

Carenza di pre-callicreina e tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT)

A. Malacrida^a, V. Chantarangkul^b, A. Tripodi^b

^aLaboratorio Analisi, Presidio Sondalo (SO), Azienda Ospedaliera della Valtellina e della Valchiavenna

^bCentro Emofilia e Trombosi, Dipartimento di Medicina Interna, Università e IRCCS Ospedale Maggiore, Milano.

Riassunto

In seguito ad uno screening pre-operatorio è identificato un paziente con un marcato prolungamento del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), tempo di protrombina (PT) normale e senza un riscontro di sanguinamenti anche in corso di precedenti interventi chirurgici. Lo studio di primo livello porta a concludere per una carenza di uno o più fattori di pertinenza dell'APTT. Lo studio successivo esclude carenze dei fattori XII, XI, IX, e VIII, restringendo così il difetto ai primi fattori della fase di contatto (pre-callicreina, chininogeno ad alto peso molecolare) che, quando si presentano isolati, non si associano a sanguinamento. L'accorciamento fino a (quasi) normalizzazione

dell'APTT, in seguito al prolungamento del tempo di incubazione della fase di contatto, suggerisce una carenza di pre-callicreina. Il paziente è operato con due giorni di ritardo senza conseguenze emorragiche. Lo studio successivo con metodo specifico conferma una carenza di pre-callicreina a livello dello 0.2%. L'APTT eseguito sul plasma paziente con diversi reagenti del commercio conferma la già nota variabilità di risposta alla carenza di pre-callicreina. L'esperienza dimostra come l'attento esame della storia clinica, in combinazione con i risultati dell'APTT eseguito prolungando i tempi di incubazione della fase di contatto, possano essere utili per giungere alla diagnosi di carenza di pre-callicreina, pur in mancanza del test specifico.

Introduzione

La moderna visione della cascata coagulatoria non distingue più fra via estrinseca ed intrinseca. E' favorita invece l'ipotesi che l'attivazione abbia inizio a partire dalla formazione del complesso fattore tissutale (FT) - fattore VII(a). Questo avviene non appena il FT, proteina transmembrana, che funge appunto da recettore per il fattore VII(a), viene a contatto con il fattore VII(a) plasmatico, scatenando una serie di attivazioni successive che portano alla generazione di quantità minime di trombina. Si innesca poi un meccanismo di propagazione che porta alla attivazione del fattore XI da parte della stessa trombina, il fattore XIa attiverà poi il fattore IX, per altro già attivato dallo stesso FT-fattore VIIa. La trombina è anche responsabile dell'attivazione dei co-fattori non enzimatici VIII e V. Il coinvolgimento dei fattori VIIIa e IXa, porta ad una generazione massiccia di fattore Xa che contribuisce poi in misura determinante ed in cooperazione con il fattore Va alla generazione di ulteriore trombina, capace della conversione fibrinogeno-fibrina¹. Questa moderna visione, nega il contributo dei fattori della fase di contatto² nella generazione della trombina in vivo e spiega quello che per anni è stato un paradosso, e cioè il prolungamento del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT)

nei carenti dei fattori della fase di contatto (fattore XII, pre-callicreina e chininogeno ad alto peso molecolare), a fronte di una storia emorragica negativa. Evidentemente i fattori della fase di contatto funzionano solo in vitro nell'APTT, mentre la loro funzione in vivo è da ricercare probabilmente altrove^{2,3}.

Tutto ciò comporta che un paziente con carenza di uno dei fattori della fase di contatto sarà identificato con l'APTT, ma questa identificazione avrà poi scarsa rilevanza pratica, perché il paziente dal punto di vista dell'emostasi sarà asintomatico. Poiché non è possibile prescindere dall'APTT come test di screening per le malattie emorragiche, si capisce allora come il laboratorio debba essere messo nelle condizioni di eseguire una diagnostica di secondo livello per stabilire la causa del prolungamento dell'APTT. In questo articolo è riportata una recente esperienza relativa alla identificazione di un paziente con carenza di pre-callicreina.

Materiali e Metodi

Reagenti

I reagenti usati per l'APTT e la loro composizione sono elencati nella tabella I. Per la rilevazione del coagulo, oltre al metodo manuale, sono stati usati i co-

agulometri MLA Electra 1800C e ACL (IL, Milano, Italia). I plasmi carenti per la determinazione dei singoli fattori sono stati forniti da IL (XII, XI, IX e VIII) e da George King Bio-Medical, Inc., Overland Park, KS 66210-4192 USA (pre-callicreina).

Descrizione del caso

Paziente maschio di 52 anni ricoverato presso il reparto di Neurochirurgia per intervento programmato di ernia discale lombare. Lo screening pre-operatorio per l'emostasi documenta un marcato prolungamento dell'APTT (187 sec.; v.n. < 37 sec.), il tempo di protrombina (PT) è normale. L'anamnesi per storia emorragica è negativa, anche se il paziente riferisce di essere stato sottoposto a interventi chirurgici ed estrazioni dentarie. L'esame dei test di emostasi in occasione di precedenti ricoveri non è possibile per la mancanza di referti, ma il paziente riferisce di occasionali riscontri di APTT variamente prolungati, ma anche normali, in precedenti occasioni.

Studio di Laboratorio (I livello)

A scopo precauzionale è chiesto al reparto un secondo prelievo per escludere la presenza accidentale di eparina nel campione. I test sul secondo campione confermano i precedenti. L'APTT, eseguito su una miscela 1:1 (plasma normale:plasma paziente) senza incubazione, risulta normale (31.9 sec.; v.n. < 37 sec.) e porta a concludere per una carenza di uno o più fattori di pertinenza dell'APTT come probabile causa del prolungamento del test.

Si procede quindi al dosaggio dei singoli fattori interessati, che sono tutti nella norma (XII, 93%; XI, > 100%; IX, > 100%; VIII, 85%). Ulteriori indagini per valutare la capacità del plasma normale di correggere il difetto documentano come quest'ultimo sia completamente corretto con una quantità di plasma normale pari all'1%.

Studio di Laboratorio (II livello)

L'esame della storia clinica e dei dati di laboratorio portano ad ipotizzare una carenza di uno dei fattori della fase di contatto (pre-callicreina, o chininogeno ad alto peso molecolare). Non disponendo di plasmi carenti per il dosaggio, si procede preventivamente nelle indagini con l'APTT eseguito allungando progressivamente i tempi di incubazione, prima dell'aggiunta del calcio cloruro. In un secondo momento si misurano i livelli di pre-callicreina con metodo coagulatorio e si studia l'APTT del paziente con altri reagenti del commercio.

Tabella I. Composizione dei reagenti APTT

Reagente	Composizione
Synthasil (IL)	Silice colloidale + fosfolipidi sintetici
Synthafax (IL)	Acido ellagico + fosfolipidi sintetici
APTT-SP (IL)	Silice + fosfolipidi sintetici
STA-APTT-LT (Stago)	Silice cristallina + fosfolipidi coniglio
Automated APTT (BioMerieux)	Silice micronizzata + fosfolipidi coniglio

Risultati

Lo studio di secondo livello con diversi reagenti APTT del commercio rivela una certa eterogeneità di comportamento (tabella II). Il reagente più sensibile al difetto è il Synthasil, seguito dall'APTT-SP, mentre il Synthafax, lo STA-APTT-LT e l'Automated APTT danno risultati pressochè normali (tabella II). I risultati dell'APTT eseguito dopo prolungamento dei tempi di incubazione con due diversi reagenti del commercio sono riportati nella figura 1. Con ambedue i reagenti si nota un progressivo accorciamento dei tempi di coagulazione all'aumentare del tempo di incubazione. L'accorciamento è più marcato per il Synthasil, meno per l'APTT-SP. Con il primo reagente l'APTT si normalizza dopo 20 minuti di incubazione (figura 1).

Tabella II. Risultati APTT

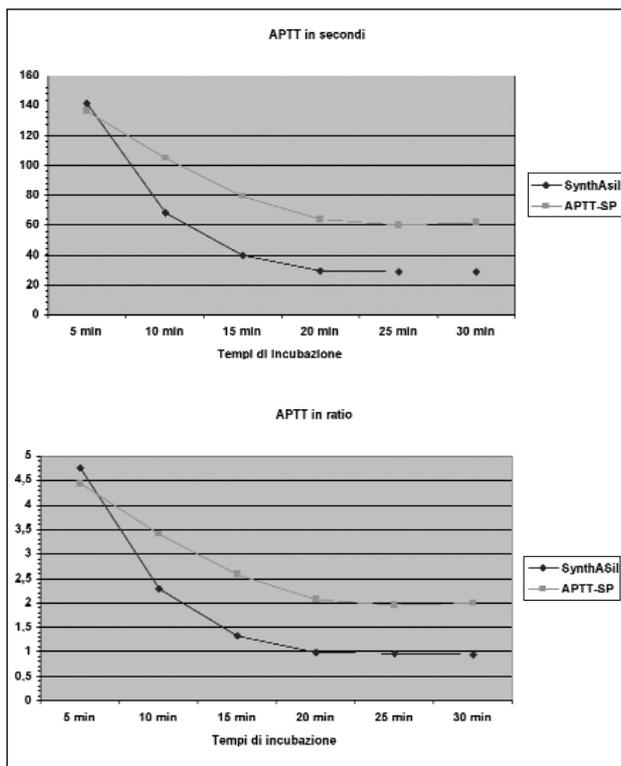
Reagente	Secondi	Rapporto (paziente/normale)
Synthasil (IL)	176.0	5.9
Synthafax (IL)	23.6	1.1
APTT-SP (IL)	151.5	4.9
STA-APTT-LT (Stago)	26.9	1.03
Automated APTT (BioMerieux)	43.5	1.07

La misura della pre-callicreina viene eseguita allestendo una curva dose-risposta mediante 5 diluizioni scalari di un pool di plasmi normali da 1:10 (100%) a 1:6250 (0.6%) e due diluizioni del plasma paziente (1:5 e 1:25) in tampone Imidazolo 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.35. La misura è eseguita con il reagente Synthasil e tecnica manuale con le seguenti modalità: plasma paziente o pool normale diluito 0.1 ml, plasma carente 0.1 ml, reagente APTT 0.1 ml, dopo incubazione per 5 minuti, 0.1 ml Calcio Cloruro (preriscaldato a 37°C) e rilevazione del coagulo. Le curve dose-risposta (semi-log) per il pool ed il paziente, documentano linearità e parallelismo accettabili, presupposto per poter determinare l'attività della precallicreina mediante il metodo di calcolo per rette parallele⁴. L'attività risulta di 0.2% rispetto al pool assunto come 100%.

Discussione

Il riscontro di un APTT prolungato in assenza di storia clinica per pregresse emorragie, soprattutto in seguito ad interventi chirurgici e/o estrazioni dentarie, è tipico delle carenze congenite dei fattori della fase di contatto della coagulazione quali il fattore XII, la pre-callicreina ed il chininogeno ad alto peso molecolare. In questi pazienti sovente l'APTT è prolungato a livelli superiori a quelli riscontrati nell'emofilico grave e pone seri problemi al chirurgo che, in assenza di uno studio approfondito sulle cause della carenza, non esegue l'intervento chirurgico programmato. Dal punto di vista clinico e di laboratorio l'e-

Figura 1. Relazione fra l'APTT (secondi e rapporto) e il tempo di incubazione prima dell'aggiunta del calcio cloruro.



sperienza qui riportata si presta ad almeno quattro considerazioni.

Primo. Emerge la necessità di un costante dialogo fra il laboratorio di emostasi ed il medico (nel caso specifico il chirurgo). Le informazioni che il laboratorio fornirà non si possono limitare al mero risultato. D'altro canto il medico non si può limitare a chiedere un risultato numerico, ma deve formulare una richiesta precisa, indirizzando l'iter diagnostico del laboratorio.

Secondo. Il laboratorio (anche quello di un ospedale generale) deve essere messo nelle condizioni di eseguire indagini approfondite di secondo livello per accertare la natura della carenza in tempi brevi e tranquillizzare il chirurgo. Dal punto di vista pratico l'accertamento diagnostico "fine" in casi come questo non sarebbe sempre strettamente necessario, se fosse nota con certezza la storia clinica del paziente. Un paziente con storia negativa anche dopo interventi chirurgici (come appunto il paziente in oggetto), che si presenta isolatamente con un APTT prolungato, suggerisce una carenza di uno dei fattori della prima via di contatto e, secondo taluni, non necessiterebbe di ulteriori approfondimenti. Tuttavia, la cautela è d'obbligo ed è in ogni caso preferibile arrivare ad una diagnosi certa.

Terzo. Il difetto di pre-callicreina non è messo in evidenza con certezza da tutti i reagenti APTT del commercio⁵. La composizione del reagente non solo in termini di attivatore, ma anche in termini di fosfolipidi, o la combinazione dei due gioca un ruolo importante nella risposta del test al difetto. A questo bisogna anche aggiungere il ruolo dello strumento. Pertanto, non è possibile fornire elementi certi sulla scelta dei reagenti più sensibili al difetto di pre-callicreina. Fra l'al-

tro, queste considerazioni spiegano il riscontro occasionale riportato dal nostro paziente di APTT variamente prolungati, o normali in occasione di precedenti ricoveri. A supporto e spiegazione della eterogeneità di risposta dei reagenti del commercio bisogna anche considerare che bastano anche quantità minime di pre-callicreina per normalizzare l'APTT, come dimostrato dalla correzione del tempo di coagulazione da parte del plasma normale quando aggiunto al plasma paziente anche a livelli dell'1%.

Quarto. Qualora non fosse disponibile il plasma carente, informazioni utili sulla probabile carenza di pre-callicreina possono essere desunte da semplici esperimenti di allungamento dei tempi di incubazione dell'APTT. La (quasi) normalizzazione dei tempi di coagulazione dopo 20 minuti di incubazione sembra essere una caratteristica della carenza di pre-callicreina⁶, anche se ci sono scarse informazioni sul comportamento in analoghi esperimenti dei plasmi carenti di chinogeno ad alto peso molecolare.

In effetti, il paziente in oggetto è stato operato con successo e senza conseguenze emorragiche due giorni dopo il ricovero, quando ancora il dosaggio specifico della pre-callicreina non era disponibile.

La spiegazione probabile dell'accorciamento del tempo di coagulazione in vitro è che il prolungamento del tempo di incubazione possa portare ad un livello ottimale di attivazione del fattore XII anche in assenza della pre-callicreina.

La carenza di pre-callicreina è in generale una evenienza assai rara, tuttavia, il caso qui descritto è il secondo giunto alla nostra osservazione in poco tempo. I dati di laboratorio nei due pazienti erano molto simili ed i due non avevano apparentemente nessuna relazione di parentela.

In conclusione, l'esperienza suggerisce come anche il laboratorio di un ospedale generale possa risolvere problemi diagnostici di media complessità in tempi relativamente brevi e con metodi diagnostici semplici.

Bibliografia

1. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003; 1:1504-14.
2. Schmaier AH. Contact activation: a revision. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 101-7.
3. Colman RW. Biologic activities of the contact factors in vivo-potential of hypotension, inflammation, and fibrinolysis, and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999; 82:1568-77.
4. Hardisty RM, Ingram GIC. *Bleeding disorders, Investigation and Management.* Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1965. pp 295.
5. Entes K, La Duca FM, Tourbaf KD. Fletcher factor deficiency. Source of variations of the activated partial thromboplastin time test. *Am J Clin Pathol* 1981; 75:626-8.
6. Asmis LM, Sulzer I, Furlan M, Lammle B. Prekallikrein deficiency: the characteristic normalization of the severely prolonged aPTT following increased preincubation time is due to autoactivation of factor XII. *Thromb Res.* 2002; 105:463-70.