

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

SCREENING MOLECOLARE DELLA TROMBOFILIA EREDITARIA: ANALISI DELLA CASISTICA E DELLE COMBINAZIONI GENOTIPICHE DEL FATTORE V LEIDEN E DEL FATTORE II PRESSO INRCA MARCHE

Molecular screening for hereditary thrombophilia: analysis of the laboratory cohort and genotypic combinations of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A at INRCA MARCHE

Relatore:

Prof.ssa Stefania Appolloni

Correlatore:

Dott. Massimo Badaloni

Tesi di Laurea di:

Angelica Anselmi

A.A. 2025-2026

INDICE

1. INTRODUZIONE 1

1.1 Emostasi: definizione e significato fisiologico 1

1.1.1 Emostasi primaria e ruolo delle piastrine 2

1.1.2 Coagulazione: dalla cascata classica al modello cellulare 3

1.1.3 Meccanismi anticoagulanti naturali e bilancio coagulativo 4

1.1.4 Fibrinolisi 5

1.2 Trombosi venosa e concetto di trombofilia 6

1.3 Fattore V Leiden 8

1.3.1 Basi molecolari e meccanismo fisiopatologico 8

1.3.2 Epidemiologia e significato clinico 9

1.4 Variante G20210A del Fattore II della protrombina 10

1.4.1 Basi molecolari 10

1.4.2 Epidemiologia e manifestazioni cliniche 10

1.5 Co-ereditarietà di Fattore V Leiden e Fattore II G20210A 11

1.6 Gene MTHFR e polimorfismi C677T e A1298C 12

1.6.1 Ruolo biologico dell'MTHFR 12

1.6.2 Posizione attuale nello screening trombofilico 13

1.7 Screening trombofilico: indicazioni, limiti e ruolo del laboratorio 14

1.8 Razionale del presente studio 16

2. SCOPO DELLA TESI 17

3. MATERIALI E METODI 18

3.1 Raccolta, accettazione e conservazione dei campioni 18

3.2 Estrazione automatizzata degli acidi nucleici 18

3.3 Pannello di genotipizzazione e allestimento della reazione 20

3.4 Amplificazione mediante PCR in tempo reale e analisi delle curve di melting 21

3.5 Disegno dello studio e costruzione della casistica 23

3.6 Gestione dei dati e analisi statistica descrittiva 23

3.7 Controllo di qualità, tracciabilità e ruolo del TSLB 23

4. RISULTATI 25

4.1 Consistenza del database e definizione della coorte 25

4.2 Distribuzione dei genotipi FV Leiden e FV G20210A 26

4.3 Combinazioni genotipiche FV/FII 27

4.4 Distribuzione per sesso, provenienza e andamento temporale 28

4.5 Esecuzione contestuale dei test MTHFR 30

4.6 Coerenza dei risultati nei test ripetuti 31

5. DISCUSSIONE 32

5.1 Inquadramento generale dei risultati 32

5.2 Fattore V Leiden e Fattore II G20210A nella casistica INRCA 32

5.3 Combinazioni genotipiche e doppia positività 32

5.4 Significato del dato MTHFR nel percorso di laboratorio 33

5.5 Valore tecnico del flusso di lavoro molecolare 33

5.6 Ruolo del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico 34

5.7 Distribuzione della richiesta e caratteristiche della popolazione 34

5.8 Limiti dello studio 34

5.9 Considerazioni conclusive 35

6. BIBLIOGRAFIA 36

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

Abbreviazione	Significato	Abbreviazione	Significato
APC	Proteina C attivata	**MTHFR**	Metilen-tetraidrofolato reduttasi
AT	Antitrombina	**NLM**	Nuclear Laser Medicine
dNTP	Deossiribonucleotidi trifosfato	**NTC**	No Template Control
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico	**PAI-1**	Plasminogen Activator Inhibitor-1
F2	Gene del Fattore II / protrombina	**PCR**	Polymerase Chain Reaction
F5	Gene del Fattore V	**Real-Time PCR**	PCR in tempo reale
FVa	Fattore V attivato	**TEV**	Tromboembolismo venoso
FVIIIa	Fattore VIII attivato	**TF**	Fattore tissutale
FXa	Fattore X attivato	**TFPI**	Tissue Factor Pathway Inhibitor
gDNA	DNA genomico	**tPA**	Attivatore tissutale del plasminogeno
HGVS	Human Genome Variation Society	**TSLB**	Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico
INRCA	Istituto Nazionale di Ricovero e Cura per Anziani	**uPA**	Attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi
K_2-EDTA	EDTA dipotassico	**VTE**	Venous thromboembolism
LED	Light Emitting Diode	**vWF**	Fattore di von Willebrand

1. INTRODUZIONE

1.1 Emostasi: definizione e significato fisiologico

L'emostasi è l'insieme coordinato dei meccanismi fisiologici che consentono di arrestare la perdita di sangue in corrispondenza di una lesione vascolare, preservando contemporaneamente la fluidità del sangue nel restante albero circolatorio. Non si tratta quindi di una semplice «coagulazione» del sangue, ma di un equilibrio dinamico tra endotelio, piastrine, proteine plasmatiche della coagulazione, sistemi anticoagulanti naturali e fibrinolisi. L'attivazione di questi sistemi deve essere rapida e localizzata: una risposta insufficiente favorisce il sanguinamento, mentre una risposta eccessiva o non adeguatamente controllata può determinare la formazione patologica di un trombo [1].

In condizioni fisiologiche l'endotelio vascolare esercita una funzione prevalentemente antitrombotica, limitando l'adesione piastrinica e l'attivazione delle proteine della coagulazione. La lesione della parete vascolare modifica profondamente questo assetto: l'esposizione della matrice subendoteliale, del collagene e del fattore tissutale crea una superficie pro-emostatica sulla quale piastrine e fattori plasmatici possono essere reclutati e attivati. Emostasi primaria ed emostasi secondaria vengono tradizionalmente descritte come fasi distinte, ma nella realtà biologica procedono in stretta interdipendenza e si potenziano reciprocamente [1,2].

Una visione d'insieme dei principali passaggi del processo emostatico è riportata nella Figura 1.1.

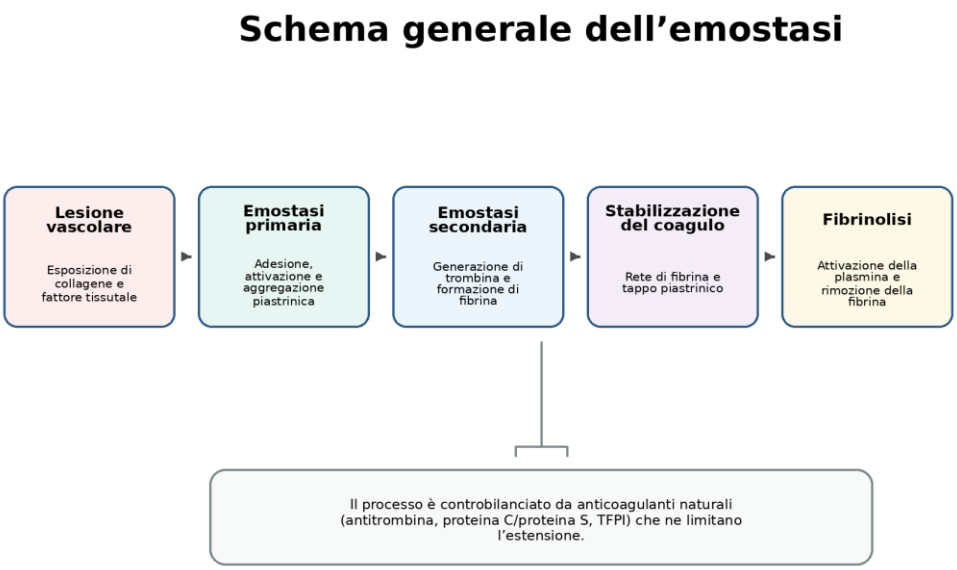


Figura 1.1. Schema generale dell'emostasi. Rappresentazione schematica originale elaborata per la presente tesi.

1.1.1 Emostasi primaria e ruolo delle piastrine

La risposta emostatica iniziale comprende una vasocostrizione locale e, soprattutto, la formazione del tappo piastrinico. In seguito alla perdita di integrità dell'endotelio, il fattore di von Willebrand (vWF) legato alla matrice subendoteliale consente l'adesione delle piastrine attraverso il complesso recettoriale GPIb-IX-V. Il collagene esposto interagisce inoltre con specifici recettori piastrinici, contribuendo all'attivazione cellulare. Le piastrine adese cambiano forma, espongono fosfolipidi anionici sulla propria membrana e rilasciano il contenuto dei granuli intracellulari, creando una superficie idonea all'assemblaggio dei complessi della coagulazione [1,2].

Tra i mediatori rilasciati o prodotti durante l'attivazione piastrinica assumono particolare importanza l'ADP e il trombossano A2, che amplificano il reclutamento e l'attivazione di nuove piastrine. L'attivazione del recettore integrinico GPIIb/IIIa consente infine al fibrinogeno di fungere da ponte tra piastrine adiacenti, determinando l'aggregazione e la formazione del tappo piastrinico iniziale. Questo tappo, da solo, è relativamente instabile e necessita della successiva deposizione di fibrina per acquisire resistenza meccanica [2].

1.1.2 Coagulazione: dalla cascata classica al modello cellulare

La coagulazione è stata a lungo rappresentata mediante il modello della «cascata», nel quale una via intrinseca e una via estrinseca convergono nell'attivazione del fattore X e nella successiva generazione di trombina. Tale schema conserva un importante valore didattico e costituisce il fondamento interpretativo di numerosi test di laboratorio, ma descrive solo in parte ciò che avviene in vivo. Il modello cellulare dell'emostasi ha evidenziato come la generazione di trombina dipenda dall'interazione tra proteine plasmatiche e specifiche superfici cellulari e possa essere distinta nelle fasi funzionali di inizio, amplificazione e propagazione [3].

L'inizio della coagulazione avviene principalmente sulle cellule che espongono fattore tissutale (TF). Il complesso TF-FVIIa attiva il fattore X a Xa e, in misura rilevante, anche il fattore IX. Le prime quantità di fattore Xa consentono la produzione di piccole quantità di trombina. Questa generazione iniziale non è sufficiente a produrre un coagulo stabile, ma svolge un ruolo fondamentale di amplificazione: la trombina attiva ulteriormente le piastrine e i cofattori V e VIII, predisponendo la superficie piastrinica alla fase di propagazione [3].

Durante la propagazione, sulla superficie delle piastrine attivate si assemblano il complesso tenasico (FIXa-FVIIIa), responsabile di una produzione efficiente di FXa, e il complesso protrombinasico (FXa-FVa), nel quale il fattore V attivato svolge la funzione di cofattore. Quest'ultimo complesso converte rapidamente la protrombina, o fattore II, in trombina. Si genera così un intenso picco di produzione di trombina (thrombin burst), snodo centrale dell'emostasi che rende particolarmente evidente il ruolo biologico dei due fattori oggetto della presente tesi: il fattore V e la protrombina [1–3].

La trombina converte il fibrinogeno solubile in monomeri di fibrina e attiva il fattore XIII, che stabilizza la rete fibrinica mediante legami covalenti. La fibrina si integra nel tappo piastrinico, ne aumenta la resistenza alla pressione emodinamica e contribuisce alla formazione del coagulo definitivo. In questo contesto, alterazioni genetiche che aumentano la persistenza dell'attività del fattore V o la disponibilità della protrombina possono spostare l'equilibrio verso una maggiore capacità procoagulante.

Per finalità didattiche, la Figura 1.2 riassume la tradizionale rappresentazione della cascata coagulativa, oggi integrata dal modello cellulare.

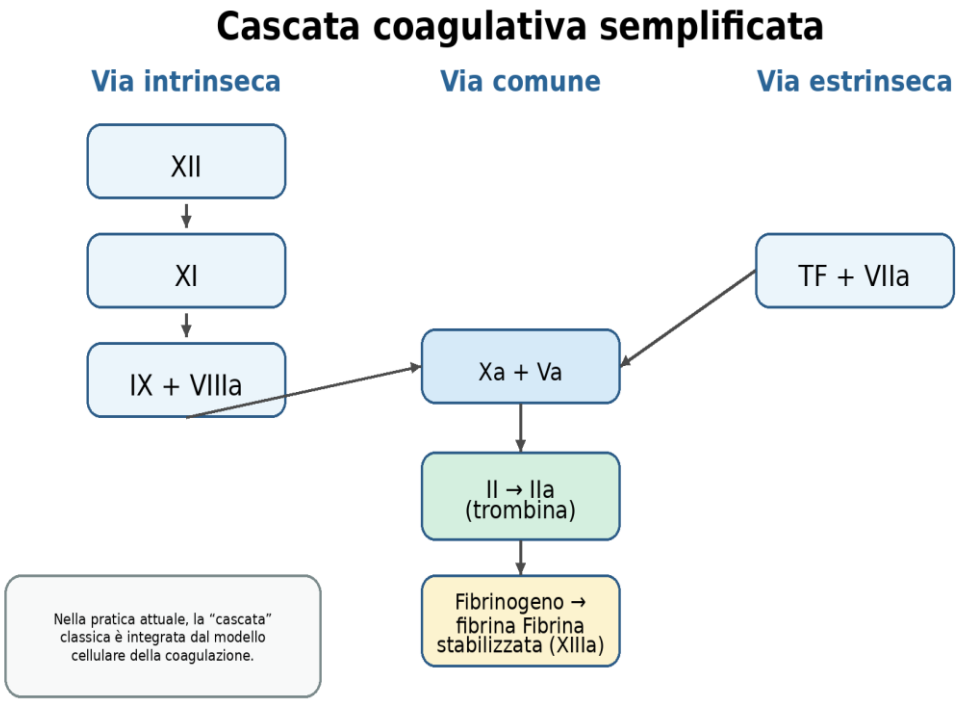


Figura 1.2. Cascata coagulativa semplificata. Rappresentazione schematica originale elaborata per la presente tesi.

1.1.3 Meccanismi anticoagulanti naturali e bilancio coagulativo

La localizzazione della coagulazione al sito di lesione è garantita da sistemi anticoagulanti naturali che limitano la diffusione dell'attivazione enzimatica. Tra i principali regolatori figurano l'antitrombina, la via della proteina C e della proteina S e il tissue factor pathway inhibitor (TFPI). L'antitrombina neutralizza diverse serin-proteasi della coagulazione, in particolare trombina e fattore Xa. Il TFPI limita invece l'attività del complesso fattore tissutale-FVIIa e del fattore Xa nelle fasi iniziali della coagulazione [1,2].

La via della proteina C è di particolare rilevanza per la comprensione del Fattore V Leiden. La trombina, quando si lega alla trombomodulina espressa sull'endotelio, modifica la propria specificità di substrato e favorisce l'attivazione della proteina C. La proteina C attivata (APC), con la proteina S come cofattore, inattiva proteoliticamente i fattori Va e VIIIa. Tale meccanismo rappresenta un importante feedback negativo della generazione di trombina; la resistenza del fattore V all'azione dell'APC costituisce il difetto funzionale caratteristico della variante Leiden [1,7,8].

1.1.4 Fibrinolisi

La formazione del coagulo è accompagnata da meccanismi che ne consentono la successiva rimozione. La fibrinolisi consiste nella degradazione proteolitica della fibrina, principalmente per opera della plasmina, generata dal plasminogeno attraverso l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e l'urochinasi (uPA). Il tPA è prodotto in particolare dall'endotelio e la sua attività è fortemente potenziata dalla presenza della fibrina, caratteristica che favorisce la localizzazione della fibrinolisi sulla superficie del coagulo [4].

Anche la fibrinolisi è sottoposta a una regolazione stringente. PAI-1 limita l'azione degli attivatori del plasminogeno, mentre l'α2-antiplasmina neutralizza la plasmina libera. Il thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), attivato nell'ambito dell'interazione trombina-trombomodulina, riduce la disponibilità dei siti di legame per il plasminogeno e il tPA sulla fibrina. Il risultato fisiologico è un equilibrio tra formazione e rimozione del coagulo, che può essere alterato da fattori genetici, acquisiti o ambientali [4].

I principali attori del sistema fibrinolitico e le loro interazioni essenziali sono schematizzati nella Figura 1.3.

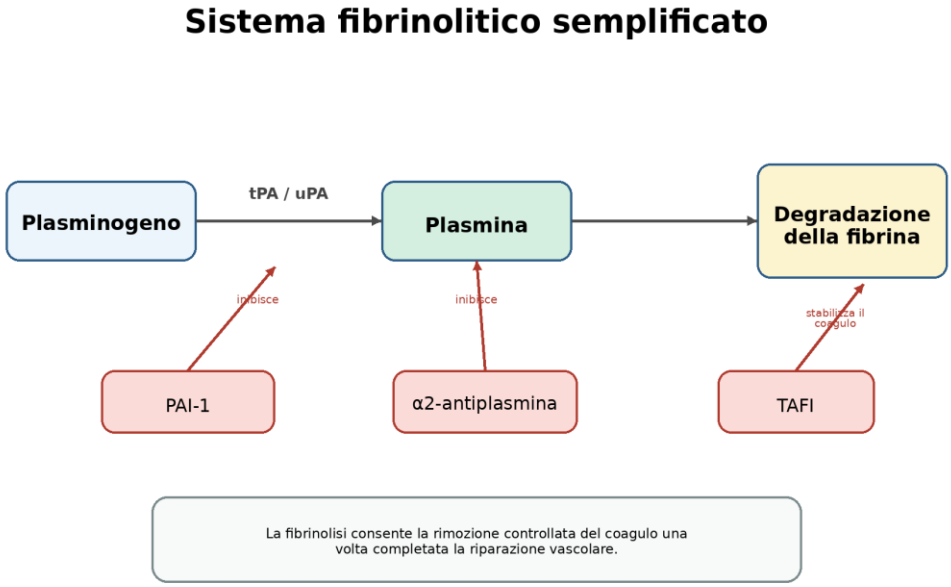


Figura 1.3. Sistema fibrinolitico semplificato. Rappresentazione schematica originale elaborata per la presente tesi.

Le principali fasi dell'emostasi e i relativi mediatori sono riassunti nella Tabella 1.1.

Fase / sistema	Principali componenti	Funzione essenziale
Vasocostrizione	Endotelio; mediatori vasoattivi	Riduzione immediata del flusso ematico al sito di lesione
Emostasi primaria	Piastrine, vWF, GPIb, GPIIb/IIIa, fibrinogeno	Formazione del tappo piastrinico iniziale
Emostasi secondaria	TF-FVIIa, FXa, trombina, fibrina	Generazione di fibrina e stabilizzazione del coagulo
Anticoagulanti naturali	Antitrombina, proteina C, proteina S, TFPI	Limitazione dell'estensione della coagulazione
Fibrinolisi	Plasminogeno, tPA/uPA, plasmina, PAI-1, α2-antiplasmina	Rimozione controllata della fibrina

Tabella 1.1. Principali fasi e componenti dell'emostasi.

1.2 Trombosi venosa e concetto di trombofilia

Il termine trombofilia indica una predisposizione alla trombosi, in particolare al tromboembolismo venoso (TEV), che comprende principalmente trombosi venosa profonda ed embolia polmonare. Le linee guida moderne distinguono condizioni trombofiliche ereditarie e acquisite identificabili mediante indagini di laboratorio. La British Society for Haematology include tra le trombofilie ereditarie meglio definite il Fattore V Leiden, la variante G20210A del gene F2 e le carenze di antitrombina, proteina C e proteina S; tra le forme acquisite riveste un ruolo centrale la sindrome da anticorpi antifosfolipidi [5].

È importante distinguere la trombofilia come alterazione biologica identificabile dal più ampio concetto di fattore di rischio trombotico. Neoplasie, chirurgia, immobilizzazione, gravidanza, puerperio, età avanzata, obesità e trattamenti estrogenici possono aumentare il rischio di TEV attraverso meccanismi differenti e possono interagire con una predisposizione genetica. Il rischio trombotico individuale è quindi il risultato dell'interazione tra caratteristiche genetiche, condizioni cliniche transitorie o persistenti e fattori ambientali [5–7].

Le trombofilie ereditarie presentano penetranza incompleta: l'identificazione di una variante genetica associata a trombosi non equivale alla diagnosi di una malattia clinicamente manifesta né consente, da sola, di prevedere se e quando si verificherà un evento trombotico. Molti portatori rimangono asintomatici per tutta la vita. Per tale motivo il dato molecolare deve essere interpretato nel contesto dell'anamnesi personale e familiare e dei fattori di rischio concomitanti, evitando di trasformare il risultato genetico in una previsione deterministica [5–7].

Le principali condizioni ereditarie rilevanti nel contesto dello screening trombofilico sono sintetizzate nella Tabella 1.2.

Condizione	**Gene / proteina**	**Meccanismo principale**	**Rilievo nello screening**
Fattore V Leiden	F5	Resistenza alla proteina C attivata	Target genetico maggiore
Protrombina G20210A	F2	Aumento dei livelli di protrombina	Target genetico maggiore
Deficit di antitrombina	SERPINC1 / AT	Ridotta inibizione della trombina e del FXa	Trombofilia ereditaria maggiore, valutazione funzionale
Deficit di proteina C	PROC / proteina C	Ridotta inattivazione di FVa e FVIIIa	Trombofilia ereditaria maggiore, valutazione funzionale
Deficit di proteina S	PROS1 / proteina S	Ridotto cofattore della proteina C	Trombofilia ereditaria maggiore, valutazione funzionale
MTHFR C677T / A1298C	MTHFR	Effetto sul metabolismo dei folati	Componente storico; non raccomandato routinariamente per TEV

Tabella 1.2. Principali trombofilie ereditarie e loro rilievo nello screening di laboratorio.

1.3 Fattore V Leiden

1.3.1 Basi molecolari e meccanismo fisiopatologico

Il gene F5 codifica il fattore V della coagulazione, una glicoproteina plasmatica sintetizzata principalmente a livello epatico. Dopo attivazione, il fattore Va agisce come cofattore del fattore Xa nel complesso protrombinasico, accelerando in modo marcato la conversione della protrombina in trombina. La sua attività viene normalmente limitata dalla proteina C attivata attraverso clivaggi proteolitici specifici [1,7].

La variante Leiden del gene F5 è storicamente indicata come G1691A e, secondo la nomenclatura HGVS corrente, come c.1601G>A, con sostituzione p.Arg534Gln. Nella nomenclatura tradizionale della proteina matura la stessa alterazione è frequentemente descritta come Arg506Gln. La variante modifica uno dei principali siti di clivaggio dell'APC e determina una ridotta inattivazione del fattore Va, producendo il fenotipo noto come resistenza alla proteina C attivata [7,8].

La persistenza dell'attività del fattore Va favorisce una maggiore generazione di trombina e sposta il sistema emostatico verso una condizione procoagulante. La scoperta della variante, descritta nel 1994 da Bertina e collaboratori, ha rappresentato un passaggio fondamentale nella comprensione delle basi molecolari della trombofilia ereditaria [8]. Il difetto viene ricercato mediante analisi genetica mirata della variante specifica; il risultato genotipico può essere wild-type, eterozigote o omozigote per l'allele Leiden.

La differenza funzionale tra il Fattore V wild-type e la variante Leiden è rappresentata schematicamente nella Figura 1.4.

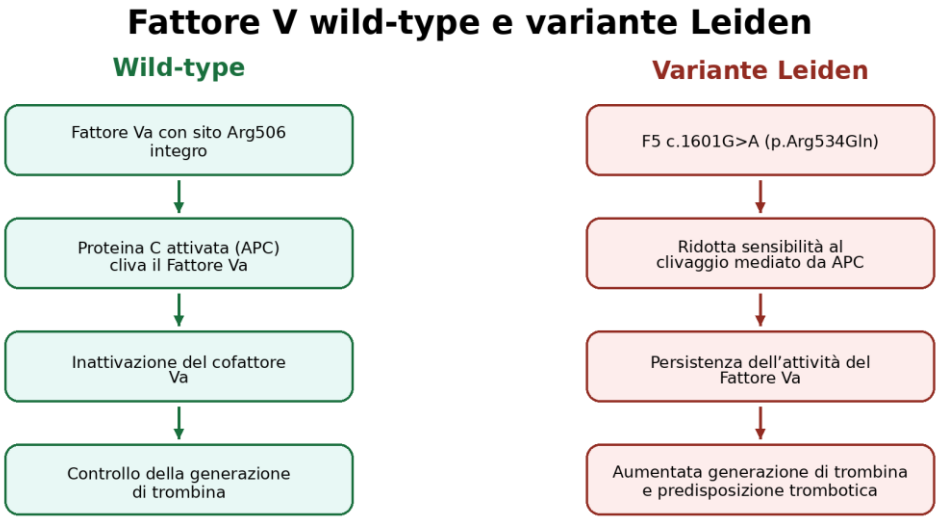


Figura 1.4. Confronto schematico tra Fattore V wild-type e variante Leiden. Rappresentazione originale elaborata per la presente tesi.

1.3.2 Epidemiologia e significato clinico

Il Fattore V Leiden è la trombofilia ereditaria più comune nelle popolazioni di origine europea, ma la frequenza presenta importanti differenze geografiche. GeneReviews riporta una prevalenza dell'eterozigosi nell'ordine del 3–8% nelle popolazioni generali statunitensi ed europee, con valori più elevati in alcune aree dell'Europa settentrionale e valori inferiori, intorno al 2–3%, in Italia e Spagna. La variante è invece molto meno frequente in molte popolazioni asiatiche, africane e indigene [7]. Queste differenze rendono necessario interpretare con cautela i confronti tra casistiche provenienti da territori diversi.

Nei soggetti eterozigoti il rischio relativo di TEV è aumentato approssimativamente di tre-otto volte rispetto ai non portatori, mentre l'omozigosi conferisce un rischio più elevato [7]. Il rischio assoluto rimane tuttavia fortemente dipendente dal contesto clinico: età, storia familiare, obesità, gravidanza, neoplasia, immobilizzazione, interventi chirurgici e impiego di estrogeni possono modificare in maniera significativa la probabilità che un portatore sviluppi un evento trombotico. Le manifestazioni più comuni sono la trombosi venosa profonda degli arti inferiori e l'embolia polmonare; possono tuttavia verificarsi trombosi anche in altri distretti venosi [7].

La natura multifattoriale del rischio è particolarmente rilevante nella comunicazione del risultato di laboratorio. Il riconoscimento di un genotipo F5 Leiden rappresenta un'informazione biologica stabile, ma non deve essere interpretato isolatamente né utilizzato automaticamente per determinare durata dell'anticoagulazione o profilassi, decisioni che dipendono dallo scenario clinico e dalle raccomandazioni specifiche [5,6].

1.4 Variante G20210A del Fattore II della protrombina

1.4.1 Basi molecolari

Il fattore II, o protrombina, è il precursore inattivo della trombina ed è codificato dal gene F2 sul cromosoma 11. L'attivazione della protrombina da parte del complesso FXa-FVa costituisce uno dei passaggi centrali della coagulazione, perché la trombina non solo converte il fibrinogeno in fibrina, ma amplifica il processo attivando piastrine e diversi fattori della coagulazione [1–3].

La variante trombofilica classica del gene F2 è indicata come G20210A e corrisponde, nella nomenclatura HGVS, a c.*97G>A. È localizzata nella regione 3′ non tradotta (3′ UTR) del gene e non determina una sostituzione amminoacidica. La sua rilevanza deriva dall'effetto sui processi di maturazione dell'RNA e sulla produzione di protrombina: i portatori presentano mediamente livelli plasmatici più elevati di protrombina, con conseguente maggiore potenziale di generazione di trombina [9,10]. La variante è stata descritta nel 1996 da Poort e collaboratori in associazione con l'aumento dei livelli di protrombina e del rischio di trombosi venosa [10].

1.4.2 Epidemiologia e manifestazioni cliniche

La trombofilia da protrombina G20210A è una delle più comuni forme di trombofilia ereditaria dopo il Fattore V Leiden. La frequenza è maggiore nelle popolazioni di origine europea e mostra una distribuzione geografica non uniforme, con valori mediamente più elevati nell'Europa meridionale [9,17]. Studi condotti in popolazioni italiane hanno inoltre evidenziato una variabilità locale, elemento che rende particolarmente interessante la descrizione di casistiche territoriali di laboratorio, pur senza assimilarle a studi di prevalenza nella popolazione generale [18].

Nei soggetti eterozigoti la variante F2 G20210A è associata a un aumento del rischio relativo di trombosi venosa profonda nell'ordine di due-cinque volte. L'omozigosi è

molto più rara e il rischio assoluto è più difficile da quantificare per la limitata numerosità delle casistiche disponibili. Anche in questo caso l'espressione clinica è variabile e numerosi portatori non sviluppano mai trombosi [9]. Il rischio aumenta in presenza di ulteriori condizioni genetiche o acquisite, a conferma del carattere multifattoriale del TEV.

La Figura 1.5 riassume il diverso significato molecolare della sequenza wild-type del gene F2 e della variante G20210A.

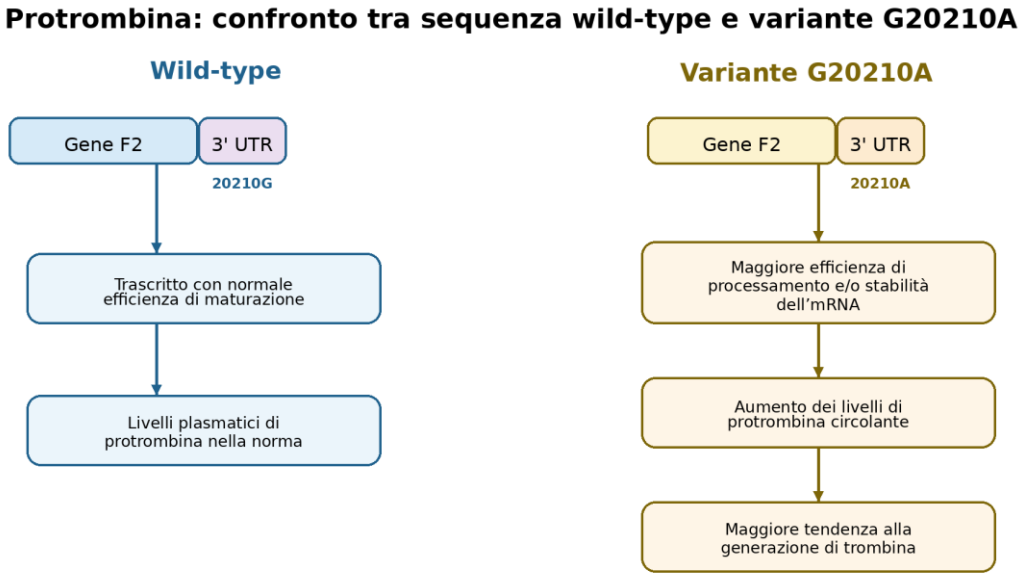


Figura 1.5. Confronto schematico tra forma wild-type del gene F2 e variante G20210A. Rappresentazione originale elaborata per la presente tesi.

1.5 Co-ereditarietà di Fattore V Leiden e Fattore II G20210A

La presenza contemporanea di più varianti trombofiliche è di particolare interesse perché può identificare un sottogruppo di soggetti con un profilo biologico differente rispetto ai portatori di una singola variante. La combinazione più frequentemente studiata è la doppia eterozigosi per F5 Leiden e F2 G20210A. GeneReviews riporta che la coesistenza dei due difetti è stata associata in diversi studi a un rischio di TEV superiore a quello dei non portatori e, in alcune casistiche, a una maggiore probabilità di eventi in età più giovane o in sedi venose non usuali [9].

La dimensione dell'effetto non è tuttavia identica in tutti gli studi. Una meta-analisi di Simone e collaboratori, comprendente 31 database, 11.239 casi e 21.521 controlli, ha confermato l'associazione di F5 Leiden e F2 G20210A con il primo evento di TEV e ha stimato per i doppi eterozigoti un odds ratio di circa 3,4, con intervallo di confidenza ampio a causa della rarità della combinazione [11]. Lo stesso lavoro non ha rilevato una chiara associazione tra omozigosi MTHFR C677T e TEV. Questi dati mostrano come la co-ereditarietà sia biologicamente rilevante, ma anche come la rarità delle combinazioni renda necessario evitare estrapolazioni eccessive dal singolo dato genotipico [11].

Da un punto di vista laboratoristico, l'analisi combinata di F5 e F2 consente di distinguere soggetti wild-type per entrambi i loci, portatori di una sola variante e portatori di combinazioni multiple. La corretta identificazione di tali profili richiede una tracciabilità rigorosa del campione e una lettura affidabile del genotipo, poiché un errore di assegnazione allelica può modificare in modo sostanziale l'inquadramento del risultato.

1.6 Gene MTHFR e polimorfismi C677T e A1298C

1.6.1 Ruolo biologico dell'MTHFR

La metilen-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR) è un enzima coinvolto nel metabolismo dei folati e nella produzione di 5-metiltetraidrofolato, donatore di gruppi metilici utilizzato per la rimetilazione dell'omocisteina a metionina. L'attività dell'enzima si inserisce quindi in una rete metabolica influenzata dalla disponibilità di folati, vitamina B12 e altri cofattori, oltre che da condizioni cliniche quali funzione renale, alimentazione e trattamenti farmacologici.

I polimorfismi MTHFR C677T (c.665C>T; p.Ala222Val) e A1298C (c.1286A>C; p.Glu429Ala) possono ridurre l'attività enzimatica in misura variabile. In particolari condizioni nutrizionali o metaboliche, soprattutto il genotipo C677T può associarsi a concentrazioni più elevate di omocisteina. Tuttavia, l'osservazione di un effetto biochimico non equivale automaticamente alla dimostrazione di un incremento clinicamente significativo del rischio trombotico.

1.6.2 Posizione attuale nello screening trombofilico

L'inquadramento dei polimorfismi MTHFR nello screening trombofilico è cambiato in modo sostanziale. L'American College of Medical Genetics and Genomics ha concluso che l'analisi dei comuni polimorfismi MTHFR possiede utilità clinica minima nella valutazione routinaria della trombofilia e ha mantenuto tale posizione anche nell'addendum successivo [12]. In modo concordante, un documento di esperti pubblicato nel 2022 ha sottolineato che MTHFR C677T e A1298C non devono essere considerati trombofilie ereditarie e non dovrebbero far parte dei pannelli destinati alla valutazione del rischio trombotico [13].

Le raccomandazioni ASH del 2023 distinguono esplicitamente le trombofilie ereditarie consolidate, quali Fattore V Leiden, variante della protrombina e deficit di antitrombina, proteina C e proteina S, da test come MTHFR C677T e A1298C, per i quali non è dimostrata un'associazione clinicamente utile con il TEV [6]. Analogamente, la British Society for Haematology non raccomanda test genetici, tra cui MTHFR, privi di un legame clinicamente significativo con la trombosi [5].

La presenza dei test MTHFR nel database oggetto della presente tesi mantiene comunque un interesse tecnico e organizzativo. Essa consente infatti di descrivere l'evoluzione storica dei pannelli molecolari e di osservare come l'offerta diagnostica debba essere continuamente rivalutata alla luce dell'evidenza scientifica. In una prospettiva di laboratorio, questo aspetto è strettamente collegato ai concetti di appropriatezza, aggiornamento delle procedure e governo del dato.

Per evidenziare le differenze tra i target genetici considerati in questo lavoro, la Tabella 1.3 propone un confronto sintetico tra F5 Leiden, F2 G20210A e MTHFR.

Target	Tipo di variante	Effetto biologico prevalente	Associazione con TEV	Ruolo attuale nel pannello
F5 Leiden	c.1601G>A; p.Arg534Gln	Resistenza alla APC e persistenza del Fattore Va	Consolidata	Rilevante nello screening selettivo
F2 G20210A	c.*97G>A (3' UTR)	Aumento dei livelli di protrombina	Consolidata	Rilevante nello screening selettivo
MTHFR C677T	c.665C>T; p.Ala222Val	Riduzione dell'attività enzimatica	Non dimostrata in modo robusto come marker routinario di TEV	Non raccomandato di routine
MTHFR A1298C	c.1286A>C; p.Glu429Ala	Riduzione moderata dell'attività enzimatica	Non dimostrata in modo robusto come marker routinario di TEV	Non raccomandato di routine

Tabella 1.3. Confronto sintetico tra F5 Leiden, F2 G20210A e polimorfismi MTHFR.

1.7 Screening trombofilico: indicazioni, limiti e ruolo del laboratorio

Lo screening trombofilico non corrisponde a un singolo esame, ma a un insieme di indagini selezionate in relazione al quesito clinico. Un pannello di trombofilia può includere test genetici, come F5 Leiden e F2 G20210A, test funzionali per antitrombina, proteina C e proteina S e, quando indicato, indagini per la sindrome da anticorpi antifosfolipidi. La composizione del pannello e il momento dell'esecuzione richiedono conoscenza dei limiti analitici e delle variabili cliniche che possono influenzare l'interpretazione [5,6].

Le linee guida contemporanee hanno progressivamente abbandonato l'idea di uno screening indiscriminato. L'American Society of Hematology ha formulato 23 raccomandazioni basate sul principio che il test debba essere eseguito quando il risultato può modificare una decisione clinica rilevante. La linea guida contiene una forte raccomandazione contro il test della popolazione generale prima dell'inizio di contraccettivi orali combinati e, in numerosi scenari, raccomandazioni condizionali contro l'esecuzione routinaria del pannello. Il test può invece essere preso in considerazione in specifiche situazioni nelle quali il risultato è potenzialmente in grado di modificare la durata dell'anticoagulazione, la profilassi o la gestione di esposizioni ormonali [6].

La British Society for Haematology adotta un'impostazione analoga e sottolinea che il test per trombofilia ereditaria dopo un evento venoso non dovrebbe essere eseguito routinariamente per guidare la gestione. Viene inoltre sconsigliato lo screening sistematico dei familiari, mentre può essere appropriato un test selettivo nei familiari di soggetti con deficit ad alto rischio di antitrombina, proteina C o proteina S quando il risultato può influire su specifiche decisioni di vita o profilassi [5]. Queste raccomandazioni evidenziano come il valore di un test dipenda non soltanto dalla sua accuratezza analitica, ma dalla sua capacità di produrre un'informazione clinicamente utile.

I test genetici per F5 e F2 presentano una caratteristica peculiare: il genotipo è stabile nel tempo e non viene modificato dall'evento trombotico acuto o dalla terapia anticoagulante. Ciò non elimina tuttavia la necessità di un corretto percorso preanalitico e post-analitico. Sono infatti prerequisiti essenziali l'identificazione univoca del paziente, il corretto prelievo, la prevenzione della contaminazione, la qualità dell'estrazione, l'impiego di adeguati controlli e l'applicazione di criteri interpretativi definiti.

Nella diagnostica molecolare il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico assume quindi un ruolo centrale lungo l'intero processo. La fase preanalitica comprende la verifica dell'idoneità del campione e della tracciabilità; la fase analitica richiede la corretta applicazione delle procedure di estrazione e amplificazione, la gestione dei reagenti e dei controlli e il riconoscimento di profili non interpretabili; la fase post-analitica comprende il controllo tecnico del risultato e la corretta registrazione e

conservazione dei dati. I principi di trasparenza, documentazione e controllo di qualità sono coerenti con le raccomandazioni MIQE 2.0 per le metodiche di PCR in tempo reale, che sottolineano l'importanza di descrivere in modo completo il campione, la preparazione degli acidi nucleici, le condizioni di reazione, i controlli e i criteri di analisi [14].

1.8 Razionale del presente studio

Il Laboratorio Analisi dell'INRCA riceve campioni provenienti sia dai reparti e dagli ambulatori interni sia da strutture esterne del territorio della provincia di Ancona. Questa organizzazione genera nel tempo una casistica ampia e diversificata, nella quale è possibile osservare non soltanto i genotipi rilevati, ma anche i pattern di richiesta, la provenienza dei campioni e l'evoluzione dell'attività diagnostica.

Alla luce delle considerazioni precedenti, l'analisi retrospettiva del database di genotipizzazione rappresenta uno strumento utile per descrivere l'attività reale del laboratorio. Il fulcro del presente lavoro è costituito dalle varianti F5 Leiden e F2 G20210A, entrambe riconosciute come trombofilie ereditarie consolidate [5–10]. L'attenzione alla loro distribuzione e alle combinazioni genotipiche permette di collegare le basi fisiopatologiche dell'emostasi alla pratica della diagnostica molecolare. L'analisi contestuale delle richieste MTHFR, interpretata alla luce delle raccomandazioni aggiornate [5,6,12,13], consente inoltre di valorizzare il ruolo del laboratorio nel processo di revisione e razionalizzazione dell'offerta diagnostica.

In questa prospettiva, la tesi non si propone di stimare la prevalenza delle varianti nella popolazione generale né di attribuire un rischio clinico individuale ai pazienti analizzati. L'obiettivo è descrivere una casistica di laboratorio, il relativo flusso di lavoro tecnico e i principali profili genotipici osservati, con particolare attenzione alla qualità del processo e al ruolo professionale del TSLB.

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro ha lo scopo di descrivere l'attività di screening molecolare delle principali varianti genetiche associate alla trombofilia ereditaria eseguita presso il Laboratorio Analisi dell'INRCA, con particolare attenzione alla variante Leiden del Fattore V e alla variante G20210A del Fattore II della protrombina.

Attraverso l'analisi retrospettiva della casistica di laboratorio, la tesi si propone di caratterizzare la distribuzione dei genotipi F5 e F2, identificare i soggetti portatori di una o più varianti e descrivere le principali combinazioni genotipiche osservate. Sono inoltre considerate alcune caratteristiche della popolazione sottoposta allo screening, quali sesso, età, anno di esecuzione e provenienza del campione.

Un ulteriore obiettivo è descrivere il ricorso contestuale ai test MTHFR C677T e A1298C all'interno del pannello molecolare, interpretandone la presenza nel database alla luce dell'evoluzione delle raccomandazioni scientifiche. Tale analisi non intende attribuire un giudizio clinico al singolo atto prescrittivo, poiché il database non contiene in modo sistematico indicazione clinica, anamnesi trombotica, familiarità e altri elementi necessari a tale valutazione.

La tesi intende infine valorizzare la dimensione tecnico-professionale del TSLB, descrivendo le fasi preanalitica, analitica e post-analitica del percorso diagnostico molecolare, le caratteristiche della strumentazione utilizzata, l'importanza dei controlli di qualità e della tracciabilità e il contributo della gestione strutturata dei dati alla qualità complessiva del processo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta, accettazione e conservazione dei campioni

L'analisi genetico-molecolare è stata condotta su campioni di sangue intero periferico raccolti in provette contenenti K_2-EDTA. I campioni afferivano al Laboratorio Analisi dell'INRCA attraverso due principali flussi: campioni interni, provenienti dai reparti e dagli ambulatori della struttura, e campioni esterni, inviati da presidi e laboratori del territorio provinciale. Secondo la routine operativa del laboratorio, i campioni non processati immediatamente venivano mantenuti in condizioni di refrigerazione (circa +4 °C) e avviati all'estrazione entro 24–48 ore; i campioni esterni venivano trasportati in contenitori isotermici a temperatura controllata (+2/+8 °C), mentre per giacenze più prolungate era previsto lo stoccaggio a −20 °C.

La fase preanalitica è stata considerata parte integrante del processo diagnostico. Prima dell'avvio alla lavorazione, la corrispondenza tra identificativo del campione e richiesta analitica, l'integrità del contenitore e la corretta tracciabilità del materiale biologico sono state verificate nell'ambito del percorso di accettazione. In una procedura di biologia molecolare la standardizzazione della fase preanalitica è essenziale, poiché qualità e conservazione del campione possono condizionare la resa dell'estrazione e, di conseguenza, l'affidabilità delle successive fasi di amplificazione [14].

3.2 Estrazione automatizzata degli acidi nucleici

L'isolamento e la purificazione del DNA genomico (gDNA) sono stati eseguiti mediante la piattaforma automatizzata ELITe InGenius® (ELITechGroup) (Figura 3.1). Il sistema è concepito come piattaforma integrata di diagnostica molecolare e consente, in funzione della configurazione scelta, l'automazione dell'estrazione degli acidi nucleici, dell'amplificazione e dell'analisi dei risultati. Nel presente flusso di lavoro la piattaforma è stata utilizzata per la fase di estrazione del DNA.



Figura 3.1. Piattaforma automatizzata ELITe InGenius® (ELITechGroup).

Lo strumento utilizza una tecnologia di estrazione basata sull'impiego di biglie magnetiche (magnetic beads) e cartucce pronte all'uso contenenti i reagenti necessari al processo [16] (Figura 3.2). Il procedimento si articola nelle seguenti macrofasi sequenziali, interamente gestite dal software della strumentazione:

1. Lisi cellulare: rottura delle membrane cellulari e nucleari mediante l'azione sinergica di un tampone chimico caotropico e della proteinasi K. Questa fase garantisce la digestione delle proteine strutturali e degli istoni e la rapida inattivazione delle nucleasi endogene.

2. Adsorbimento: legame selettivo e reversibile del gDNA rilasciato alla superficie delle biglie magnetiche, favorito dalle elevate concentrazioni saline del tampone di lisi.

3. Lavaggio (washing): passaggi consecutivi di lavaggio volti a rimuovere i contaminanti cellulari e i potenziali inibitori della successiva reazione di PCR, quali gruppo eme, emoglobina e proteine plasmatiche. Durante questa fase il gDNA rimane ancorato alla fase solida grazie all'applicazione di un campo magnetico che immobilizza le biglie.

4. Eluizione: rilascio del DNA purificato mediante un tampone a basso contenuto salino (tampone di eluizione) a temperatura controllata.

Il gDNA così ottenuto è stato immediatamente impiegato nelle sedute di amplificazione oppure, in alternativa, conservato a −20 °C.

L'automazione della fase estrattiva riduce il numero di manipolazioni manuali, favorisce la standardizzazione del processo e contribuisce a limitare il rischio di

contaminazione crociata. Il DNA eluito è stato utilizzato per le successive sedute di genotipizzazione oppure conservato a −20 °C. La registrazione del campione, della seduta e dell'esito costituisce un elemento fondamentale della tracciabilità analitica e del controllo di qualità del percorso molecolare.



Figura 3.2. Cartucce reagenti pronte all'uso per l'estrazione automatizzata.

3.3 Pannello di genotipizzazione e allestimento della reazione

La genotipizzazione è stata eseguita mediante kit commerciali Nuclear Laser Medicine (NLM) basati su PCR in tempo reale e successiva analisi delle curve di melting. Il pannello di interesse comprendeva la variante Leiden del gene F5, storicamente indicata come G1691A e descritta secondo la nomenclatura HGVS come c.1601G>A (p.Arg534Gln), la variante F2 c.*97G>A, comunemente denominata G20210A, e i polimorfismi MTHFR c.665C>T (C677T) e c.1286A>C (A1298C) [7,9,12].

Le due varianti principali oggetto dello studio sono state F5 Leiden e F2 G20210A, entrambe considerate tra le alterazioni ereditarie più consolidate nell'ambito della trombofilia venosa [6–10]. Le varianti MTHFR C677T e A1298C sono state mantenute nell'analisi del database in quanto presenti nel pannello storico di laboratorio e utili a descrivere il pattern di richiesta; le più recenti raccomandazioni, tuttavia, non le considerano marcatori di trombofilia venosa da includere routinariamente nei pannelli per TEV [6,12].

Le reazioni sono state allestite in accordo con le istruzioni del produttore. Per ciascun campione il volume finale di reazione era pari a 25 µL, ottenuto combinando 21 µL di

master mix e 4 µL di DNA genomico estratto. La miscela comprendeva i componenti necessari all'amplificazione, inclusi DNA polimerasi hot-start, dNTP, sali e sonde fluorescenti di ibridazione.

Ogni seduta analitica comprendeva controlli positivi a genotipo noto e un controllo negativo di amplificazione (No Template Control, NTC), preparato sostituendo il DNA con acqua di grado biologia molecolare. L'impiego sistematico di controlli rappresenta un requisito essenziale per verificare la corretta esecuzione della seduta, riconoscere eventuali problemi di amplificazione e intercettare contaminazioni ambientali o fenomeni di carry-over. La documentazione di campioni, reagenti, controlli e risultati è coerente con i principi di trasparenza e riproducibilità richiamati dalle linee guida MIQE per le metodiche PCR in tempo reale [14].

3.4 Amplificazione mediante PCR in tempo reale e analisi delle curve di melting

L'amplificazione e la rilevazione della fluorescenza sono state effettuate sul termociclatore Rotor-Gene® Q (QIAGEN) (Figura 3.3). Lo strumento utilizza una configurazione a rotore: i tubi sono disposti su un rotore che ruota in una camera ad aria termostatata, così da esporre i campioni a condizioni termiche e ottiche uniformi. Secondo la documentazione tecnica del produttore, la piattaforma presenta un'uniformità termica dell'ordine di ±0,02 °C e utilizza sorgenti LED e un fotomoltiplicatore per la rilevazione dei segnali fluorescenti [15].

La configurazione rotatoria riduce gli effetti di posizione tipici dei blocchi termici convenzionali e consente a ogni provetta di transitare davanti allo stesso sistema ottico. Tale caratteristica è particolarmente utile nelle analisi di genotipizzazione basate sulla discriminazione di curve di melting, nelle quali piccole differenze di temperatura possono assumere rilevanza interpretativa [15].



Figura 3.3. Termociclatore Rotor-Gene® Q (QIAGEN)

Il protocollo termico impostato sul software dello strumento prevedeva una fase iniziale di denaturazione e attivazione enzimatica a 95°C, seguita da 40 cicli comprendenti denaturazione a 95 °C, annealing a 54 °C ed estensione a 72 °C, secondo la procedura utilizzata in laboratorio. Al termine dell'amplificazione veniva eseguita l'analisi di melting per la discriminazione allelica.

La discriminazione genotipica si basa sul comportamento di sonde fluorescenti che ibridano con la regione bersaglio. Durante la fase di dissociazione post-PCR, l'aumento progressivo della temperatura determina il distacco delle sonde dal prodotto amplificato; la temperatura alla quale si verifica la perdita del segnale dipende dalla stabilità dell'ibrido. Un perfetto appaiamento e un appaiamento contenente un mismatch mostrano quindi profili di melting differenti. Il genotipo eterozigote genera due popolazioni di ibridi e, di conseguenza, un profilo a due picchi. I valori di temperatura di melting sono specifici per ciascun target e kit e devono essere interpretati sulla base dei controlli e dei criteri definiti dal produttore, anziché come soglie universali.

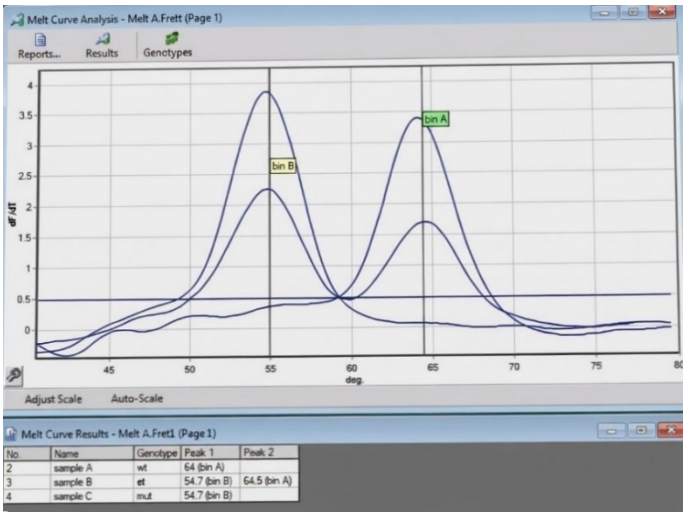


Figura 3.4. Esempio di curve di melting utilizzate per la discriminazione genotipica.

3.5 Disegno dello studio e costruzione della casistica

È stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo descrittivo sulla casistica afferente al Laboratorio Analisi dell'INRCA nel periodo compreso tra Gennaio 2021 e il 30 maggio 2026. La matrice di partenza comprendeva i risultati registrati per F5 Leiden, F2 G20210A, MTHFR C677T e MTHFR A1298C, insieme ai principali dati anagrafici e di provenienza. L'unità di analisi è stata il singolo paziente. I controlli di qualità e le registrazioni non riconducibili a un paziente sono stati esclusi dalla casistica epidemiologico-descrittiva.

Per il nucleo principale dello studio sono stati selezionati i pazienti con un risultato interpretabile disponibile sia per F5 Leiden sia per F2 G20210A, in modo da utilizzare un denominatore comune per il confronto delle combinazioni genotipiche. Le determinazioni ripetute dello stesso target nello stesso paziente sono state ricondotte a un singolo profilo genotipico, dopo verifica della concordanza dei risultati.

3.6 Gestione dei dati e analisi statistica descrittiva

L'elaborazione è stata volutamente impostata come analisi descrittiva, coerentemente con gli obiettivi di una tesi triennale in Tecniche di Laboratorio Biomedico. Sono stati calcolati conteggi assoluti e percentuali dei genotipi, distribuzione per sesso e fasce di età, principali provenienze dei campioni e andamento annuale delle richieste. Per l'età sono stati riportati media, deviazione standard, mediana e intervallo osservato. Le combinazioni FV/FII sono state descritte mediante una tabella dei genotipi. Per MTHFR è stata valutata la frequenza di esecuzione contestuale nella coorte principale e nei soggetti portatori di varianti FV/FII. Non sono stati applicati modelli multivariati o test inferenziali complessi, in quanto l'obiettivo era descrivere la casistica e il flusso di lavoro di laboratorio.

La gestione della matrice dati e le elaborazioni descrittive sono state effettuate mediante Microsoft Excel. Tutti i risultati sono presentati in forma aggregata; nessun identificativo personale è riportato nelle tabelle, nei grafici o nelle sezioni dei risultati.

3.7 Controllo di qualità, tracciabilità e ruolo del TSLB

Nel percorso analitico il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico interviene in più punti critici: verifica dell'idoneità e della tracciabilità del campione, preparazione e

gestione dei reagenti, conduzione dell'estrazione automatizzata, allestimento della PCR, inserimento e controllo dei materiali di controllo, sorveglianza della seduta strumentale e valutazione tecnica dei profili di amplificazione e melting. La standardizzazione di queste fasi, insieme alla registrazione delle eventuali ripetizioni, contribuisce a rendere il risultato riproducibile e verificabile. In questo lavoro la concordanza dei test ripetuti è stata utilizzata come indicatore descrittivo aggiuntivo di coerenza interna del dato di laboratorio, senza attribuirle il significato di una formale validazione analitica.

4. RISULTATI

4.1 Consistenza del database e definizione della coorte

Nel periodo compreso tra Gennaio 2021 e il 30 maggio 2026 il database conteneva 14.317 determinazioni molecolari complessive riconducibili a 5.834 pazienti unici. Le determinazioni più rappresentate erano MTHFR C677T (4.112), FV Leiden (3.886), FII G20210A (3.073) e MTHFR A1298C (3.018); erano inoltre presenti 228 determinazioni relative al polimorfismo FV HR2, non incluso negli obiettivi principali di questa tesi. Dopo la ricostruzione del profilo per singolo paziente, 3.773 soggetti disponevano di un risultato interpretabile per FV Leiden, 2.999 per FII G20210A, 4.029 per MTHFR C677T e 2.961 per MTHFR A1298C.

La coorte primaria, definita dalla disponibilità contemporanea di un risultato genotipico interpretabile sia per FV Leiden sia per FII G20210A, comprendeva 2.761 pazienti. Questa popolazione ha rappresentato il denominatore utilizzato per la descrizione dei genotipi e delle loro combinazioni.

Caratteristica	**Valore**
Pazienti nella coorte primaria *(FV + FII)*	2.761
Femmine	2.119 (76,7%)
Maschi	642 (23,3%)
Età media ± DS	42,97 ± 19,54 anni
Età mediana	40,02 anni
Intervallo di età osservato	0–93,11 anni
<30 anni	842 (30,5%)
30–50 anni	952 (34,5%)
51–70 anni	635 (23,0%)
>70 anni	332 (12,0%)

Tabella 4.1. Caratteristiche anagrafiche della coorte primaria.

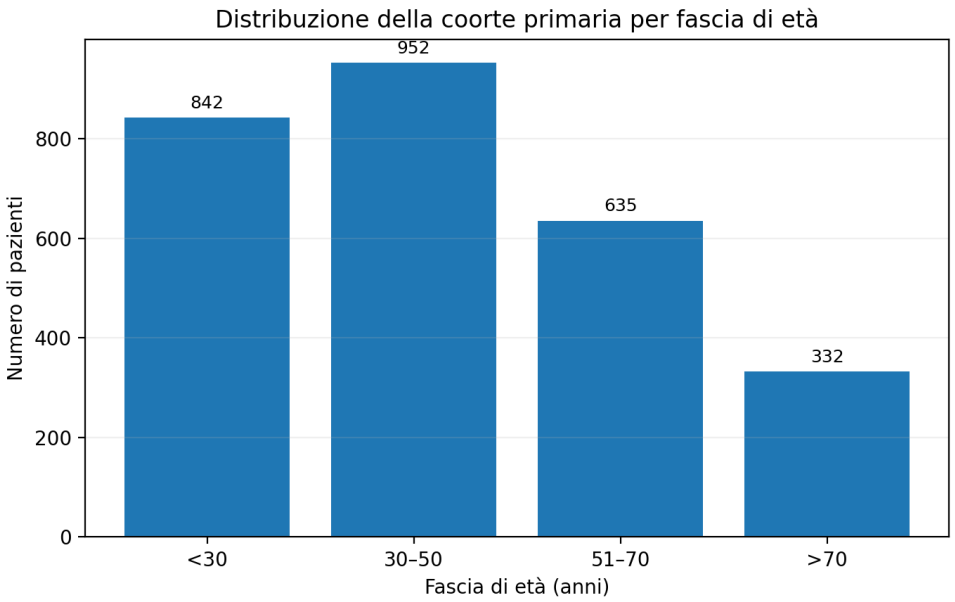


Figura 4.1. Distribuzione della coorte primaria per fascia di età.

4.2 Distribuzione dei genotipi FV Leiden e FII G20210A

Per la variante FV Leiden, 2.599 pazienti (94,13%) presentavano il genotipo GG *(omozigote wild-type)*, 153 (5,54%) il genotipo GA *(eterozigote)* e 9 (0,33%) il genotipo AA *(omozigote mutato)*. Considerando complessivamente i genotipi GA e AA, 162 soggetti (5,87%) risultavano portatori dell'allele variante.

Per la variante FII G20210A, 2.641 pazienti (95,65%) presentavano il genotipo GG *(omozigote wild-type)*, 119 (4,31%) il genotipo GA *(eterozigote)* e 1 (0,04%) il genotipo AA *(omozigote mutato)*. I portatori dell'allele 20210A erano pertanto 120 (4,35% della coorte).

Gene	Genotipo	n.	% della coorte
FV Leiden *(wild-type)*	GG	2.599	94,13
FV Leiden *(eterozigote)*	GA	153	5,54
FV Leiden *(omozigote mut.)*	AA	9	0,33
FV G20210A *(wild-type)*	GG	2.641	95,65
FII G20210A *(eterozigote)*	GA	119	4,31
FII G20210A *(omozigote mut.)*	AA	1	0,04

Tabella 4.2. Distribuzione dei genotipi FV Leiden e FII G20210A.

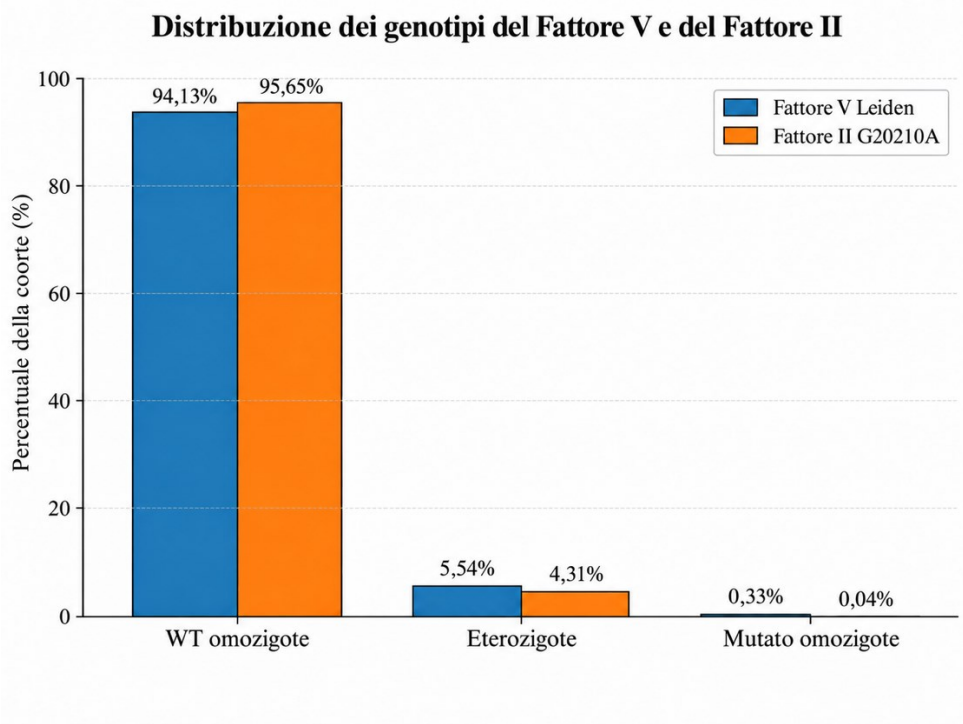


Figura 4.2. Distribuzione percentuale dei genotipi FV Leiden e FII G20210A.

4.3 Combinazioni genotipiche FV/FII

L'analisi combinata dei due target principali ha evidenziato che 2.486 soggetti (90,04%) erano wild-type per entrambi i geni. In 268 pazienti (9,71%) era presente una variante in uno solo dei due geni, mentre 7 soggetti (0,25%) erano portatori contemporaneamente dell'allele variante per FV Leiden e per FII G20210A.

FV Leiden	FII G20210A	n.	% della coorte
GG *(wt)*	GG *(wt)*	2.486	90,04
GA *(etero)*	GG *(wt)*	146	5,29
AA *(omozig mut)*	GG *(wt)*	9	0,33
GG *(wt)*	GA *(etero)*	113	4,09
GA *(etero)*	GA *(etero)*	6	0,22
GA *(etero)*	AA *(omozig mut)*	1	0,04
AA *(omozig mut)*	GA *(etero)*	0	0,00
AA *(omozig mut)*	AA *(omozig mut)*	0	0,00

Tabella 4.3. Combinazioni genotipiche FV Leiden/FII G20210A nella coorte primaria.

Tra i sette doppi portatori, sei presentavano la combinazione GA/GA, cioè eterozigosi per entrambi i target, mentre un paziente presentava FV GA *(eterozigote)* associato a F2 AA *(omozigote mutato)*. Non sono stati osservati casi con FV AA associato a FII GA né doppi omozigoti AA/AA.

4.4 Distribuzione per sesso, provenienza e andamento temporale

La popolazione sottoposta allo screening combinato era costituita prevalentemente da donne (76,7%). Tra i portatori di FV Leiden, sia eterozigoti che omozigoti mutati, erano presenti 111 femmine e 51 maschi; tra i portatori di FII G20210A, sempre eterozigoti più omozigoti mutati, 82 femmine e 38 maschi. Dei sette doppi portatori, cinque erano maschi e due femmine. Tali dati sono riportati esclusivamente in forma descrittiva e non sono stati utilizzati per formulare inferenze sul rischio individuale.

Profilo	Femmine	Maschi	Totale
Coorte primaria	2.119	642	2.761
Portatori FV Leiden	111	51	162
Portatori FII G20210A	82	38	120
Doppi portatori FV/FII	2	5	7

Tabella 4.4. Distribuzione per sesso dei principali profili genotipici.

Le principali provenienze della coorte erano Jesi Ospedale (811 pazienti), Senigallia Ospedale (534), Loreto Ospedale (455), esterni INRCA (398), esterni Osimo (246) e Fabriano Ospedale (176). Le restanti 141 osservazioni erano distribuite tra reparti interni e altre sedi con numerosità inferiori. La provenienza deve essere interpretata come origine della richiesta e del campione, e non come residenza del paziente.

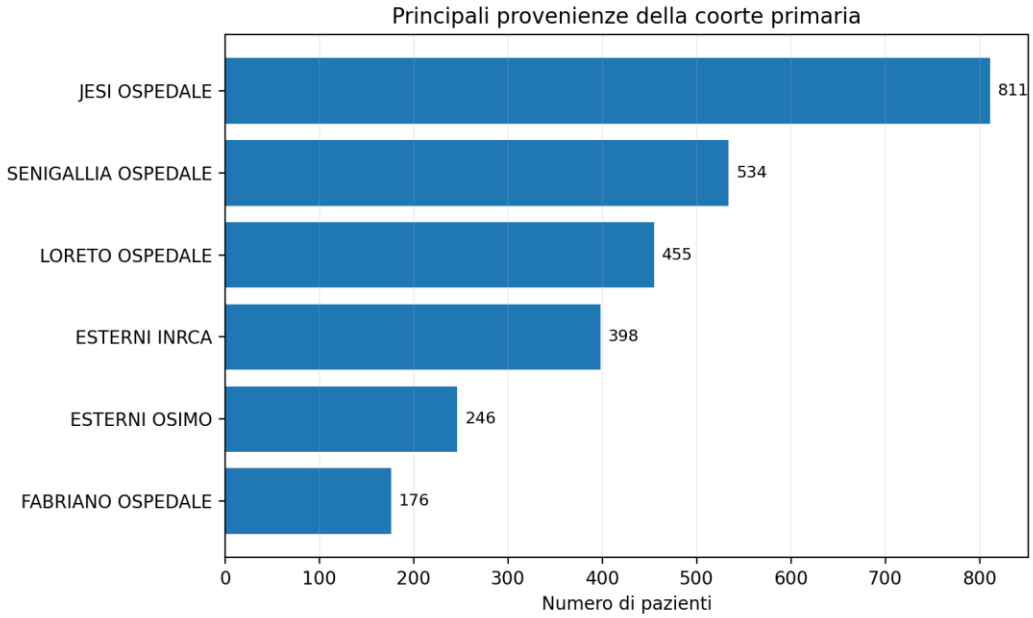


Figura 4.3. Principali provenienze della coorte primaria.

Considerando, per ciascun paziente, l'anno della prima determinazione utile con disponibilità di entrambi i risultati FV/FII, la numerosità della coorte è risultata pari a 482 pazienti nel 2021, 436 nel 2022, 551 nel 2023, 604 nel 2024, 616 nel 2025 e 72 nella prima metà del 2026. Il dato del 2026 è parziale, poiché il database disponibile si arresta al 30 maggio, e non è pertanto direttamente confrontabile con gli anni completi.

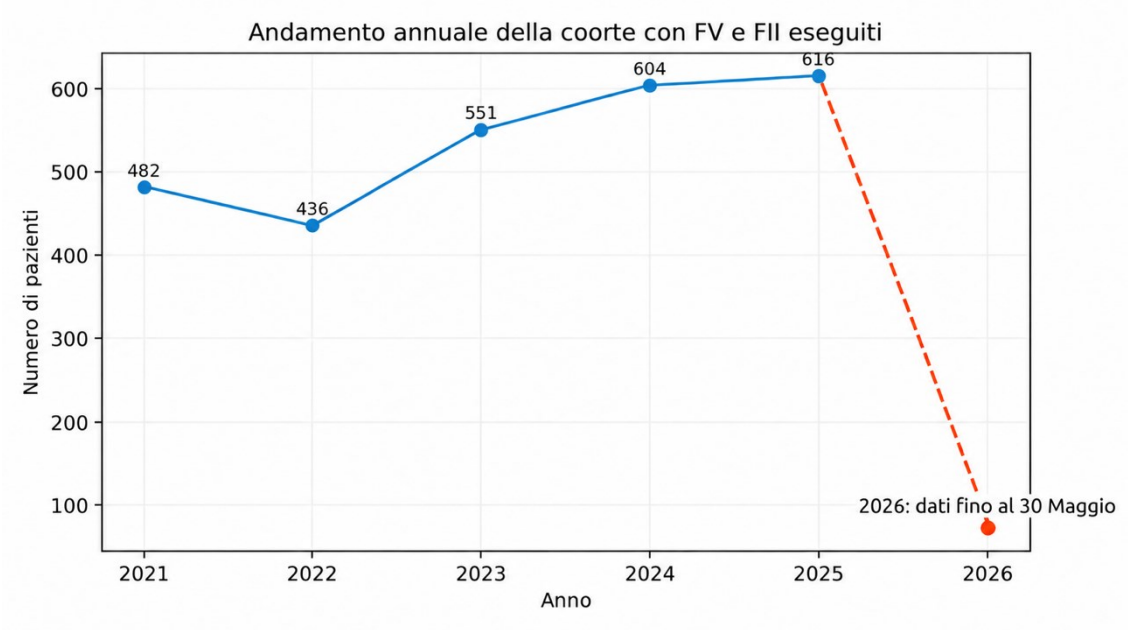


Figura 4.4. Andamento annuale della coorte sottoposta a test combinato F5 Leiden/F2 G20210A.

4.5 Esecuzione contestuale dei test MTHFR

Nella coorte primaria, il test MTHFR C677T risultava eseguito in 1.576 pazienti (57,1%) e il test MTHFR A1298C in 1.199 (43,4%). Entrambi i test erano disponibili in 1.172 pazienti (42,4%), mentre almeno uno dei due era stato eseguito in 1.603 soggetti (58,1%), (Figura 4.5).

Tra i 1.576 soggetti testati per C677T, 453 presentavano genotipo CC *(wild-type)*, 747 CT *(eterozigote)* e 376 TT *(omozigote mutato)*. Tra i 1.199 soggetti testati per A1298C, 589 presentavano genotipo AA *(wild-type)*, 490 AC *(eterozigote)* e 120 CC *(omozigote mutato)*. Nei sette soggetti doppi portatori FV/FII, il test C677T era stato eseguito in quattro casi (tre CT *(etero)* e un TT *(omo mutato)*), mentre il test A1298C era stato eseguito in tre casi (due AC *(etero)* e un AA *(wild-type)*).

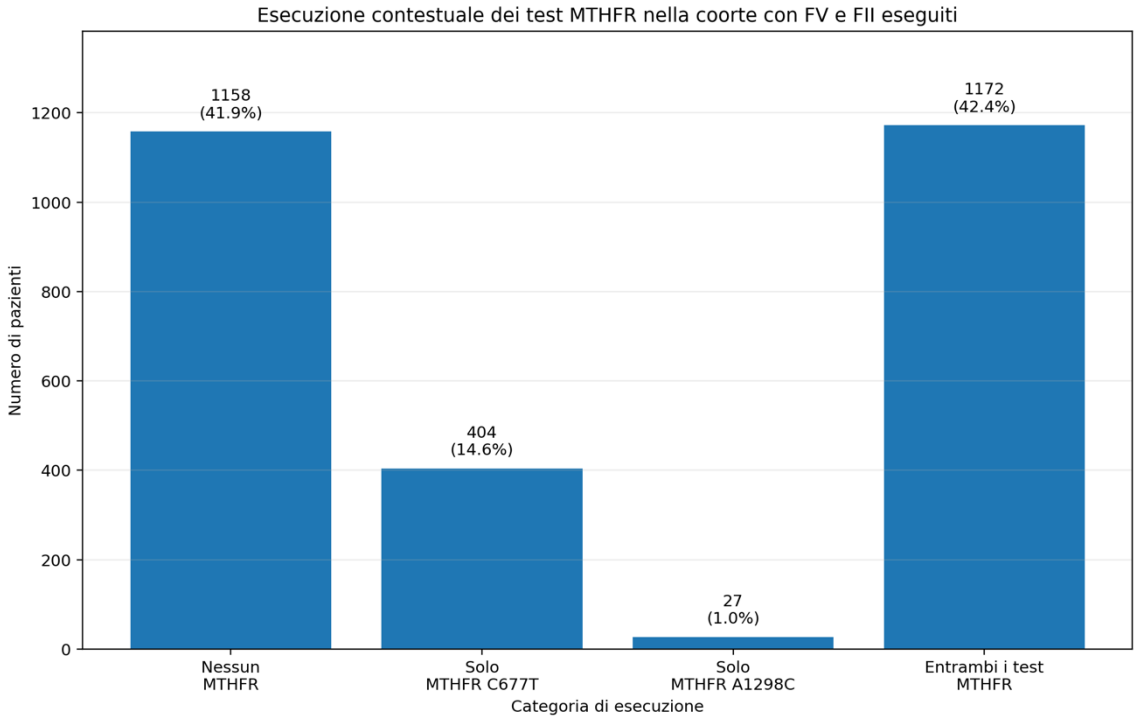


Figura 4.5. Distribuzione dell'esecuzione contestuale dei test MTHFR C677T e A1298C nella coorte primaria sottoposta a genotipizzazione per Fattore V Leiden e Fattore II G20210A.

Indicatore MTHFR nella coorte primaria	n.	% su 2.761
C677T eseguito	1.576	57,1
A1298C eseguito	1.199	43,4
Entrambi eseguiti	1.172	42,4
Almeno uno dei due eseguito	1.603	58,1

Tabella 4.5. Frequenza di esecuzione dei test MTHFR nella coorte primaria.

4.6 Coerenza dei risultati nei test ripetuti

In un'ottica prevalentemente tecnico-laboratoristica è stata inoltre verificata la concordanza dei risultati nei pazienti sottoposti a più determinazioni dello stesso target. Sono stati identificati 96 pazienti con ripetizione del test FV Leiden e 62 con ripetizione del test FII G20210A. Nei risultati interpretabili non sono state osservate discordanze genotipiche tra determinazioni ripetute dello stesso paziente. Tale dato rappresenta un indicatore descrittivo di coerenza interna del database, pur non sostituendo una specifica procedura di validazione analitica.

Target	Pazienti con test ripetuto	Discordanze genotipiche osservate
FV Leiden	96	0
FII G20210A	62	0
MTHFR C677T	67	0 tra i risultati interpretabili
MTHFR A1298C	42	0 tra i risultati interpretabili

Tabella 4.6. Coerenza interna dei genotipi nei pazienti con determinazioni ripetute.

5. DISCUSSIONE

5.1 Inquadramento generale dei risultati

Il presente lavoro descrive l'esperienza di un laboratorio di diagnostica molecolare su una casistica ampia e territorialmente diversificata, con 14.317 determinazioni registrate in poco più di cinque anni e 2.761 pazienti nei quali FV Leiden e FII G20210A erano stati studiati entrambi. L'interesse principale non è la stima della prevalenza nella popolazione generale, ma la caratterizzazione di ciò che effettivamente giunge al laboratorio: volumi di attività, profili genotipici, combinazioni di varianti e pattern di richiesta. Questa distinzione è essenziale, perché le linee guida sottolineano che l'impiego dei test di trombofilia deve essere contestualizzato alla specifica situazione clinica e non esteso indiscriminatamente alla popolazione generale [6].

5.2 Fattore V Leiden e Fattore II G20210A nella casistica INRCA

Nella coorte selezionata, il 5,87% dei pazienti era portatore di FV Leiden e il 4,35% di FII G20210A. Queste frequenze risultano compatibili con il fatto che si tratti di una popolazione sottoposta a screening e non di un campione casuale di popolazione. Per FV Leiden, GeneReviews riporta una distribuzione fortemente dipendente dall'origine geografica e valori generalmente inferiori nell'Europa meridionale rispetto ad alcune aree dell'Europa settentrionale; per FII G20210A, la prevalenza di eterozigosi nella popolazione generale europea è descritta nell'ordine di circa 1,7–3%, con valori mediamente più elevati nell'Europa meridionale [7,9,17]. Anche studi italiani hanno mostrato una marcata variabilità regionale, confermando che il confronto tra casistiche deve essere effettuato con cautela [18].

5.3 Combinazioni genotipiche e doppia positività

La presenza contemporanea delle varianti FV Leiden e FII G20210A è stata osservata in sette pazienti, pari allo 0,25% della coorte. Sei erano doppi eterozigoti e uno presentava eterozigosi per FV associata a omozigosi per FII. La doppia positività è numericamente rara, ma merita attenzione dal punto di vista laboratoristico, perché la coesistenza di più difetti trombofilici può modificare il profilo di rischio rispetto alla presenza di un singolo difetto e rappresenta una delle ragioni per cui un referto genetico deve essere interpretato nel contesto clinico complessivo [7,9]. Il presente database, tuttavia, non contiene in

modo sistematico eventi trombotici, familiarità, esposizione ormonale, gravidanza o altri fattori acquisiti; non è quindi possibile associare direttamente le combinazioni genotipiche osservate a esiti clinici individuali.

5.4 Significato del dato MTHFR nel percorso di laboratorio

Un risultato rilevante dal punto di vista organizzativo è l'elevata frequenza con cui i test MTHFR compaiono accanto ai due target maggiori: almeno uno dei due polimorfismi MTHFR era stato analizzato nel 58,1% della coorte F5/F2. Questo dato documenta un modello di richiesta storicamente diffuso nei pannelli di trombofilia. Le conoscenze attuali, tuttavia, hanno modificato in modo sostanziale l'interpretazione di tali varianti. L'American Society of Hematology non include MTHFR C677T e A1298C tra le componenti raccomandate di un pannello di trombofilia venosa, poiché tali polimorfismi non hanno dimostrato un'associazione clinicamente utile con il TEV; analogamente, l'ACMG ha concluso che il test MTHFR presenta utilità clinica minima nella valutazione routinaria della trombofilia [6,12]. La presenza di questi esami nel database mantiene comunque valore per una tesi TSLB, perché consente di mostrare come il laboratorio debba adattare i propri pannelli e la propria offerta diagnostica all'evoluzione delle evidenze scientifiche.

5.5 Valore tecnico del flusso di lavoro molecolare

Il percorso analitico utilizzato associa estrazione automatizzata del DNA e genotipizzazione mediante PCR in tempo reale con analisi di melting. L'automazione con ELITe InGenius® riduce i passaggi manuali e permette una gestione standardizzata dell'estrazione basata su tecnologia a biglie magnetiche [16]. La successiva amplificazione sul Rotor-Gene® Q sfrutta una configurazione rotatoria progettata per uniformare le condizioni termiche e il percorso ottico dei campioni; il produttore riporta un'uniformità termica di ±0,02 °C, caratteristica particolarmente utile nelle applicazioni di melting [15]. La presenza di un controllo positivo e di un NTC in ogni seduta assume un ruolo centrale: il primo verifica la capacità del sistema di riconoscere il profilo atteso, mentre il secondo consente di intercettare segnali compatibili con contaminazione. Le raccomandazioni MIQE 2.0 ribadiscono il valore della documentazione completa del

campione, delle condizioni analitiche, dei controlli e dei criteri interpretativi per garantire riproducibilità e trasparenza delle metodiche PCR [14].

5.6 Ruolo del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico

Questa impostazione rende evidente il ruolo del TSLB come figura che collega la fase preanalitica, il processo strumentale e la qualità del dato. La correttezza del risultato molecolare non dipende esclusivamente dal termociclatore o dal kit, ma dalla concatenazione di operazioni controllate: identificazione e conservazione del campione, corretta preparazione dei reagenti, prevenzione della contaminazione, gestione dei controlli, verifica dei profili di amplificazione e melting, tracciabilità delle ripetizioni e registrazione del risultato. Il fatto che nelle determinazioni ripetute di F5 e F2 non siano state osservate discordanze genotipiche offre un elemento descrittivo favorevole sulla coerenza interna della casistica. Tale osservazione non rappresenta una validazione formale del metodo, che richiederebbe un disegno dedicato con materiali di riferimento, precisione, ripetibilità, riproducibilità e criteri prestabiliti, ma valorizza la corretta gestione del dato di routine.

5.7 Distribuzione della richiesta e caratteristiche della popolazione

La marcata prevalenza del sesso femminile (76,7%) e la maggiore numerosità nelle fasce inferiori ai 50 anni suggeriscono che una quota rilevante dei test possa essere richiesta in contesti tipici dell'età riproduttiva o in presenza di specifici quesiti clinici. Questa interpretazione deve tuttavia rimanere prudente, poiché il database non contiene in maniera sistematica la motivazione della richiesta. Analogamente, la distribuzione per provenienza mostra una forte partecipazione dei presidi di Jesi, Senigallia, Loreto, Osimo e Fabriano e degli utenti esterni INRCA, ma tale informazione descrive la rete dei flussi diagnostici più che la distribuzione geografica delle varianti nella popolazione.

5.8 Limiti dello studio

I principali limiti derivano dalla natura retrospettiva e laboratoristica della raccolta. La casistica è selezionata dai criteri di richiesta del test e non è rappresentativa della popolazione generale della provincia di Ancona. Non sono disponibili in modo strutturato indicazione clinica, storia personale e familiare di VTE, terapie ormonali, gravidanza, comorbidità, origine etnica o altri fattori acquisiti che consentirebbero di contestualizzare

il risultato genetico. La provenienza del campione non coincide necessariamente con la residenza del paziente. Il 2026 è inoltre rappresentato soltanto fino al 30 maggio. Infine, il database contiene il risultato finale del test ma non tutti i parametri grezzi di qualità della singola seduta, quali curve complete, temperature di melting, identificativi di lotto e metriche strumentali; di conseguenza, l'analisi di qualità è limitata alla coerenza dei risultati registrati.

5.9 Considerazioni conclusive

Nel complesso, lo studio mostra come un database di routine possa essere utilizzato non solo per descrivere la distribuzione delle varianti F5 e F2, ma anche per ricostruire il percorso diagnostico e mettere in evidenza aspetti organizzativi e di qualità propri del laboratorio. La casistica INRCA evidenzia una frequenza di portatori del 5,87% per F5 Leiden e del 4,35% per F2 G20210A nella popolazione sottoposta a screening, con sette casi di doppia positività. La frequente associazione dei test MTHFR documenta inoltre l'importanza di una periodica revisione dei pannelli molecolari alla luce delle evidenze e delle linee guida. In una prospettiva TSLB, il messaggio principale è che accuratezza analitica, standardizzazione, tracciabilità e gestione critica del dato sono componenti inseparabili della qualità diagnostica molecolare.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Gale AJ. Current understanding of hemostasis. Toxicol Pathol. 2011;39(1):273-280. doi:10.1177/0192623310389474.

2. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. Indian J Anaesth. 2014;58(5):515-523. doi:10.4103/0019-5049.144643.

3. Hoffman M, Monroe DM III. A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost. 2001;85(6):958-965. PMID:11434702.

4. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. Blood Rev. 2015;29(1):17-24. doi:10.1016/j.blre.2014.09.003.

5. Arachchillage DJ, Mackillop L, Chandratheva A, Motawani J, MacCallum P, Laffan M. Thrombophilia testing: a British Society for Haematology guideline. Br J Haematol. 2022;198(3):443-458. doi:10.1111/bjh.18239.

6. Middeldorp S, Nieuwlaat R, Baumann Kreuziger L, et al. American Society of Hematology 2023 guidelines for management of venous thromboembolism: thrombophilia testing. Blood Adv. 2023;7(22):7101-7138. doi:10.1182/bloodadvances.2023010177.

7. Pastori D, Menichelli D, Valeriani E, Pignatelli P. Factor V Leiden Thrombophilia. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2026. Updated 16 May 2024.

8. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature. 1994;369(6475):64-67. doi:10.1038/369064a0.

9. Kujovich JL. Prothrombin Thrombophilia. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2026. Updated 4 February 2021.

10. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3′-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996;88(10):3698-3703. PMID:8916933.

11. Simone B, De Stefano V, Leoncini E, et al. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin

20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. Eur J Epidemiol. 2013;28(8):621-647. doi:10.1007/s10654-013-9825-8.

12. Hickey SE, Curry CJ, Toriello HV. ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. Genet Med. 2013;15(2):153-156. doi:10.1038/gim.2012.165. See also: Bashford MT, Hickey SE, Curry CJ, Toriello HV. Addendum. Genet Med. 2020;22(12):2125. doi:10.1038/s41436-020-0843-0.

13. Deloughery TG, Hunt BJ, Barnes GD, Connors JM. A call to action: MTHFR polymorphisms should not be a part of inherited thrombophilia testing. Res Pract Thromb Haemost. 2022;6(4):e12739. doi:10.1002/rth2.12739.

14. Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. Clin Chem. 2025;71(6):634-651. doi:10.1093/clinchem/hvaf043.

15. QIAGEN. Rotor-Gene® Q MDx User Manual. Version for Rotor-Gene Q Software 2.3.5 or higher. QIAGEN; 2023.

16. ELITechGroup Molecular Diagnostics. ELITe InGenius® system and extraction reagents: official product and technical documentation. ELITechGroup; accessed September 2026.

17. Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. Thromb Haemost. 1998;79(4):706-708. PMID:9569177.

18. Sottilotta G, Mammì C, Furlò G, Oriana V, Latella C, Trapani Lombardo V. High incidence of factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy southern Italians. Clin Appl Thromb Hemost. 2009;15(3):356-359. doi:10.1177/1076029607310218.