

Interpretazione degli esami relativi all'emostasi in corso di gravidanza

Benedetto Morelli¹, Barbara Montaruli², Claudia Bellini³, Alessia Bertelli⁴, Mariarosa Carta⁵, Paola Calzoni⁶, Paolo Fassina⁷, Paola Pradella⁸, Angela Rogolino⁹

¹Synlab Italia, Sezione Ematologia, Castenedolo, Brescia

²UOC Laboratorio Analisi, AO Ordine Mauriziano, Torino

³Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale Misericordia Grosseto, AUSL Toscana Sudest, Grosseto

⁴Dipartimento Di Medicina Sperimentale E Clinica, Malattie Aterotrombotiche, AOU Careggi, Firenze

⁵Medicina Di Laboratorio, AuLSS 8 Berica, Vicenza

⁶Uos Coagulazione, AOU Senese, Siena

⁷Servizio Di Medicina Di Laboratorio, Ulss 7 Pedemontana

⁸Laboratorio Di Patologia Dell'emostasi, Dipartimento Di Medicina Trasfusionale, Ospedale di Cattinara, Trieste

⁹SOD Malattie Aterotrombotiche, Dipartimento Cardiotoracovascolare, AOU Careggi, Firenze

ABSTRACT

Interpretation of hemostasis tests during physiological pregnancy

Pregnancy is associated with significant modifications of the hemostatic system (endothelium, platelets, coagulation and fibrinolysis) resulting in a prothrombotic state. This is mainly due to an increase in the activity of some procoagulant factors and to the decrease of some physiological inhibitors. The plasma concentrations of these hemostatic system components therefore show important modifications during the three trimesters of pregnancy; as a consequence, the clinical laboratory should report specific reference intervals for the three trimesters of pregnancy or at least add a comment to the laboratory report. The screening tests (although very differently) are also influenced by this hypercoagulability condition and therefore also for PT, APTT, fibrinogen, antithrombin and D-dimer, different reference intervals for the three trimesters of pregnancy should be considered. Global tests have been used (viscoelastometric techniques and thrombin generation test) for monitoring the hemostatic imbalance that occurs during pregnancy; these techniques are very promising but, except for the use of viscoelastometry in monitoring *post-partum* hemorrhagic risk, they are still far from clinical practice.

Keywords: gravidanza, emostasi, medicina di laboratorio

INTRODUZIONE

L'emostasi è un sistema in costante e delicato equilibrio dinamico tra il sistema della coagulazione e il sistema della fibrinolisi: nel corso della gravidanza normale compaiono significative variazioni di tutte le componenti del sistema emostatico (endotelio, piastrine, coagulazione, fibrinolisi) (Figura 1). In particolare, durante la gravidanza normale, si riscontra un aumento dell'attività della maggior parte dei fattori procoagulanti, una diminuzione dell'attività di alcuni inibitori fisiologici ed una diminuzione dell'attività fibrinolitica, che determinano nel loro insieme una condizione di ipercoagulabilità (1-4). Questa condizione, legata soprattutto a cambiamenti ormonali, protegge la donna dall'emorragia fatale durante il parto ma, nello stesso tempo, la espone al rischio

di manifestazioni tromboemboliche. La condizione di ipercoagulabilità è più marcata intorno al termine della gravidanza e nell'immediato periodo *post-partum*. Tuttavia, anche se molto più raramente, possono verificarsi complicanze emorragiche lungo tutto il decorso della gravidanza, durante il parto o nel periodo *post-partum*. Le modificazioni nel sistema della coagulazione nel corso di una gravidanza normale sono coerenti con un continuo processo di basso grado di attivazione della coagulazione plasmatica, che genera uno stato di coagulazione intravascolare disseminata (CID) di lieve entità (5). Tutti i cambiamenti che si verificano nel sistema emostatico durante la gravidanza fisiologica possono comportare variazioni significative dei valori di riferimento degli esami di indagine del sistema coagulativo, a partire dai test di screening sino alla determinazione della attività o della

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, 1 Synlab Italia, Sezione Ematologia, Via Beato Lodovico Pavoni, 18 Castenedolo (BS), Email: benemorelli47@gmail.com

Ricevuto: 05.04.2022

Revisionato: 28.04.2022

Accettato: 17.05.2022

Publicato on-line: 07.06.2022

DOI: 10.19186/BC_2022.039

concentrazione dei vari componenti dell'emostasi: ciò rende necessaria una approfondita conoscenza dei valori degli esami di primo e di secondo livello relativi all'emostasi durante la gravidanza fisiologica e soprattutto una stretta interazione tra laboratorio e clinica per una corretta interpretazione di questi parametri quando determinati durante il periodo gestazionale e nel *post-partum* (6-10).

In questa rassegna verranno esaminati innanzitutto gli esami di screening, che rappresentano non solo gli esami più frequentemente richiesti in corso di gravidanza [conta piastrinica, tempo di protrombina (PT), tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), fibrinogeno, D-dimero ed antitrombina], ma anche la determinazione dei fattori procoagulanti e degli inibitori fisiologici. Saranno descritti, infine altri esami specificamente utilizzati per le indagini sul sistema emostatico durante la gravidanza.

PIASTRINE

Uno degli esami più frequentemente richiesti in corso di gravidanza è rappresentato dall'emocromo, che include vari parametri, tra cui le piastrine che rappresentano una delle quattro componenti del sistema emostatico. Molti studi sono stati pubblicati sulla conta piastrinica in gravidanza, incluse le gravidanze gemellari (11-16); tra gli studi più recenti e più importanti riveste un ruolo rilevante la metanalisi di Reese et al. (17) che ha analizzato i risultati di 3 039 studi sulle variazioni della conta piastrinica in gravidanza e nel periodo *post-partum*. I valori medi ricavabili dalla metanalisi sono: 251 x 10⁹/L ([intervallo di confidenza al 95% (IC95%): 238-264] nel primo trimestre; 238 x 10⁹/L (IC95%: 222-253) nel secondo trimestre; 224 x 10⁹/L (IC95%: 213-235) nel terzo trimestre; 237 x 10⁹/L (IC95%: 209-264) al momento del parto; 247 x 10⁹/L (IC95%: 207-287) tra la 4^a e l'8^a settimana

dopo il parto. Il valore medio all'interno dei 5 periodi presi in considerazione tende gradualmente a diminuire rispetto ad un valore medio al di fuori della gravidanza di 275 x 10⁹/L (i.r.150-400) sino al terzo trimestre per poi risalire dal momento del parto ed ulteriormente aumentare tra la 4^a e l'8^a settimana dopo il parto. Degli 11 studi longitudinali (le stesse donne monitorate nei diversi periodi della gravidanza) presi in esame nella metanalisi, 7 riportavano una diminuzione della conta piastrinica, gli altri 4 non osservavano variazioni.

La maggior parte degli studi pubblicati sino ad ora suggerisce una lieve diminuzione della conta piastrinica già a partire dal primo trimestre di gravidanza; in effetti, il riscontro di una lieve piastrinopenia è la seconda complicanza più comune della gravidanza dopo l'anemia. Al momento del parto, solo il 9,9% delle donne con gravidanza senza complicanze presenta piastrinopenia, cioè un conteggio piastrinico <150 x 10⁹/L (18-19). La piastrinopenia può presentarsi in forma isolata e spesso clinicamente benigna o associata a disordini sistemici, sia specifici della gravidanza [preeclampsia, Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets syndrome (HELLP)] che non specifici [microangiopatie trombotiche, Lupus Eritematoso Sistemico (LES), CID, Sindrome da Anticorpi Antifosfolipidi (APS), infezioni virali].

La forma più comune è la piastrinopenia gestazionale o incidentale, forma benigna con valori piastrinici solitamente non <100 x 10⁹/L, che va differenziata dalla porpora trombocitopenica immune e dalla fisiologica e modesta riduzione del conteggio piastrinico che si verifica con maggiore frequenza nel terzo trimestre di gravidanza. Valori <100 x 10⁹/L si possono riscontrare nell'1% di gravidanze senza complicanze; ancora più rari sono i conteggi piastrinici <80 x 10⁹/L (0,1%).

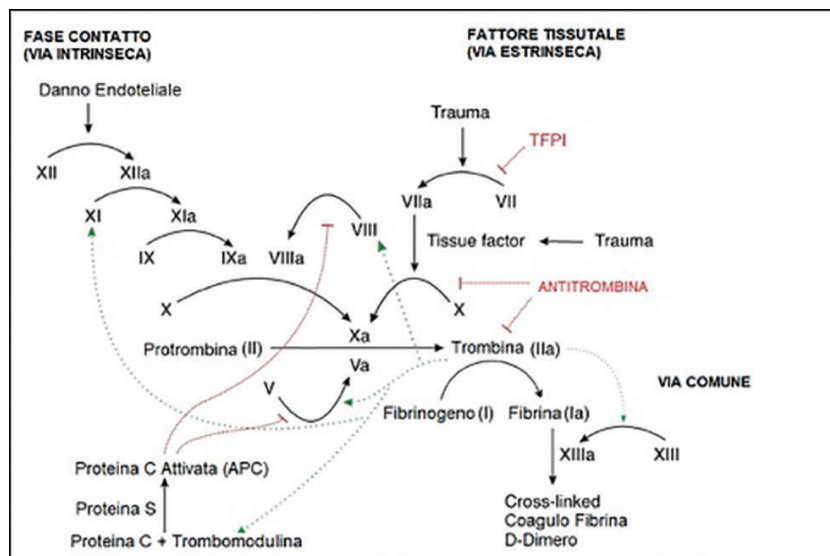


Figura 1
 Meccanismi di formazione della fibrina e sua dissoluzione.
 TFPI, Tissue Factor Pathway Inhibitor

In estrema sintesi, la conta piastrinica tende a diminuire nel corso delle gravidanze fisiologiche, a partire dal primo trimestre e la diminuzione si accentua nel terzo trimestre per l'aumento della emodiluizione fisiologica della gravidanza. Solo raramente le piastrine scendono al di sotto delle $150 \times 10^9/L$ (~10%) e ancora più eccezionalmente al di sotto delle $100 \times 10^9/L$ (<1%); in entrambi i casi è opportuno un monitoraggio più frequente ed un approfondimento diagnostico (20-22).

TEMPO DI PROTROMBINA E TEMPO DI TROMBOPLASTINA PARZIALE ATTIVATO

PT e APTT, gli esami di screening della coagulazione, sono esami globali deputati all'esplorazione della fase coagulativa dell'emostasi ed utili a identificare eventuali difetti dell'emostasi in soggetti asintomatici che debbano essere sottoposti ad intervento chirurgico, o a stabilire quale è la fase della coagulazione responsabile del difetto nei pazienti che hanno una storia emorragica (23,24).

Il PT è definito come il tempo, espresso in secondi, necessario affinché un'aliquota di plasma povero di piastrine, coaguli in seguito all'aggiunta di un estratto tissutale di origine umana o animale (tromboplastina) e ioni calcio a 37°C; esso si allunga in caso di carenza del fattore della via estrinseca (VII), di carenza dei fattori della via comune (X, V, II) e di carenza di fibrinogeno. È fondamentale per valutare la sintesi epatica dei fattori della coagulazione ed i deficit di vitamina K; è utilizzato per monitorare la terapia anticoagulante orale condotta con antagonisti della vitamina K (AVK) e può essere prolungato in corso di terapia con anticoagulanti orali diretti (DOAC) (23,24).

L'APTT è definito come il tempo, espresso in secondi, necessario affinché un'aliquota di plasma povero di piastrine coaguli in seguito all'aggiunta di un attivatore della fase di contatto (caolino, acido ellagico, silice), di fosfolipidi in funzione di sostituto piastrinico e di ioni calcio a 37°C; esso si allunga in caso di carenza dei fattori della via intrinseca (VIII, IX, XI e XII) e della via comune (II, V, X) e di carenza dei fattori della fase di contatto (precallicreina e chininogeno ad alto peso molecolare); il deficit di quest'ultimi non si associa a problemi emorragici. L'APTT viene utilizzato per monitorare la terapia con eparina non frazionata ed il suo allungamento può essere provocato, oltre che da una carenza di uno o più fattori della via intrinseca, anche dalla presenza in circolo di anticorpi antifosfolipidi (APL), tipo Lupus Anticoagulant (LA) o in corso di terapia anticoagulante con AVK e DOAC (23,24).

Il PT e l'APTT sono misurati in secondi e sono comparati ad un intervallo di riferimento che riflette i valori riscontrati negli individui sani. Poiché i reagenti usati per effettuare entrambi gli esami variano in funzione del sistema reagente-strumento e del lotto dei reagenti in uso, gli intervalli di riferimento possono variare non solo da laboratorio a laboratorio, ma anche all'interno dello stesso laboratorio, quindi, per armonizzare l'espressione

dei risultati, viene raccomandato per il PT e per l'APTT l'uso del rapporto (25); nel caso di pazienti in trattamento con AVK è raccomandato esprimere il risultato del PT in INR (International Normalized Ratio) in sostituzione del rapporto¹.

Durante la gravidanza si verificano importanti modificazioni del sistema coagulativo: come già detto, la gravidanza è infatti correlata ad uno stato di ipercoagulabilità, dovuto ai fisiologici cambiamenti ormonali che determinano l'aumento dei livelli plasmatici della maggior parte dei fattori procoagulanti (6,7,10). Tali aumenti evolvono nei diversi trimestri della gravidanza e si traducono in un accorciamento, anche se di modesta entità, di entrambi gli esami globali PT ed APTT (26).

Gli intervalli di riferimento dei secondi e della ratio del PT si accorciano progressivamente nei tre trimestri della gravidanza fisiologica, gli intervalli del secondo e terzo trimestre in maniera maggiore rispetto al primo trimestre (9,27-30).

Anche gli intervalli di riferimento dei secondi e del rapporto dell'APTT si accorciano progressivamente nei tre trimestri della gravidanza, anche se in maniera più contenuta nel secondo e terzo trimestre (9,27-30).

I valori di riferimento per trimestre di gravidanza di PT ed APTT, espressi in ratio, ricavati dalla letteratura e riportati nella Tabella 1, forniscono solo una indicazione generale ma comunque costituiscono una modalità di espressione dei risultati più appropriata rispetto all'utilizzo dei secondi, in quanto i tempi di coagulazione dei due esami di screening sono reagente e strumento specifici (9,26-30).

FIBRINOGENO E TEMPO DI TROMBINA

Il fibrinogeno è una globulina con PM di 340 kD, sintetizzata negli epatociti e presente nel plasma con un intervallo di riferimento tra 2,0 e 4,5 g/L.

La molecola è trascritta da 3 geni *FGB*, *FGA* e *FGG* situati in una regione di ~50 kb del cromosoma 4 (31); ogni gene è trascritto singolarmente. I tre polipeptidi sintetizzati (α , β e γ) sono poi assemblati nel reticolo endoplasmatico; a questa fase seguono modifiche post-traslazionali a livello dell'apparato di Golgi che danno origine alla molecola matura. La molecola di fibrinogeno viene rilasciata in circolo e presenta una emivita di 120 ore.

Il fibrinogeno è una proteina che gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento di una normale emostasi: è il precursore solubile della fibrina ed inoltre fornisce un supporto per la generazione della trombina e per l'aggregazione piastrinica. Le patologie in grado di modificare il fibrinogeno possono essere acquisite o ereditarie.

I disordini ereditari del fibrinogeno sono rari e possono essere suddivisi in disordini di tipo quantitativo (Tipo I) e disordini di tipo qualitativo (Tipo II). I disordini di Tipo I (afibrinogenemia ed ipofibrinogenemia) modificano la quantità di fibrinogeno in circolo, i livelli circolanti

¹Il rapporto è il calcolo tra il tempo impiegato a coagulare del campione del paziente e il tempo di coagulazione dell'NPP (Normal Pool Plasma); l'INR è il rapporto elevato all'ISI (International Sensitivity Index), cioè al valore che esprime la sensibilità della tromboplastina in uso rispetto all'IRP (International Reference Preparation).

Tabella 1
Principali modifiche dei parametri dell'emostasi in gravidanza, suddivisi per trimestre.

Parametro (unità di misura)	Valori di riferimento (non in gravidanza)	Modifiche globali in gravidanza	I Trimestre 4-15 settimane	Modifiche	II trimestre 16-24 settimane	Modifiche	III trimestre 25 settimane termine	Modifiche
Piastrine (x 10 ⁹ /L)	150-400	= ↓	149-363	=	145-331	=	134-314	= ↓
PT (rapporto)	0,80-1,20	↓	0,77-1,15	↓	0,79-1,12	↓	0,77-1,05	↓
APTT (rapporto)	0,80-1,20	↓	0,88-1,14	↓	0,77-1,14	↓	0,78-1,15	↓
Tempo di trombina (rapporto)	0,91-1,19	= ↓	0,88-1,12	= ↓	0,79-1,17	= ↓	0,83-1,15	= ↓
Fibrinogeno (g/L)	2,00-4,50	↑	3,14-4,43	↑	3,68-5,14	↑	4,18-6,36	↑
D-dimero (µg/L FEU)	<500	↑↑	200-900	↑	200-1500	↑↑	400-2800	↑↑↑
Antitrombina	85-125	= ↓	73-124	= ↓	71-122	= ↓	68-117	= ↓
Proteina C (cromogenica)	70-130	= ↑	77-153	= ↑	78-162	= ↑	76-162	=
Proteina S (libera, antigene)	50-134	↓	30-166	↓	28-88	↓	28-87	↓
APCR Classica (rapporto)	>2,3	= ↓	2,33-3,45	=	2,18-3,30	=	2,02-3,30	↓
APCR Modificata (rapporto)	>2,0	=	2,39-2,87	=	2,35-2,83	=	2,36-2,88	=
Fattore II (% o IU/dL)	64-132	= ↑	76-127	=	80-178	= ↑	76-210	= ↑
Fattore V (% o IU/dL)	66-126	=	49-143	=	52-131	=	49-131	=
Fattore VII (% o IU/dL)	61-157	↑	42-439	↑	84-600	↑	77-600	↑
Fattore VIII (% o IU/dL)	58-184	↑	53-335	↑	92-392	↑	126-436	↑
Fattore IX (% o IU/dL)	69-157	↑	71-196	↑	79-199	↑	84-226	↑
Fattore X (% o IU/dL)	74-149	= ↑	66-148	=	75-168	= ↑	62-244	= ↑
Fattore XI (% o IU/dL)	67-169	= ↓ ↑	45-217	= ↓ ↑	57-184	= ↓ ↑	62-207	= ↓ ↑
Fattore XII (% o IU/dL)	64-196	= ↑	58-300	= ↑	73-267	= ↑	52-314	= ↑
Fattore XIII (% o IU/dL)	59-185	↓	54-170	↓	44-148	↓	41-125	↓
vWF:Ag (% o IU/dL)	46-146	↑	71-226	↑	99-303	↑	121-405	↑
vWF:RICOF (% o IU/dL)	48-173	↑	82-125	↑	70-178	↑	75-167	↑
ADAMTS13 attività (% o IU/dL)	36-150	↓	30-116	↓	28-88	↓	28-87	↓

PT, Tempo di Protrombina; APTT, Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato; APCR, Resistenza alla Proteina C Attivata; vWF:Ag, fattore di von Willebrand antigene, WF:RICOF, fattore di von Willebrand Cofattore Ristocetinico; ADAMTS13, A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13.

sono ridotti (<1,5 g/L) o assenti. I disordini di Tipo II (disfibrinogenemia ed ipodisfibrinogenemia) influenzano la qualità del fibrinogeno circolante (32).

I difetti acquisiti del fibrinogeno possono presentarsi a causa di una coagulopatia da consumo, ad esempio CID, in concomitanza di un trauma maggiore (coagulopatia indotta da trauma), di una malattia epatica o neoplastica ed in seguito a complicanze ostetriche (33).

Il fibrinogeno è inoltre una proteina di fase acuta che aumenta in corso di infiammazione e/o infezione.

La gravidanza rappresenta invece, una condizione fisiologica che determina un aumento dei livelli di fibrinogeno, essendo associata a cambiamenti significativi nell'emostasi, necessari sia per lo sviluppo placentare sia per affrontare lo sforzo emostatico del parto.

Durante la gravidanza si assiste infatti ad un significativo e progressivo aumento della concentrazione del fibrinogeno, che parte da valori di circa 3 g/L del primo trimestre fino ad arrivare a valori di circa 6 g/L del terzo trimestre, ritornando poi a livelli di normalità nel *post-partum* (10). Questo andamento dei valori del fibrinogeno in gravidanza è ormai documentato da numerosi autori in diversi studi condotti su numerosità variabile di popolazione (10,29,30,34,35).

Pertanto, nel caso si rilevi un aumento del fibrinogeno in gravidanza, il clinico non deve richiedere ulteriori approfondimenti in quanto questo si colloca all'interno dello stato di ipercoagulabilità fisiologica del periodo gestazionale. Sarebbe dunque auspicabile che i laboratori introducessero nei referti i valori plasmatici del fibrinogeno suddivisi per trimestri di gravidanza. È invece importante valutare bassi livelli di fibrinogeno in quanto è stato documentato che un valore basso di fibrinogeno registrato nella 35°-37° settimana potrebbe essere un predittore indipendente di emorragia *post-partum* (PPH) (36).

Sono invece minori le evidenze delle variazioni a carico del Tempo di Trombina (TT) in gravidanza.

Il tempo di trombina valuta quella parte del processo emostatico in cui il fibrinogeno solubile si trasforma in filamenti di fibrina: è quindi influenzato dal livello e/o dalla funzionalità del fibrinogeno (ipofibrinogenemia e disfibrinogenemia) e dalla presenza di inibitori diretti della trombina (eparina, irudina e prodotti di degradazione del fibrinogeno).

Durante la gravidanza fisiologica si assiste ad una lieve, ma non sempre significativa, diminuzione dei secondi del tempo di trombina. Tuttavia, la scarsità dei dati presenti in letteratura che hanno valutato il TT durante la gravidanza, rende difficile una corretta interpretazione delle sue variazioni, per cui la sua determinazione non ha rilievo nella pratica clinica (29,37-40).

I valori di riferimento del fibrinogeno e del TT inseriti nella Tabella I, forniscono solo una indicazione generale: ogni laboratorio, a seconda della strumentazione e del metodo utilizzato, dovrebbe calcolare i propri valori di riferimento suddivisi in trimestri di gravidanza.

D-DIMERO

Con il termine D-dimero ci si riferisce ai frammenti polipeptidici derivati dalla degradazione della fibrina ad opera della plasmina (41). La loro presenza nel sangue riflette quindi l'attivazione sia della coagulazione che della fibrinolisi.

Durante la gravidanza fisiologica si instaura uno stato di ipercoagulabilità (42) e l'andamento del D-dimero riflette proprio questo aspetto: la sua concentrazione nel plasma materno aumenta progressivamente dalle prime settimane di gravidanza fino al parto (43) per poi scendere nei primi tre giorni dopo il parto e ritornare ai valori pre-gravidanza entro le 6 settimane dal parto (44).

Sono disponibili diversi studi mirati alla definizione degli intervalli di riferimento suddivisi per epoca gestazionale. Tralasciando esperienze interessanti ma condotte su un esiguo numero di partecipanti (45-47) oppure relative ad intervalli di gravidanza diversi dalla suddivisione classica nei tre trimestri (48), un interessante approccio è la valutazione longitudinale delle gestanti nel corso della gravidanza (9,49).

In particolare, lo studio di Hedengran et al. (49) ha coinvolto un importante numero di soggetti con gravidanza fisiologica, con prelievi seriati dal primo trimestre di gravidanza fino ai primi giorni dopo il parto (non tutte le pazienti hanno eseguito tutti i prelievi previsti, ma la numerosità dei campioni era comunque elevata in tutti i trimestri di gravidanza). I valori di riferimento dei tre trimestri sono stati calcolati considerando i percentili 2,5th e 97,5th della distribuzione dei dati, con intervallo di confidenza del 90% (IC90%); il dato relativo al limite inferiore dei primi due intervalli è legato al limite di misura dello strumento utilizzato. I valori ottenuti (espressi come µg/L FEU) nei tre trimestri sono risultati compresi tra 200 (IC90%: 200-200) e 900 (IC90%: 800-900) nel primo trimestre, tra 200 (IC90%: I) e 1 500 (IC90%: 1 400-1 600) nel secondo trimestre (IC90%: 200-200), tra 400 (IC90%: 400-500) e 2 800 (IC90% 2 600-3 100) nel terzo trimestre; le donne esaminate nei tre trimestri sono state rispettivamente 222, 1412 e 971 (49).

Tali risultati sono simili a quanto ottenuto anche nello studio di Szecsi et al. (9), simile al precedente sia per numerosità che per metodologia, ed in linea anche con altri studi basati su casistiche numerose, ma con metodologia di tipo trasversale (gestanti arruolate per un unico prelievo in diversi momenti della gravidanza) (50-52).

Tuttavia, al momento, come sottolinea anche Bourjelly G (51), più che l'intervallo di riferimento è necessario validare dei valori soglia decisionali, per consentire l'utilizzo del D-dimero durante la gravidanza nell'esclusione del tromboembolismo venoso (TEV).

Infatti, il ruolo del D-dimero al di fuori della gravidanza riguarda l'esclusione di trombosi venosa profonda (TVP) ed embolia polmonare (EP) nell'ambito di algoritmi decisionali, in associazione alla probabilità clinica pre-test, valutata con alcuni score clinici, e all'utilizzo di tecniche diagnostiche per immagini (ultrasonografia doppler per TVP, angiografia polmonare o scintigrafia polmonare con

ventilazione/perfusione TAC per EP) (52,53).

Il descritto incremento fisiologico del D-dimero durante la gravidanza determina secondo alcuni autori (54) l'impossibilità di utilizzare questo parametro per escludere il TEV: in particolare Hedengran, et al. (49) evidenziano come il D-dimero sia al di sopra del valore decisionale di 500 µg/L FEU comunemente utilizzato nei vari algoritmi diagnostici, nel 25% delle donne nel primo trimestre di gravidanza e nel 100% delle donne nell'ultimo trimestre.

Per questo motivo molte Linee Guida non raccomandano l'utilizzo del D-dimero nelle donne in gravidanza (55), ma l'European Society of Cardiology (ESC), sulla base di due importanti studi (56,57), riconosce invece un ruolo del D-dimero nell'escludere la diagnosi di EP nelle pazienti a basso rischio clinico di TEV (58).

Quindi il D-dimero potrebbe avere un ruolo nella gestione delle donne in gravidanza con sospetto TEV (59), ma sono necessari ulteriori studi per identificare e validare specifici valori decisionali.

FATTORI DELLA COAGULAZIONE

Tra i fattori della coagulazione, il fattore von Willebrand (vWF) gioca un ruolo fondamentale sia nell'emostasi primaria, in quanto promuove da un lato l'adesione delle piastrine alle pareti danneggiate del vaso sanguigno e fa da ponte tra una piastrina e l'altra, sia nell'emostasi secondaria, in quanto lega il fattore VIII della coagulazione proteggendolo dalla degradazione enzimatica. La carenza di questa proteina determina la malattia emorragica congenita più frequente (malattia di Willebrand), nella quale sono coinvolte sia l'emostasi primaria (endotelio e piastrine) che la coagulazione plasmatica. Il vWF consiste in una serie eterogenea di multimeri composti da subunità glicoproteiche, collegate tra loro da legami disolfuro; il vWF viene secreto come multimero di grandi dimensioni e viene poi scisso a livello del dominio A2 dalla metalloproteasi ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13). Il vWF è una glicoproteina multifunzionale con diversi domini contenenti vari siti di legame correlati a diverse attività funzionali; pertanto, a differenza della diagnostica di altre carenze fattoriali, è necessario più di un esame per valutare tutte le funzioni del vWF. La diagnostica della malattia di Willebrand è basata anche sulla determinazione delle due proprietà fondamentali del vWF, la sua concentrazione immunologica espressa come vWF:Ag e l'attività funzionale, espressa anche come vWF:RCo per la sua capacità di agglutinare in presenza dell'antibiotico ristocetina. Entrambi i parametri vWF:Ag e vWF:RCo aumentano nel corso della gravidanza (4,5,7,60-64); il vWF antigene aumenta nei tre trimestri in misura maggiore rispetto al vWF:RCo (63,64). Anche la valutazione della funzionalità piastrinica determinata attraverso l'utilizzo del PFA200 (Platelet Function Analyzer) è fortemente inficiata dal progressivo incremento del vWF determinando dei Closure Time (CT) significativamente più corti.

L'enzima responsabile del taglio proteolitico dei

multimeri ultra-larghi del vWF è l'ADAMTS13, una metalloproteasi in grado di eliminare i multimeri insolitamente grandi del vWF che, altrimenti, potrebbero innescare la formazione di trombi piastrinici. La concentrazione dell'ADAMTS13 (ADAMTS13 antigene) e la sua attività (ADAMTS13 attività) diminuiscono in maniera progressiva durante tutta la gravidanza (30,63,64).

I cambiamenti dei livelli di vWF (vWF:Ag e vWF:Rco) e dei livelli di ADAMTS13 attività che si osservano in corso di gravidanza, suddivisi per trimestre, sono riportati nella Tabella 1.

Oltre al vWF sono coinvolti nella formazione del coagulo numerosi altri fattori (dal fibrinogeno al FXIII): durante la gravidanza si osservano cambiamenti fisiologici che determinano un aumento della concentrazione della maggior parte di questi fattori (6,30).

Il fattore XIII, fattore deputato alla stabilizzazione della fibrina mediante la formazione di legami covalenti, secondo quanto descritto in letteratura già nei primi anni '80, aumenta la sua concentrazione nel primo trimestre di gravidanza, per attestarsi su valori simili ai valori normali delle donne non gravide nel terzo trimestre (5,65). Pubblicazioni più recenti, invece, riportano una diminuzione significativa del fattore XIII in tutti e tre i trimestri della gravidanza (30,66).

Il fattore V della coagulazione è stabile durante tutta la gravidanza e gli intervalli misurati per trimestre sono sovrapponibili ai valori di riferimento della non gravidanza (4,9,30,67-69).

I fattori II e X sono stabili durante il primo trimestre della gravidanza con intervalli per trimestre sovrapponibili ai valori riscontrati nelle donne non gravide; nel secondo e terzo trimestre, aumentano la loro concentrazione secondo alcuni lavori della letteratura (3,9,12,16), mentre si mantengono stabili, secondo altri (9,68).

I fattori della coagulazione VII, VIII, e IX aumentano tutti progressivamente il loro livello di concentrazione nei tre trimestri della gravidanza fisiologica, anche se l'aumento del fattore IX è più contenuto rispetto all'aumento dei fattori VII e VIII (4,9,30,50,60,67-69). Il fattore VII aumenta gradualmente in gravidanza e può arrivare nell'ultimo trimestre a misurare 10 volte i valori di riferimento delle non gravide (60). Il fattore VIII aumenta in maniera progressiva nel corso della gravidanza con aumenti nei primi due trimestri che vanno in parallelo agli aumenti del suo carrier, il vWF:Ag; nell'ultimo trimestre i valori di fattore VIII e del vWF:Ag divergono: si osserva un aumento maggiore del fattore vWF rispetto al fattore VIII: questo determina un raddoppio dei valori del rapporto vWF:Ag/fattore VIII, che passa da 1 nei primi due trimestri a circa 2 nel terzo trimestre (60).

Il fattore della coagulazione XII secondo la maggior parte dei dati riportati in letteratura, aumenta in maniera progressiva in tutti e tre i trimestri della gravidanza fisiologica (4,30,66,69), secondo altri dati invece, la sua concentrazione è stabile durante tutta la gravidanza e gli intervalli misurati per trimestre sono sovrapponibili ai valori di riferimento delle non gravide (9).

Anche i dati riguardanti il fattore XI, sono contrastanti; secondo alcuni lavori della letteratura la sua

concentrazione diminuisce nel corso della gravidanza raggiungendo una concentrazione al termine gravidanza intorno al 60-70% (2,4,70): Secondo dati della letteratura più recenti, i livelli di fattore XI rimangono stabili durante tutta la gravidanza fisiologica o aumentano in maniera contenuta (3,9,30,68,69).

Alla luce di quanto sopra esposto, non è appropriato richiedere la determinazione di fattori procoagulanti nel corso della gravidanza, perché molti di questi fattori aumentano in maniera significativa e quindi possono mascherare eventuali carenze borderline; per una corretta definizione del livello dei fattori procoagulanti è opportuno attendere almeno due mesi dopo l'espletamento del parto.

I cambiamenti dei livelli dei fattori della coagulazione in corso di gravidanza, suddivisi per trimestre, sono riportati nella Tabella 1.

ANTITROMBINA

L'antitrombina (AT) è il più potente anticoagulante naturale (29) ed è una serino-proteasi di 432 aminoacidi prodotta nel fegato che inibisce principalmente il fattore IIa (trombina) e il FXa, ma anche i fattori VIIa, IXa, XIa, XIIa, callicreina e plasmina (71). Il deficit ereditario di antitrombina comporta uno stato di ipercoagulabilità con un rischio di TEV aumentato da 5 a 50 volte. La carenza ereditaria a trasmissione autosomica dominante ha un'incidenza di 0,02-0,17% nella popolazione generale e tra 1 e 5% nei pazienti con TEV. Il primo episodio trombotico compare in genere tra i 10 e i 50 anni ed il rischio di trombosi dovuto al deficit di AT è più alto rispetto ai deficit di PC o di PS e molto più alto rispetto alla presenza del Fattore V Leiden o della mutazione G20210A del Fattore II (72). Anche livelli moderatamente bassi di AT sono stati associati ad un incremento del rischio di TEV ricorrente da 1,6 a 3,7 volte a seconda del valore soglia utilizzato (AT <87% o <70%) (73).

Il deficit può essere quantitativo (tipo I) o qualitativo (tipo II). In quest'ultimo caso viene prodotta una variante proteica con attività ridotta. I due principali metodi di determinazione dell'AT misurano o l'attività (esame funzionale) o la quantità della proteina (determinazione immunologica dell'antigene); solo i primi metodi devono essere utilizzati nella pratica clinica in quanto sono gli unici metodi in grado di mettere in evidenza la presenza di deficit quantitativi e qualitativi (72). I valori di riferimento negli adulti variano solitamente tra 80 e 120%, dove il 100% corrisponde all'attività antitrombinica di una unità di AT in 1 mL di plasma di riferimento, anche se si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca il proprio intervallo di riferimento. Nel deficit congenito del soggetto eterozigote i livelli sono generalmente compresi tra il 40 e il 70%, comportando un aumento del rischio di TEV ricorrente (73); ricordiamo che la condizione omozigote non è compatibile con la vita, tranne che per il tipo I HBS (Heparin Bindng Site), estremamente raro, nel quale le manifestazioni trombotiche possono essere anche di tipo arterioso.

Nel deficit di tipo I si riscontra una riduzione consensuale dell'AT misurata sia con il metodo funzionale che col metodo immunologico. Poiché nel deficit di tipo

qualitativo (tipo II) la misura con metodo immunologico può risultare normale, l'esame raccomandato per lo studio della carenza di AT è in prima istanza il metodo cromogenico (funzionale) dell'attività antitrombinica, con eparina e preferibilmente con un tempo di incubazione breve (30 secondi). Il metodo cromogenico può essere anti-Xa oppure anti-IIa a seconda che venga aggiunto al plasma del paziente, insieme all'eparina, un eccesso di fattore Xa o di trombina in grado di clivare un substrato, rilasciando un composto cromogenico. La lettura spettrofotometrica dell'entità del cambiamento di assorbanza, in genere a 405 nm, è inversamente proporzionale all'attività della AT presente nel campione. Le Linee Guida della International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) suggeriscono in prima battuta l'utilizzo del metodo anti-Xa (72) e il corretto uso della denominazione dell'esame: AT e non ATIII, dal momento che delle 6 molecole di antitrombina presenti in natura solo la ATIII è associata ad importanti funzioni fisiopatologiche; quindi, nei referti deve sempre comparire la corretta denominazione antitrombina (AT).

Se viene riscontrato un livello di attività inferiore rispetto al valore di riferimento è necessario escludere prima di tutto una carenza di origine acquisita attribuibile a recente trombosi, chirurgia, CID, insufficiente funzione epatica, terapia estroprogestinica, proteinuria. Utile in questi casi è valutare altri esami come l'APTT e il PT, che possono aiutare a supportare l'eziologia acquisita e/o a verificare l'idoneità del campione: se accorciati, possono essere un'eventuale spia di un plasma parzialmente coagulato. Inoltre, la normalità di PC e PS è generalmente più indicativa per deficit ereditario di AT e suggerisce un approfondimento con saggio immunologico, mentre PC e PS sono più spesso carenti nei deficit secondari di AT. Nella determinazione della AT inoltre deve essere esclusa la presenza nel campione di farmaci anticoagulanti interferenti. Si ricorda in particolare che il Dabigatran comporta valori falsamente elevati con il metodo anti-IIa, mentre gli Xabani, viceversa, producono lo stesso effetto con il metodo anti-Xa; pertanto, in questi casi un deficit potrebbe risultare mascherato (72).

La gravidanza costituisce una particolare situazione in cui vi è un aumento generale del rischio di TEV. L'AT gioca un ruolo importante nell'eventuale sviluppo di TEV in gravidanza, in quanto il deficit ereditario di AT comporta un aumento del rischio che è stato quantificato in modo variabile in vari studi (74,75), ma è almeno del 3% (76), che è un rischio considerevolmente più alto rispetto al rischio legato alla sola gravidanza che si aggira tra lo 0,1 e lo 0,2% (78). Si osservano risultati apparentemente discordanti in letteratura riguardo all'andamento dell'attività antitrombinica durante la gravidanza. Alcuni studi concludono che i livelli di AT non sono modificati durante la gravidanza (6,9,10,30,69,78-82), mentre altri studi indicano una diminuzione dell'AT (29,50,83). Tuttavia, questi ultimi in realtà evidenziano una significativa ma modesta diminuzione dei livelli di AT che tende a diminuire nel corso della gravidanza fino al parto. Inoltre, sebbene questi recenti lavori siano focalizzati sullo studio delle variazioni fisiologiche degli intervalli di riferimento nei parametri dell'emostasi in

gravidanza, hanno un disegno non longitudinale e si basano solo sulla popolazione cinese, sottolineando la necessità di studi multicentrici più ampi che includano donne di differente origine geografica (74).

Pertanto, come evidenziato da uno studio longitudinale condotto sulla popolazione caucasica (9) e confermato anche da uno studio comparativo (74) e da uno studio longitudinale condotto in Svezia (84), i livelli di AT in gravidanza, al parto e nel *post-partum* risultano solo leggermente più bassi rispetto all'intervallo di riferimento nella donna non gravida (Tabella 1) Tale diminuzione non supera il 20% in gravidanza e il 30% al parto, che è il momento a maggior rischio di emorragia (74). Solo un piccolo numero di donne ha raggiunto concentrazioni inferiori al 50% in uno studio danese (9). Tali diminuzioni possono essere attribuite maggiormente all'emodiluzione della gravidanza, anche se nello studio di James, et al. (74) si ipotizza che la diminuzione al momento del parto sia legata ad un consumo di AT compatibile con un processo trombotico nella pelvi e che altri possibili meccanismi implicati siano una ridotta produzione o una aumentata perdita urinaria. Tuttavia, lo stesso studio sottolinea che nella maggioranza dei casi i valori di AT sono rimasti all'interno degli intervalli di riferimento (74). Infatti, l'AT è più bassa nella preeclampsia e nella sindrome HELLP rispetto alla gravidanza fisiologica, con valori medi che si aggirano tra il 60 e l'85% (85).

PROTEINA C E PROTEINA S

I sistemi anticoagulanti naturali sono meccanismi atti a regolare la generazione di trombina a protezione dagli eventi tromboembolici. Il sistema della PC rappresenta il più importante sistema anticoagulante naturale dopo l'antitrombina; di questo sistema fanno parte, oltre alla PC stessa, la PS e la trombomodulina. La PC e la PS sono prodotte nel fegato (78).

La PC è rilasciata in circolo in forma inattiva ma, in seguito al legame della trombina al suo recettore trombomodulina sulle cellule endoteliali, è attivata in proteina C attivata (APC). Con la PS come cofattore, la APC assume la capacità di degradare proteoliticamente i fattori VIIIa e Va, rispettivamente nel complesso tenasico e nel complesso protrombinasico, rallentando le reazioni della coagulazione plasmatica e spegnendo di fatto la produzione di trombina. La PS in circolo è presente per circa il 60% associata alla proteina che lega la frazione C4b del complemento e per la restante parte in forma libera, che è in grado di complessarsi con la APC e di favorirne l'azione (78,86). La riduzione o il rallentamento dell'inibizione del processo coagulativo è in grado di provocare un aumento della formazione di trombina e determinare quindi uno stato di ipercoagulabilità. Questa situazione può essere associata a fattori ereditari, quali la mutazione "gain-of-function" del FV Leiden nella Resistenza alla PC attivata (APCR), oppure a deficit congeniti di PC e PS. Un analogo effetto può essere prodotto da cause acquisite che determinano l'aumento dei fattori procoagulanti e la diminuzione degli anticoagulanti, come accade in corso di gravidanza (5,10), a causa dei cambiamenti ormonali fisiologici.

La letteratura fornisce informazioni spesso contrastanti per quanto riguarda l'andamento di questi parametri durante la gestazione. In alcuni articoli si riporta che la PC rimane pressoché invariata, a differenza della PS (6,9,60,68); altri autori, invece, affermano che la PC incrementa già durante i primi 2 trimestri (30,50,87), anche se il valore medio rimane entro i limiti di riferimento fino a fine gestazione (50). Il motivo di questo eventuale incremento non è chiaro, anche se si è ipotizzato che serva a bilanciare la concomitante riduzione della PS, che la maggior parte degli autori riconoscono fin dalle prime settimane e che diventa via via più marcata nei trimestri successivi (9, 30,50,62,69). Secondo altri studi, invece, tutti gli anticoagulanti naturali sono destinati a diminuire progressivamente dal primo al terzo trimestre (29). La variabilità di questi parametri durante la gravidanza suggerisce una cauta valutazione dei risultati degli esami di laboratorio, soprattutto se le determinazioni sono eseguite per la prima volta durante la gestazione in assenza di risultati precedenti. Sarebbe opportuno quindi che gli intervalli di riferimento sui referti fossero diversificati in base ai trimestri di gravidanza e fossero adattati alla realtà locale. In ogni caso anche gli intervalli di riferimento al di fuori della gravidanza devono essere accuratamente determinati ed espressi diversamente almeno per uomini e donne, dal momento che è stato dimostrato che le concentrazioni plasmatiche delle proteine anticoagulanti naturali variano non solo in funzione di età, sesso e stato ormonale (88,89), ma sono anche legate a fattori ambientali, quali l'etnia e la provenienza geografica (50). In ogni caso il metodo consigliato per la determinazione della PC durante lo screening trombofilico è il metodo cromogenico, che risulta specifico e poco soggetto a interferenze, anche se non è in grado di identificare alcune varianti rare (90). Ricordiamo che i metodi coagulativi per la determinazione della PC sono in grado di rilevare la presenza di tutte e tre i difetti (tipo 1, tipo 2A e di tipo 2B), ma non sono consigliati dalle Linee Guida del Scientific and Standardization Committee della ISTH in quanto risentono fortemente di alcune limitazioni (90). I metodi basati sull'APTT possono produrre valori falsamente diminuiti a causa degli elevati livelli del FVIII presenti nel plasma delle donne in gravidanza; anche la presenza di APCR, dovuta principalmente alla presenza della mutazione FV Leiden, può determinare risultati falsamente diminuiti di PC. Al contrario, i metodi basati sul dilute Russell Viper Venom Time (dRVVT) non vengono influenzati dagli alti livelli del FVIII perché il veleno attivo direttamente il FX e sono solo in minima parte inficiati dalla presenza del FV Leiden. Infine, la presenza di LAC può determinare allungamenti dei tempi di coagulazione per l'effetto anticoagulante prodotto dall'anticoagulante lupico, in misura diversa a seconda della composizione fosfolipidica dei reagenti utilizzati. Riassumendo, con gli esami cromogenici le interferenze sono poche e sono limitate a campioni attivati o alla presenza di Hemolysis, Icterus, Lipemia (HIL) nel campione; molto più numerose sono le cause interferenti sulle determinazioni con metodi coagulativi (oltre a campioni attivati ed HIL, presenza di DOAC, di alte dosi di eparina non frazionata o eparina a basso peso molecolare, alti livelli di FVIII, presenza di

LAC, presenza di APCR, soprattutto legata alla presenza della mutazione FV Leiden).

Per la determinazione della PS sono consigliati invece i saggi immunologici, soprattutto quelli basati sul dosaggio della frazione PS libera, cioè la forma attiva, e che rappresentano quindi un surrogato dell'esame funzionale. Come per la PC, anche per quanto riguarda la PS, i metodi funzionali coagulativi sono ritenuti in grado di identificare sia varianti quantitative che qualitative, ma sono soggetti a interferenze di vario tipo, risultando quindi scarsamente specifici (91). Anche in questo caso è opportuno ricordare che entrambi i metodi (immunologici e funzionali) risentono della variabilità preanalitica (campioni attivati e/o presenza di HIL); le metodiche coagulative sono significativamente inficiate dalla presenza di elevati livelli del FVIII, di LAC, del FV Leiden, di inibitori diretti della trombina e del FXa, di eparina (se nei reagenti utilizzati non sono presenti dei prodotti neutralizzanti),

RESISTENZA ALLA PROTEINA C ATTIVATA

La resistenza all'effetto della APCR è il fenomeno per cui in un soggetto si sviluppa la incapacità della proteina C di inattivare uno o entrambi i suoi substrati, cioè le forme attivate dei fattori V e VIII (FVa e FVIIIa). Ciò determina una diminuzione della efficacia del sistema inibitorio della PC e causa un aumento della generazione di trombina, producendo in tal modo una condizione di ipercoagulabilità che può sfociare in una manifestazione di TEV (92). Nella maggior parte dei soggetti, la APCR è dovuta alla presenza del FV Leiden, provocata da una mutazione puntiforme nel gene del FV, che comporta la sostituzione di un residuo amminoacidico in posizione 506 all'interno del sito di taglio della molecola (93). Il FVa che ne deriva è particolarmente resistente alla degradazione da parte della APC, mantenendo quindi efficiente il processo coagulativo e producendo un aumento della generazione di trombina. Sono state identificate altre mutazioni a carico del FV coinvolte nella APCR, ma sono decisamente molto più rare (94). La APCR ereditaria è stata identificata come un fattore di rischio significativo per trombosi venosa (95,96), perdita fetale tardiva (97) e preeclampsia (98).

Negli ultimi anni, è stato riconosciuto il potenziale significato della resistenza che si verifica in assenza di mutazioni note del gene del fattore V: a questo fenomeno è stato dato il nome di APCR acquisita.

Il metodo originale per la ricerca della APCR basato sulla esecuzione di due APTT eseguiti su plasma non diluito (con e senza aggiunta di PC attivata) (92), è soggetto a numerose interferenze per cui è stata successivamente proposta una modifica che ha migliorato la sensibilità e la specificità dell'esame per la ricerca della mutazione Leiden mediante la diluizione del campione con un plasma carente di FV. Il metodo originale di Dahlback (metodo classico) ha scarsa sensibilità per la mutazione Leiden (tra il 50 e l'86% secondo quanto riportato in letteratura) in quanto è influenzato da carenze fattoriali, da attività della PS libera <30%, dallo stato gravidico, da elevati livelli di FVIII, dalla assunzione di estrogeni, da terapie

anticoagulanti diretti contro il FIIa e il FXa. Al contrario, i metodi (modificati) che, prevedono la prediluizione del campione con plasma depleto di FV hanno sensibilità e specificità vicine al 100% ma sono insensibili alla maggior parte delle forme di APCR acquisite. Un altro approccio metodologico per la ricerca della APCR prevede l'attivazione diretta del FXa con il veleno di vipera Russell utilizzato nel dRVVT: anche in questo caso sono utilizzati esami che prevedono o escludono la prediluizione con plasma depleto di FV, determinando valori di sensibilità e specificità paragonabili a quelli ottenuti con l'APTT (99).

Nel corso della gravidanza, l'APCR eseguita con entrambi i metodi (APTT e dRVVT), con e senza prediluizione con plasma depleto di FV, presenta valori medi progressivamente decrescenti dal primo trimestre sino al termine della gravidanza per poi normalizzarsi una settimana dopo il parto (100). Gli intervalli di riferimento non differiscono invece rispetto ai valori pre-gravidanza ad eccezione dei valori determinati con l'esame classico nel terzo trimestre.

Alla luce di quanto sopra esposto si consiglia durante la gravidanza la ricerca della mutazione Leiden con metodo di biologia molecolare in analogia alla ricerca della mutazione G20210A del Fattore II; la ricerca della APCR, eseguita con entrambi i metodi sopra descritti, produce valori inferiori all'intervallo di riferimento non facilmente interpretabili.

ALTRI PARAMETRI DI STUDIO DELL'EMOSTASI

Altri parametri di studio dell'emostasi sono stati utilizzati nel corso della gravidanza normale, tra questi alcuni marcatori di attivazione della coagulazione come il frammento protrombinico 1+2 (F1+2) e i complessi trombina-antitrombina (TAT), il test di generazione della trombina (TGT) e le tecniche di viscoelastometria, cioè la tromboelastografia (TEG) e la tromboelastometria rotazionale (ROTEM). Tutti gli studi che hanno indagato l'F1+2 nel corso delle gravidanze normali hanno evidenziato valori significativamente aumentati rispetto ai valori antecedenti la gravidanza, con valori crescenti dal primo al terzo trimestre. Uno degli articoli più interessanti in merito a questo parametro è quello di Bremme, et al. (6) nel quale viene fatta la distinzione in 6 periodi, 4 all'interno della gravidanza (tra la 10^a e la 15^a settimana, tra la 23^a e la 25^a, tra la 32^a e la 35^a, tra la 38^a e la 40^a), e due nel *post-partum* (1 settimana dopo, 8 settimane dopo). I valori che sono stati riscontrati nei 6 periodi suindicati sono stati rispettivamente: [nmol/L; media (DS)] 0,97(0,38); 1,63 (0,58); 2,57 (0,82); 3,14 (1,24); 2,51 (1,71); 0,84 (0,24). Ad eccezione dell'ultimo periodo preso in considerazione (8 settimane dopo il parto), tutti i periodi sono caratterizzati da valori significativamente più alti rispetto all'intervallo di riferimento (al di fuori della gravidanza i valori dell'F1+2 sono compresi tra 0,44 e 1,1 nmol/L). In un lavoro più recente di Tang, et al. (101) è stata eseguita una metanalisi sui valori ottenuti da 6 studi, con un totale di 667 donne in gravidanza normale. All'inizio della gravidanza il valore medio dell'F1+2 è risultato 1,49 nmol/L (IC95%: 1,19-1,80), leggermente più alto rispetto ai valori antecedenti la gravidanza (1,19

nmol/L; IC95%: 0,95-1,32). I livelli dell'F1+2 aumentano col progredire della gravidanza, raggiungono un picco tra la 29^a e la 36^a settimana con un valore medio di 3,05 nmol/L (IC95%: 2,41-3,70) e quindi gradualmente diminuiscono verso la fine della gravidanza; i livelli dell'F1+2 si assestano infine su valori simili a quelli pre-gravidanza verso la 18^a settimana dopo il parto (valore medio 1,92 nmol/L; IC95%: 0,58-3,27). In un altro lavoro di Joly et al. (102) è stata eseguita la ricerca dell'F1+2 nei tre trimestri e i valori ottenuti (espressi in questo contesto in pM) (102) sono stati rispettivamente [media (DS)]: 206 (50), 422 (146) e 576 (162) a dimostrazione di una progressiva crescente attivazione della coagulazione, con un $p < 0,0001$ nel confronto tra i tre trimestri. Anche i complessi TAT sono stati oggetto di alcuni studi ed anch'essi mostrano un aumento progressivo della loro concentrazione nel corso di gravidanze non complicate. Nel lavoro di Bremme KA (6) sono riportati valori di TAT ($\mu\text{g/L}$, media (DS)): 3,1 (1,4); 5,9 (2,6); 7,1 (2,4); 8,2 (2,5); 1,9 (0,5); 2,1 (0,7), $< 2,7$ rispettivamente nei seguenti periodi: tra la 12^a e la 15^a settimana, alla 24^a, alla 35^a, al momento del parto, 5 settimane dopo il parto, dopo allattamento, al di fuori della gravidanza. Joly et al. (102) hanno misurato i complessi TAT su 101 donne in gravidanze non complicate ed hanno riscontrato nel corso dei tre trimestri i seguenti valori ($\mu\text{g/L}$, media (DS)): 4,13 (1,05); 6,79 (1,65); 8,19 (1,39) con un $p < 0,0001$ rispetto ai valori pre-gravidanza. In un lavoro di Bombeli et al. (103) sono stati misurati i TAT nel corso della gravidanza di 261 donne suddivise in due gruppi: donne a basso ed alto rischio per eventi tromboembolici per storia personale o familiare di trombosi e presenza di una condizione trombofilica ereditaria o acquisita. Non è stata riscontrata differenza nei valori di TAT (e di D-dimero) tra il gruppo a basso rischio e quello ad alto rischio. Solo nelle donne che hanno sviluppato trombosi durante la gravidanza si sono riscontrati valori significativamente più elevati di TAT e di D-dimero, indipendentemente dalla profilassi eparinica. Molte donne a basso rischio clinico avevano valori di TAT e D-dimero elevati, e viceversa molte donne a rischio clinico molto alto presentavano valori di TAT e di D-dimero normali.

La TEG e la ROTEM sono tecniche di viscoelastometria utilizzate prevalentemente in modalità POCT che utilizzano campioni di sangue intero per valutare la coagulazione e la fibrinolisi. Questi dispositivi vengono ampiamente utilizzati in cardiocirurgia, mentre il loro utilizzo in ostetricia ha al momento limitate prove solide a sostegno del loro uso. Le perplessità verso il loro uso routinario in ostetricia possono essere dovute all'attuale mancanza di studi randomizzati controllati e di ampi studi osservazionali. In una recente metanalisi di Amgalan et al. (104) sono stati inclusi 93 studi, espletati dal 1989 al 2020, che hanno arruolato un totale di 32817 partecipanti. Sessantadue (66,7%) di questi studi hanno utilizzato TEG e 31 (33,3%) hanno utilizzato ROTEM. Ad oggi, ci sono solo due studi randomizzati controllati sull'uso di TEG/ROTEM in ostetricia. ROTEM può essere utilizzato per guidare la terapia trasfusionale nella PPH. TEG e ROTEM possono rilevare la condizione di ipercoagulabilità associata alla gravidanza. La variabilità tra protocolli di

studio e risultati suggerisce la necessità di futuri ampi studi prospettici di alta qualità con protocolli armonizzati per studiare l'utilità di TEG/ROTEM nella valutazione del rischio di trombosi ed emorragia, nonché nel guidare la profilassi e il trattamento delle pazienti gravide. Dall'articolo sopra citato emerge la considerazione che la viscoelastometria può essere utilizzata soprattutto per il monitoraggio della PPH, mentre il suo potenziale utilizzo nella gestione delle condizioni di ipercoagulabilità è relativamente poco studiato. Sulla base di questo studio, l'uso della viscoelastometria dovrebbe essere indirizzato al monitoraggio della terapia trasfusionale in ostetricia e alla identificazione delle pazienti a rischio di grave emorragia. Sono necessari ulteriori studi, idealmente ampi studi clinici multicentrici controllati, per ampliare l'applicabilità di TEG/ROTEM in ostetricia, convalidare approcci guidati da TEG/ROTEM, progettare protocolli ospedalieri e determinare i loro effetti sui risultati clinici per ridurre morbilità e mortalità in ostetricia. I parametri che si possono evincere dai tracciati elaborati dal TEG e dal ROTEM sono molteplici: R (Reaction time), K (Kinetics), α (angolo), MA (Maximum Amplitude), Ly30 e Ly60 (% di lisi del coagulo a 30' e a 60') per il TEG; CT (Clotting Time), CFT (Clot Formation Time), α , MCF (Maximum Clot Firmness), CL30 e CL60 per il ROTEM correlati rispettivamente al tempo di coagulazione, alla cinetica del coagulo, all'angolo alfa, alla forza del coagulo, alla percentuale di lisi del coagulo a 30' e a 60'. Numerosi sono i test che vengono eseguiti su entrambi gli strumenti; attraverso l'uso delle metodiche viscoelastometriche si possono avere informazioni sulla via estrinseca e sulla via intrinseca della coagulazione, sull'effetto della terapia eparinica, sulla efficienza del sistema fibrinolitico, sulla funzionalità piastrinica e sulla efficacia di alcuni agenti antiaggreganti. Nel lavoro di Della Rocca et al. (105) è stata messa in evidenza una differenza significativa ($p < 0,001$) nella maggior parte dei parametri del tracciato tromboelastografico tra donne gravide e donne non gravide: [media (DS)] R= 6,1 (1,8); K = 1,4 (0,5); $\alpha = 70,6$ (6,5); MA = 71 (3,8); (in gravidanza); R = 7,8 (2,5); K = 2,7 (2,3); $\alpha = 57,7$ (11,6); MA = 61 (5,9) (non gravidanza). Anche con il ROTEM si ottengono nelle donne in gravidanza valori diversi da quelli ottenuti al di fuori della gravidanza con significatività statistica maggiore per l'MCF e per il CFT, con differenze ancora più marcate nel secondo e nel terzo trimestre di gravidanza, che si protraggono sino alla terza settimana dopo il parto (106-108).

Il test di generazione della trombina (TGT) è un metodo introdotto da Hemker et al. (109) già diversi anni fa per valutare l'efficienza globale del sistema emostatico in diverse condizioni fisiologiche, para-fisiologiche e patologiche nel corso delle quali si possono instaurare condizioni di ipercoagulabilità o di ipocoagulabilità. La coagulazione del sangue intero, indotta da diversi agenti scatenanti (fattore tissutale, fosfolipidi, trombomodulina, a diverse concentrazioni) e con l'ausilio di substrati fluorogenici viene monitorata nel tempo permettendo di elaborare un tracciato (trombogramma) caratterizzato da alcuni parametri: Lag time, che è il tempo necessario affinché inizi la formazione di trombina, il Peak height

che rappresenta la massima concentrazione di trombina, il Time to peak, cioè il tempo necessario per raggiungere il picco di trombina, il Velocity index, cioè la pendenza della parte iniziale della curva che riflette la velocità con cui viene generata la trombina, l'ETP (Potenziale Endogeno di Trombina) o area sotto la curva che riflette la quantità totale di trombina generata e lo Start tail, cioè il tempo necessario affinché la generazione di trombina scenda a zero. Questo test è stato utilizzato anche nelle donne in gravidanza ed ha messo in evidenza variazioni significative di alcuni parametri, in particolare dell'ETP e del Velocity index a dimostrazione di uno stato di ipercoagulabilità che si manifesta anche in maniera precoce, cioè sin dal primo trimestre e persiste, senza variazioni significative, sino al puerperio (110-113).

CONCLUSIONI

Dai dati esposti nella rassegna si può constatare che molti parametri del sistema emostatico vanno incontro a variazioni nel corso della gravidanza; alcune di queste variazioni sono significativamente importanti, altre lo sono meno, altri parametri ancora non risentono in maniera significativa della gravidanza. Tra gli esami di screening il parametro che varia in maniera più importante durante la gravidanza è sicuramente il D-dimero, per il quale ancora oggi si è alla ricerca di un valore decisionale da utilizzare per la diagnosi di esclusione di complicanze tromboemboliche venose; anche per il fibrinogeno vi è un incremento progressivo della sua concentrazione sin dal primo trimestre; variazioni minori si registrano invece per il PT, l'APTT e l'antitrombina.

Tra gli esami di approfondimento diagnostico per la valutazione del rischio emorragico (determinazione dei fattori procoagulanti) è la valutazione del FVIII quella che presenta le variazioni più importanti; anche il vWF, determinato sia con metodica immunologica (vWF:Ag) che funzionale (vWF:RCo), aumenta in maniera importante, seguito dal FVII e dal FIX; lievi aumenti o minime variazioni si hanno a carico del FII, FXI e FXII; solo il FXIII diminuisce.

L'aumento significativo del FVIII condiziona fortemente e rende quindi non correttamente interpretabili i test basati sull'APTT che risentono in maniera importante dei livelli del FVIII; di conseguenza la ricerca dei LAC con test basati sull'APTT o APTT modificati può risultare falsamente negativa ed anche la ricerca della APCR con metodo APTT può fornire risultati falsamente positivi.

Anche la misura degli inibitori fisiologici (PC e PS) in gravidanza può portare a conclusioni errate, come ad esempio falsa positività, cioè condizione di trombofilia, in donne con valori di PS <50% o a falsa negatività (assenza di condizione trombofilica) quando la misura della PC viene eseguita nel terzo trimestre di gravidanza.

Sulla base dei dati presentati in questa rassegna si suggerisce:

- in caso di sospetta trombofilia primaria, eseguire gli esami per la trombofilia (AT, PC, PS, APCR, APL) prima della gravidanza o, in alternativa, eseguirli a distanza di almeno due mesi dal parto;
- le Linee Guida delle Società di Ostetricia-Ginecologia

e le Società nel campo dell'Emostasi (SISSET ed ISTH) nelle donne con anamnesi negativa per complicanze trombotiche e gravidanza fisiologica non suggeriscono l'esecuzione di nessun esame di indagine dell'emostasi con l'eccezione dell'emocromo (in occasione della prima visita, a partire dalla 7^a settimana e da ripetere tra la 35^a e la 37^a settimana) e della misura del fibrinogeno anch'esso tra la 35^a e la 37^a settimana; gli altri esami di screening dell'emostasi vengono richiesti come buona pratica quotidiana (quindi al di fuori delle indicazioni delle Linee Guida);

- riportare sul referto degli esami richiesti in corso di gravidanza commenti che aiutino i clinici ad interpretare in maniera corretta i risultati, alla luce anche di quanto proposto dal Gruppo di Studio Emostasi e Trombosi di SIBioC (vedi Tabella 1).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Howie PW. Blood clotting and fibrinolysis in pregnancy. *Postgrad Med J* 1979;55:362-6.
2. Hellgren M, Blombäck M. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in pregnancy, during delivery and in the puerperium. I. Normal condition. *Gynecol Obstet Invest* 1981;12:141-54.
3. Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:125-30.
4. Ataulkhanov FI, Koltsova EM, Balandina AN, et al. Classic and Global Hemostasis Testing in Pregnancy and during Pregnancy Complications. *Semin Thromb Hemost* 2016;42:696-716.
5. Holmes VA, Wallace JM. Haemostasis in normal pregnancy: a balancing act? *Biochem Soc Trans* 2005;33:428-32.
6. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:153-68.
7. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res* 2004;114:409-14.
8. Clark P. Changes of hemostasis variables during pregnancy. *Semin Vasc Med* 2003;3:13-24.
9. Szecsi PB, Jørgensen M, Klajnbar A, et al. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost* 2010;103:718-27.
10. Simioni P, Campello E. I cambiamenti a livello emostatico in gravidanza. Hemostatic changes in pregnancy. *Reviews in Health Care* 2013;4 Suppl 3:31-9.
11. Fenton V, Saunders K, Cavill I, et al. The platelet count in pregnancy. *J Clin Pathol* 1977;30:68-9.
12. Harrison KL, Bramich L, Collins KA, et al. Platelet count during normal pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1982;22:74-5.
13. Verdy E, Bessous V, Dreyfus M, et al. Longitudinal analysis of platelet count and volume in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1997;77:806-7.
14. Li A, Yang S, Zhang J, et al. Establishment of reference intervals for complete blood count parameters during normal pregnancy in Beijing. *J Clin Lab Anal* 2017;31:e22150.
15. Reese JA, Peck JD, Deschamps DR, et al. Platelet Counts during Pregnancy. *N Engl J Med* 2018;379:32-43.
16. Zeng Y, Li L, Mao M, et al. Establishment of reference intervals of complete blood count for twin pregnancy. *BMC*

- Pregnancy Childbirth 2021;21:714.
17. Reese JA, Peck JD, McIntosh JJ, et al. Platelet counts in women with normal pregnancies: A systematic review. *Am J Hematol* 2017;92:1224-32.
 18. Fogerty AE. Thrombocytopenia in Pregnancy: Mechanisms and Management. *Transfus Med Rev* 2018;32:225-9.
 19. Haram K, Søfteland E, Hervig T, et al. Thrombocytopenia in pregnancy. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2003;123:2250-2.
 20. Bergmann F, Rath W. The Differential Diagnosis of Thrombocytopenia in Pregnancy. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112:795-802.
 21. Cines DB, Levine LD. Thrombocytopenia in pregnancy. *Blood* 2017;130:2271-7.
 22. Elmaradny E, Alneel G, Alkhattaf N, et al. Predictive values of combined platelet count, neutrophil-lymphocyte ratio, and platelet-lymphocyte ratio in preeclampsia. *J Obstet Gynaecol* 2021;1-7.
 23. Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc* 2007;82:864-73.
 24. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med* 2017;48:295-313.
 25. Tripodi A, Lippi G, Plebani M. How to report results of prothrombin and activated partial thromboplastin times. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:215-22.
 26. Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987;70:165-72.
 27. Wang W, Long K, Deng F, et al. Changes in levels of coagulation parameters in different trimesters among Chinese pregnant women. *J Clin Lab Anal* 2021;35:e23724.
 28. Jin Y, Lu J, Jin H, et al. Reference intervals for biochemical, haemostatic and haematological parameters in healthy Chinese women during early and late pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:973-9.
 29. Cui C, Yang S, Zhang J, et al. Trimester-specific coagulation and anticoagulation reference intervals for healthy pregnancy. *Thromb Res* 2017;156:82-6.
 30. Momot AP, Semenova NA, Belozerov DE, et al. The dynamics of the hemostatic parameters in physiological pregnancy and after delivery. *J Hematol Blood Transfus Disord* 2016;3:1-18.
 31. Cappelletti RM. Fibrinogen and fibrin: structure and functional aspects. *Thrombin Funct Pathophysiol* 2012;263-91
 32. De Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: An update. *Semin Thromb Hemost* 2013;9:585-95.
 33. May JE, Wolberg AS, Lim MY. Disorders of fibrinogen and fibrinolysis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2021;35:1197-217.
 34. Réger B, Péterfalvi Á, Litter I, et al. Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women. *Thromb Res* 2013;131:183-7.
 35. Joly B, Barbay V, Borg JY, et al. Comparison of markers of coagulation activation and thrombin generation test in uncomplicated pregnancies. *Thromb Res* 2013;132:386-91.
 36. Charbit B, Mandelbrot L, Samain E, et al. The decrease of fibrinogen is an early predictor of the severity of postpartum hemorrhage. *J Thromb Haemost* 2007;5:266-73.
 37. Liu JJ, Yuan EW, Lee L. Gestational age-specific reference intervals for routine haemostatic assays during normal pregnancy. *Clin Chim Acta* 2012;413:258-61.
 38. Gong JM, Shen Y, He YX. Reference intervals of routine coagulation assays during the pregnancy and puerperium period. *J Clin Lab Anal* 2016;30:912-17.
 39. Ren K, Wei Y, Qiao R, et al. Changes in coagulation during twin pregnancies. *Clin Appl Thromb* 2020;26:1-5.
 40. Hui C, Lili M, Libin C, et al. Changes in coagulation and hemodynamics during pregnancy: A prospective longitudinal study of 58 cases. *Arch Gynecol Obstet* 2012;285:1231-6.
 41. Favresse J, Lippi G, Roy PM, et al. D-dimer: Preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2018;55:548-77.
 42. Marik PE, Plante LA. Venous thromboembolic disease and pregnancy. *N Engl J Med* 2008;359:2025-33.
 43. Murphy N, Broadhurst DI, Khashan AS, et al. Gestation-specific D-dimer reference ranges: a cross-sectional study. *BJOG* 2015;122:395-400.
 44. Epiney M, Boehlen F, Boulvain M, et al. D-dimer levels during delivery and the postpartum. *J Thromb Haemost* 2005;3:268-71.
 45. Morse M. Establishing a normal range for D-Dimer levels through pregnancy to aid in the diagnosis of pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:1202-4.
 46. Kline JA, Williams GW, Hernandez-Nino J. D-dimer concentrations in normal pregnancy: new diagnostic thresholds are needed. *Clin Chem* 51;5:825-9.
 47. Hanse AT, Ansidreas BH, Salving JD, et al. Changes in fibrin D-dimer, fibrinogen and protein S during pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71:173-6.
 48. Giavarina D, Mezzena G, Dorizzi RM, et al. Reference interval of D-dimer in pregnant women. *Clin Biochem* 2001;34:331-3.
 49. Hedengran KK, Andersen MR, Stender S, et al. Large D-dimer fluctuation in normal pregnancy: a longitudinal cohort study of 4,117 samples from 714 healthy danish women. *Obstet Gynecol Int* 2016;2016:3561675.
 50. Fu M, Liu J, Xing J, et al. Reference intervals for coagulation parameters in non-pregnant and pregnant women. *Scientific Reports* 2022;12:1-10.
 51. Bourjely G. D-dimer use in venous thromboembolic disease in pregnancy. *BJOG* 2015;122:401.
 52. Linkins LA, Lapner ST. Review of D-dimer testing: good, bad and ugly. *Int J Lab Hem* 2017;39:98-103.
 53. Weitz Ji, Fredenburgh JC, Eikelboom JW. A test in context: D-Dimer. *Journal of the American College of Cardiology* 2017;70:2411-20.
 54. Goodacre S, Horspool K, Nelson-Piercy C, et al. The DiPEP study: an observational study of the diagnostic accuracy of clinical assessment, D-dimer and chest x-ray for suspected pulmonary embolism in pregnancy and postpartum. *BJOG* 2019;126:383-92.
 55. Bellesini M, Robert-Ebadi H, Combescure C, et al. D-dimer to rule out venous thromboembolism during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2021;19:2454-67.
 56. Van der Pol LM, Tromeur C, Bistervels IM, et al. Pregnancy-Adapted YEARS Algorithm for Diagnosis of Suspected Pulmonary Embolism. *N Engl J Med* 2019;380:1139-49.
 57. Righini M, Van Es J, Den Exter PL, et al. Age-adjusted D-dimer cut-off levels to rule out pulmonary embolism: the ADJUST-PE study. *JAMA* 2014;311:1117-24.
 58. Cohen SL, Feizullayeva C, McCandlish JA, et al. Comparison of international societal guidelines for the diagnosis of suspected pulmonary embolism during pregnancy. *Lancet Haematol* 2020;7:e247-e258.
 59. Viau-Lapointe J, Arseneault MP. New evidence in diagnosis of pulmonary embolism during pregnancy. *Obstet Med* 2020;13:120-4.
 60. Franchini M. Haemostasis and pregnancy. *Thromb Haemost* 2006;95:401-13.

61. Sié P, Caron C, Azam J, et al. Reassessment of von Willebrand factor (VWF), VWF propeptide, factor VIII:C and plasminogen activator inhibitors 1 and 2 during normal pregnancy. *Br J Haematol* 2003;121:897-903.
62. Kristoffersen AH, Petersen PH, Bjørge L, et al. Within-subject biological variation of activated partial thromboplastin time, prothrombin time, fibrinogen, factor VIII and von Willebrand factor in pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1297-1308
63. Sánchez-Luceros A, Fariás CE, Amaral MM, et al. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost* 2004;92:1320-6.
64. Feys HB, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. ADAMTS13 in health and disease. *Acta Haematol* 2009;121:183-5
65. Persson BL, Stenberg P, Holmberg L, et al. Transamidating enzymes in maternal plasma and placenta in human pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *J Dev Physiol* 1980;2:37-46.
66. Sharief LT, Lawrie AS, Mackie IJ, et al. Changes in factor XIII level during pregnancy. *Haemophilia* 2014;20:e144-8.
67. Stirling Y, Woolf L, North WR, et al. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1984;52:176-82.
68. Hammerova L, Chabada J, Drobny J, et al. Longitudinal evaluation of markers of hemostasis in pregnancy. *Bratisl Lek Listy* 2014;115:140-4.
69. Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol* 2009;114:1326-31
70. Condie RG. A serial study of coagulation factors XII, XI and X in plasma in normal pregnancy and in pregnancy complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1976;83:636-9.
71. Hepner M, Karlaftis V. Antithrombin. *Methods Mol Biol* 2013;992:355-64.
72. Van Cott EM, Orlando C, Moore GW, et al. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2020;18:17-22.
73. Sokol J, Timp JF, Cessie S, et al. Mild antithrombin deficiency and risk of recurrent venous thromboembolism: results from the MEGA follow-up study. *J Thromb Haemost* 2018;16:680-8.
74. James AH, Rhee E, Thames B, et al. Characterization of antithrombin levels in pregnancy. *Thromb Res* 2014;134:648-51.
75. Nicholson M, Chan N, Bhagirath V, et al. Prevention of venous thromboembolism in 2020 and beyond. *J Clin Med* 2020;9:2467.
76. Friederich PW, Sanson BJ, Simioni P, et al. Frequency of pregnancy-related venous thromboembolism in anticoagulant factor-deficient women: implications for prophylaxis. *Ann Intern Med* 1996;125:955-60
77. James AH. Prevention and treatment of venous thromboembolism in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55:774-87.
78. O'Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17:385-96.
79. Uchikova EH, Ledjev II. Changes in haemostasis during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;119:185-8.
80. Ataulkhanov FI, Koltsova EM, Balandina AN, et al. Classic and Global Hemostasis Testing in Pregnancy and during Pregnancy Complications. *Semin Thromb Hemost* 2016;42:696-716.
81. Sekiya A, Hayashi T, Kadohira Y, et al. Thrombosis Prediction Based on Reference Ranges of Coagulation-Related Markers in Different Stages of Pregnancy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017;23:844-50.
82. Hammerova L, Chabada J, Drobny J, et al. Longitudinal evaluation of markers of hemostasis in pregnancy. *Bratisl Lek Listy* 2014;115:140-4.
83. Wang W, Long K, Deng F, et al. Changes in levels of coagulation parameters in different trimesters among Chinese pregnant women. *J Clin Lab Anal* 2021;35:e23724.
84. Wickström K, Edelstam G, Löwbeer Ch, et al. Reference intervals for plasma levels of fibronectin, von Willebrand factor, free protein S and antithrombin during third-trimester pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:31-40.
85. Morton A, Laurie J. Physiological changes of pregnancy and the Swansea criteria in diagnosing acute fatty liver of pregnancy. *Obstet Med* 2018;11:126-31.
86. Amiral J, Seghatchian J. Revisiting the activated protein C-protein S-thrombomodulin ternary pathway: Impact of new understanding on its laboratory investigation. *Transfus Apher Sci* 2019;58:538-44.
87. Said JM, Ignjatovic V, Monagle PT, et al. 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;103:984-8.
88. Veen CSB, Durian MF, Kruij MJHA, et al. Thrombophilia: women-specific reference ranges can prevent misdiagnosis in women. *J Appl Lab Med* 2018;2:737-45.
89. Franchi F, Biguzzi E, Martinelli I, et al. Normal reference ranges of antithrombin, protein C and protein S: effect of sex, age and hormonal status. *Thromb Res* 2013;132:e152-7.
90. Cooper PC, Pavlova A, Moore GW, et al. Recommendations for clinical laboratory testing for protein C deficiency, for the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2020;18:271-7.
91. Marlar RA, Gausman JN, Tsuda H, et al. Recommendations for clinical laboratory testing for protein S deficiency: Communication from the SSC committee plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2021;19:68-74.
92. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004-8.
93. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
94. Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost* 2010;8:445-53
95. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, et al. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82:1989-93.
96. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993;342:1503-6.
97. Martinelli I, Taioli E, Cetin I, et al. M. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late pregnancy loss. *N Engl J Med* 2000;343:1015-8.
98. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, et al. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:902-5.
99. Moore GW, Van Cott JEM, Cutler JA, et al. Recommendations for clinical laboratory testing of activated protein C resistance; communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2019;17:1555-61

100. Kitchen S, Makris M. Reference Ranges. In: Practical hemostasis and thrombosis. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 2016;444-451.
101. Tang J, Lin Y, Mai H, et al. Meta-analysis of reference values of haemostatic markers during pregnancy and childbirth. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2019;58:29-35.
102. Joly B, Barbay V, Borg J-Y, et al. Comparison of markers of coagulation activation and thrombin generation test in uncomplicated pregnancies. *Thromb Res* 2013;132:386-91.
103. Bombeli T, Raddatz-Mueller P, Fehr J. Coagulation activation markers do not correlate with the clinical risk of thrombosis in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:382-9.
104. Amgalan A, Allen T, Othman M, et al. Systematic review of viscoelastic testing (TEG/ROTEM) in obstetrics and recommendations from the women's SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2020;18:1813-38.
105. Della Rocca G, Dogareschi T, Cecconet T, et al. Coagulation assessment in normal pregnancy: thrombelastography with citrated non activated samples. *Minerva Anestesiol* 2012;78:1357-64.
106. Huissoud C, Carrabin N, Benchaib M, et al. Coagulation assessment by rotation thrombelastometry in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 2009;101:755-61.
107. de Lange NM, van Rheenen-Flach LE, Lance MD, et al. Peri-partum reference ranges for ROTEM(R) thromboelastometry. *Br J Anaesth* 2014;112:852-9.
108. Duraj L, Stasko J, Hasko M, et al. Monitoring of hemostasis by rotational thrombelastometry during normal pregnancy and postpartum. *Acta Medica Martiniana* 2015;15:5-12.
109. Hemker HC, Béguin S. The generation of thrombin in whole plasma. Biochemical possibilities and physiological realities. *Verh K Acad Geneeskde Belg* 1985;47:321-39.
110. Bagot CN, Leishman E, Onyiaodike CC, et al. Normal pregnancy is associated with an increase in thrombin generation from the very early stages of the first trimester. *Thromb Res* 2017;157:49-54.
111. Dargaud Y, Hierro S, Rugeri L, et al. Endogenous thrombin potential, prothrombin fragment 1 + 2 and D-dimers during pregnancy. *Thromb Haemost* 2010;103:469-71.
112. Eichinger S, Weltermann A, Philipp K, et al. Prospective evaluation of hemostatic system activation and thrombin potential in healthy pregnant women with and without factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1999;82:1232-6.
113. Rosenkranz A, Hiden M, Leschnik B, et al. Calibrated automated thrombin generation in normal uncomplicated pregnancy. *Thromb Haemost* 2008;99:331-7.