazione della pressione sanguigna. Il ruolo di ATR-1 e quello di mediare l'attività dell'angiotensina II, e per tale motivo è stato ampiamente studiato. In particolare, il polimorfismo Al I 66C ( variante C), rispetto alla condizione normale (variante A), è stato più volte associato all'ipertensione. L'interazione tra ATR-1 ed ACE determina l'insorgenza di implicazioni cliniche. Infatti, è stato dimostrato che in condizione di eterozigosi dei geni ATR-1 (eterozigote NC) e ACE (eterozigote 1/0), essi interagiscono sinergicamente aumentando il rischio di infarto miocardico che incrementa ulteriormente quando i polimorfismi sono presenti in omozigosi (ATR-1: CIC e ACE: D/D). Riassumendo: genotipo A/A: stato normale: genotipo A/C: condizione di rischio; genotipo CIC: rischio più elevato.

## ANALISI DELLE MUTAZIONI: TECNOLOGIA UTILIZZATA

Per la ricerca delle mutazioni descritte si esegue inizialmente una reazione enzimatica di amplificazione del DNA, conosciuta come Polymerase Chain Reaction (PCR), che consente di amplificare *in vitro* una specifica regione della molecola, copiandola in varie fasi successive, fino ad ottenerne milioni di copie.

Successivamente i prodotti di PCR così ottenuti vengono sottoposti ad analisi di sequenza automatizzata mediante l'impiego di un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente. L'analisi di mutazione viene effettuata mediante analisi comparativa tra le sequenze ottenute per il campione in esame e le sequenze di riferimento dei geni investigati, depositate nel database internazionale GeneBank.

Attualmente la tecnica di sequenziamento Sanger rappresenta il GOLD STANDARD in campo diagnostico per la ricerca di mutazioni perché è l'unica tecnica che consente di rilevare mutazioni con un'accuratezza maggiore dell'99,99%. Sebbene sia possibile rilevare mutazioni anche con altre tecniche (Utilizzo di sonde fluorescenti, analisi delle curve di melting, Next generation sequencing, ...) tuttavia il metodo Sanger rimane l'unico metodo con le più elevate sensibilità e specificità tanto da dover essere utilizzato a supporto e riconferma delle mutazioni rilevate con gli altri metodi.

L'accuratezza del sequenziamento Sanger, inoltre, può essere monitorata attraverso la valutazione del Quality Value che è un'espressione della probabilità di errore di una sequenza e che può essere impostato in maniera tale da ridurre la probabilità di errore a meno dello 0,01%.

L'analisi genetica dei fattori predisponenti alla trombofilia, rispetto ai test coagulativi funzionali, ha il vantaggio di non risentire delle alterazioni che si verificano in modo aspecifico durante la fase acuta di un

evento trombotico, durante la terapia anticoagulante, durante la fase acuta di altre patologie, durante la terapia estroprogestinica, in gravidanza e in presenza di epatopatie.

Lo screening genetico permette quindi di ottenere un risultato e un'indicazione diagnostica che non risentono di interferenze dovute a terapie o fasi acute di patologie o dell'evento trombotico stesso, azzerando quindi la necessità della ripetizione degli esami con un conseguente risparmio sui costi.

## BIBLIOGRAFIA

F. R. ROSENDAAL and P. H. REITSMA: Genetics of venous thrombosis ; Article first published online: 13 JUL 2009; DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03394.x Journal of thrombosis and haemostasis

Bertina RM, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994;369:64-67

De Stefano V, Finaggi G, Mannucci PM: Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes and management. Blood 1996;87:3531-44

Björn Dahlbäck : Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders; Blood 2008; 112(1):19-27

Italo Antonozzi e Elio Gulletta: Medicina di Laboratorio – Logica & Patologia Clinica; 2015, by Piccin Nuova Libreria SpA

Josè Manuel Soria, BSc, PhD et al.: Multilocus Genetic Risk Scores for Venous Thromboembolism Risk Assessment; Journal of the American Heart Association DOI: 10.1161/JAHA.114.001060

Svetlana Madjunkova,<sup>1</sup> Marija Volk,<sup>2</sup> Borut Peterlin,<sup>2</sup> and Dijana Plaseska-Karanfilska: Detection of Thrombophilic Mutations Related to Spontaneous Abortions by a Multiplex SNaPshot Method; GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS Volume 16, Number 4, 2012

Mark A. Crowther, MD; and John G. Kelton, MD: Congenital Thrombophilic States Associated with Venous Thrombosis: A Qualitative Overview and Proposed Classification System; Ann Intern Med. 2003;138(2):128-134.

Pagina | 10

Frits R. Rosendaal et al.: Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behavior; ASH Education Book January 1, 2005 vol. 2005 no. 1 1-12

S.Testa et al.: Gli screening per trombofilia ; JLM Vol 5 N 2,2004

Gomes MP, Deitcher SR: Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review, in Arch. Intern. Med., vol. 164, n° 18, ottobre 2004, pp. 1965–76,

Simpson EL, Stevenson MD, Rawdin A, Papaioannou D,:

Thrombophilia testing in people with venous thromboembolism: systematic review and cost-effectiveness analysis, in Health Technol. Assess., vol. 13, n° 2, gennaio 2009, pp. iii, ix–x, 1–91, DOI:10.3310/hta13020, PMID 19080721.