

REVIEW

I NUOVI ANTICOAGULANTI ORALI ED IL LABORATORIO: UNA SINTESI SEMPLICE PER IL NON-ESPERTO

New oral anticoagulants and laboratory: a user friendly guide for non-experts

ROSANNA ABBATE, MD, MADDALENA PAZZI, MD, RITA PANICCIA, BSC, AGATINA ALESSANDRELLO LIOTTA, BSC, ROSSELLA MARCUCCI, MD PHD

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Firenze

SUMMARY

Recently, therapeutic options for patients who need anticoagulation therapy have been extended for the introduction of the new oral anticoagulants (NOACs). NOACs may be prescribed for the prevention of ischemic stroke and systemic embolism in patients with non-valvular AF and for treatment and prophylaxis of venous thromboembolism. NOACs are as effective as the vitamin K antagonists (VKA) but they offer better safety features. They are associated with a lower risk of major bleeding; in particular they reduce the risk of intra-cerebral bleeding. These drugs, which are administered at a fixed dose and whose effectiveness does not need a laboratory monitoring, are characterized by a rapid onset of action, rapid elimination and a more predictable pharmacokinetics than the VKA. In some clinical situations, it might be useful to know the status of coagulation levels or the plasmatic drug concentration. For this, we can use two kind of tests; qualitative tests (aPTT and PT) which can be quickly performed in all laboratories and quantitative tests (DTT, ECT, ANTI-FXa activity) that can be used to measure the plasma concentration of the drug. Test sensitivity (PT and aPTT) is variable according to the type of the drug and to the reagent used for its execution; for this reason it is essential for all laboratories to define the sensitivity of the clotting test used and to share this information with the clinicians.

Keywords: *New oral anticoagulants, PT, aPTT, anti-FXa activity, clinical interpretation of laboratory testing, calibration.*

Introduzione

Da alcuni anni, la scelta terapeutica in presenza dell'indicazione ad un anticoagulante orale, si è ampliata grazie all'introduzione dei cosiddetti **Nuovi Anticoagulanti Orali (NAO)**.

Indirizzo per la corrispondenza

Maddalena Pazzi
Azienda Ospedaliero
Universitaria Careggi
Largo Brambilla, 3 - 50134 Firenze
Email: maddalena.pazzi@gmail.com

Tali farmaci, a parità di efficacia clinica, dimostrata sia nei pazienti con Fibrillazione Atriale Non Valvolare (FANV) che in quelli affetti da Tromboembolismo Venoso, presentano profili di sicurezza migliori rispetto ai precedenti antagonisti della vitamina K (AVK); i NAO si sono dimostrati infatti associati ad un rischio di sanguinamento generale, ed in particolare cerebrale, più basso (1-4).

I NAO attualmente prescrivibili in Italia sono i seguenti:

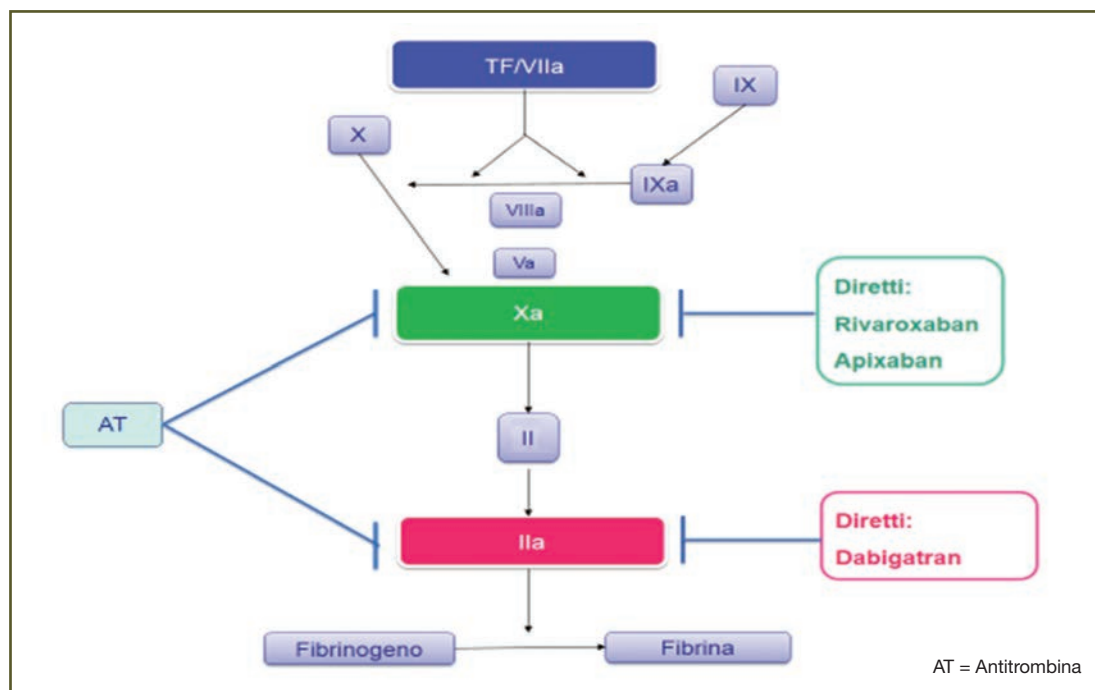


Figura 1 - Cascata coagulativa e bersagli dei NAO.

- **Dabigatran**, inibitore diretto della trombina.
- **Rivaroxaban ed Apixaban**, entrambi inibitori diretti del FXa (*Figura 1*).

Allo stato attuale, le indicazioni per cui i NAO sono stati approvati in Italia sono costituite da (*Tabella 1*):

- Prevenzione dell'ictus e dell'embolia sistemica in pazienti affetti da Fibrillazione Atriale Non Valvolare (1, 2, 4).
- Trattamento della TVP associata o meno ad Embolia Polmonare (3).
- Prevenzione primaria di episodi tromboembolici in pazienti adulti sottoposti a chirurgia sostitutiva elettiva totale dell'anca o del ginocchio (5, 6).
- Prevenzione di eventi aterotrombotici in pazienti dopo una sindrome coronarica acuta (SCA) con biomarcatori cardiaci elevati, somministrato insieme con acido acetilsalicilico (ASA) o con ASA e clopidogrel o ticlopidina (7, 8).

Tabella 1 - Indicazioni alla terapia anticoagulante con i NAO.

Prevenzione dell' ictus e dell' embolia sistemica in pazienti affetti da fibrillazione atriale non valvolare.	- Dabigatran - Rivaroxaban - Apixaban
Trattamento della TVP associata o meno ad embolia polmonare.	- Rivaroxaban
Prevenzione primaria di episodi tromboembolici in pazienti adulti sottoposti a chirurgia sostitutiva elettiva totale dell'anca o del ginocchio.	- Dabigatran - Rivaroxaban - Apixaban
Prevenzione di eventi aterotrombotici in pazienti adulti dopo una sindrome coronarica acuta (SCA) con biomarcatori cardiaci elevati, somministrato insieme con acido acetilsalicilico (ASA) o con ASA e clopidogrel o ticlopidina.	- Rivaroxaban

In *Tabella 2* sono riportate le principali caratteristiche farmacodinamiche e cinetiche dei diversi NAO.

La farmacocinetica dei NAO è più prevedibile rispetto a quella degli AVK (warfarin,

Tabella 2 - Caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche dei NAO.

Proprietà	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban
Target	F IIa (trombina)	F Xa	
Biodisponibilità %	6,5	66	50
Cmax (ore)	0,5-2	2-4	3-4
Emivita (ore)	12-14	11-13	12
Posologia	BID	OD	BID
Escrezione renale	85%	36%	27,00%
Metabolismo	P-gp	P-gp e Cyp 3A4	P-gp e Cyp 3A4

acenocumarolo), il loro dosaggio è fisso, e non è necessario monitorarne l'effetto anticoagulante né misurarne la concentrazione plasmatica.

Per la determinazione dell'effetto anticoagulante dei NAO sono disponibili 2 tipi di test:

- 1) **test qualitativi** quali il tempo di protrombina (**PT**) e il tempo di tromboplastina parziale attivata (**aPTT**);
- 2) **test quantitativi** quali il tempo di trombina diluito (**dTT**), la valutazione dell'attività anti Fattore X attivato (**anti-FXa**) e il tempo di ecarina (**ECT**).

I TEST QUALITATIVI sono disponibili in tutti i laboratori, sono di rapida esecuzione ed in situazioni di emergenza offrono indicazioni sullo stato coagulativo del paziente. Questi test non offrono indicazioni sulla concentrazione plasmatica del farmaco.

I TEST QUANTITATIVI possono essere utilizzati per valutare la concentrazione plasmatica del farmaco mediante la determinazione dell'effetto antitrombinico per dabigatran ed anti-FXa per rivaroxaban ed apixaban. I test sono eseguibili in circa 30 minuti ma la loro disponibilità non è presente al momento in tutti i laboratori.

Lo spettrofotometro di massa HPLC-tandem è in grado di misurare direttamente la concentrazione plasmatica della molecola anticoagulante. Il test è disponibile in un numero limitato di laboratori e non rap-

presenta una metodologia applicabile nella pratica clinica.

Per l'ampia disponibilità dei test qualitativi, PT e aPTT, è importante, per il clinico, che vengano definite le variazioni dei test in corso di somministrazione dei NAO. Differenti studi hanno dimostrato la loro sensibilità all'effetto anticoagulante dei NAO, anche se in misura variabile in base sia al farmaco somministrato sia al reagente utilizzato per l'esecuzione del test. In assenza di una diffusa esperienza clinica consolidata circa la gestione dei nuovi anticoagulanti che in Italia sono disponibili solo da circa 1 anno, nella pratica clinica l'uso di questi test può essere utile solo per escludere concentrazioni plasmatiche eccessivamente alte o eccessivamente basse del farmaco.

Essenziale nella valutazione dei test è conoscere il tempo intercorso tra l'ultima assunzione del farmaco e il prelievo ematico. In situazioni cliniche di emergenza, qualora non si possa procedere al dosaggio quantitativo della concentrazione plasmatica del farmaco, PT e aPTT possono offrire indicazioni utili per decisioni sia in ambito medico, in relazione per es. alla somministrazione di terapia sostitutiva, sia in ambito chirurgico, in relazione per es. alla tempistica di un intervento.

In questa iniziale fase di rapida diffusione dei NAO, emerge evidente la necessità che tutti i laboratori valutino la sensibilità

dei propri reagenti (comparando i risultati dei propri test di PT e aPTT con specifici calibratori plasmatici) al fine di fornire al clinico una corretta interpretazione del test coagulativo.

Dabigatran

Dabigatran etexilato è un pro-farmaco che dopo somministrazione orale viene convertito mediante idrolisi a livello plasmatico ed epatico in dabigatran e trasformato in un potente inibitore diretto, competitivo e reversibile della trombina. Dabigatran è dunque il principio attivo presente nel plasma. (Tabella 2).

La dose raccomandata per la prevenzione del TEV in pazienti sottoposti a chirurgia sostitutiva elettiva totale dell'anca o del ginocchio è di 220 mg/die, ridotta a 150 mg/die in pazienti con insufficienza renale moderata (ClCr 30-50 mL/min), età >75 anni e/o che assumono contemporaneamente farmaci inibitori potenti della Glicoproteina P (ad es. antimicotici azolici per via sistemica, ciclosporina, tacrolimus, dronedarone).

La dose raccomandata per la prevenzione dell'ictus ischemico in pazienti fibrillanti è di 150 mg per 2 volte al giorno, ridotta a 110 mg/bid in caso di età >80 anni ed in caso di aumentato rischio di sanguinamento. La massima concentrazione nel plasma (picco - Cmax) è raggiunta dopo circa 2 ore dall'assunzione. In particolare gli studi di farmacocinetica hanno osservato che in pazienti che assumono Dabigatran 150 mg/bid, la media geometrica della concentrazione massima è pari a 175 ng/mL con range 117-275 ng/mL (25°-75° percentile). Per la concentrazione minima invece (valle - Cthrough), dopo 12 ore dall'ultima assunzione, la media geometrica delle concentrazioni è pari a 91 ng/mL con range tra 61 e 143 ng/mL (25°-75° percentile) (Tabella

3) (9). La concentrazione massima (Cmax) e l'area sotto la curva concentrazione plasmatica/tempo risultano proporzionali alla dose somministrata.

L'emivita misurata in soggetti sani che abbiano assunto dosi multiple di dabigatran, è di 12-14 h; l'emivita è indipendente dalla dose somministrata. Col peggioramento della funzione renale si osserva un progressivo allungamento dell'emivita, che raggiunge le 27 ore quando la Clearance della Creatinina (ClCr) si riduce sotto i 30 mL/min (Tabella 2).

Test qualitativi (Tabella 4)

L'aPTT, espresso in termini di **ratio**, è un test qualitativo diffusamente disponibile e di rapida esecuzione, che offre un'indicazione sullo stato di anticoagulazione del paziente ma che non dà informazioni riguardo la concentrazione del farmaco (10, 11). In studi di farmacocinetica è stato dimostrato che l'aPTT è influenzato da dabigatran alle basse e alle medie concentrazioni plasmatiche misurate a valle.

L'allungamento dell'aPTT è lineare fino a concentrazioni plasmatiche ≤ 200 ng/mL; oltre tali livelli la curva raggiunge un plateau. In pazienti che assumono dabigatran (150 mg/bid), l'aPTT mediano misurato al momento della concentrazione di picco (quando la Cmax media è pari a 175 ng/mL) risulta prolungato di circa 2 volte rispetto ai controlli; a valle (quando la Cthrough media è pari a 91 ng/mL), l'aPTT è prolungato di circa 1,5 volte rispetto ai controlli (Tabella 3) (12-14).

La variabilità del risultato dell'aPTT in rapporto al reagente utilizzato per eseguire il test, raggiunge livelli dell'ordine del 10% (13-15); l'espressione del risultato in termini di ratio (aPTT paziente/aPTT normale) anziché di secondi riduce pertanto la variabilità del test. Studi che hanno valuta-

Tabella 3 - Concentrazioni a valle e a picco ed influenza sui test coagulativi.

	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban
Concentrazione plasmatica a valle (mediana e range, 25°-75° percentile)	91 ng/mL (61 - 143 ng/mL) 12-14 h dopo l'ingestione	32 ng/mL [6-239 ng/mL] 16-24 h dopo l'ingestione	103 ng/mL [41 - 230 ng/mL] 12-24 h dopo l'ingestione
Risposta del test	aPTT aumentato circa 1,5 volte limite superiore	–	Attività anti-FXa pari a circa 1,5 UI/ml
Concentrazione plasmatica a picco (mediana e range, 25°-75° percentile)	175 ng/mL [117-275 ng/mL] circa 2h dopo l'ingestione	215 ng/mL [22-535 ng/mL] 2-4 h dopo l'ingestione	171 ng/ml [91 - 321 ng/mL] 1-4 h dopo l'ingestione
Risposta del test	aPTT aumentato circa 2 volte limite superiore	PT aumentato circa 1,5 volte il limite superiore	Attività anti-FXa pari a circa 2,6 UI/ml

to la variabilità dei risultati di aPTT, in base ai reagenti utilizzati, hanno dimostrato che concentrazioni plasmatiche di farmaco eccessivamente basse (circa 10 ng/mL) si associano a valori di aPTT ratio nella norma ($\leq 1,2$).

È stato osservato che valori di aPTT ratio $>2,5$ possono indicare una concentrazione sopra-terapeutica (≥ 400 ng/mL) del farmaco (Tabella 3) (10).

Il tempo di protrombina (PT) è scarsamente influenzato da dabigatran. Alla

concentrazione di 100 ng/mL, il PT rimane entro il range di normalità; è stata verificata una grande variabilità in base al reagente utilizzato (10, 14, 16).

Test quantitativi (Tabella 4)

Il dTT con metodo Hemoclot e l'ECT sono test in grado di valutare la concentrazione del farmaco attraverso la misura dell'effetto antitrombinico. Il dTT eseguito con metodica Hemoclot*, che confronta

Tabella 4 - Modificata da EHRA. Interpretazione dei test coagulativi.

Test	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban
PT	non indicato	Prolungamento: può indicare un aumento del R di sanguinamento (necessaria una calibrazione locale)	non indicato
aPTT	a valle: >2 volte il limite superiore suggerisce un aumento del R di sanguinamento	non indicato	non indicato
anti-FXa	non utilizzabile	Quantitativo: non ancora dati a disposizione riguardo i valori soglia associati ad aumentato R di trombosi/sanguinamento	Quantitativo: non ancora dati a disposizione riguardo i valori soglia associati ad aumentato R di trombosi/sanguinamento
dTT	a valle: >200 ng/ml 0 >65 sec, aumento R sanguinamento	non indicato	non indicato
ECT	a valle: ≥ 3 volte il limite superiore, aumento R sanguinamento.	non influenzato	non utilizzabile
INR	da non utilizzare	da non utilizzare	da non utilizzare

i tempi di coagulazione del paziente con quelli di una curva di calibrazione in presenza di concentrazioni note del farmaco, mostra una relazione lineare con la concentrazione plasmatica del farmaco fino a valori pari 500 ng/mL. La sensibilità del metodo è elevata anche per concentrazioni plasmatiche molto basse dell'ordine di 0 ng/mL (10, 17-19) e attualmente risulta essere il metodo più accurato per misurare la concentrazione del farmaco.

Dall'esperienza clinica tratta dai pazienti arruolati nello studio RELY, è stato osservato che la frequenza degli eventi emorragici maggiori raddoppia nella popolazione in cui sia stata misurata una concentrazione al punto valle (C_{through}) superiori a 200 ng/mL (20).

L'ECT è un test sensibile e correlato in modo lineare fino a concentrazioni pari a 500 ng/mL ma non disponibile in maniera diffusa (10, 17, 18).

Oltre ai test menzionati, che rappresentano quelli studiati, riportiamo anche il tempo di coagulazione attivato (ACT), test bedside utilizzato soprattutto in cardiologia interventistica. I dati a disposizione circa l'utilizzo di questo test per la determinazione dell'attività anticoagulante di dabigatran sono molto limitati. È stata riportata una relazione fra concentrazione del farmaco e risposta del test di tipo lineare fino a concentrazioni di 250 ng/mL. Oltre questo valore, la curva che descrive tale relazione perde la linearità e tende ad appiattirsi per concentrazioni molto elevate (≥ 500 ng/mL) (12, 13).

Il **tempo di trombina (TT)** è un test sensibile all'effetto antitrombinico di dabigatran. Alla concentrazione di picco (175 ng/mL) misurata in soggetti che assumono dabigatran 150 bid risulta prolungato anche di 10 volte rispetto al valore basale, quindi un TT nel range di normalità esclude la presenza di effetto anticoagulante di

dabigatran (10, 13, 17, 18).

I test basati sull'inibizione del fattore Xa non sono influenzati da dabigatran.

Conclusioni per dabigatran (Tabella 5)

- L'aPTT è influenzato sensibilmente da Dabigatran anche alle basse concentrazioni plasmatiche, ma non fornisce indicazioni sulla concentrazione del farmaco. È necessario che ogni laboratorio definisca la sensibilità del reagente impiegato a dabigatran.
- I risultati dell'aPTT devono essere espressi come ratio allo scopo di ridurre la variabilità associata all'utilizzo di differenti reagenti. (aPTT paziente/ aPTT soggetto normale).
- Il PT è poco sensibile a dabigatran e i risultati ottenuti risultano fortemente influenzati dal tipo di reagente utilizzato.
- DTT ed ECT sono in grado di misurare la concentrazione plasmatica di dabigatran.

Rivaroxaban

Rivaroxaban è un inibitore diretto, competitivo e reversibile del fattore Xa. Circa i 2/3 della dose somministrata subiscono una degradazione metabolica; una metà viene eliminata per via renale e l'altra metà per via fecale. Il restante 1/3 della dose somministrata viene eliminato immutato come principio attivo direttamente nelle urine (Tabella 1).

Nella profilassi del tromboembolismo venoso, in pazienti sottoposti a chirurgia di sostituzione elettiva di anca o di ginocchio, la dose giornaliera raccomandata è di 10 mg/die.

A scopo terapeutico, la dose raccomandata è di 15 mg/bid nei primi 21 giorni di terapia da ridurre poi a 20 mg/die, in

Tabella 5 - Effetti di Dabigatran sui test coagulativi.

Caratteristiche	PT/INR	aPTT	ECT	TT	DTT (hemoclot)	Anti-FXA
Sensibilità alla presenza plasmatica	Bassa	Moderata	Alta	Molto Alta	Alta	-*
Correlazione con la concentrazione	Moderata	Moderata	Forte	Moderata	Forte	-*
Relazione dose/risposta	Lineare	Curvilinea	Lineare	Curvilinea	Lineare	-*
Utilità clinica	Limitata	Valori normali suggeriscono concentrazioni plasmatiche molto basse	Potenzialmente utilizzabile per il monitoraggio	Valori normali escludono la presenza di farmaco nel plasma	Potenzialmente utilizzabile per il monitoraggio	-*

*- = non influenzato dal farmaco somministrato.

un'unica somministrazione, a partire dal 22° giorno. Per la prevenzione dell'ictus ischemico e dell'embolia sistemica in pazienti con FA non valvolare, la dose raccomandata è 20 mg al giorno, da ridurre a 15 mg in caso di clearance della creatinina tra 15 e 50 mL/min. La massima concentrazione plasmatica è raggiunta dopo 2-4 ore dall'assunzione. Gli studi di farmacocinetica condotti sui pazienti arruolati nello studio Einstein DVT (3) hanno mostrato che, in pazienti che assumono rivaroxaban 20 mg/die per la terapia della TVP, la media geometrica delle concentrazioni raggiunte dopo 2-4 h e dopo 24 h dall'assunzione sono rispettivamente 215 ng/mL (range tra 22-535 ng/mL) e 32 ng/mL (range 6-239 ng/mL) (Tabella 3) (3, 21).

Test qualitativi (Tabella 4)

Il PT è un test qualitativo diffusamente disponibile e di rapida esecuzione che offre un'indicazione sullo stato di anticoagulazione del paziente in terapia con rivaroxaban, ma che non fornisce informazioni riguardo la concentrazione del farmaco.

Studi di farmacocinetica hanno mostrato che esiste una relazione lineare tra allungamento del PT e concentrazione plasmatica

del farmaco; la linearità si mantiene per un ampio spettro di concentrazioni. Per concentrazioni di farmaco pari a 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL e 700 ng/mL, il PT ratio risulta pari a 1,15, 1,27, 1,50, 1,76 e 2,76 rispettivamente (16, 22-25).

Esiste un'ampia variabilità di risposta inter-laboratorio in termini di allungamento del PT in base al reagente utilizzato per l'esecuzione del test (16, 24, 26, 27). Per questo motivo il modo più accurato per esprimere i risultati del PT è la ratio che valuta l'allungamento del PT del paziente rispetto al PT di un soggetto normale. Tale metodo permette di ridurre la variabilità causata dalle differenti tromboplastine.

Il PT/INR che si applica per il monitoraggio della terapia con AVK, costituisce un'espressione del risultato non idonea alla valutazione dell'effetto anticoagulante di rivaroxaban (Tabella 4) (22-25).

L'aPTT è influenzato da rivaroxaban ma con scarsa sensibilità per le basse concentrazioni di farmaco (<50 ng/mL). Gli studi di farmacocinetica hanno dimostrato che in pazienti che ricevono rivaroxaban 20 mg/die, alla concentrazione di picco, l'aPTT ratio può risultare prolungato di circa 1,5-2 volte mentre a valle l'aPTT ratio può rimanere nei limiti della norma (16, 27, 28).

Test quantitativi (Tabella 4)

La misura dell'attività anti Xa consente di valutare la concentrazione del farmaco, facendo riferimento ai valori ottenuti da una curva di calibrazione in presenza del farmaco a concentrazioni note; studi di farmacocinetica hanno osservato che la curva dose/risposta è lineare fino a 500 ng/mL (samama 2010).

Il test risulta sensibile a rivaroxaban a partire da 20 ng/mL fino a 660 ng/mL, intervallo che copre lo spettro atteso dei livelli plasmatici di rivaroxaban dopo somministrazione di dosi terapeutiche (14, 16, 28-30).

Al momento questo test non è disponibile in tutti i laboratori (Tabella 4). Il **TT** e il **tempo di ecarina (ECT)** (28) non risultano influenzati dalla presenza di rivaroxaban nel plasma.

Conclusioni per rivaroxaban (Tabella 6)

- Il PT è influenzato sensibilmente da rivaroxaban e vi è una relazione lineare tra il suo allungamento e la concentrazione plasmatica. È necessario che ogni laboratorio definisca la sensibilità del

reagente impiegato per l'esecuzione del PT in risposta a rivaroxaban.

- I risultati del PT devono essere espressi come ratio (PT secondi paziente /PT secondi soggetto normale) allo scopo di ridurre la variabilità associata all'utilizzo di differenti reagenti.
- Il PT / INR non deve essere utilizzato per valutare l'attività anticoagulante di rivaroxaban.
- L'aPTT è influenzato da rivaroxaban ma con scarsa sensibilità.
- Il dosaggio dell'attività anti-FXa è in grado di misurare la concentrazione plasmatica di rivaroxaban.

Apixaban

Apixaban è un potente inibitore orale, reversibile, diretto e altamente selettivo del sito attivo del fattore Xa. Apixaban inibisce il FXa libero e quello legato al coagulo.

Apixaban ha molteplici vie di eliminazione; della dose somministrata nell'uomo, circa il 25% è stata rilevata come metaboliti, per la maggioranza fecali. L'escrezione renale rappresenta circa il 27% della clearance totale.

Apixaban è eliminato anche per via biliare ed intestinale diretta. Apixaban ha una clearance totale di circa 3,3 l/h e un'em-

Tabella 6 - Effetti di Rivaroxaban sui test coagulativi.

Caratteristiche	PT/INR	aPTT	ECT	TT	DTT (hemoclot)	Anti-FXA
Sensibilità alla presenza plasmatica	Moderata	Bassa	-*	-*	-*	Alta
Correlazione con la concentrazione	Alta	Bassa	-*	-*	-*	Alta
Relazione dose/risposta	Lineare	Lineare	-*	-*	-*	Lineare
Utilità clinica	Valori normali suggeriscono concentrazioni plasmatiche molto basse	Limitata	-*	-*	-*	Quantitativo: utilizzabile per il monitoraggio, ma non routinariamente disponibile

*- = non influenzato dal farmaco somministrato.

vita di circa 12 ore (*Tabella 2*). Per la prevenzione del TEV in pazienti sottoposti a chirurgia ortopedica di sostituzione di protesi di anca o di ginocchio, la dose raccomandata è di 2,5 mg bid. Per la prevenzione dell'ictus e dell'embolia sistemica in pazienti affetti da fibrillazione atriale non valvolare, la dose raccomandata è di 5 mg bid.

Dagli studi di farmacocinetica effettuati sui soggetti che hanno partecipato allo studio Aristotle (4), la C_{max} (misurata dopo 2 h dall'ultima assunzione) in pazienti affetti da FANV che assumevano apixaban alla dose di 2,5 mg/bid e 5 mg/bid era in media pari a 123 ng/mL con range tra 69 e 221 ng/mL, e pari a 171 ng/mL con range tra 91 e 321 ng/mL rispettivamente. La C_{min} (misurata a valle, dopo 12-24 h dall'ultima assunzione) era in media pari a 79 ng/mL con range tra 4 e 162 ng/mL e pari a 103 ng/mL con range tra 41 e 230 ng/mL rispettivamente (*Tabella 3*) (29).

Test qualitativi (*Tabella 4*)

Il PT correla in modo lineare con la concentrazione del farmaco ma il test è scarsamente sensibile ad apixaban. Studi di farmacocinetica hanno verificato che in presenza di concentrazioni plasmatiche di farmaco pari a 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 400 ng/mL, i risultati di PT ratio risultavano pari rispettivamente a 1,0±0,0, 1,1±0,0, 1,1±0,0, 1,2±0,0, 1,3±0,0 (30). Per concentrazioni misurate a picco oltre il 75° percentile, il PT ratio può risultare nella norma (PT<1,2).

L'aPTT è influenzato da apixaban in maniera modesta; si allunga in modo progressivo ma non lineare con l'aumentare della concentrazione del farmaco. In studi di farmacocinetica, alla concentrazione di 100 ng/mL, l'aPTT ratio è inferiore a 1,2. Un aPTT ratio nella norma è stato osser-

vato fino a concentrazioni plasmatiche di 400 ng/mL. Per concentrazioni comprese tra 500 ng/mL e 1000 ng/mL, l'aPTT ratio varia tra 1,3 e 1,4 (31, 32).

Test quantitativi (*Tabella 4*)

Il dosaggio dell'attività anti-FXa mostra un rapporto lineare diretto con la concentrazione plasmatica del farmaco. Tale relazione risulta lineare per un ampio range di concentrazioni compreso tra 2 e 500 ng/mL (sensibilità del metodo 2-9 ng/mL) (13, 14, 33); nei pazienti fibrillanti in apixaban (2,5 mg/bid) alla C_{max} si registra il picco di attività anti-FXa che risulta dell'ordine di 1,8 (1,0-3,3) UI/mL (29). Alla C_{min} invece la mediana dell'attività anti-FXa risulta dell'ordine di 1,2 (0,51-2,4) UI/mL.

La correlazione lineare che si mantiene per le basse e le alte concentrazioni plasmatiche rende i test anti-FXa metodiche sufficientemente accurate per la valutazione della concentrazione plasmatica di apixaban (31, 33). Il TT e il ECT non sono influenzati dalla somministrazione di apixaban.

Conclusioni per apixaban (*Tabella 7*)

- Il PT e l'aPTT sono influenzati da apixaban ma con scarsa sensibilità: le variazioni osservate per le concentrazioni del farmaco comprese tra il 25° e il 75° percentile sono di lieve entità ed entrambi i test presentano un'alta variabilità inter-laboratorio in base al tipo di reagente utilizzato.
- Il dosaggio dell'attività anti-Xa è un test sensibile ad apixaban, in grado di misurare la concentrazione plasmatica del farmaco.
- Il PT/INR non deve essere utilizzato per valutare l'attività anticoagulante di apixaban.

Tabella 7 - Effetti di Apixaban sui test coagulativi.

Caratteristiche	PT/INR	aPTT	ECT	TT	DTT (hemoclot)	Anti-FXA
Sensibilità alla presenza plasmatica	Bassa	Bassa	-*	-*	-*	Alta
Correlazione con la concentrazione	Bassa	Bassa	-*	-*	-*	Alta
Relazione dose/risposta	Lineare	Curvilinea	-*	-*	-*	Lineare
Utilità clinica	Limitata	Limitata	-*	-*	-*	Quantitativo: utilizzabile per il monitoraggio, ma non routinariamente disponibile

*- = non influenzato dal farmaco somministrato.

Test dell'emostasi che possono essere influenzati dai nao (34, 35)

La *tabella 8* mostra i test dell'emostasi che possono essere influenzati dall'assunzione dei NAO. L'attività della proteina S può risultare sovrastimata dalla presenza nel plasma di un NAO. Anche la misura della resistenza alla Proteina C attivata, può risultare influenzata dalla presenza dei NAO. In soggetti portatori di mutazione eterozigote del Fattore V di Leiden e in terapia con NAO, tale misura può risultare nella norma. In pazienti in terapia con rivaroxaban la concentrazione del fibrinogeno è sovrastimata quando questa è misurata

Tabella 8 - Altri test influenzati dai NAO.

	Dabigatran	Rivaroxaban	Apixaban
Proteina S (test funzionale)	↑↑	↑↑	↑
Proteina S (test immunologico)	-*	-*	-*
APCR	↑↑	↑	-*
Fibrinogeno (PT derivato)	-*	↑	-*
Fibrinogeno (metodo Clauss)	-*	-*	-*
Lupus Anticoagulant (LAC)	↑	↑	↑
Antitrombina	↑	↑	↑
Proteina C	↑↑	↑	↑

*- =Il test non è influenzato dalla somministrazione del NAO.

con test PT-derivati. Al contrario la misura del fibrinogeno secondo Clauss non viene alterata. Infine pazienti che sono in terapia anticoagulante con un NAO possono risultare falsi positivi alla ricerca di Lupus Anticoagulant (LAC).

Sebbene i range di concentrazione plasmatica misurata a picco e a valle dopo somministrazione dei NAO non rappresentino un'indicazione di intervallo terapeutico, in alcune situazioni cliniche può essere utile conoscere, insieme all'entità delle variazioni dell'assetto coagulativo (PT e aPTT), la concentrazione del farmaco:

1. Valutazione del rischio emorragico prima di procedure ad elevato rischio di sanguinamento sia chirurgiche (neurochirurgia) che mediche (es.trombolisi sistemica in corso di ictus ischemico).
2. Gestione degli episodi di sanguinamento maggiore; valutazione rapporto rischio/beneficio per l'utilizzo di concentrati pro-coagulanti, possibilità di ricorrere ad emodialisi (36).
3. Verifica della compliance, (seppur a breve termine data la breve emivita dei NAO), soprattutto in caso di comparsa di un evento ischemico in corso di terapia.
4. Valutazione del rischio di sanguinamento in caso di peggioramento della clearance della creatinina.
5. Pazienti con peso molto elevato (>100 kg) o molto ridotto (<50 kg).

6. Necessità di somministrare farmaci che interferiscono col metabolismo dei NAO.

Commento

1. I NAO non necessitano di un monitoraggio routinario della loro attività anticoagulante. I range terapeutici generalmente utilizzati per verificare la corretta gestione della terapia con warfarin (PT/INR), con eparina non frazionata (aPTT/attività anti-FXa) o EBPM (attività anti-FXa) NON devono essere applicati ai NAO.
2. PT e aPTT sono modificati dai NAO ma non indicano la concentrazione del farmaco.
3. I laboratori di analisi devono conoscere la sensibilità dei propri test di PT e aPTT ai nuovi anticoagulanti orali e dovrebbero condividere questa informazione con i clinici.
4. Una corretta interpretazione dei risultati ottenuti dai test qualitativi e quantitativi richiede la conoscenza dell'intervallo di tempo intercorso tra l'ultima assunzione del farmaco e il prelievo ematico.
5. La determinazione della concentrazione del farmaco può essere utile in alcune situazioni cliniche.
6. In considerazione della prevalente

escrezione renale dei NAO, è necessaria la valutazione della clearance della creatinina con cadenza personalizzata ma almeno annuale.

Prospettive future

I test qualitativi, rapidamente eseguibili in tutti i laboratori, sono sensibili all'attività anticoagulante dei NAO con risposta variabile in base al farmaco somministrato e al reagente impiegato per l'esecuzione del test stesso.

In quelle condizioni in cui potrebbe essere utile conoscere l'entità dell'effetto anticoagulante del farmaco, una limitazione al loro impiego è rappresentata dalla mancanza attuale di indicazioni circa la loro interpretazione. L'incertezza deriva sia dal fatto che non sono ancora a disposizione dati di real world che definiscano i "range" terapeutici, sia dalla mancanza di ampi studi di correlazione fra concentrazione plasmatica e risposta dei test qualitativi.

Nell'attesa che nuovi dati ci forniscano una chiave di lettura più precisa, è necessario che ciascun laboratorio definisca la sensibilità del proprio test qualitativo ai NAO così da poter utilizzare il dato che ne deriva per stimare l'effetto anticoagulante del farmaco.

Glossario

ACT: Tempo di coagulazione attivato.
Anti-FXa: Test cromogenico per la valutazione dell'attività anti Fattore X attivato.
aPTT: Tempo di tromboplastina parziale attivata.
ASA: Acido acetilsalicilico.
AVK: Antagonisti della Vitamina K.
ClCr: Clearance Creatinina.**
Cmax: Concentrazione plasmatica massima.
Cmin: Concentrazione plasmatica minima.
dTT: Tempo di trombina diluito.

ECT: Tempo di ecarina.
FANV: Fibrillazione Atriale Non Valvolare.*
NAO: Nuovi Anticoagulanti Orali.
PT: Tempo di protrombina.
SCA: Sindrome Coronarica Acuta.
TEV: Tromboembolismo venoso.
TT: Tempo di trombina.
TVP: Trombosi Venosa Profonda.

*Vedi definizione dell'European Society of Cardiology di Fibrillazione Atriale Non Valvolare.

**Calcolata con metodo di Cockcroft- Gault.

RIASSUNTO

Recentemente le opzioni terapeutiche, nel panorama dell'anticoagulazione, si sono ampliate grazie all'introduzione dei nuovi anticoagulanti orali diretti (NAO) indicati per la prevenzione dell'ictus ischemico e delle embolie sistemiche nei pazienti con fibrillazione atriale non valvolare e per la terapia e profilassi del tromboembolismo venoso. Tali farmaci a parità di efficacia clinica rispetto ai precedenti antagonisti della vitamina K (AVK), presentano profili di sicurezza migliori in quanto tutti si sono dimostrati associati ad un rischio di sanguinamento generale ed in particolare cerebrale inferiore. Peculiarità di questi nuovi farmaci che consentono di impiegare un dosaggio fisso e di non richiedere il monitoraggio dell'efficacia anticoagulante, sono il rapido inizio di azione, la rapida eliminazione e la farmacocinetica più prevedibile rispetto agli AVK. In alcune situazioni cliniche può essere tuttavia utile conoscere l'entità delle variazioni dell'assetto coagulativo o della concentrazione del farmaco. A tale scopo sono disponibili due tipologie di test: test qualitativi (aPTT e PT), eseguibili in tutti i laboratori, di rapida esecuzione e di possibile utilizzo in caso di emergenza e test quantitativi (dTT, ECT, attività ANTI-FXa) che possono essere utilizzati per misurare la concentrazione plasmatica del farmaco ma che non sono eseguibili in tutti i laboratori. La sensibilità dei test (PT e aPTT) risulta variabile in base al farmaco somministrato ed al tipo di reagente utilizzato per la sua esecuzione; per tale motivo è necessario che tutti i laboratori definiscano e condividano con i clinici la sensibilità ai NAO dei test coagulativi utilizzati.

Parole chiave: *Nuovi Anticoagulanti Orali, PT, aPTT, Dosaggio anti-FXa, Interpretazione, Calibrazione.*

Bibliografia

1. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J et al. RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1139-51.
2. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J et al. Rivaroxaban versus warfarin in non valvular atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011; 365: 883-91.
3. Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B et al. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *EINSTEIN Investigators.* *N Engl J Med.* 2010 Dec 23; 363: 2499-510. doi: 10.1056/NEJMoa1007903. Epub 2010 Dec 3.
4. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ et al. ARISTOTLE Committees and Investigators. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011; 365: 981-92.
5. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N et al. RENOVATE Study Group. Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet.* 2007; 370: 949-56.
6. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N et al. RE-MODEL Study Group. Oral dabigatran etexilate vs. subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 2178-85.
7. Mega JL, Braunwald E, Mohanavelu S et al. ATLAS ACS-TIMI 46 study group. Rivaroxaban versus placebo in patients with acute coronary syndromes (ATLAS ACS-TIMI 46): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet.* 2009; 374: 29-38.
8. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD et al. ATLAS ACS 2-TIMI 51 Investigator. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012; 366: 9-19.
9. PRADAXA (dabigatran etexilate mesylate). Product information. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc, Ridgefield, CT. Available at: http://www.boehringeringelheim.ca/content/dam/internet/opu/ca_EN/documents/humanhealth/product_monograph/Pradaxpm.pdf. Accessed May 22, 2013.
10. Baglin, A. Hillarp, A. Tripodi et al. Measuring oral direct inhibitors of thrombin and factor Xa: a recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *T. J Thromb Haemost.* 2013; 11: 756-60.
11. Dager WE, Gosselin RC, Kitchen S et al. Dabigatran effects on the international normalized ratio, activated partial thromboplastin time, thrombin time, and fibrinogen: a multicenter, in vitro study. *D. Ann Pharmacother.* 2012; 46: 1627-36.
12. Lindahl 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.
13. Joanne van Ryn; Joachim Stangier; Sebastian

- Haertter et al. Dabigatran etexilate - a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2010; 103: 1116-1127.
14. Baglin T, Keeling D, Kitchen S; British Committee for Standards in Haematology. Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2012; 159: 427-9.
 15. Baglin T. The role of the laboratory in treatment with new oral anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2013;11 (Suppl. 1): 122-8.
 16. Samama MM, Martinoli JL, Le Flem L et al. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban – an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost.* 2010; 103: 815-25.
 17. Tripodi A. The laboratory and the direct oral anticoagulants. *Blood.* 2013; 121: 4032-5.
 18. Stangier J, Rathgen K, Stähle 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: 292-303.
 19. Avecilla ST, Ferrell C, Chandler WL et al. Plasma-diluted thrombin time to measure dabigatran concentrations during dabigatran etexilate therapy. *Am J Clin Pathol.* 2012; 137: 572-4.
 20. Reilly PA, Lehr T, Haertter S et al. RE-LY Investigators. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63: 321-8.
 21. Xarelto (rivaroxaban). Product information. Bayer AG, Leverkusen, Germany. Available at: <http://www.bayer.ca/files/Xarelto%20English%2012APR2013.pdf>. Accessed May 22, 2013.
 22. Tripodi A. Which test to use to measure the anticoagulant effect of rivaroxaban: the prothrombin time test. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 576-8.
 23. 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.
 24. Huisman MV, Lip GY, Diener HC et al. Dabigatran etexilate for stroke prevention in patients with atrial fibrillation: resolving uncertainties in routine practice. *Thromb Haemost.* 2012; 107: 838-47.
 25. Rodgers R, Bagot CN, Lawrence C et al. Correlating prothrombin time with plasma rivaroxaban level. *Br J Haematol.* 2013; 163: 685-7.
 26. Mani H, Rohde G, Stratmann G et al. Accurate determination of rivaroxaban levels requires different calibrator sets but not addition of anti-thrombin. *Thromb Haemost.* 2012; 108: 191-8.
 27. 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: 133-9.
 28. Lindhoff-Last E, Samama MM, Ortel TL et al. Assays for measuring rivaroxaban: their suitability and limitations. *Ther Drug Monit.* 2010; 32: 673-9.i
 29. Eliquis (apixaban). Product information. Bristol-Myers Squibb Co, Princeton, NJ. Available at: http://www.pfizer.ca/en/our_products/products/monograph/313. Accessed May 22, 2013.
 30. 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* 2011; 129: 492-8.
 31. Barrett YC, Wang Z, Frost C et al. Clinical laboratory measurement of direct factor Xa inhibitors: anti-Xa assay is preferable to prothrombin time assay. *Thromb Haemost.* 2010; 104: 1263-71.
 32. Gouin-Thibault I, Flaujac C, Delavenne X et al. Assessment of apixaban plasma levels by laboratory tests: suitability of three anti-Xa assays. A multicentre French GEHT study. *Thromb Haemost.* 2014; 111: 240-8.
 33. Jonathan Douxfils; Christian Chatelain; Bernard Chatelain et al. Impact of apixaban on routine and specific coagulation assays: a practical laboratory guide. *Thromb Haemost.* 2013; 110: 283-94.
 34. Mani H. Interpretation of coagulation test results under direct oral anticoagulants. *Int J Lab Hematol.* 2014; 36: 261-8.
 35. Eby C. Novel anticoagulants and laboratory testing. *Int J Lab Hematol.* 2013; 35: 262-8.
 36. Siegal DM, Crowther MA. Acute management of bleeding in patients on novel oral anticoagulants. *Eur Heart J.* 2013; 34: 489-98.