

Il laboratorio e i nuovi anticoagulanti orali

Benedetto Morelli¹, Emilio Ascari² a nome del Gruppo di Studio SIBioC Emostasi e Trombosi

¹Rho, MI

²Laboratorio Analisi, Spedali Civili di Brescia

ABSTRACT

Laboratory and new oral anticoagulants. Heparins and vitamin K antagonists are drugs of choice for treatment and prevention of thrombotic pathologies. These drugs have a considerable degree of safety and efficacy, but they may present certain drawbacks, as they require frequent laboratory monitoring (unfractionated heparins and anti-vitamin K) or intravenous or subcutaneous administration (low molecular weight heparins). Due to these reasons, several studies have been performed to identify new anticoagulant drugs with characteristics of safety, efficacy and possibility of oral administration and no need of laboratory monitoring. New direct oral anticoagulants (DOAs) have as direct target thrombin (factor IIa) or factor-Xa inhibition; their safety and efficacy have been investigated in several phase III studies. DOAs in most advanced stage of release are dabigatran, rivaroxaban and apixaban; the first drug is a direct thrombin inhibitor, the others are direct factor-Xa inhibitors. DOAs do not require routine laboratory monitoring due to their high dose-response predictability; there is, however, a necessity to measure their anticoagulant effect in some particular situations. In those situations, it is important for the laboratory to consider: 1) how DOAs can interfere in the measurement of basic and more specialistic coagulation parameters; 2) which tests are the most suitable to detect the presence of the new drug; 3) which tests are the most useful to measure the anticoagulant effect; 4) which tests are the most suitable to monitor the antagonizing effect of some drugs ("reversal") in case of DOA overdose.

INTRODUZIONE

Uno dei settori della ricerca farmacologica in grande fermento negli ultimi anni è sicuramente quello rappresentato dalla terapia anticoagulante, per la quale, a ragione, è stato decretato l'inizio di una nuova era con l'introduzione di nuove e promettenti molecole. La terapia anticoagulante costituisce il cardine del trattamento nella prevenzione primaria e secondaria dello "stroke" in pazienti con fibrillazione atriale (FA) e dell'embolia polmonare (EP) in pazienti con trombosi venosa, ambiti nei quali si sono concentrate le applicazioni dei nuovi farmaci anticoagulanti (1). Il warfarin e gli altri antagonisti della vitamina K (AVK) da oltre 50 anni rappresentano la terapia di riferimento, di provata efficacia, per la profilassi cardioembolica, in particolare nei pazienti con FA (2). Il loro meccanismo d'azione consiste nell'inibizione della sintesi epatica di alcuni fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti (fattori II, VII, IX e X). A fronte della loro provata efficacia,

gli AVK presentano, tuttavia, alcune limitazioni relative alle loro caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche, che ne rendono difficoltoso l'impiego nella pratica clinica (3):

- inizio d'azione lento,
- imprevedibilità della risposta farmacologica, determinata soprattutto dalla variabilità interindividuale nel metabolismo citocromo P450-dipendente,
- stretta finestra terapeutica,
- necessità di monitoraggio di laboratorio,
- necessità di frequenti aggiustamenti posologici,
- numerose interazioni farmacologiche e alimentari.

Nella pratica clinica, questi limiti si traducono in sottoutilizzo degli AVK, inadeguata anticoagulazione e frequenti interruzioni del trattamento. Negli ultimi anni abbiamo assistito a un intenso sviluppo di nuovi farmaci anticoagulanti con l'obiettivo di ridurre gli svantaggi dei farmaci al momento disponibili, mantenendone nel contempo l'elevata efficacia e sicurezza. Le

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, Via San Carlo 131, 20017 Rho, MI. Tel. 0293505382, E-mail benemorelli@interfree.it

Ricevuto: 10.03.2013

Revisionato: 21.05.2013

Accettato: 23.05.2013

caratteristiche del farmaco ideale da utilizzare in profilassi dovrebbero essere le seguenti (4):

- offrire una semplice via di somministrazione, possibilmente orale,
- avere caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche altamente prevedibili,
- ampia finestra terapeutica,
- somministrazione a dosi fisse,
- non necessità di monitoraggio di laboratorio.

I NUOVI ANTICOAGULANTI ORALI

La ricerca dei nuovi farmaci anticoagulanti si è concentrata su molecole sintetiche capaci di inibire la coagulazione in modo possibilmente diretto, cioè senza necessità di legarsi a cofattori per esercitare la propria azione, e selettivo, cioè nei confronti di un singolo elemento della cascata coagulativa. Sono state così sviluppate sia molecole in grado di inibire selettivamente la trombina (fattore IIa) che molecole dirette sul fattore Xa; questi fattori giocano un ruolo di primo piano nella cascata coagulativa e sono comuni sia alla via intrinseca che alla via estrinseca. La trombina, in particolare, ricopre un ruolo centrale e svolge numerose attività. Pertanto, i farmaci antitrombinici diretti hanno l'obiettivo di prevenire non solo la formazione di fibrina, compito principale della trombina, ma anche di inibire l'attivazione, mediata dalla trombina, dei fattori V, VIII, XI e XIII e delle piastrine. I primi farmaci antitrombinici a essere sviluppati sono stati farmaci a somministrazione parenterale, come l'irudina e la bivalirudina (5). Il primo farmaco antitrombinico somministrato per via orale è stato invece lo ximelagatran, che fu sperimentato con successo nella prevenzione e terapia del tromboembolismo venoso (TEV) e nella prevenzione dell'ictus e delle embolie sistemiche nei pazienti con FA e che arrivò a essere approvato nell'Unione Europea per l'utilizzo clinico, ma che fu successivamente ritirato nel 2006 a causa di effetti epatotossici (6).

I nuovi anticoagulanti diretti orali (DOA), che sono ormai in avanzata fase di rilascio, sono il dabigatran (nome commerciale Pradaxa, prodotto da Boehringer Ingelheim), il rivaroxaban (Xarelto, prodotto da Bayer) e l'apixaban (Eliquis, prodotto da Pfizer). Il primo farmaco è diretto contro la trombina, mentre gli altri due sono diretti contro il fattore Xa. Il loro meccanismo d'azione, insieme a quello di altri farmaci in via di sviluppo, è illustrato nella Figura 1. Nella Tabella 1 sono indicate le caratteristiche principali. Nella Tabella 2 vengono messi a confronto alcuni aspetti rilevanti nella conduzione del trattamento dei pazienti in terapia tradizionale con AVK o con DOA.

Dabigatran

Il dabigatran etexilato è il profarmaco della molecola attiva dabigatran, che è in grado di legarsi in modo reversibile e altamente specifico alla trombina senza necessità di cofattori. A differenza dalle eparine, l'effetto di inibizione avviene sia sulla trombina libera che sulla

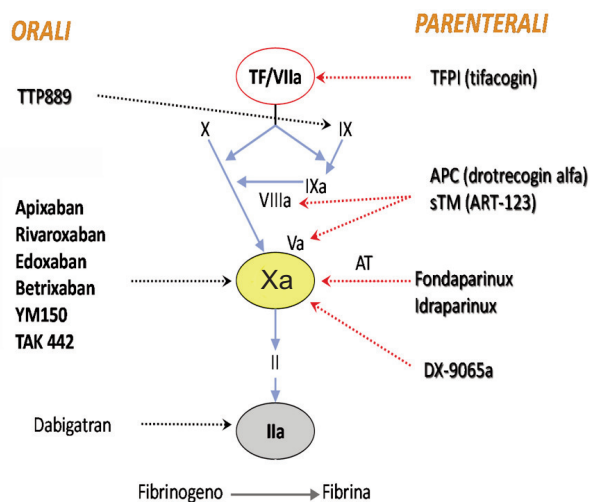


Figura 1
Rappresentazione schematica della cascata coagulativa e livello di azione dei nuovi anticoagulanti orali diretti.
AT, antitrombina.

trombina legata al trombo. Il dabigatran viene somministrato per via orale, ha un inizio d'azione rapido, un'emivita di circa 12-17 ore e viene eliminato prevalentemente per via renale. L'effetto farmacodinamico risulta prevedibile e riproducibile e le caratteristiche farmacocinetiche consentono anche un'unica somministrazione giornaliera (7). Il dabigatran ha una scarsa propensione all'interazione con il cibo e con altri farmaci. Poiché l'amiodarone è un inibitore del trasportatore dell'efflusso glicoproteina P (P-gp) e il dabigatran etexilato è un substrato di questo trasportatore (anche se il meccanismo non è stato ancora completamente chiarito), la loro concomitante assunzione determina un incremento della concentrazione massima (C-max) del dabigatran pari a ~60%. In caso di somministrazione concomitante dei due farmaci viene consigliata una riduzione del dosaggio del dabigatran a 150 mg al giorno, da 220 mg (8).

I dati degli studi di fase III in chirurgia ortopedica maggiore di pazienti trattati con il dabigatran dimostrano chiaramente che questo farmaco offre un profilo di efficacia e di sicurezza equivalente a quello del farmaco standard, l'enoxaparina, con in più diversi vantaggi pratici rappresentati dalla somministrazione orale, che appare vantaggiosa soprattutto laddove vi è l'indicazione a proseguire il trattamento dopo la dimissione dall'ospedale, dalla natura sintetica del prodotto e dall'assenza di rischio di trombocitopenia indotta da eparina (HIT), per cui non è necessario il monitoraggio della conta piastrinica (9).

Il dabigatran è approvato per l'uso clinico nella profilassi del TEV in pazienti sottoposti a chirurgia protesica di ginocchio o d'anca. La dose raccomandata è 220 mg al giorno, con l'eccezione della prima dose, somministrata tra 1 e 4 ore dopo l'intervento, che deve essere di 110 mg. Un aspetto pratico molto importante riguarda alcune popolazioni di pazienti a maggior rischio di complicanze emorragiche dopo somministrazione di

Tabella 1*Caratteristiche principali dei nuovi anticoagulanti orali*

Nome del farmaco	Dabigatran etexilato	Rivaroxaban	Apixaban
Nome commerciale	Pradaxa	Xarelto	Eliquis
Profarmaco	Si	No	No
Target farmacologico	Trombina (fattore IIa)	Fattore Xa	Fattore Xa
PM	628	436	460
Biodisponibilità	7%	>80%	66%
Legame alle proteine plasmatiche	35%	95%	87%
T _{max} (ore)	2	2-4	1-3
T _{1/2} (ore)	12-17	9-13	8-15
Principali enzimi metabolici	Glucuroniltransferasi	CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2J2	CYP3A4
Trasportatore	Glicoproteina P	Glicoproteina P	Glicoproteina P
Via di eliminazione	≈80% renale ≈20% biliare	Renale: ≈33% in forma immutata ≈33% in metaboliti inattivi ≈33% biliare	≈30% renale ≈70% biliare
No. dosi giornaliere	2	1	2

Tabella 2*Confronto tra trattamento con antagonisti della vitamina K (AVK) e nuovi anticoagulanti diretti orali (DOA) nella gestione del paziente*

	AVK	DOA
Visita (anamnesi, esame fisico)	Si	Si
Prescrizione (indicazione clinica, posologia)	Si	Si
Informazione/educazione	Si	Si
Frequente monitoraggio degli esami della coagulazione	Si	No
Controllo della funzionalità renale	No	Si
Aggiustamento della dose	Si	No
Controllo della adesione/"compliance"	No (valutazione frequente)	Si
"Management" in condizioni speciali (chirurgia/complicanze)	Si	Si
Controllo clinico periodico	No (valutazione frequente)	Si
Esami della coagulazione in supporto a interventi clinici e terapeutici in specifiche situazioni	Si	Si (mancano ancora linee guida definitive) ¹

profilassi anticoagulante. In pazienti con "clearance" della creatinina compresa tra 30 e 50 mL/min e in pazienti di età >75 anni viene raccomandato di ridurre il dosaggio a 150 mg al giorno, con una prima dose di 75 mg. Questo adattamento posologico ha l'obiettivo di aumentare la sicurezza proprio nelle popolazioni potenzialmente più critiche. Una "clearance" della creatinina <30 mL/min ha rappresentato, invece, un criterio di esclusione dagli studi ed è pertanto, al momento, una controindicazione assoluta all'impiego di questo farmaco. Oltre che nella profilassi del TEV nei pazienti ortopedici, altri utilizzi potenziali del dabigatran sono stati messi in luce da importanti studi epidemiologici quali:

- lo studio RELY ("Randomized evaluation of long-term anticoagulant therapy"), condotto in 18.000 pazienti

- con FA, randomizzati a ricevere o dabigatran (a due diversi dosaggi) o warfarin, per circa 20-24 mesi (10);
- lo studio RECOVER, condotto su 2.500 soggetti affetti da TEV, che sono stati randomizzati a trattamento per un totale di 6 mesi con dabigatran 150 mg due volte al giorno o con warfarin, dopo un'iniziale terapia parenterale;
- lo studio REMEDY, condotto su 2.000 pazienti con TEV sintomatico, che avevano già ricevuto 3-6 mesi di trattamento convenzionale e che sono stati randomizzati a 18 mesi con dabigatran 150 mg due volte al giorno o con warfarin;
- lo studio RESONATE, condotto su 2.000 pazienti con TEV sintomatico, che avevano già ricevuto 3-6 mesi di trattamento convenzionale e che sono stati randomizzati a 18 mesi con dabigatran.

¹A questo proposito, vedere il Documento di consenso pubblicato a pag. 301 di questo numero di *Biochimica Clinica* (NdE).

Rivaroxaban

Il rivaroxaban è il primo inibitore orale selettivo del fattore Xa sviluppato dalla ricerca clinica; questo farmaco ha ricevuto l'approvazione per l'impiego clinico nella prevenzione del TEV nella chirurgia protesica d'anca e di ginocchio negli Stati Uniti, in Canada e nell'Unione Europea. Numerosi studi clinici tuttora in corso stanno inoltre valutando l'efficacia e la sicurezza del rivaroxaban nella prevenzione e nella terapia in numerosi ambiti del tromboembolismo sia venoso che arterioso. Gli studi clinici di fase I hanno mostrato che il rivaroxaban è ben tollerato in volontari sani, con un profilo farmacocinetico prevedibile e stabile rispetto alle dosi. Inoltre, l'effetto farmacodinamico è prevedibile e riproducibile e le caratteristiche farmacocinetiche consentono un'unica somministrazione quotidiana (11).

Il rivaroxaban viene assorbito nel tratto gastrointestinale, è eliminato principalmente nelle urine e ha una biodisponibilità superiore al 80%. Le concentrazioni plasmatiche di farmaco raggiungono il picco dopo 3-4 ore; l'emivita del rivaroxaban nel plasma va da 5 a 9 ore negli individui giovani e da 11 a 13 ore nei soggetti anziani (12).

Non è necessario alcun monitoraggio di laboratorio perché il rivaroxaban ha dimostrato una scarsa interazione sia con il cibo che con numerosi farmaci; inoltre, la dose del rivaroxaban non deve essere ridotta in presenza di insufficienza renale lieve e moderata (creatinina "clearance", 30-80 mL/min). Limitati dati clinici esistono in caso di insufficienza renale grave (creatinina "clearance", 15-29 mL/min) e indicano che le concentrazioni plasmatiche del rivaroxaban sono significativamente aumentate in questo sottogruppo di pazienti; quindi, il rivaroxaban deve essere impiegato con cautela in questo contesto clinico. Infine, il rivaroxaban non è raccomandato nei pazienti con creatinina "clearance" <15 mL/min ed è controindicato in pazienti con patologia epatica associata a coagulopatia ed elevato rischio emorragico, mentre deve essere impiegato con cautela in pazienti cirrotici con insufficienza epatica moderata senza coagulopatia.

Apixaban

L'apixaban è un anticoagulante che agisce come inibitore orale, diretto e selettivo del fattore X attivato della coagulazione. Si tratta di un pirazolo biciclico che si lega direttamente e reversibilmente al sito attivo del fattore Xa ed esercita un'azione anticoagulante e antitrombotica riducendo la conversione della protrombina in trombina. La biodisponibilità dell'apixaban è di ~50% per dosi fino a 10 mg, è rapidamente assorbito con C-max che si riscontrano da 3 a 4 ore dopo l'assunzione della compressa. L'apixaban ha molteplici vie di eliminazione; ~25% è eliminato come metaboliti, con la maggioranza riscontrata nelle feci. L'escrezione renale dell'apixaban rappresenta ~27% della sua "clearance" totale. L'emivita è di ~12 ore.

L'apixaban si somministra per via orale, 2 volte al giorno, non richiede un monitoraggio laboratoristico e ha

anch'esso una scarsa propensione all'interazione con altri farmaci. È attualmente indicato nella prevenzione del TEV nei pazienti adulti sottoposti a intervento chirurgico di sostituzione elettiva dell'anca o del ginocchio. La dose raccomandata è 2,5 mg due volte al giorno e la dose iniziale deve essere assunta da 12 a 24 ore dopo l'intervento chirurgico. Non sono previsti aggiustamenti posologici nei pazienti anziani e nei pazienti con insufficienza renale lieve e moderata. L'apixaban ha recentemente ricevuto l'approvazione per l'utilizzo clinico per la profilassi del TEV in chirurgia protesica elettiva d'anca e di ginocchio. Per questa indicazione l'apixaban si somministra alla dose di 2,5 mg due volte al giorno, iniziando la terapia 12-24 ore dopo l'intervento.

Negli studi sulla profilassi del TEV in chirurgia ortopedica, l'apixaban ha dimostrato, rispetto alla enoxaparina 30 mg *bis in die*, un'efficacia significativamente superiore nel ridurre gli eventi TEV, inclusa la prevenzione del TEV maggiore (trombosi venosa profonda prossimale, EP non fatale e morte TEV-correlata), senza aumentare il rischio emorragico (13). L'apixaban è utilizzato anche in numerosi altri studi epidemiologici, dove è stato testato per altre patologie quali la prevenzione dell'ictus nella FA, la prevenzione del TEV in alcune patologie internistiche, il trattamento delle sindromi coronariche acute e il trattamento acuto e cronico del TEV (14-16).

DOA E LABORATORIO

Le proprietà farmacologiche dei DOA fanno sì che non sia più necessario un monitoraggio costante della loro attività anticoagulante, come richiesto per i pazienti in trattamento con eparina non frazionata o con AVK, entrambi caratterizzati da una ristretta finestra terapeutica. Nel caso dei nuovi DOA è, invece, utile determinare in alcune circostanze la intensità dell'effetto anticoagulante prodotto dai farmaci, soprattutto se vi è il sospetto che il paziente sia ipo- o iperscoagulato. La Tabella 3 indica le circostanze nelle quali è importante avere a disposizione esami di laboratorio che indichino il livello di anticoagulazione generato nei pazienti dal trattamento con i nuovi DOA (17). In particolare, per quello che riguarda l'aspetto laboratoristico, è opportuno che tutti i laboratori siano in grado di riconoscere le possibili alterazioni a carico degli esami dell'emostasi nei pazienti in trattamento con i DOA e, in particolare, sapere:

1) qual è il comportamento degli esami di screening della coagulazione plasmatica [tempo di protrombina (PT), tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), tempo di trombina (TT)], del fibrinogeno plasmatico misurato secondo la metodica di riferimento (Clauss) o con il metodo PT-derivato, del D-dimero, degli inibitori fisiologici della coagulazione (antitrombina, proteina C, proteina S), della ricerca della resistenza alla proteina C attivata (aPCR), della ricerca dei "lupus anticoagulant" (LAC) e del dosaggio dei fattori procoagulanti;

2) quali sono gli esami consigliati per la misurazione

Tabella 3

Situazioni nelle quali è utile la misura dell'effetto anticoagulante dei nuovi anticoagulanti diretti orali

Prima di interventi chirurgici o prima di procedure invasive nel caso di assunzione del farmaco nelle 24 ore precedenti (o per un periodo superiore se la "clearance" della creatinina è <50 mL/min)

In presenza di episodi emorragici o di recidive trombotiche

Se necessita antagonizzazione immediata dell'effetto anticoagulante

In caso di sospetto di alterazione della funzionalità renale o epatica

Nelle persone molto anziane e nei bambini

Per verificare la "compliance" alla terapia

In caso di sospetto sovradosaggio

Per verificare una possibile interazione con altri farmaci

In caso di individui con peso corporeo elevato o ridotto

Tabella 4

Comportamento degli esami della coagulazione di primo e secondo livello nei pazienti in trattamento con nuovi anticoagulanti diretti orali

Esame	Inibitori diretti della trombina (dabigatran)	Inibitori diretti del fattore Xa (rivaroxaban, apixaban)
PT (espresso in "ratio")	↑	↑
aPTT (espresso in "ratio")	↑	↑
Tempo di trombina (espresso in "ratio")	↑↑	N
Fibrinogeno (sec. Clauss)	N/↓	N
Fibrinogeno (PT-derivato)	N/↓	N/↓
Antitrombina	Test eseguito con IIa: ↑ Test eseguito con Xa: N	Test eseguito con IIa: N Test eseguito con Xa: ↑
D-dimero	N	N
Proteina C	Metodo coagulativo: ↑ Metodo cromogenico: N	Metodo coagulativo: ↑ Metodo cromogenico: N
Proteina S	Metodo funzionale: ↑ Metodo immunologico: N	Metodo funzionale: ↑ Metodo immunologico: N
aPCR	↑	↑
Ricerca "lupus anticoagulant"	↑	↑
Fattori procoagulanti	↓	↓

PT, tempo di protrombina; aPTT, tempo di tromboplastina parziale attivato; N, nessun effetto; aPCR, test di resistenza alla proteina C attivata.

dell'effetto anticoagulante e per il monitoraggio della efficacia delle terapie antagonizzanti in caso di complicanze emorragiche.

Comportamento degli esami della coagulazione

Nella Tabella 4 sono riassunti i comportamenti degli esami per lo studio dell'emostasi di primo e secondo livello nei pazienti in trattamento con i DOA.

Tempo di protrombina

In studi condotti su volontari sani il dabigatran è stato in grado di determinare allungamento del PT in relazione all'aumento della concentrazione del farmaco; tuttavia, il PT è insensibile agli effetti complessivi del dabigatran. In uno studio che ha preso in esame 5 diverse tromboplastine per determinare il PT alla concentrazione

residua e alla concentrazione massima del dabigatran, l'"International Normalized Ratio" (INR) non ha mai superato il valore di 1,2 (18). Inoltre, si è riscontrata una grande variabilità nei risultati del PT in funzione della tromboplastina utilizzata. E' opportuno anche segnalare che il dabigatran può determinare sovrastima del INR se determinato con metodo "point-of-care", anche se non è ancora chiaro il motivo di questa sovrastima. Anche se il PT risulta allungato alle dosi sovraterapeutiche, l'insensibilità e la variabilità dei risultati fanno sì che questo esame non possa essere utilizzato per monitorare l'efficacia delle procedure di antagonizzazione ("reversal") attuate nel paziente emorragico.

Il PT è più sensibile al rivaroxaban che al dabigatran (19); il rivaroxaban è in grado di prolungare il PT in

maniera lineare all'aumentare delle concentrazioni del farmaco, ma esistono, tuttavia, sensibili differenze tra le varie tromboplastine commerciali (19, 20), che non possono essere attenuate con l'utilizzo del INR, dal momento che questo indice è stato introdotto solo per gli AVK. Di conseguenza, se il PT viene utilizzato per evidenziare la presenza del farmaco e per il "reversal", è importante che esso venga espresso in "ratio" anziché in INR (21). Se viene utilizzato INR per esprimere i risultati del PT, è importante ricordare che l'intervallo terapeutico del INR compreso tra 2 e 3, utilizzato per monitorare l'efficacia e la sicurezza degli AVK, non si deve applicare in caso di trattamento anticoagulante con rivaroxaban.

Uno studio condotto con 12 tromboplastine ha messo in luce anche per l'apixaban gli stessi problemi riscontrati con l'utilizzo del PT in soggetti trattati con rivaroxaban (22).

Tempo di tromboplastina parziale attivato

L'aPTT è più sensibile agli effetti del dabigatran rispetto al PT, con variabilità molto minore dei vari reagenti; il suo prolungamento è correlato all'incremento della dose, ma non in modo lineare rispetto alla concentrazione del farmaco. La responsività è adeguata dal momento che una concentrazione plasmatica di 200 µg/L prolunga aPTT di ~2,5 volte il valore basale. Nei pazienti che ricevono 150 mg due volte al giorno, aPTT "ratio" alla concentrazione massima è da 1,5 a 1,8 volte il controllo (23). Nei pazienti che ricevono 110 mg due volte al giorno, aPTT "ratio" alla concentrazione massima è da 1,4 a 1,7 volte il controllo (23). Al di sopra dei 100 µg/L aPTT è sempre prolungato (18). I risultati di aPTT sono influenzati dai coagulometri e dai reagenti utilizzati, con una variabilità comunque contenuta al di sotto del 10% (23). Un aPTT normale è in grado di escludere livelli di anticoagulazione adeguati nei pazienti in trattamento con dabigatran. Ulteriori studi sono comunque necessari per stabilire le sensibilità relative dei vari reagenti aPTT al dabigatran.

Anche il rivaroxaban prolunga aPTT in maniera dose-dipendente e linearmente con l'aumento della concentrazione del farmaco. La responsività è adeguata dal momento che una dose di 200 µg/L è in grado di prolungare aPTT di ~1,5 volte il valore basale, ma esistono sensibili differenze di responsività tra le varie cefaline commerciali (24).

Alla luce di quanto sopra esposto è indispensabile che ogni laboratorio verifichi la sensibilità dei propri reagenti per PT e per aPTT ai nuovi DOA; questo può essere fatto utilizzando i calibratori commerciali già disponibili sul mercato del diagnostico.

Tempo di trombina

TT mostra una risposta lineare alla concentrazione del dabigatran (18, 23), ma i risultati sono fortemente dipendenti dai reagenti e dai coagulometri utilizzati. La maggior parte dei metodi commerciali sono troppo sensibili alla presenza del dabigatran, come evidenziato anche da un recente esercizio proposto dall'"United

Kingdom National External Quality Assessment Scheme" (UK-NEQAS) (aprile 2012), al quale hanno partecipato ~470 laboratori. Nell'esercizio era richiesta la determinazione di vari esami della coagulazione (PT, aPTT, fibrinogeno, TT e antitrombina) su 5 campioni di plasma contenenti dabigatran alla concentrazione di 0, 50, 200, 500 e 1000 µg/L. Per l'esecuzione del TT erano utilizzati oltre 30 reagenti: l'allungamento del TT era già significativo con una concentrazione di dabigatran di 50 µg/L; con una concentrazione di 200 µg/L quasi il 90% dei laboratori non era più in grado di fornire un risultato. In definitiva, TT è un esame sensibile per stabilire la presenza del dabigatran; al contrario, la presenza del farmaco può essere esclusa da un TT normale.

Rivaroxaban e apixaban non mostrano alcun effetto sul TT (25).

Fibrinogeno

Nei pazienti in trattamento con rivaroxaban e apixaban non vi sono variazioni significative; al contrario, nei pazienti in trattamento con dabigatran vi possono essere riduzioni molto significative se il fibrinogeno viene determinato con il metodo di Clauss mediante alcuni reagenti commerciali, come evidenziato anche dall'esercizio del UK-NEQAS sopra citato e come riferito anche in altri lavori (18, 26). E' opportuno, quindi, che ogni laboratorio implementi metodiche per il dosaggio del fibrinogeno insensibili all'effetto del dabigatran.

D-dimero

I DOA non interferiscono con la determinazione del D-dimero e, in generale, sui parametri determinati con metodo immunologico; ovviamente, si possono riscontrare valori più bassi dell'atteso proprio per l'effetto inibitorio nei confronti dell'attivazione della coagulazione e della fibrinolisi prodotto dai DOA (27).

Antitrombina

Il dosaggio della antitrombina risulta sovrastimato in maniera significativa nei pazienti in trattamento con dabigatran e/o rivaroxaban: essendo i metodi funzionali per la determinazione dell'antitrombina basati sull'utilizzo dell'anti-IIa o dell'anti-Xa, si dovrà misurare l'antitrombina con un metodo anti-Xa, se il paziente assume dabigatran, o con un metodo anti-IIa, se il paziente assume rivaroxaban (18, 19, 27).

Proteina C e proteina S

La misurazione dell'attività anticoagulante della proteina C e della proteina S eseguita con metodo coagulativo risente della presenza sia del dabigatran che di rivaroxaban e apixaban. In questi casi si consiglia la determinazione della proteina C con metodo cromogenico e la determinazione della proteina S dosando la frazione libera con metodo immunologico, anche se in questo caso i due metodi non sono in grado di riconoscere tutte le varianti funzionali delle due proteine (27).

Test di resistenza alla proteina C attivata

I metodi classici basati sulla esecuzione di due aPTT eseguiti con e senza aggiunta di proteina C attivata risentono della presenza del dabigatran e del rivaroxaban; in questi casi si ottengono valori di "ratio" della aPCR più elevati sia nei soggetti normali che nei portatori eterozigoti della mutazione fattore V Leiden (18). In analogia ai dosaggi della proteina C e della proteina S, anche la determinazione della aPCR deve essere eseguita su campioni di sangue prelevati a distanza dal trattamento (in pratica dopo un intervallo di 12-14 ore dalla assunzione del DOA). I metodi basati sull'attivazione della coagulazione a livello della protrombinasi, invece, non risentono della presenza dei DOA (19).

Fattori procoagulanti

Il dosaggio dell'attività dei fattori procoagulanti basato sull'utilizzo del PT (fattori II, V, VII e X) o dell'aPTT (fattori VIII, IX, XI e XII) può essere inficiato dalla presenza del rivaroxaban e del dabigatran, producendo una sottostima dei livelli di attività (18, 20, 27, 28). Tuttavia, dal momento che questi dosaggi vengono eseguiti su plasma diluito, soltanto le concentrazioni di rivaroxaban vicine al picco di massima concentrazione (~200 µg/L) o ancora più elevate possono generare una sottostima dell'attività. Di conseguenza, si raccomanda di eseguire i dosaggi dei fattori su campioni di sangue prelevati appena prima dell'assunzione dell'anticoagulante essendo minima in tale momento l'interferenza prodotta dal farmaco. Se questo non fosse possibile o in casi dubbi, viene suggerito di ridurre l'interferenza del farmaco eseguendo il dosaggio dell'attività dei fattori con diluizioni del plasma ancora più spinte di quelle che vengono solitamente utilizzate. In caso di sovradosaggio (concentrazione del rivaroxaban >400 µg/L) una sottostima significativa del dosaggio dei fattori è altamente probabile.

Ricerca LAC

In presenza di rivaroxaban e dabigatran tutti gli esami raccomandati per la ricerca LAC, cioè i test fosfolipide-dipendenti [aPTT, "kaolin clotting time" (KCT), "silica clotting time" (SCT), "dilute prothrombin time" (dPT), "dilute russell viper venom test" (dRVVT)], risultano allungati (24). L'allungamento dei tempi si riscontra sia sul test eseguito indiluito che sui test di conferma, alterando la "ratio" e producendo false positività. Nessuna interferenza è stata, invece, riscontrata nella ricerca degli anticorpi anti-cardiolipina e anti-β₂-glicoproteina I (anti-GPI).

Altri esami per lo studio dell'emostasi

Altri esami sono stati suggeriti per lo studio dell'emostasi nei pazienti in trattamento con DOA; tra questi, il tempo di reptilasi, il test di generazione della trombina, la tromboelastografia, il "prothrombinase-induced clotting time" (PiCT), l'"ecarin clotting time"

(ECT) e l'"hep test". L'influenza dei DOA su questi test è ancora in fase di studio e la loro applicabilità nell'uso quotidiano e soprattutto in urgenza inducono a considerare con ancora maggiore cautela l'utilizzo di questi esami in laboratorio (25).

Esami da eseguire in urgenza per valutare l'effetto dei DOA

Alla luce dei vari studi fino a ora condotti (18-21), si può suggerire l'utilizzo dei seguenti esami nei pazienti in trattamento con i nuovi DOA:

- per il dabigatran: aPTT, TT e "diluted thrombin time" (29),
- per il rivaroxaban: PT e anti-fattore Xa,
- per l'apixaban: PT e anti-fattore Xa.

Gli esami indicati sono suggeriti in base alle caratteristiche di linearità, riproducibilità, disponibilità della metodica e facilità di esecuzione. E' opportuno ricordare che anche una terapia eparinica sovradosata può determinare un allungamento significativo oltre che dell'aPTT anche del TT per cui, se non è nota la terapia che sta facendo il paziente, occorre eseguire un tempo di reptilasi (o di trombin-coagulasi) per escludere l'assunzione di eparina. Ovviamente, è importante che si conoscano perfettamente le caratteristiche di sensibilità ai nuovi farmaci dei reagenti utilizzati in laboratorio per l'esecuzione del PT, dell'aPTT, del TT e del dosaggio dell'anti-Xa.

Quando effettuare il prelievo

Un altro aspetto molto importante è il momento in cui eseguire il prelievo poiché i meccanismi di inizio e fine azione dei DOA sono molto rapidi. In generale, i DOA raggiungono il loro picco di C-max 2 ore dopo l'assunzione del farmaco e i livelli continuano poi a decrescere sino a raggiungere il nadir (C-res) dopo ~12 ore dall'assunzione. Esistono differenze significative tra i vari farmaci per quello che riguarda il C-res: il rivaroxaban determina un allungamento minimo del PT a 12 ore di distanza dalla somministrazione di una dose di 10 mg; invece, il dabigatran alla dose di 200 mg dopo 12 ore è ancora in grado di allungare in maniera significativa il PT (essendo ancora al 50% della propria attività). Ancora oggi continua il dibattito su quando sia opportuno prelevare, cioè se al C-max o al C-res; i lavori più recenti sottolineano che un allungamento dei risultati degli esami riscontrato al C-res correla meglio con le complicanze emorragiche (24).

Altri esami utili a determinare l'effetto dei DOA

Al di fuori delle situazioni urgenti nelle quali è importante determinare la presenza dell'anticoagulante, esistono altre situazioni nelle quali è opportuno eseguire esami quantitativi per determinare esattamente il livello del farmaco:

- in caso di deterioramento progressivo della funzionalità renale,
- per il calcolo della dose ottimale del farmaco nei pazienti che assumono altri farmaci che sono noti

per alterare significativamente la farmacocinetica dei DOA,

- per il calcolo della dose ottimale in pazienti con estremi di peso.

I livelli del farmaco possono essere misurati direttamente con dosaggi di tipo non funzionale, come ad es. HPLC o spettrometria di massa, o di tipo funzionale; tra questi ultimi, gli esami più idonei per la misurazione del livello del dabigatran sembrano essere l'“hemoclot thrombin inhibitor” (HTI) e l'ECT (30). I dosaggi cromogenici dell'anti-Xa sono sensibili alla presenza del rivaroxaban e dell'apixaban (31, 32); essi richiedono una configurazione, dei calibranti e dei controlli specifici. I risultati, espressi in concentrazioni ponderali ($\mu\text{g/L}$), sono ottenuti a partire da una curva di calibrazione ottenuta con plasmici titolati contro rivaroxaban e apixaban. Il dosaggio cromogenico dell'anti-Xa in pazienti in trattamento con rivaroxaban è in grado di misurare un ampio intervallo di concentrazioni del farmaco (20-660 $\mu\text{g/L}$), che copre i livelli plasmatici attesi di rivaroxaban dopo dosi terapeutiche (31). È importante anche determinare la sensibilità dell'esame e la precisione della misurazione dell'attività anti-Xa nella zona bassa della curva in considerazione di possibili interventi chirurgici o altre manovre invasive. L'interpretazione dei risultati necessita anche della conoscenza dell'ora del prelievo in rapporto all'ora di somministrazione del farmaco, ricordando che la C-max viene raggiunta da 2 a 4 ore dopo l'assunzione del farmaco.

Sospetto sovradosaggio di DAO

Per individuare un sovradosaggio è consigliabile una misura dell'attività anticoagulante residua (C-res) poco prima dell'assunzione della compressa successiva. Tuttavia, al momento pochi dati sono disponibili in merito ai valori attesi e alle soglie di sovradosaggio correlate con l'insorgenza di complicanze emorragiche nei pazienti in trattamento con DOA.

Per il rivaroxaban, i valori suggeriti dai produttori del farmaco per un paziente in trattamento con 20 mg al giorno sono pari rispettivamente a 215 $\mu\text{g/L}$ (intervallo: 22-535) alla C-max e a 32 $\mu\text{g/L}$ (intervallo: 6-239) alla C-res. Come si può notare, vi è una grandissima variabilità interindividuale.

Per quello che riguarda invece i livelli di dabigatran associati a rischio di sanguinamento, i dati più interessanti sono quelli riscontrati da Douxfils et al. (28) utilizzando 5 diversi reagenti per aPTT e HTI. Per ognuno dei reagenti era calcolato il valore di “ratio” alla C-max e alla C-res che correlavano con rischio di sanguinamento nelle due diverse popolazioni prese in esame (pazienti di chirurgia ortopedica e pazienti con FA), trattati con due diverse dosi del farmaco (200 e 150 mg di dabigatran, rispettivamente) (28).

“Reversal” in corso di terapia con DAO

Tra i pochi aspetti negativi dei nuovi farmaci, quello di maggior rilievo è sicuramente rappresentato dalla

manca di un antidoto efficace e sicuro, come invece è previsto nel “reversal” delle complicanze emorragiche legate al trattamento eparinico e con gli AVK. Per ciò che concerne le complicanze emorragiche riscontrate in pazienti in trattamento con il rivaroxaban è stata suggerita la possibilità di somministrare fattore VII attivato ricombinante o concentrati del complesso protrombinico attivato (FEIBA) dopo provvedimenti emostatici generali (ritardo della somministrazione oppure sospensione del farmaco, compressione meccanica, intervento chirurgico, somministrazione di emoderivati) (33). I risultati non appaiono al momento incoraggianti in quanto si sono registrati comunque eventi fatali sia di tipo emorragico che di tipo trombotico legato all'utilizzo del fattore VIIa e dei FEIBA. Allo stato attuale sia per rivaroxaban che per apixaban sono in corso ricerche per la preparazione di un anticorpo monoclonale in grado di agire sul fattore Xa, target di entrambi i farmaci (la proteina ricombinante r-antidote PRT064445) (34). Per il “reversal” in caso di sovradosaggio di dabigatran sono suggerite procedure diverse da quelle adottate per il sovradosaggio da rivaroxaban, come ad esempio l'utilizzo di acido tranexamico o di procedure dialitiche (35).

Per monitorare l'efficacia del “reversal” nei pazienti in trattamento con i DOA sono suggeriti i seguenti esami (18):

- dabigatran: aPTT,
- rivaroxaban: anti-fattore Xa.

CONCLUSIONI

I DOA, a differenza degli AVK, sono in grado di fornire una protezione antitrombotica sicura ed efficace quando vengono somministrati a dosi fisse e quindi, in linea teorica, non richiedono monitoraggio della loro attività anticoagulante attraverso l'esecuzione di esami di laboratorio. Tuttavia, esistono alcune circostanze nelle quali il laboratorio deve necessariamente essere coinvolto per misurare il livello di anticoagulazione generato nel paziente in seguito al trattamento con dabigatran, rivaroxaban o apixaban. In queste circostanze il laboratorio deve essere in grado di:

- 1) proporre gli esami più idonei a rilevare, in condizioni urgenti e non, la presenza dei nuovi farmaci,
- 2) interpretare in maniera corretta i parametri di valutazione dell'emostasi di primo e secondo livello, che vengono richiesti contestualmente al trattamento anticoagulante,
- 3) eseguire gli esami più idonei per monitorare l'efficacia del “reversal” nei pazienti con emorragia critica,
- 4) interagire con i clinici per una corretta interpretazione dei risultati.

Dal momento che l'arrivo di questi nuovi DOA è imminente anche sul mercato italiano e quindi anche il loro impiego nei pazienti ricoverati e ambulatoriali, è opportuno che ogni laboratorio si prepari a gestire queste problematiche in maniera tempestiva, in accordo con i clinici e soprattutto coi medici referenti dei Centri

per la Diagnosi della Trombosi eventualmente presenti all'interno della struttura ospedaliera.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, et al. Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:7s-47s.
- You JJ, Singer DE, Howard PA, et al. Antithrombotic therapy for atrial fibrillation. Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e531S-75S.
- Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood* 1990;75:1753-62.
- Bounameaux H, Reber G. New oral antithrombotics: a need for laboratory monitoring. *Against. J Thromb Haemos* 2010;8:627-30.
- Di Nisio M, Middeldorp S, Buller HR. Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med* 2005;353:1028-40.
- Albers GW, Diener HC, Frison L, et al. Ximelagatran vs warfarin for stroke prevention in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a randomized trial. *JAMA* 2005;293:690-8.
- Stangler J, Rathgen K, Stahle H, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007;64:292-302.
- Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, et al. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos* 2008;36:386-99.
- Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, et al. Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2009;361:2342-52.
- Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009;361:1139-51.
- EINSTEIN Investigators. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2010;363:2499-510.
- Turpie AG. Advances in oral anticoagulation treatment: the safety and efficacy of rivaroxaban in the prevention and treatment of thromboembolism. *Ther Adv Hematol* 2012;3:309-23.
- Lassen MR, Davidson BL, Gallus A, et al. The efficacy and safety of apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, as thromboprophylaxis in patients following total knee replacement. *J Thromb Haemost* 2007;5:2368-75.
- Lassen MR, Gallus A, Raskob GE, et al. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement. *N Engl J Med* 2010;363:2487-98.
- Alexander JH, Lopes RD, James S, et al. Apixaban with antiplatelet therapy after acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2011;365:699-708.
- Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, et al. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:981-92.
- Harenberg J, Marx S, Krejczyk M, et al. New anticoagulants - promising and failed developments. *Br J Pharmacol* 2012;165:363-72.
- Lindhal TL, Baghaei F, Blixter IF, et al. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thromb Haemost* 2011;105:371-8.
- Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *J Thromb Haemost* 2011;9:113-9.
- Samama MM, Contant G, Spiro TE, et al. Evaluation of the prothrombin time for measuring rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls: results of a multicenter field trial. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012;18:150-8.
- Tripodi A, Chantarangkul V, Guinet C, et al. The International Normalized Ratio calibrated for rivaroxaban has the potential to normalize prothrombin time results for rivaroxaban-treated patients: results of an in vitro study. *J Thromb Haemost* 2011;9:226-8.
- Nagler M, Wuillemin W. Laboratory diagnostic with regard to new anticoagulants - monitoring and influence on coagulation tests. *Ther Umsch* 2012;69:650-6.
- Van Ryn J, Stangler J, Haertter S, et al. Dabigatran etexilate - a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 2010;103:1116-27.
- Tripodi A. The laboratory and the new oral anticoagulants. *Clin Chem* 2013;59:353-62.
- Samama MM, Guinet C. Laboratory assessment of new anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:761-72.
- Halbmayer WM, Weigel G, Quehenberger P, et al. Interference of the new oral anticoagulant dabigatran with frequently used coagulation tests. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:1601-5.
- Mani H, Hesse C, Stratmann G, et al. Rivaroxaban differentially influences ex vivo global coagulation assays based on the administration time. *Thromb Haemost* 2011;106:156-64.
- Douxflis J, Mullier F, Robert S, et al. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring of dabigatran etexilate. *Thromb Haemost* 2012;107:985-97.
- Tripodi A, Di Iorio G, Lippi G, et al. Position paper on laboratory testing for patients taking new oral anticoagulants. Consensus document of FCSA, SIMeL, SIBioC and CISMEL. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:2137-40.
- Stangler J, Feuring M. Using the Hemoclot direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:138-43.
- Samama MM, Guinet C, Le Flem L. Do new oral anticoagulants require laboratory monitoring? The clinician point of view. *Thromb Res* 2012;130(suppl 1):S88-9.
- Asmis LM, Alberio L, Angelillo-Scherrer A, et al. Rivaroxaban: quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests. A study in 9 Swiss laboratories. *Thromb Res* 2012;129:494-8.
- Siegal DM, Cuker A. Reversal of novel oral anticoagulants in patients with major bleeding. *J Thromb Thrombolysis* 2013;35:391-8.
- Lu G, deGuzman FR, Hollenbach SJ, et al. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nat Med* 2013;19:446-51.
- Alikhan R, Rayment R, Keeling D, et al. The acute management of haemorrhage, surgery and overdose in patients receiving dabigatran. *Emerg Med J* 2013 (Epub ahead of print). doi:10.1136/emmermed-2012-201976.