



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE  
*INDIRIZZO MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE*

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Giacomo Laffi

**Incidenza, caratteristiche e prognosi delle trombosi venose  
profonde distali asintomatiche nell'ambito di un reparto di  
medicina interna**

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

**Dottorando**

*Dott Gabriele Ciuti*

**Tutore**

*Prof. Alberto Moggi Pignone*

**Coordinatore**

Prof. Giacomo Laffi

Anni 2010/2013

# Indice

<b>1 INTRODUZIONE.....</b>	<b>.....</b>
1.1 Clinica e test preclinici.....	23
<b>2 LE TROMBOSI VENOSE PROFONDE DISTALI.....</b>	<b>27</b>
2.1 Cenni di anatomia del sistema venoso distale.....	27
2.2 Incidenza.....	29
2.3 Patogenesi e fattori di rischio.....	29
2.4 Clinica.....	30
2.5 Diagnosi strumentale.....	30
2.6 Prognosi.....	34
2.7 Profilassi e terapia.....	35
2.8 Revisione della letteratura.....	36
<b>3 RICERCHE PERSONALI.....</b>	<b>41</b>
3.1 Scopo dello studio.....	41
3.2 Disegno dello studio.....	41
3.3 Pazienti esaminati.....	46
3.4 Materiali e metodi.....	46
3.5 Analisi Statistica.....	48
3.6 Risultati.....	50
3.6.1 Caratteristiche Cliniche.....	50
3.6.2 Fattori di rischio cardiovascolari.....	51
3.6.3 Patologia medica acuta presente al momento del ricovero.....	52
3.6.4 Fattori di rischio per TEV.....	53
3.6.5 Fattori predittivi per TVPd.....	57
3.6.6 Profilassi antitrombotica precedente al ricovero.....	58
3.6.7 Gruppo di pazienti con TVPd.....	59
<b>4 DISCUSSIONE.....</b>	<b>62</b>
<b>5 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>66</b>

# 1 INTRODUZIONE

La malattia tromboembolica venosa (TEV), termine che comprende la trombosi venosa profonda (TVP) e la sua più temibile complicanza, l'embolia polmonare (EP), rappresenta la terza causa di mortalità per malattie cardiovascolari dopo l'infarto del miocardio e l'ictus cerebrale. La TVP, che è più frequente a carico degli arti inferiori, può riconoscere diversi fattori di rischio quali eteroplasie, traumi, chirurgia, immobilizzazione, gravidanza e puerperio, uso di contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva, trombofilia (ereditaria e acquisita). Le TVP degli arti inferiori si suddividono in base alla sede della vena interessata in: prossimali (vene femorali e poplitea) oppure distali (vene gemellari, tibiali, peroniere, soleali, plantari). E' ben noto come le TVP prossimali siano caratterizzate da un elevato rischio di embolizzazione e di letalità se non trattate, per cui è univocamente accettata la necessità di iniziare una terapia anticoagulante il più precocemente possibile(1, 2). Minori sono invece le evidenze sulle TVP distali (TVPd) per quanto riguarda l'incidenza, la clinica, la prognosi e la terapia.

La gestione delle TVPd è quindi un problema ancora aperto ed è necessario identificare quali siano le caratteristiche delle TVPd più utili a stratificare il rischio nel singolo paziente e a decidere la strategia terapeutica più adeguata in termini di efficacia e sicurezza.

## LA MALATTIA TROMBOEMBOLICA VENOSA

### Epidemiologia

La malattia TEV si presenta come primo evento in circa 100/100.000 soggetti ogni anno negli Stati Uniti e la sua incidenza aumenta esponenzialmente da meno di 5/100.000 tra gli individui con età inferiore a 15 anni, a circa 500/100.000 in quelli di 80 anni d'età.

Approssimativamente 1/3 dei pazienti con TEV manifesta un'EP associata o meno a TVP, mentre 2/3 presentano solo una TVP. Nonostante la terapia anticoagulante, la malattia TEV recidiva in modo frequente nei primi mesi dopo l'evento iniziale (circa il 7% a 6 mesi). La mortalità per TVP si aggira intorno al 6% e quella per EP intorno al 12% entro 1 mese dalla diagnosi. Il periodo dell'anno sembra avere un'influenza sull'incidenza, con una maggior frequenza di eventi TEV nei mesi invernali.

Nel 25-50% dei pazienti il primo evento si verifica in condizioni idiopatiche, ovvero in assenza di un fattore di rischio acquisito (neoplasia, gravidanza e puerperio, uso di estroprogestinici, immobilizzazione prolungata, traumi e interventi chirurgici)(3, 4).

### Patogenesi

Nel XIX secolo Rudolph Virchow fu il primo a identificare le alterazioni fisiopatologiche che, da sole o in combinazione tra loro, predispongono allo sviluppo di trombosi venosa(5).

La cosiddetta triade di Virchow (1856) comprende la stasi, l'ipercoagulabilità e le alterazioni della parete vasale e rimane ancora oggi un utile punto di partenza per la discussione della patogenesi del TEV.

Con il termine **stasi** si indica sia una riduzione della velocità lineare del flusso che una riduzione del ritorno venoso, le cui cause possono essere generali o locali. Tra le cause generali vi sono lo scompenso cardiaco congestizio e condizioni che provocano iperviscosità ematica, come le malattie mieloproliferative, le poliglobulie secondarie o le gammopatie monoclonali. A livello locale un rallentamento del flusso sanguigno si può avere in caso di dilatazione venosa, come avviene in pazienti con varici venose degli arti inferiori, oppure in situazioni che determinano ostacolo al deflusso negli arti, quali una prolungata immobilizzazione (in cui viene meno il meccanismo di pompa dovuto all'attività muscolare) o una compressione venosa estrinseca (da utero gravido, masse pelviche) o intrinseca (pregressa TVP).

Nonostante l'osservazione clinica e gli studi sperimentali abbiano da tempo mostrato che la comparsa di trombosi venosa si associa con grandissima frequenza alla stasi venosa, il preciso ruolo di quest'ultima nell'insorgenza della trombosi non è ancora ben definito(6).

Uno stato di **ipercoagulabilità** può realizzarsi sia a livello sistemico che a livello locale, ma la condizione necessaria per la formazione del trombo, in entrambi i casi, è rappresentata dal superamento del potenziale antitrombotico locale della parete vasale. Particolare interesse riveste in questo settore la trombofilia, ovvero uno stato di ipercoagulabilità associato ad anomalie dell'emostasi. Nella pratica clinica stati di ipercoagulabilità possono realizzarsi in condizioni quali traumi o grandi interventi chirurgici. In questi casi si verifica, come conseguenza del traumatismo tissutale, il passaggio in circolo di materiale tromboplastinico con attivazione sistemica della coagulazione di grado tale da superare il potenziale antitrombotico locale. Vi sono poi situazioni di ipercoagulabilità distrettuale dovuta all'attivazione di monociti-macrofagi che sintetizzano tromboplastina o alla produzione di fattori procoagulanti da parte di cellule neoplastiche(7).

Le **alterazioni della parete vasale**, terza componente della triade di Virchow, sono rappresentate essenzialmente dal danno e dalla disfunzione endoteliale. Le cellule endoteliali sono cellule metabolicamente attive capaci di liberare numerose sostanze attive sul sistema emostatico. In condizioni fisiologiche, l'endotelio conserva intatte le sue caratteristiche di tromboresistenza attraverso molteplici meccanismi: 1) azione antiaggregante piastrinica, grazie alla produzione e rilascio di prostaciclina ed ossido nitrico e alla presenza sulla superficie luminale delle cellule endoteliali di ADPasi, in grado di degradare le molecole di ADP prodotte dalle piastrine attivate; 2) azione anticoagulante, svolta dalle molecole di eparansolfato, costitutivamente presenti sulla superficie luminale e in grado di potenziare l'attività dell'antitrombina, e dalla trombomodulina, recettore di membrana che si lega alla trombina favorendo l'attivazione del sistema anticoagulante della proteina C- proteina S; 3) azione fibrinolitica, grazie alla generazione e rilascio di attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA). In caso di danno o attivazione endoteliale, l'endotelio perde le sue caratteristiche di tromboresistenza per acquistare, al contrario, un fenotipo protrombotico, che si realizza anch'esso attraverso molteplici azioni: 1) azione proadesiva e proaggregante piastrinica, mediante la produzione di fattore attivante le piastrine (PAF), potente agonista dell'aggregazione piastrinica, e di fattore di von

Willebrand (vWF), principale collante dell'adesione piastrinica; 2) azione procoagulante, legata all'esposizione del fattore tissutale sulla superficie luminale delle cellule endoteliali e alla disponibilità di una superficie fosfolipidica sulla quale possono assemblarsi i complessi tenasico e protrombinasico della cascata coagulativa; 3) azione antifibrinolitica, grazie al rilascio di inibitori degli attivatori del plasminogeno (PAI)(8).

Tutti i più comuni fattori di rischio per TEV sono riconducibili ad uno o più elementi della triade di Virchow ed il peso relativo di ciascuna delle tre componenti varia nelle diverse situazioni cliniche associate ad un aumentato rischio di trombosi.

### **Fattori di rischio classici**

I fattori di rischio per malattia TEV sono molteplici. Mentre alcuni di questi sono ben consolidati, il peso di altri è ancora oggetto di studio.

#### ***Età***

Il rischio di TEV aumenta in modo esponenziale con l'aumentare dell'età, con un'incidenza che varia da circa 1/10.000 casi/anno nei soggetti di età inferiore ai 40 anni a circa 1/100 casi/anno nei soggetti di età superiore ai 75 anni.

Non è chiaro quanto questo aumento del rischio sia imputabile esclusivamente al fattore età in quanto tale e quanto invece dipenda dalla presenza di altre situazioni la cui prevalenza aumenta all'aumentare dell'età, quali l'immobilizzazione, la riduzione del tono muscolare e l'elevata frequenza di comorbidità.

Il fattore età rimane tuttavia molto importante nella valutazione del rischio tromboembolico e, conseguentemente, nel valutare l'opportunità di eseguire o meno una profilassi in situazioni a rischio(9).

#### ***Sesso***

Sebbene condizioni quali gravidanza, puerperio, uso di contraccettivi orali e terapia ormonale sostitutiva si associno ad un aumento del rischio di TEV nelle donne, gli studi epidemiologici mostrano che gli uomini hanno un rischio lievemente superiore di andare incontro a TEV rispetto alle donne, soprattutto in età più avanzata(9).

#### ***Obesità***

L'obesità è stata a lungo citata come fattore di rischio per TEV, soprattutto in relazione alla comparsa di TVP post-operatoria; tuttavia esistono in letteratura dati contraddittori circa il fatto che si tratti di un fattore di rischio indipendente per malattia TEV(10).

## **Chirurgia**

La chirurgia maggiore rappresenta uno dei fattori di rischio più importanti per TEV. Lo stato di ipercoagulabilità dovuto al passaggio in circolo di materiale tromboplastinico in seguito al traumatismo tissutale e la stasi venosa, conseguente al decubito forzato del paziente sia per l'anestesia che per l'intervento chirurgico, sono gli elementi della triade di Virchow che rendono ragione del rischio trombotico associato alla chirurgia. Un'attivazione transitoria della coagulazione, seppure di grado variabile, avviene praticamente in tutti gli interventi chirurgici, iniziando durante l'intervento e persistendo per almeno 12-24 ore. Tuttavia, il tipo di intervento chirurgico in sé è spesso più importante delle caratteristiche del singolo paziente nel determinare il livello di rischio tromboembolico. La chirurgia ortopedica maggiore e la neurochirurgia sono tra quelle a più elevato rischio. Il rischio di sviluppo di TVP dopo intervento di protesi totale d'anca o ginocchio in assenza di profilassi varia dal 45% al 70% e l'EP fatale si riscontra nell'1%-3% dei pazienti. Un aumentato rischio è associato anche alla chirurgia addomino-toracica, urologica (in particolare la prostatectomia a cielo aperto) e ginecologica. Alcuni studi mostrano come l'EP rappresenti una non infrequente complicanza degli interventi di cardiocirurgia ed in particolare di bypass aorto-coronarico.

Il rischio di TEV non è limitato all'immediato periodo post-operatorio, ma permane per diverse settimane, soprattutto per alcuni tipi di intervento, quali l'artroprotesi d'anca. I dati sull'incidenza complessiva di TEV nei pazienti chirurgici sono stati riportati in molti studi. L'età avanzata, la presenza di neoplasie maligne e altri fattori di rischio generali aumentano il rischio di TVP e/o EP(10).

## **Traumi**

Numerosi studi, autoptici e non, hanno documentato un'elevata incidenza di TVP e/o EP nei pazienti traumatizzati. L'EP costituisce la terza più comune causa di morte in questi pazienti, verificandosi nel 2%-22% di coloro che sopravvivono oltre le prime 24 ore.

Tutti e tre gli elementi della triade di Virchow contribuiscono allo sviluppo di trombosi nei pazienti traumatizzati: il danno della parete vasale, come conseguenza diretta dell'insulto traumatico; la stasi, come risultato di paralisi, immobilizzazione o di un ridotto flusso di sangue secondario a shock emorragico; l'ipercoagulabilità, quale conseguenza dell'attivazione del sistema coagulativo nel tentativo di frenare l'emorragia.

I pazienti a più alto rischio (50%-60%) sono quelli con trauma cranico, trauma spinale, fratture pelviche e degli arti inferiori. Nei pazienti con trauma spinale la frequenza di EP è pari al 5%; il rischio è maggiore durante le prime 2 settimane e l'EP fatale è rara dopo i 3 mesi dal trauma. Al rischio di eventi TEV nei pazienti traumatizzati contribuiscono l'età avanzata, l'immobilizzazione prolungata e il ricorso eccessivo a trasfusioni di sangue(11).

### ***Immobilità***

L'associazione tra immobilità e malattia TEV è stata documentata in numerosi studi: tra questi il Leiden Thrombophilia Study, i cui risultati indicano come il 15,6% dei pazienti con eventi TEV avesse avuto un periodo di immobilità prima dell'evento (sia durante la permanenza in ospedale che a domicilio) rispetto all'1,7% del gruppo di controllo.

Tutte le condizioni caratterizzate da immobilità (immobilizzazione da gesso, allettamento prolungato, paralisi) sono tali da provocare una riduzione dell'attività di pompa muscolare con conseguente stasi venosa. Il rischio tromboembolico incrementa quando all'immobilità si associano altri fattori di rischio.

Alcuni studi mostrano un'aumentata frequenza di eventi TEV anche in rapporto a viaggi aerei di lunga durata, tanto da identificare una sindrome clinica particolare detta "economy class syndrome". Tuttavia, vi è generale consenso nel ritenere che il rischio di eventi TEV clinicamente importanti (quali un'EP massiva) correlati a viaggi aerei di lunga durata sia molto basso e che la maggior parte degli eventi si verifichi in soggetti a rischio a causa di pregressi episodi di TEV o di altri fattori predisponenti(11).

La gravidanza rappresenta una condizione fisiologica associata a notevoli modificazioni del sistema emostatico che conducono ad uno stato di ipercoagulabilità caratterizzato da aumento di diversi fattori della coagulazione, riduzione della proteina S e dell'attività fibrinolitica(12). L'aumentata tendenza alla trombosi provocata da queste alterazioni è amplificata inoltre dalla stasi venosa secondaria alla compressione dei vasi da parte dell'utero gravido(13).

L'incidenza di TEV durante la gravidanza e il puerperio è di circa 0,7-1,3/1.000 donne/anno con un rischio di circa 10 volte più elevato rispetto a donne non gravide della stessa età. Il rischio è maggiore nel terzo trimestre di gravidanza e incrementa ulteriormente nel puerperio. Allo stato di ipercoagulabilità si aggiungono infatti altre situazioni di rischio, quali il parto cesareo, l'immobilità o l'utilizzo di estrogeni.



Il rischio di TEV legato alla gravidanza è sensibilmente maggiore nelle donne con alterazioni trombofiliche, quali ad esempio un deficit di antitrombina, proteina C o proteina S oppure la resistenza alla proteina C attivata, rispetto a donne gravide prive di tali alterazioni. Tra le donne con storia di TEV in gravidanza, l'incidenza di recidive durante una successiva gravidanza è stata stimata tra il 4% e il 15% (13).

### ***Contraccettivi orali e terapia ormonale sostitutiva***

Sin dagli anni '60 del Novecento è noto che l'uso di contraccettivi orali si associa ad un aumentato rischio di TEV.

La trombogenicità dei contraccettivi orali è riconducibile essenzialmente a modificazioni del sistema emostatico, simili a quelle che si verificano fisiologicamente durante la gravidanza. L'uso della pillola anticoncezionale può infatti ridurre i livelli plasmatici di inibitori fisiologici della coagulazione quali la proteina S e l'antitrombina, aumentare i livelli plasmatici di alcuni fattori della coagulazione e alterare la risposta alla proteina C attivata. Tali modificazioni sono dose-dipendenti.

I contraccettivi orali costituiscono il più comune fattore di rischio transitorio per TEV in donne in età fertile. È stato dimostrato che l'aumento del rischio di eventi TEV nelle donne che usano contraccettivi orali diviene evidente dopo 4 mesi dall'inizio dell'assunzione, non è influenzato dalla durata dell'assunzione e scompare entro 3 mesi dalla sospensione dei contraccettivi orali.

Anche se inizialmente il rischio era stato attribuito essenzialmente alla dose di estrogeni, successivamente è stato osservato che esso dipende anche dal tipo di progestinici. I contraccettivi orali di terza generazione, contenenti desogestrel o gestodene come progestinici, conferiscono un rischio (anche di EP fatale) 2 volte maggiore rispetto a quelli di seconda generazione, contenenti levonorgestrel. Vi sono inoltre dati di laboratorio che mostrano una più spiccata resistenza alla proteina C attivata con l'uso di contraccettivi orali di terza rispetto a quelli di seconda generazione.

Il rischio di TEV correlato all'uso di contraccettivi orali è maggiore in donne con alterazioni trombofiliche, essendo aumentato di 20 volte in donne portatrici della mutazione Leiden del fattore V e di 16 volte in quelle con la mutazione G20210A del gene della protrombina. Il rischio inoltre è particolarmente marcato se all'uso di contraccettivi orali si associano il fumo di sigaretta e l'obesità.

Diversi studi hanno dimostrato che anche la terapia ormonale sostitutiva in menopausa è associata a un rischio aumentato di 2-4 volte di andare incontro a

eventi TEV. Le dosi di estrogeni usate per la terapia ormonale sostitutiva sono molto minori di quelle usate per la contraccezione e la via di somministrazione è talvolta diversa (transdermica anziché orale). Il rischio relativo è tuttavia considerevole e non molto diverso da quello stimato per i contraccettivi orali. Ciò può essere spiegato dal fatto che queste preparazioni sono utilizzate da un gruppo di donne di età più avanzata, con un'incidenza di base di TEV maggiore rispetto a quella osservata per le donne in età fertile. Di conseguenza, la terapia ormonale sostitutiva conduce a un maggior numero di eventi TEV nella popolazione femminile (rischio assoluto) rispetto all'uso di contraccettivi orali(13).

### ***Neoplasie maligne***

Le neoplasie maligne sono condizioni associate ad un aumentato rischio trombotico. Fu Armand Trousseau, nel 1865, a notare per primo come nei pazienti neoplastici vi fosse un'elevata frequenza di trombosi, individuando nelle tromboflebiti migranti ("saltans et migrans") un segno specifico per la presenza di una neoplasia occulta.

Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare tale predisposizione alla trombosi nei pazienti neoplastici. In primo luogo, deve essere considerata quale fattore causale la neoplasia maligna di per sé. Questa infatti, oltre ad avere effetti umorali (secrezione di sostanze procoagulanti ad azione attivante il fattore X -cancer procoagulant- e di fattore tissutale da parte delle cellule tumorali, riduzione dell'attività fibrinolitica, anomalie della funzione piastrinica, presenza di lupus anticoagulant), è in grado di esercitare anche effetti meccanici (ad esempio compressione fino all'ostruzione dei vasi venosi) e di condizionare effetti generali (ad esempio reazioni della fase acuta e proteine infiammatorie). In secondo luogo, sono da considerare gli effetti della malattia (quali ad esempio l'immobilizzazione, il ridotto introito dietetico di vitamine) e gli effetti del trattamento, sia esso chirurgico, radioterapico o chemioterapico.

Importanti sono anche i reciproci rapporti tra neoplasia e attivazione della coagulazione. Se è vero infatti che la neoplasia è in grado di indurre modificazioni del sistema coagulativo conducendo ad uno stato di ipercoagulabilità, è altrettanto vero che la formazione di fibrina, quale end-point dell'attivazione di tale sistema, è importante non solo perchè favorisce la trombosi, ma anche perchè influenza la crescita e la disseminazione tumorale.

Gli eventi trombotici nei pazienti neoplastici possono manifestarsi non solo come TVP e/o EP ma anche come trombosi in sedi inusuali, quali le vene degli arti

superiori o del collo, le vene cave, le vene viscerali o quelle cerebrali. Approssimativamente si calcola che pazienti affetti da neoplasie maligne abbiano un rischio di eventi TEV maggiore di circa 7 volte rispetto a soggetti di controllo.

I tipi di tumore che più frequentemente si associano a complicanze tromboemboliche sono quelli pancreatici, gastro-intestinali, ovarici e polmonari ed, in particolare, gli adenocarcinomi mucinosi(14).

Anche se eventi trombotici si verificano più comunemente nel contesto di neoplasie maligne in stadio avanzato, questi possono rappresentare talvolta la prima manifestazione di una neoplasia occulta e precedere anche di anni la diagnosi di tumore. In uno studio prospettico basato su criteri diagnostici standardizzati e su una chiara stratificazione per altri fattori di rischio, Prandoni e coll.(15) hanno dimostrato che esiste un'associazione significativa fra la diagnosi di trombosi venosa idiopatica ed il successivo riscontro di una neoplasia clinicamente manifesta, mentre tale associazione è debole in pazienti nei quali è individuabile un fattore di rischio transitorio per TEV. Sulla base dei risultati di questo e altri studi, si stima che pazienti con un primo episodio di TEV idiopatico abbiano una probabilità del 10%-20% di avere una neoplasia maligna alla diagnosi o entro i successivi 2 anni. Pertanto, un esame fisico accurato, esami di laboratorio e indagini strumentali, quali una radiografia del torace e un'ecografia addominale, dovrebbero essere eseguiti in tutti i pazienti che presentano un primo episodio TEV idiopatico al fine di escludere la possibile presenza di una neoplasia occulta. Tuttavia, i dati di alcuni studi dimostrano che una diagnosi più precoce non si traduce di fatto in un miglioramento della prognosi e della sopravvivenza di questi pazienti(16).

### ***Precedenti eventi tromboembolici venosi***

Precedenti eventi TEV rappresentano un fattore di rischio per recidiva. In particolare, è stato stimato che pazienti con pregressi episodi di TEV, quando esposti a situazioni ad alto rischio (chirurgia maggiore, immobilizzazione prolungata, etc), hanno un rischio circa 8 volte maggiore di sviluppare un nuovo episodio rispetto a pazienti senza storia di TVP e/o EP. I pazienti con un primo episodio di EP hanno un rischio 3 volte maggiore di una nuova EP rispetto a quelli con un primo episodio di TVP non associato a EP(10).

### **Trombofilia**

Con il termine trombofilia si indicano alterazioni dell'emostasi, ereditarie o acquisite,

che sono responsabili di uno stato di ipercoagulabilità e rendono un individuo a più alto rischio di sviluppo di trombosi. Il termine è classicamente utilizzato per indicare pazienti con eventi tromboembolici atipici, caratterizzati da: 1) precoce età di insorgenza; 2) tendenza alla recidiva; 3) localizzazioni inusuali o multiple; 4) gravità dell'evento sproporzionata rispetto all'entità di eventuali fattori scatenanti.

Si possono considerare due categorie di stati trombofilici: quelli ereditari e quelli acquisiti.

Per trombofilia ereditaria si intende una tendenza al tromboembolismo geneticamente determinata con tutte le caratteristiche sopra indicate in presenza di una storia familiare positiva per eventi tromboembolici. Tuttavia, questa definizione non è applicabile ai più recenti tipi di trombofilia ereditaria, poiché, a causa della loro bassa penetranza clinica, si possono trovare famiglie la cui storia è completamente silente.

Gli stati trombofilici ereditari comprendono: 1) difetti degli inibitori fisiologici della coagulazione (antitrombina, proteina C, proteina S, cofattore eparinico II, TFPI -Tissue Factor Pathway Inhibitor-); 2) aumentati livelli o aumentata funzione dei fattori della coagulazione (resistenza alla proteina C attivata, fattore V Leiden, polimorfismo G20210A del gene della protrombina, disfibrinogenemia, elevati livelli dei fattori della coagulazione VIII, IX e XI); 3) iperomocisteinemia; 4) alterazioni del sistema fibrinolitico (difetto di plasminogeno, difetto di t-PA, elevati livelli di PAI-1, elevati livelli di TAFI -Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor- ed elevati livelli di Lipoproteina(a)).

L'identificazione di un numero sempre maggiore di anomalie permette oggi di riconoscere una predisposizione ereditaria in circa il 60%-70% dei pazienti con TEV(17-19).

Gli stati trombofilici acquisiti comprendono invece condizioni cliniche eterogenee classicamente riconosciute come associate ad un aumentato rischio di TEV, quali età avanzata, immobilizzazione, chirurgia, traumi, uso di estroprogestinici, gravidanza e puerperio, neoplasie maligne, infezioni e stati infiammatori. Particolare rilevanza assume tra questi ultimi anche la sindrome da anticorpi antifosfolipidi.

Le due categorie tuttavia non si escludono a vicenda: il rischio tromboembolico deve essere considerato infatti come il risultato di un processo dinamico che vede l'interazione tra le alterazioni trombofiliche ereditarie e i fattori di rischio acquisiti(20).

I pazienti con trombofilia ereditaria dovrebbero essere considerati pertanto ad alto

rischio di TEV (rischio peraltro variabile per le diverse alterazioni) e dovrebbe essere rivolta loro un'attenzione maggiore in termini di misure profilattiche e terapeutiche. Mentre per quanto riguarda la profilassi vi è sostanziale accordo sulla necessità di proteggere adeguatamente questi soggetti quando esposti a situazioni di rischio acquisite, più dibattuto è il discorso relativo alla terapia. Il trattamento in acuto di un episodio di TEV in pazienti con trombofilia ereditaria è sostanzialmente analogo a quello di altri pazienti senza predisposizione genetica; inoltre, al momento, non vi sono evidenze che la conoscenza della presenza di un'alterazione trombofilica possa essere di aiuto al clinico nel prendere decisioni sulla intensità e durata ottimali della terapia anticoagulante. Pertanto, la decisione deve essere presa su base individuale, considerando anche le altre caratteristiche di ogni singolo paziente.

Lo screening per trombofilia dopo un primo episodio di TEV può essere importante non solo per il paziente, ma anche per i familiari, in quanto permette di identificare soggetti asintomatici portatori dell'anomalia e quindi da sottoporre a profilassi primaria in situazioni ad alto rischio.

### ***Antitrombina***

L'antitrombina (AT) è una glicoproteina a singola catena (peso molecolare 58 kDa) appartenente alla famiglia delle serpine (serine-protease inhibitors). È sintetizzata dagli epatociti e dalle cellule endoteliali, ha un'emivita di 36-60 ore ed è escreta dai reni.

L'AT è considerata il principale inibitore della trombina, ma la sua azione è rivolta anche all'inibizione della maggior parte delle proteasi seriniche coinvolte nel processo coagulativo, quali i fattori IXa, Xa, XIa e XIIa. L'azione inibitoria dell'AT è di per sé lenta, ma è notevolmente accelerata (di oltre tre ordini di grandezza) dall'eparina e da molecole eparino-simili, come le catene laterali di eparan-solfato dei proteoglicani presenti sulla superficie delle cellule endoteliali.

Il difetto ereditario di AT è molto raro: la sua prevalenza è stimata intorno allo 0,02%-0,17% nella popolazione generale, 1,1% in pazienti con TEV non selezionati e 0,5%-4,9% in casi selezionati. Tale difetto è trasmesso come carattere autosomico dominante: l'eterozigosi è la condizione più frequente, mentre l'omozigosi è assai rara e spesso caratterizzata da gravi problemi clinici o incompatibile con la vita. Da un punto di vista fenotipico si distinguono: difetti di tipo quantitativo (tipo I), caratterizzati dalla riduzione sia dei livelli plasmatici di AT antigene che della sua attività e associati ad un rischio tromboembolico molto elevato, e difetti di tipo

qualitativo (tipo II), caratterizzati dalla riduzione dell'attività dell'AT in presenza di normali livelli plasmatici di AT antigene. Questi ultimi raggruppano le anomalie molecolari del sito reattivo dell'inibitore, associate ad un rischio tromboembolico maggiore, quelle del sito di legame dell'eparina, associate ad un rischio tromboembolico minore salvo nei soggetti omozigoti, e le anomalie sia del sito reattivo che del sito di legame dell'eparina. Queste modificazioni a livello molecolare danno luogo alle varianti dell'AT, ad esempio AT Parigi, Basilea, Padova.

Il deficit ereditario di AT rappresenta l'anomalia costituzionale associata al rischio più elevato di TEV: è stato stimato infatti che circa la metà dei soggetti con tale deficit abbia un evento prima dei 25 anni. Le manifestazioni prevalenti sono rappresentate per oltre il 90% da TVP degli arti inferiori e/o EP, mentre le trombosi del distretto splancnico e dei seni venosi cerebrali contribuiscono per meno del 5%. Inoltre, in gravidanza il deficit di AT conferisce un più alto rischio di TEV rispetto al deficit di proteina C o Proteina S(21).

### **Proteina C**

La proteina C (PC) è una glicoproteina vitamina K-dipendente (peso molecolare 62 kDa) costituita da una catena leggera (21 kDa) e una catena pesante (41 kDa). È sintetizzata dal fegato come zimogeno inattivo, ha un'emivita di circa 7 ore ed è escreta dai reni.

Per svolgere la sua azione inibitoria la PC deve essere attivata: l'attivazione avviene ad opera della trombina in seguito al legame di quest'ultima con la trombomodulina, glicoproteina presente a livello della membrana plasmatica delle cellule endoteliali. La PC attivata acquista la funzione di serino-proteasi ed è in grado di inattivare i fattori Va e VIIIa. La PC attivata è dotata anche di proprietà antifibrinolitiche e antiflogistiche.

La prevalenza del difetto ereditario di PC nella popolazione generale è stimata intorno allo 0,14%-0,5%, mentre in pazienti con TEV risulta pari al 3,2% in casi non selezionati e all'1,4%-8,6% in casi selezionati. Data la bassa prevalenza nella popolazione generale, il rischio attribuibile per tutti gli eventi trombotici legato a tale deficit è solo dell'1%-2%.

I difetti di PC sono trasmessi come carattere autosomico dominante e possono essere di tipo quantitativo (tipo I), caratterizzati dalla riduzione sia dei livelli di PC antigene che della sua attività, o di tipo qualitativo (tipo II), caratterizzati da riduzione dell'attività della PC in presenza di normali livelli di PC antigene.

L'espressione clinica dei deficit ereditari di PC è variabile. I soggetti omozigoti possono avere infatti fin dalla nascita eventi clinici di estrema gravità, quali la *purpura fulminans* neonatale, una condizione potenzialmente fatale caratterizzata da trombosi multiple dei piccoli vasi con conseguente necrosi cutanea. La forma eterozigote, più comune, si traduce in una malattia TEV recidivante; il rischio relativo è di 8-10 volte maggiore rispetto alla popolazione generale e circa il 50% di questi soggetti va incontro a eventi entro i 40 anni. Il trattamento con farmaci anticoagulanti orali nei pazienti eterozigoti può provocare la comparsa di necrosi cutanea all'inizio della terapia. Tale complicanza è legata alla più breve emivita della PC rispetto agli altri fattori vitamina K-dipendenti e alla conseguente rapida e marcata riduzione dei livelli plasmatici della PC prima che si manifesti l'effetto anticoagulante del trattamento.

Numerose condizioni possono interferire con il dosaggio biologico della PC: la gravidanza e l'uso di contraccettivi orali provocano un aumento dei suoi livelli plasmatici, mentre eventi trombotici acuti, epatopatie, nefropatie, coagulazione intravascolare disseminata (CID) e trattamento con farmaci anti-vitamina K ne riducono i livelli. Pertanto, il dosaggio biologico della PC, al fine di documentare eventuali deficit, non può essere fatto se non a distanza di almeno un mese dalla sospensione del trattamento con anti-vitamina K e lontano da eventi acuti(22).

### **Proteina S**

La proteina S (PS) è una glicoproteina vitamina K-dipendente a singola catena (peso molecolare 64 kDa). È sintetizzata dagli epatociti e in piccole quantità anche dalle cellule endoteliali e dai megacariociti midollari, ha un'emivita di 36-60 ore ed è escreta dai reni. Nel plasma la PS è presente per il 60% in forma legata alla proteina legante il C4b (C4bBP) e per il restante 40% in forma libera.

La PS, nella sua forma libera, agisce come cofattore dell'attività anticoagulante della PC attivata favorendo, in virtù della sua alta affinità per i fosfolipidi, la degradazione dei fattori Va e VIIIa legati ai fosfolipidi sulle membrane delle cellule endoteliali e delle piastrine.

La prevalenza del difetto ereditario di PS in pazienti con TEV è del 2,2% in casi non selezionati e dell'1,4%-7,5% in casi selezionati. Poiché non sono disponibili dati certi sulla prevalenza del deficit di PS nella popolazione generale, è molto difficile quantificare l'entità del rischio tromboembolico correlato a tale deficit. Molti fattori esogeni, quali l'età, lo stato ormonale e l'uso di contraccettivi orali, influenzano i livelli

di PS, rendendo quindi difficile interpretare correttamente i dati di laboratorio. Se consideriamo infatti globalmente tutti gli studi disponibili, risulta che il deficit di PS libera (ovvero della quota non legata al C4bBP misurata con metodo immunologico) abbia un modesto impatto sul rischio di sviluppare eventi trombotici (rischio relativo di 2) e che tale deficit nella popolazione generale contribuisca a tutti gli eventi trombotici soltanto per l'1%.

Il difetto ereditario di PS è trasmesso come carattere autosomico dominante. Secondo una classificazione fenotipica si distinguono tre tipi di difetti di PS: i difetti di tipo I, caratterizzati da ridotti livelli antigenici di PS sia totale che libera con conseguente riduzione della sua attività; i difetti di tipo II, caratterizzati da riduzione dell'attività della PS in presenza di normali livelli antigenici sia di PS totale che libera; quelli di tipo III, con livelli antigenici normali di PS totale, ma riduzione della PS libera e conseguentemente della funzionalità.

La presentazione clinica dei deficit ereditari di PS è simile a quella dei deficit di PC: i soggetti eterozigoti infatti possono andare incontro a eventi TEV recidivanti e talvolta necrosi cutanea da warfarin, mentre gli omozigoti, sebbene estremamente rari, presentano manifestazioni cliniche gravi.

Così come per la PC, i dosaggi biologici di PS, al fine di documentare eventuali deficit, devono essere fatti al di fuori del trattamento con farmaci anti-vitamina K e a distanza dall'episodio trombotico(19).

### ***Mutazione Leiden del fattore V e resistenza alla PC attivata***

La PC attivata è un enzima anticoagulante responsabile della specifica degradazione dei fattori Va e VIIIa, legati ai fosfolipidi in presenza di ioni calcio sulle superfici delle piastrine e delle cellule endoteliali. La sua attività anticoagulante è potenziata e supportata dalla PS e probabilmente anche dal fattore V non attivato.

Nel 1993 l'osservazione da parte di Dahlback e coll.(22) di diversi casi di trombofilia familiare secondari ad un probabile deficit di un nuovo cofattore della PC diverso dalla PS ha portato alla scoperta della resistenza alla PC attivata (APCR). Questa alterazione si traduce in una riduzione dell'attività anticoagulante della PC attivata: l'aPTT di questi pazienti infatti non si allunga dopo l'aggiunta di PC attivata al loro plasma.

Studi successivi hanno dimostrato che, in circa il 90% dei casi, questa anomalia è dovuta ad una mutazione puntiforme a carico del gene del fattore V che porta ad una singola sostituzione aminoacidica a livello del sito di attacco della PC attivata sul



fattore Va (sostituzione dell' arginina (Arg) in posizione 506 con una glutammina (Gln): mutazione Arg 506 Gln). Il fattore V così mutato, chiamato anche Fattore V Leiden (fattore V R506Q), una volta attivato diventa resistente all'azione inibitrice da parte della PC attivata(23).

Questa anomalia ereditaria, a trasmissione autosomica dominante, rappresenta oggi, perlomeno nella popolazione caucasica, la principale causa di trombofilia ereditaria, avendo una prevalenza di circa il 5% nella popolazione generale (prevalenza che raggiunge anche il 10%-15% nelle popolazioni nordeuropee) ed essendo presente in circa il 20% di pazienti non selezionati con TEV ed in più del 50% dei probandi provenienti da famiglie selezionate con trombofilia familiare. La mutazione Leiden del fattore V potrebbe essere legata infatti ad un vantaggio evolutivo, quale la protezione verso situazioni causanti un'eccessiva perdita di sangue, ad esempio durante il parto e le mestruazioni.

Nei soggetti con fattore V Leiden il rischio di sviluppo di eventi TEV è aumentato di circa 5 volte rispetto alla popolazione generale nei soggetti eterozigoti e di circa 80 volte in quelli omozigoti. La penetranza delle manifestazioni cliniche nei soggetti con fattore V Leiden è variabile. La maggioranza dei soggetti eterozigoti non sviluppa mai eventi TEV e anche gli omozigoti possono non presentare manifestazioni cliniche durante la loro vita. Ne risulta che il fattore V Leiden è di per sé un moderato fattore di rischio per TEV e lo sviluppo di tale patologia spesso dipende dalla presenza di altri fattori di rischio, come la gravidanza e il puerperio, l'uso di contraccettivi orali, gravi eventi traumatici o interventi chirurgici.

Tuttavia, se consideriamo l'alta prevalenza della mutazione nella popolazione generale, l'associazione con altri fattori di rischio trombotico si realizza con una frequenza elevata. Inoltre, vi può essere una co-ereditarietà del fattore V Leiden e di altri difetti genetici. Tale associazione è stata dimostrata per esempio in soggetti sintomatici con deficit di AT o di PC (circa 14%-19%) e nelle famiglie di probandi con carenza di PS (38%). In pazienti portatori del fattore V Leiden e del polimorfismo C677T del gene della metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR), responsabile di iperomocisteinemia (fattore di rischio protrombotico indipendente), è stato osservato un aumentato rischio trombotico. I portatori delle due alterazioni genetiche, fattore V Leiden e polimorfismo G20210A del gene della protrombina (cosiddetti doppi eterozigoti), sviluppano eventi tromboembolici in età inferiore (in media 22 anni) rispetto ai portatori di una sola mutazione. Il rischio stimato associato alla presenza

del polimorfismo del fattore V si è dimostrato maggiore rispetto a quello dovuto al polimorfismo G20210A del fattore II.

La più frequente manifestazione clinica dell'APCR dovuta alla presenza di fattore V Leiden è rappresentata da TVP degli arti inferiori con o senza EP. Vi sono tuttavia numerose segnalazioni di una ridotta prevalenza del fattore V Leiden o della APCR in pazienti con EP isolata rispetto a quelli con TVP non associata a EP, fenomeno che è stato definito "paradosso del fattore V Leiden". Altre manifestazioni, meno frequenti, comprendono: tromboflebiti superficiali, trombosi retiniche, trombosi del sistema venoso portale e mesenterico, trombosi della vena giugulare interna e dei seni venosi cerebrali. Inoltre, è stata documentata un'associazione tra APCR e varie patologie con complicanze trombotiche, quali la sindrome di Budd-Chiari, la sindrome nefrosica, l'ulcera degli arti inferiori, la trombocitopenia da eparina, il priapismo, la policitemia vera, la trombocitemia essenziale, la necrosi cutanea e la preeclampsia. Discusso è il ruolo del fattore V Leiden nel determinare il rischio di recidiva dopo un primo episodio di TEV: infatti, mentre in alcuni studi tale rischio è variabile da 2,4 a 4,1, in altri non c'è differenza di rischio tra portatori di fattore V Leiden e non, se non in presenza di fattori aggiuntivi come l'uso di contraccettivi orali o il polimorfismo G20210A del gene della protrombina(10).

#### ***APCR non causata dalla presenza di fattore V Leiden***

In circa il 10% dei casi l'APCR non è causata dalla mutazione Leiden del fattore V; tuttavia, è stato dimostrato che essa rappresenta un fattore di rischio per TEV indipendentemente dalla presenza di fattore V Leiden(24).

Sono stati scoperti altri polimorfismi del fattore V, più rari del fattore V Leiden, anch'essi causa di APCR, quali l'aplotipo del fattore V, definito HR2, il fattore V Cambridge e il fattore V Hong-Kong. Una forma "acquisita" di APCR può essere legata ad elevati livelli di fattore VIII, condizione che si verifica in gravidanza, in corso di malattie infiammatorie e in rapporto all'uso di contraccettivi orali. Un'altra causa acquisita di APCR può essere il risultato della presenza di anticorpi antifosfolipidi. È stato suggerito infatti che uno dei possibili meccanismi di azione di questi anticorpi potrebbe consistere nel blocco selettivo della funzione della PC attivata sulle superfici fosfolipidiche.

#### ***Polimorfismo G20210A del gene della protrombina***

Il polimorfismo G20210A del gene della protrombina è stato descritto per la prima volta nel 1996 da Poort e coll.(25), che osservarono che circa il 18% di pazienti

selezionati con TEV e l'1% di soggetti di un gruppo di controlli sani avevano una mutazione puntiforme, con sostituzione di una guanina con un'adenina, in posizione 20210 all'estremità 3' non tradotta del gene della protrombina. Questa mutazione è stata messa in relazione con un incremento dei livelli plasmatici di protrombina: il meccanismo consisterebbe nell'induzione di un'aumentata formazione di mRNA e quindi di un'aumentata sintesi di protrombina. Verosimilmente l'aumento dei livelli di protrombina nel plasma, indotto dalla mutazione genetica, conduce ad uno squilibrio tra fattori procoagulanti, anticoagulanti e sistema fibrinolitico, determinando in ultima analisi uno stato trombofilico. i procoagulanti, anticoagulanti e sistema fibrinolitico, determinando in ultima analisi uno stato trombofilico.

L'ereditabilità genetica dei livelli plasmatici di protrombina è relativamente alta (superiore al 50%), indicando che una porzione sostanziale della variabilità fenotipica nei livelli plasmatici di protrombina è dovuta all'effetto dei geni e, in particolare, alla presenza del polimorfismo G20210A.

Il polimorfismo del gene della protrombina, insieme alla mutazione Leiden del fattore V, rappresenta oggi la causa più comune di trombofilia ereditaria. La prevalenza di tale polimorfismo nella popolazione generale è del 2%-5%, mentre è del 7%-18% in pazienti con eventi TEV idiopatici. Vari dati suggeriscono una distribuzione del polimorfismo nelle diverse popolazioni simile a quella del fattore V Leiden.

I soggetti eterozigoti hanno un rischio di TEV circa 3 volte maggiore rispetto alla popolazione generale sana e la maggior parte di questi non sviluppa eventi tromboembolici prima dell'età di 50 anni. La condizione di omozigosi invece è più rara e si associa ad un ulteriore incremento del rischio.

Numerosi studi suggeriscono che questo polimorfismo non sia sufficiente da solo per lo sviluppo di TEV, ma che richieda la presenza di fattori di rischio addizionali, ereditari o acquisiti. A supporto di tale ipotesi, vi è l'osservazione che il polimorfismo G20210A del gene della protrombina è spesso ereditato insieme al fattore V Leiden e che esiste un'azione sinergica tra le due alterazioni nell'aumentare il rischio trombotico. A differenza del fattore V Leiden, la coesistenza della transizione C677T del gene della MTHFR non aumenta il rischio trombotico nei soggetti portatori della mutazione G20210A del gene della protrombina.

Risultati contrastanti sono stati ottenuti dal "Physicians Health Study" su un campione significativo di 14.916 americani seguiti per un periodo di 10 anni: è stata stimata infatti una modesta associazione tra tale polimorfismo e il rischio di TEV, che

risulta pertanto molto minore rispetto al rischio associato al fattore V Leiden.

Recentemente sono stati condotti studi anche sul rischio di recidiva dopo sospensione della terapia anticoagulante orale, eseguita per un precedente evento TEV, che non hanno documentato un rischio significativamente più alto rispetto alla popolazione di controllo in pazienti con il polimorfismo G20210A del gene della protrombina. Al contrario, l'associazione di questo polimorfismo con il fattore V Leiden configura un rischio di recidiva di 2,6 (IC 95%: 1,3-5,1), delineando pertanto la possibile necessità di una terapia anticoagulante più prolungata dopo un primo evento trombotico(10).

### ***Omocisteina***

L'omocisteina è un aminoacido solforato generato come prodotto intermedio del metabolismo della metionina. La principale fonte di omocisteina è costituita dalla metionina introdotta con la dieta o derivata in piccole quantità dalle proteine endogene: l'introito medio di metionina con la dieta è di circa 15-35 mg/kg al giorno, mentre il fabbisogno giornaliero è di 10-40 mg/kg.

I livelli plasmatici di omocisteina sono controllati da due distinte vie metaboliche: la rimetilazione dell'omocisteina a metionina e la transulfurazione dell'omocisteina a cisteina. L'omocisteina si forma per demetilazione della metionina introdotta con la dieta. La rimetilazione dell'omocisteina a metionina può avvenire sia mediante una reazione catalizzata dall'enzima metionina sintasi, che utilizza l'N-5-metiltetraidrofolato come donatore di metile e la vitamina B<sub>12</sub> come cofattore, che attraverso il trasferimento di un gruppo metilico a partire dalla betaina ad opera dell'enzima betaina-omocisteina metiltransferasi. L'N-5 metiltetraidrofolato è generato per riduzione del 5,10-metilentetraidrofolato ad opera dell'enzima MTHFR e deve essere demetilato a tetraidrofolato attraverso l'azione della metionina sintasi per entrare nel pool dei folati intracellulari ridotti. L'omocisteina è deviata verso la via della transulfurazione quando la concentrazione di metionina è tale da saturare il ciclo della metionina e dei folati o quando è richiesta la sintesi di cisteina. Nella prima reazione di questa via metabolica l'omocisteina è condensata con la serina a formare cistationina ad opera dell'enzima cistationina β-sintasi (CBS), che utilizza la vitamina B<sub>6</sub> come cofattore. La cistationina è quindi idrolizzata a cisteina e α-chetobutirrato dall'enzima γ-cistationinasi, anch'esso vitamina B<sub>6</sub>-dipendente. L'eccesso di cisteina può essere ossidato a taurina o solfati organici oppure escreto con le urine. Pertanto, la transulfurazione è importante non solo per la sintesi della cisteina, ma anche per

catabolizzare l'omocisteina in eccesso derivante dal ciclo della metionina, prevenendone l'accumulo intracellulare. Mentre la via della transulfurazione è implicata nella regolazione della concentrazione plasmatica di omocisteina nel periodo post-prandiale o dopo carico di metionina, la rimetilazione, principale via metabolica dell'omocisteina, è responsabile dei livelli plasmatici a digiuno.

L'omocisteina è metabolizzata a livello intracellulare e solo una piccola quota è rilasciata in circolo; circa il 70% dell'omocisteina plasmatica è legata alle proteine e principalmente all'albumina.

Un aumento dei livelli plasmatici di omocisteina può essere dovuto sia a cause genetiche che acquisite. Le più note forme genetiche di iperomocisteinemia sono rappresentate dal deficit di CBS (causa dell'omocistinuria congenita) e dal polimorfismo C677T del gene della MTHFR. Questo polimorfismo, che dà luogo alla produzione di un enzima termolabile, è responsabile di una riduzione del 50% dell'attività dell'MTHFR ed è associato ad un aumento lieve-moderato dei livelli di omocisteina solo nei soggetti omozigoti che presentano un concomitante deficit di folati, vitamina B<sub>12</sub> o vitamina B<sub>6</sub>. La prevalenza di soggetti omozigoti per il polimorfismo C677T della MTHFR è di circa il 5%-15% nelle diverse popolazioni, ma risulta più elevata nella popolazione italiana, essendo pari al 18%.

Forme acquisite di iperomocisteinemia sono spesso legate a deficit di acido folico, vitamina B<sub>12</sub> o vitamina B<sub>6</sub>, conseguenti a scarso apporto nutrizionale, malassorbimento intestinale, aumentate richieste da parte dell'organismo o somministrazione di alcuni farmaci, come antiepilettici, antibiotici, antifolici, colestiramina, salicilati, contraccettivi orali. Altre forme acquisite di iperomocisteinemia si possono riscontrare in pazienti con ridotta funzionalità renale, ipotiroidismo, diabete mellito o malattie caratterizzate da rapida proliferazione cellulare, quali neoplasie o psoriasi. I livelli plasmatici di omocisteina sono inoltre fisiologicamente più elevati nel sesso maschile e in età senile, molto probabilmente a causa dell'influenza degli ormoni sessuali sul metabolismo dell'aminoacido.

La determinazione dei livelli plasmatici di omocisteina può essere effettuata in condizioni basali o dopo test da carico con metionina, che consiste nell'assunzione per os di una dose standard di metionina (0,1 g/kg di peso corporeo) con successiva determinazione dell'omocisteina nel plasma a distanza di 4 ore. La risposta alla somministrazione di metionina è considerata alterata quando la concentrazione plasmatica di omocisteina dopo carico di metionina supera il 95° percentile o la

media più 2 deviazioni standard di quella dei soggetti presi come controllo.

Dati di letteratura indicano che la valutazione combinata di omocisteinemia a digiuno e dopo test da carico con metionina rende possibile l'identificazione di un maggior numero di soggetti con questa alterazione metabolica. Il 40% dei soggetti iperomocisteinemici ha infatti livelli normali di omocisteina basale e sviluppa iperomocisteinemia solo dopo test da carico con metionina.

Elevati livelli plasmatici di omocisteina sono stati messi in associazione con un aumentato rischio di trombosi sia venosa che arteriosa. Numerose sono le ipotesi sui possibili meccanismi di danno indotto dall'iperomocisteinemia(26).

A livello endoteliale il danno provocato dall'omocisteina sembra essere legato all'induzione di una condizione di stress ossidativo. L'omocisteina inibisce infatti l'ossido nitrico sintasi endoteliale (e-NOS) riducendo così la disponibilità di monossido di azoto e quindi la vasodilatazione. Il monossido di azoto in condizioni normali è in grado di detossificare l'omocisteina attraverso la formazione di S-nitroso-omocisteina, che è a sua volta un vasodilatatore. L'auto-ossidazione dell'omocisteina in eccesso porta alla produzione di radicali liberi, tossici per le cellule endoteliali; normalmente il glutatione è in grado di neutralizzare questi radicali, ma in presenza di elevati livelli plasmatici di omocisteina l'attività della glutatione perossidasi è ridotta. Un ulteriore meccanismo di danno a livello endoteliale è rappresentato da una riduzione del catabolismo della dimetilarginina asimmetrica, potente inibitore dell'e-NOS. L'iperomocisteinemia può direttamente alterare la metilazione del DNA, determinando un'alterazione dell'espressione genica sia a livello delle cellule endoteliali che delle cellule muscolari lisce. Diversi studi suggeriscono che l'omocisteina sia in grado di indurre la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari con conseguente riduzione del lume vasale. L'omocisteina in eccesso inoltre può essere convertita in omocisteina-tiolattone, capace di formare addotti con le LDL che possono essere fagocitati dai macrofagi e incorporati nelle cellule schiumose delle placche aterosclerotiche in via di sviluppo. L'omocisteina si auto-ossida rapidamente nel plasma, portando alla produzione di radicali liberi, che provocano la perossidazione dei lipidi della membrana plasmatica delle cellule endoteliali e delle lipoproteine; le LDL ossidate rappresentano uno stimolo per l'attivazione piastrinica e contribuiscono all'aterogenesi.

Il danno indotto dall'iperomocisteinemia è legato anche ad alterazioni del sistema emostatico che, globalmente, determinano una tendenza alla trombosi. L'omocisteina

sembra essere in grado di attivare le piastrine, promuovendone l'adesione e l'aggregazione, come è suggerito dall'osservazione che la biosintesi di trombossano  $A_2$  è significativamente aumentata in soggetti omocistinurici. Le alterazioni del processo coagulativo provocate dall'omocisteina sono da ricondurre essenzialmente all'induzione di uno sbilanciamento dell'attività endoteliale in senso protrombotico, che avviene attraverso numerosi meccanismi: aumento dell'espressione del fattore tissutale, attivazione del fattore XII, attivazione del fattore V, inibizione dell'espressione di trombomodulina e dell'attivazione della PC, inibizione dell'espressione di molecole di eparansolfato sulla superficie endoteliale.

Numerosi studi epidemiologici e sperimentali hanno indagato l'associazione tra iperomocisteinemia e rischio di trombosi sia venosa che arteriosa.

Per quanto riguarda il distretto arterioso, sebbene elevati livelli di omocisteina siano correlati ad un aumento del rischio, questo appare più alto e maggiormente significativo in pazienti con malattie cardiovascolari preesistenti o bassi livelli di vitamine del gruppo B.

Nel decennio scorso diversi studi epidemiologici hanno identificato nell'iperomocisteinemia lieve-moderata un fattore di rischio indipendente per TVP ed EP(27).

In uno studio condotto su 269 pazienti con un primo episodio di TVP arruolati nel Leiden Thrombophilia Study, è stato rilevato che il 10% di questi soggetti aveva livelli di omocisteina superiori al 95° percentile con un rischio relativo di TEV di 2,5 volte superiore rispetto ad un gruppo di controllo paragonabile per età e per sesso. Questo rischio era indipendente dalla presenza degli altri riconosciuti fattori di rischio, come il deficit di AT, PC o PS o la APCR ed è risultato avere un peso maggiore nei soggetti di sesso femminile rispetto a quelli di sesso maschile. Anche dati provenienti da studi caso-controllo svoltisi in Italia dimostrano che il rischio di TEV è da 2 a 3 volte maggiore nei pazienti con iperomocisteinemia rispetto ai soggetti con livelli plasmatici di omocisteina normali. Esistono tuttavia altri studi, sempre retrospettivi, che non hanno dimostrato l'associazione tra iperomocisteinemia e TEV. Il rischio di TEV legato all'iperomocisteinemia è stato valutato anche in uno studio prospettico, il Physicians' Health Study. In questo studio l'iperomocisteinemia conferiva un rischio relativo di 3,4 di trombosi venosa idiopatica e il rischio trombotico era aumentato di 10 volte in soggetti iperomocisteinemici e portatori del fattore V Leiden.

Una recente meta-analisi di den Heijer e coll.(28), condotta su studi prospettici e

retrospettivi al fine di valutare l'associazione tra iperomocisteinemia, polimorfismo C677T del gene dell'MTHFR e TEV, ha dimostrato tuttavia solo un modesto aumento del rischio legato all'iperomocisteinemia.

La relazione tra il polimorfismo C677T dell'MTHFR e il rischio di trombosi è ancora controversa. La maggior parte degli autori è concorde nel ritenere che questo polimorfismo non rappresenti un fattore di rischio indipendente per TEV o che comunque possa contribuire alla predisposizione alla trombosi solo in presenza di altri fattori di rischio ereditari o acquisiti. Elevati livelli di omocisteina sono stati associati inoltre ad un aumentato rischio di recidiva di TEV.

L'iperomocisteinemia può essere facilmente corretta attraverso supplementazione vitaminica con acido folico, vitamina B<sub>12</sub> e vitamina B<sub>6</sub>. L'assunzione giornaliera di acido folico determina infatti una riduzione del 25% dei livelli di omocisteina anche a basse dosi di 0,5 mg. Ciò ha condotto a verificare, mediante studi di intervento, se la riduzione dei livelli plasmatici di omocisteina attraverso la supplementazione vitaminica fosse efficace nel ridurre il rischio di nuovi eventi trombotici sia venosi che arteriosi. Recentemente, i risultati di questi primi studi(29-32) hanno deluso le aspettative, mostrando che il trattamento vitaminico non si associa a una riduzione del rischio di nuovi eventi trombotici in pazienti con pregresso ictus ischemico, infarto miocardico o TEV, suggerendo quindi che il rischio assoluto di trombosi legato all'iperomocisteinemia sia basso e dipenda essenzialmente dalla contemporanea presenza di altre alterazioni trombofiliche.

### ***Sindrome da anticorpi antifosfolipidi***

Gli anticorpi antifosfolipidi (aPL) sono un gruppo eterogeneo di immunoglobuline mono o policlonali, di classe IgM, IgG ed IgA, dirette verso differenti complessi proteina-fosfolipidi e messe in evidenza da sistemi che utilizzano i fosfolipidi come substrato.

Questi anticorpi sono stati identificati per la prima volta come anticorpi responsabili della falsa positività ai test per la sifilide.

Il vero target degli aPL è rappresentato in realtà dalle proteine leganti i fosfolipidi (a differenza dei veri positivi ai test per la sifilide, in cui gli anticorpi riconoscono direttamente i fosfolipidi). Tra queste la più importante è la  $\beta_2$ -glicoproteina I (GPI), una glicoproteina a singola catena (peso molecolare 50 kDa) la cui molecola è organizzata in 5 unità omologhe ripetute di circa 60 residui aminoacidici. Questa proteina è in grado di legarsi ai fosfolipidi anionici delle membrane cellulari, grazie a



interazioni elettrostatiche mediate da aminoacidi cationici del dominio V della molecola.

Appartengono alla famiglia degli aPL: il lupus anticoagulant (LAC), gli anticorpi anticardiolipina (aCL) e gli anticorpi anti-  $\beta_2$ GPI.

La presenza di aPL è fortemente correlata con eventi trombotici, sia del distretto venoso che di quello arterioso, associati a trombocitopenia e a patologia della gravidanza (poliabortività, morte fetale, pre-eclampsia/eclampsia, insufficienza placentare). L'associazione di almeno una di queste manifestazioni cliniche con la presenza in circolo di aPL definisce la "sindrome da anticorpi antifosfolipidi" (APS). Secondo i nuovi criteri classificativi per la definizione della APS, la positività del LAC e/o la presenza in circolo degli altri aPL devono essere confermate in 2 o più occasioni a distanza di almeno 12 settimane l'una dall'altra; gli aCL e gli anticorpi anti-  $\beta_2$ GPI, di classe IgG e/o IgM, devono inoltre essere presenti a medio-alto titolo (> 40 GPL o MPL o > 99° percentile per i primi, > 99° percentile per i secondi)(33).

La patogenesi della trombosi nella APS e il ruolo della  $\beta_2$ -GPI in questo processo non sono ancora del tutto noti. Al momento attuale le principali ipotesi patogenetiche sono rappresentate da: 1) interferenza con i meccanismi anticoagulanti fisiologici, come il sistema della PC-PS, l'annessina V e il TFPI e con il sistema fibrinolitico; 2) effetti su numerosi tipi di cellule, quali leucociti, cellule endoteliali, piastrine e cellule trofoblastiche, con conseguente induzione dell'espressione di fenotipi protrombotici e proadesivi; 3) attivazione del complemento e stimolazione di reazioni infiammatorie a livello della superficie vascolare e/o trofoblastica.

Gli aPL possono essere riscontrati anche in numerose altre condizioni cliniche, quali malattie autoimmuni (principalmente il Lupus Eritematoso Sistemico -LES- e la porpora trombocitopenica idiopatica), infezioni, prolungati trattamenti farmacologici con alcuni tipi di farmaci e, in alcuni casi, in soggetti apparentemente sani che spesso sviluppano malattie autoimmuni negli anni futuri.

La prevalenza degli aPL nella popolazione generale è stata stimata tra l'1% e il 5%, con tassi maggiori negli anziani e in soggetti con comorbidità.

Il rischio trombotico associato a questi anticorpi, soprattutto in soggetti giovani senza altri fattori di rischio, non è stato stimato con certezza, ma l'incidenza di eventi tromboembolici varia tra il 6% e l'8%.

Il LAC è stato descritto per la prima volta nel 1952 da Conley e Hartman in dodici pazienti affetti da LES. Paradossalmente, nonostante gli allungamenti, talora vistosi,

dei tempi di coagulazione (aPTT, tempo di coagulazione al caolino, tempo del veleno di vipera di Russel, test di inibizione della tromboplastina diluita) osservabili *in vitro*, i pazienti con LAC non hanno tendenza all'emorragia, ma presentano più frequentemente episodi trombotici. Complicanze trombotiche sono state riscontrate infatti in circa il 30% dei pazienti con LAC: nel 67% dei casi si tratta di trombosi venose e nel 37% arteriose, queste ultime prevalentemente a livello del circolo cerebrale e carotideo (nel 63% dei casi). È stata inoltre dimostrata una forte associazione tra LAC e poliabortività, spesso da ricondurre a processi trombotici a livello dei vasi placentari.

La positività del LAC sembra essere più specifica per la APS rispetto alla presenza a medio-elevato titolo degli aCL. In una metanalisi sul rischio di TEV in pazienti con aPL, escludendo i pazienti con LES, il rischio relativo per il LAC è risultato pari a 11. Una revisione sistematica della letteratura ha dimostrato che, su 5 studi, tutti riportavano associazioni significative tra LAC e trombosi, con rischio relativo variabile tra 5,7 e 9,4. Gli aCL non sono un fattore di rischio trombotico così forte come il LAC. Nella stessa revisione solo 15 su 28 studi hanno mostrato significative associazioni tra aCL e trombosi, con significatività statistica variabile a seconda del tipo di evento trombotico. In particolare, l'associazione sembra migliore con l'ictus ischemico e l'infarto miocardico piuttosto che con il TEV. In uno studio prospettico caso-controllo nell'ambito del LITE (Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology) non è stata riscontrata alcuna associazione tra elevati titoli di aCL e TEV.

Per quanto riguarda il rischio trombotico connesso agli anticorpi anti-  $\beta_2$ GPI, alcuni studi hanno messo in evidenza come la contemporanea presenza di una sottopopolazione di tali anticorpi e di positività per il LAC risulti fortemente associata ad una storia clinica di eventi trombotici(34).

### **1.1 Clinica e test preclinici**

I sintomi di presentazione sono spesso aspecifici e segni clinici quali edema dell'arto interessato, presenza di dolore, dolorabilità alla pressione (segno di Hunter), dolorabilità alla flessione dorso-plantare (segno di Homans), dolorabilità alla pianta del piede (segno di Payr), dolorabilità al cavo popliteo (segno di Krieg), dolorabilità alla compressione (segno di Tschmark) sono poco affidabili, anche nel caso di trombi localizzati in sede prossimale.

Meno del 25% dei pazienti che presentano segni e sintomi di TVP risultano poi avere

effettivamente una trombosi venosa profonda alle susseguenti indagini strumentali; questo accade anche nell'ambito di gruppi ad alto rischio(35). A tale proposito, al fine di stratificare i pazienti che presentino un sospetto clinico di TVP sulla base del rischio effettivo, è stato messo a punto uno schema, denominato "Score di Wells"(36), che riassume i principali fattori di rischio acquisiti esposti nel capitolo precedente e, in base alla loro presenza, porta alla realizzazione di un punteggio, permettendo poi di suddividere i soggetti come a bassa, media ed alta probabilità di TVP (**Tabella 1**) :

<b>Variabile</b>	<b>Punteggio</b>
Neoplasia maligna (diagnosticata fino a 6 mesi prima)	1
Immobilizzazione arto inferiore	1
Degenza a letto > 3 giorni	1
Chirurgia maggiore (entro 4 settimane)	1
Edema di tutto l'arto o improntabile	1
Circolo collaterale superficiale	1
Polpaccio > 3 cm rispetto al controlaterale	1
Diagnosi alternativa altrettanto verosimile	-2
<b>Punteggio &gt;2:</b> TVP altamente probabile <b>Punteggio &lt;2:</b> TVP non probabile	

**Tabella 1: Score di Wells**

E' importante sottolineare la riduzione della probabilità clinica di una TVP determinata da una diagnosi alternativa altrettanto verosimile; a tal proposito riportiamo alcune patologie da porre in diagnosi differenziale con una TVP degli arti inferiori(**Tabella 2**):

● Ischemia arteriosa acuta, fistola artero-venosa;
● Rottura cisti di Baker;
● Ematoma;
● Erisipela, panniculite;
● Tromboflebite superficiale, linfedema, sindrome post- trombotica, linfangite, compressione venosa esterna;
● Edema (cardiaco, ipoprotidemico, da calcio antagonisti e nefrogeno).
● Mixedema

**Tabella 2: patologie da porre in diagnosi differenziale con la TVP degli arti inferiori**

Lo “Score di Wells” fornisce perciò un punteggio indicativo della probabilità pre-test di TVP; tuttavia una diagnosi definitiva può essere effettuata solo attraverso il completamento con un esame strumentale quale l'ecocolordoppler o la venografia.

#### Ruolo del D-dimero nella diagnosi della TVP.

Il D-dimero (DD) è il prodotto finale della degradazione della fibrina stabilizzata da legami crociati covalenti. La sua presenza nel sangue dipende dall'attivazione della coagulazione, con formazione di fibrina, dapprima solubile, poi stabilizzata per azione del fattore XIII (attivato dalla trombina) e successiva proteolisi da parte del sistema fibrinolitico(37).

Ha un peso molecolare di circa 180.000 Dalton ed è formato da due subunità identiche derivate da due molecole di fibrina monomero. La sua emivita nel plasma è di circa 8 ore ed è eliminato dall'organismo attraverso il rene ed il sistema reticoloendoteliale.

Poiché il 2-3 % del fibrinogeno del plasma è fisiologicamente convertito in fibrina e poi degradato, piccole quantità di DD sono rilevabili nel plasma di individui sani; per tale motivo, esiste un bilancio fra formazione e lisi della fibrina anche in condizioni fisiologiche.

La concentrazione plasmatica del DD è incrementata in tutte le circostanze fisiologiche e patologiche associate con un incremento della formazione di fibrina ed

una conseguente degradazione da parte della plasmina(38).

Il DD è tipicamente elevato in pazienti con tromboembolismo venoso; la formazione del trombo è infatti normalmente seguita da un'immediata risposta fibrinolitica con il rilascio di prodotti di degradazione della fibrina nel torrente circolatorio. Per tale motivo, l'assenza di un rialzo del DD comporta che la trombosi non si sta verificando.

La determinazione del valore del DD è diventata molto frequente a causa della sua associazione con condizioni cliniche correlate alla trombosi, ma il suo uso da parte dei clinici è spesso inappropriato(39). Bisogna infatti tenere sempre presente che i livelli di D-dimero nel plasma possono essere influenzati da molti fattori: l'età del trombo e la sua misura, il potenziale fibrinolitico, la presenza di trattamento anticoagulante ed altri depositi intravascolari ed extravascolari di fibrina quali fonti addizionali di prodotti di degradazione della fibrina(40, 41). I metodi per la determinazione del D-dimero sono tutti basati sull'uso di anticorpi monoclonali che riconoscono epitopi sui frammenti DD, formando dei complessi antigene-anticorpo che possono essere rilevati attraverso tecniche ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) o tecniche di agglutinazione(42). Il DD determinato attraverso queste tecniche è stato dimostrato essere un marker di TVP acuta altamente sensibile (sensibilità superiore al 98%)(43); tuttavia esso non è specifico, cosicché un valore positivo del DD risulta in una bassissima possibilità di permettere da solo di stabilire una diagnosi di TVP o di tromboembolia polmonare (TEP). Per tale motivo il reale valore della determinazione del DD è laddove sia presente un risultato negativo; infatti, con la sua alta sensibilità ed il suo alto valore predittivo negativo, il DD ha guadagnato un ruolo nella diagnosi di TEV per l'esclusione della malattia, potenzialmente riducendo la necessità delle indagini strumentali(44).

## 2 LE TROMBOSI VENOSE PROFONDE DISTALI

### **2.1 Cenni di anatomia del sistema venoso distale**

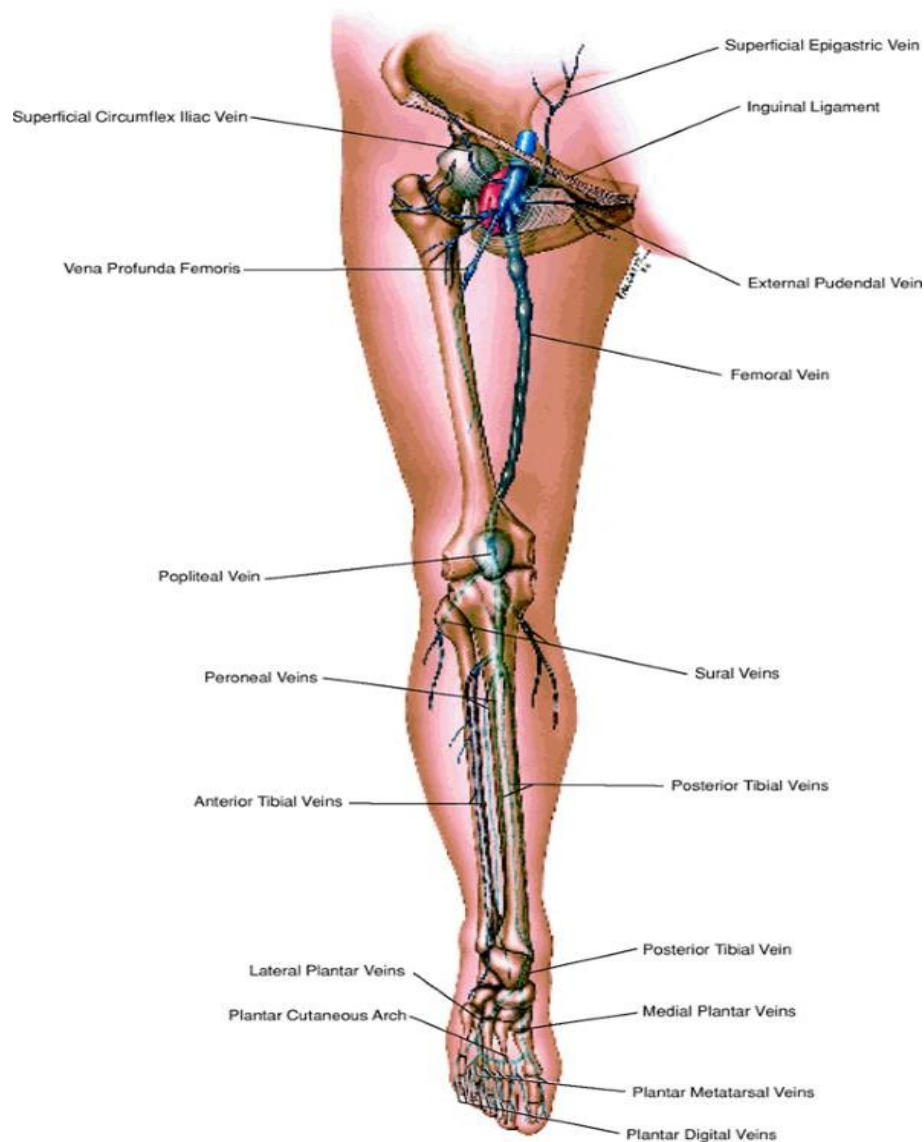
Al di sotto del ginocchio il sistema venoso è costituito dalle vene gemellari mediali e laterali, che drenano il distretto del muscolo omonimo, le tibiali posteriori e anteriori, le soleali e infine le plantari (**Figura 1**). Ogni arteria di questo distretto è affiancata da almeno due vene satelliti.

Le *vene profonde del piede* originano a livello della pianta con le v. digitali plantari le quali sboccano nell'arco plantare profondo, drenato dalle plantari laterali. Queste, confluendo con le plantari mediali, danno origine alle *v. tibiali posteriori (VTP)*. Sul dorso del piede invece, le v. metatarsali dorsali affluiscono nelle *v. tibiali anteriori (VTA)* le quali, dopo esser risalite fino al tubercolo del muscolo tibiale anteriore e penetrate attraverso la membrana interossea, confluiscono nel *tronco tibio-peroneale comune*. Le VTP originano a livello della doccia mediale del calcagno dalle v. plantari laterali e terminano sotto l'arcata tendinea del muscolo soleo confluendo con le *v. peroniere (VP)*. Queste, poggiando sulla membrana interossea e seguendo la cresta mediale della fibula, si anastomizzano più volte con le VTA e VTP per poi confluire nel tronco tibio-peroniero (VTTP). La v. poplitea è quindi costituita dall'unione della VTA con il VTTP.

I rami affluenti della v. poplitea sono le v. dell'articolazione del ginocchio, la v. piccola safena e le v. muscolari (*soleali* e *gemellari*). Le *v. soleali* sono brevi vene valvolate tra di loro intercomunicanti che drenano il muscolo soleo e che sboccano nelle VTTP e nelle interossee. Le *v. gemellari* originano invece dai seni venosi dei muscoli gemelli e si continuano con ramificazioni muscolari che confluiscono in un *ramo mediale* e in uno *laterale* che frequentemente sboccano nella v. poplitea al di sotto della crosse della piccola safena. Anche queste vene sono dotate di numerose valvole(45, 46).

Come già noto, il flusso venoso degli arti è sostenuto essenzialmente dalla contrazione sinergica dei muscoli adiacenti il vaso e tale meccanismo è particolarmente evidente a livello distale; infatti, durante la normale deambulazione si rileva un aumento significativo del flusso venoso sia nel compartimento profondo

che superficiale(47, 48). Si desume quindi che l'immobilizzazione risulti tra i fattori di rischio più importanti per lo sviluppo delle trombosi di questo distretto.



**Figura 1: anatomia del distretto venoso degli arti inferiori**  
(fonte: *Atlas of Vascular Anatomy - R.Uflaker, 2nd Ed. 2006*)

## **2.2 Incidenza**

Studi recenti hanno mostrato come l'incidenza delle TVPd sia addirittura superiore a quella delle TVP prossimali sia nei pazienti ospedalizzati(49-52) che in quelli ambulatoriali (44, 50)], in contrasto a quanto riportato in alcuni studi del passato(36, 53, 54). Le TVPd sono spesso asintomatiche(52, 55), probabilmente per l'anatomia del sistema venoso distale caratterizzato da numerose anastomosi e vene doppie; di conseguenza risulta difficile stimare la reale incidenza nella popolazione generale. Infatti, i dati di letteratura più rilevanti, ovvero quelli con un'ampia casistica e più recenti, provengono per lo più da da studi condotti su pazienti sintomatici per TVP e/o ad elevato rischio per TEV sia in ambito ambulatoriale che ospedalizzati. L'incidenza delle TVPd stimata in questi studi è variabile e va dal 4,7 al 36% circa(56, 57) rappresentando comunque oltre il 50-70% di tutte le TVP osservate(50, 51).

Gli studi che invece comprendono anche i pazienti asintomatici provengono da casistiche spesso più ristrette e/o sono condotti su pazienti di interesse chirurgico (soprattutto in campo ortopedico) dove l'incidenza è influenzata più frequentemente dalla presenza di specifici fattori di rischio transitori, quali l'immobilizzazione, il trauma e l'intervento chirurgico, fortemente correlati allo sviluppo delle TVPd. In questa tipologia di pazienti, ad elevato-elevatissimo rischio, è stata registrata un'incidenza molto variabile, dal 20% fino ad oltre l'80%(58-60).

Secondo alcuni studi condotti su pazienti affetti da patologia medica acuta, le TVPd asintomatiche stimate erano il 6,7-11,5% rappresentando il 60-76% di tutte le TVP osservate(51, 55, 61).

Secondo numerosi dati di letteratura, le sedi delle TVPd più frequentemente coinvolte sono (in ordine decrescente): peroniere, soleali, tibiali posteriori e gemellari(62-64).

## **2.3 Patogenesi e fattori di rischio**

La patogenesi delle TVPd è la stessa delle altre trombosi di qualsiasi distretto ed è essenzialmente secondaria all'alterazione di uno dei fattori della triade di Virchow. Numerosi dati in letteratura(49, 65) suggeriscono che le TVPd sono più legate a fattori transitori quali la chirurgia (in particolare quelli di tipo ortopedico(58)), i viaggi(66) e l'immobilizzazione rispetto a quelle prossimali che invece sono associate



a condizioni croniche o irreversibili (età avanzata, eteroplasia in fase attiva, scompenso cardiaco o insufficienza respiratoria). Tra i fattori di rischio non modificabili, l'età avanzata risulta il parametro maggiormente associato allo sviluppo delle TVPd probabilmente perché con il progredire degli anni si verifica una progressiva riduzione della deambulazione fino ad arrivare spesso ad una progressiva immobilizzazione. La presenza di un' eteroplasia infine risulta un forte fattore di rischio non solo per le TVP prossimali, ma anche per quelle distali: un recente studio(67) ha infatti dimostrato che, nei pazienti con eteroplasia in stadio avanzato (e immobilizzati), si verificava un' elevata incidenza di TVPd asintomatiche (34%)

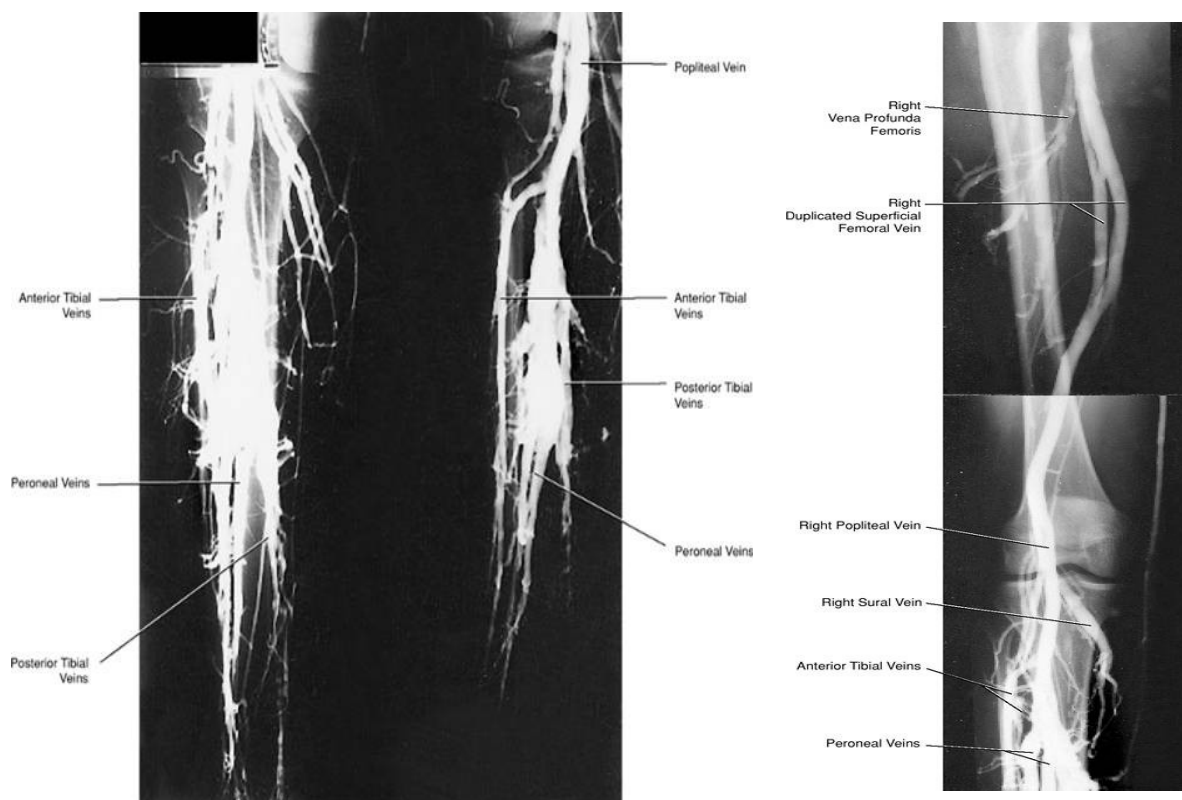
## **2.4 Clinica**

Come già in parte enunciato, le TVPd sono spesso asintomatiche(68). La sintomatologia dovuta alla presenza di una TVP dipende da vari fattori tra cui il tipo di vena coinvolta (singola o doppia), il livello di ostruzione, la presenza o meno di occlusione completa, etc.. I classici segni suggestivi per TVP (edema monolaterale, senso di pesantezza, dolore gravativo..) a livello del distretto distale possono essere molto meno pronunciati perché l'ostacolo al flusso venoso determinato dalla trombosi può essere ben vicariato dalla duplicità della vena e/o dalla presenza di collaterali. A tale proposito, uno studio di Galanaud et al(69). ha dimostrato che, nei pazienti con TVPd, il sintomo più comune era il dolore localizzato e meno frequente la comparsa di tumefazione dell'arto rispetto a quelli con TVP prossimale. Infine, il rischio di embolia polmonare in presenza di TVPd non è ben accertato; secondo alcuni studi la possibilità che questo evento si verifichi non è affatto trascurabile, con un'incidenza che varia tra il 7 e il 10% dei casi(46).

## **2.5 Diagnosi strumentale**

La venografia (VG) rappresenta la metodica gold-standard per la diagnosi delle TVP dell'arto inferiore (figura 2). La metodica è tuttavia gravata da numerosi effetti collaterali quali l'invasività, il rischio di ipersensibilità al mezzo di contrasto e, non ultimo, la potenziale capacità di provocare essa stessa una TVP per cui non può essere proposta come metodica di screening. L'utilizzo della VG, applicata allo studio

delle vene distali, necessita di particolari protocolli di studio per questo distretto (soprattutto per le vene muscolari) che sono stati modificati nei vari anni(70) e questo spiega in parte perchè in alcuni studi la frequenza delle TVPd sia relativamente bassa(53). Gli studi che hanno utilizzato la venografia comprendono casistiche ristrette e spesso di interesse chirurgico. La metodica alternativa per la diagnosi di TVP è rappresentata dall'ecocolordoppler (ECD). Gli studi che hanno utilizzato la venografia comprendono casistiche ristrette e spesso di interesse chirurgico.



**Figura 2: esempi di venografia degli arti inferiori**  
 (fonte: *Atlas of Vascular Anatomy - R.Uflaker, 2nd Ed. 2006*)

La metodica alternativa per la diagnosi di TVP è rappresentata dall'ecocolordoppler (ECD).

L'ECD, unito alla tecnica CUS (Compression Ultrasound), permette di porre diagnosi di TVP in modo agevole, è privo di effetti collaterali ed è economico se confrontato con la venografia. L'ECD è dotato, secondo alcuni studi(71, 72) di sensibilità e specificità elevate per le TVP prossimali (rispettivamente 95% e 97%) ma ridotte per le distali (rispettivamente 50–75% e 90–95%). In contrasto, numerosi studi(51, 73-

76) dimostrano che si può raggiungere, implementando la tecnica color-doppler, una sensibilità dell' 88-95%.

Lo studio del distretto distale si esegue utilizzando una sonda lineare ad elevata definizione (5-7,5Mhz) e può essere diviso in due fasi. Nella prima, i vasi sono identificati con la metodica B-mode (con scala di grigi) e studiati in sezione trasversa e longitudinale. Come per il distretto prossimale, si applica una compressione con la sonda stessa al fine di verificare la compressibilità/incompressibilità del vaso per tutta la sua lunghezza (tale tecnica viene detta, in termini anglosassoni, *comprehensiveCUS* o *CCUS*). Nell'ultima fase, si utilizza la tecnica Color-doppler, unita alla "spremitura" distale, per confermare l'adeguatezza della diagnosi e acquisire ulteriori dati come ad esempio il grado di occlusione del vaso.

L'accuratezza dell'ECD nella diagnosi di TVPd è stata fonte di forte dibattito. Studi di confronto tra le due metodiche hanno dato risultati contrastanti; dati in letteratura mostrano infatti come talvolta l'ECD sovrastimi(71) o addirittura sottostimi(55) le TVPd. E' necessario per questo fare alcune importanti considerazioni: l'ECD è strettamente operatore dipendente, di conseguenza la capacità diagnostica è fortemente correlata alla sua preparazione ed esperienza. Tutto questo, unito all'utilizzo di apparecchi con elevata definizione, è essenziale per lo studio del distretto distale che risulta peraltro più complesso rispetto a quello prossimale(46, 57). Inoltre, numerose alterazioni strutturali e/o patologiche del muscolo(ematomi, pseudocisti, etc..), che tra l'altro sono particolarmente frequenti (intorno al 10%(77)), possono essere scambiate erroneamente per TVP da un occhio inesperto con conseguente sovrastima. In numerosi dati di letteratura l'ECD è spesso utilizzato da operatori inesperti e/o in modo inadeguato (per esempio l'analisi post-hoc delle immagini ECD magari effettuate da un altro operatore(61)) per cui è necessario esaminare con cautela ogni singolo studio sulle TVPd. Nelle immagini seguenti si riportano alcuni esami ECD nel soggetto normale (**Figura 3**) e nei pazienti con TVP (**Figura 4,5**).

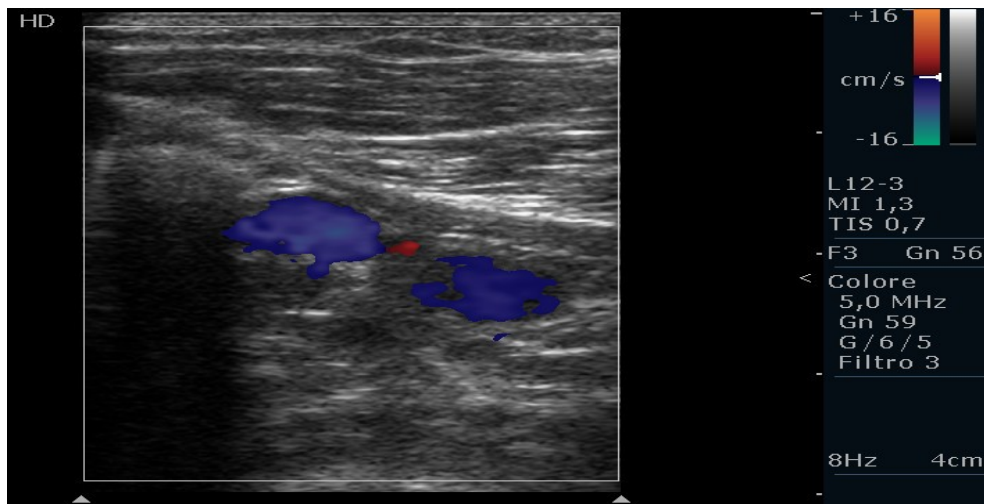


Figura 3: immagine ecografica di vene (blu) e arteria (rossa) peroniere normali con scansione trasversale analizzate con tecnica color Doppler

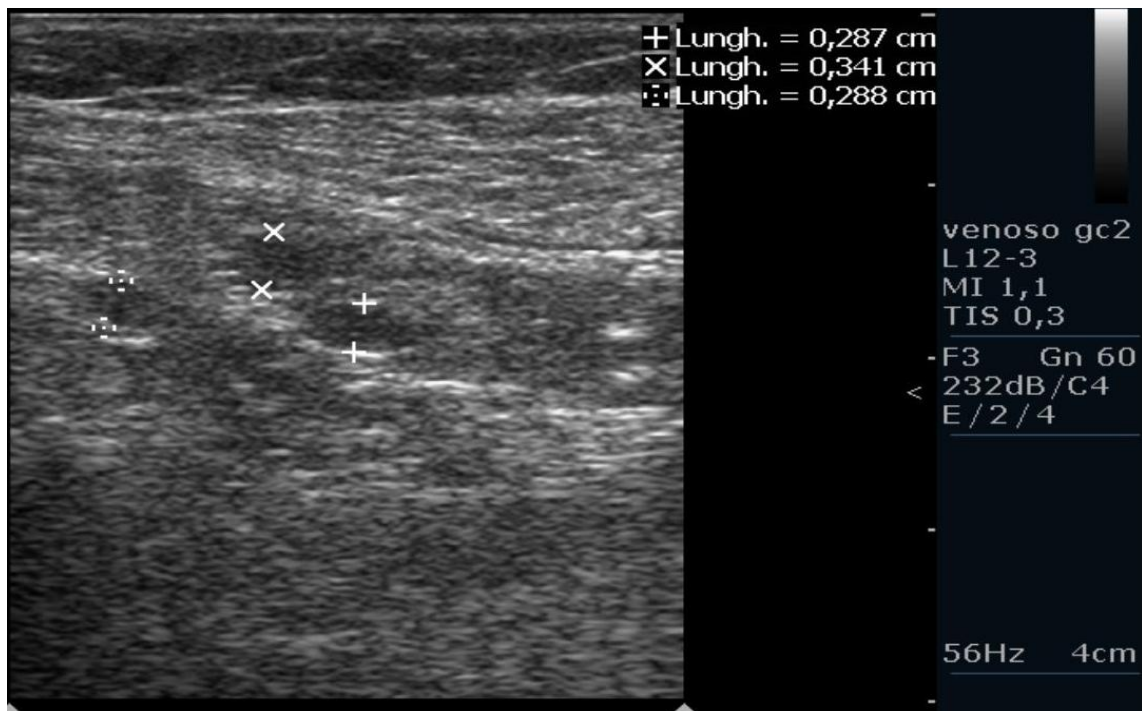
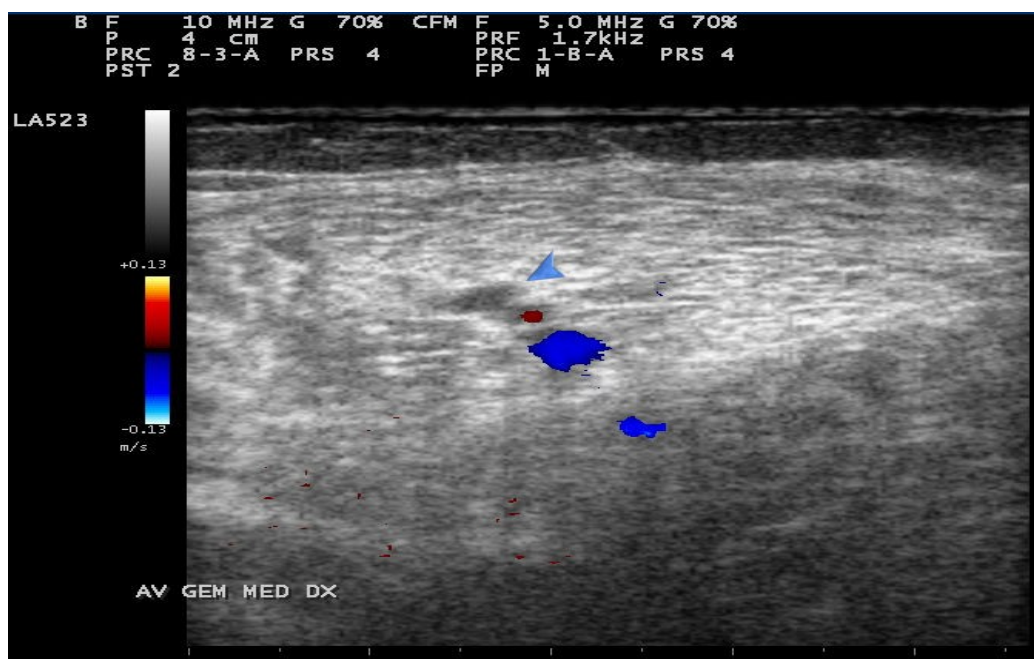


Figura 4: multiple TVP soleali mediali alla sola scansione in scala di grigi (B-Mode)



**Figura 5: immagine ecografica con tecnica color-Doppler di TVP delle gemellari mediali. Lo spot rosso indica l'arteria omonima. La freccia blu indica la vena con trombosi**

## **2.6 Prognosi**

Il rischio di embolizzazione per le TVPd non è ancora ben chiaro: affinché questo avvenga secondo alcuni è necessario che si verifichi l'estensione della TVPd alle vene prossimali, evento che risulta peraltro molto variabile (0-44%, 10% nei pazienti non trattati, 4% in quelli trattati)(44, 64); in uno studio di Parisi et al(78). la progressione delle TVPd nelle vene prossimali si verificava nel 2,9% dei pazienti trattati con eparina e specialmente se la TVPd era idiopatica. Il ridotto potere emboligeno delle TVPd isolate (cosiddette perché rimangono confinate al di sotto del cavo popliteo) sarebbe da ascrivere alla fissità alle pareti vasali e alla piccola massa trombotica che queste vene riuscirebbero a contenere(70). Numerosi autori tuttavia non sono d'accordo con questa convinzione, sottolineando che esiste comunque un'associazione statisticamente significativa tra le TVPd e la EP(46, 57, 79-81) e un elevato rischio di mortalità rispetto ai soggetti sani (OR 2,0;  $p < 0,05$ )(49) che rimane comunque inferiore alle TVP prossimali(61) e dovuta prevalentemente a cause diverse dal TEV(65). Su quest'ultimo punto è necessario fare una considerazione: l'immobilizzazione, come già enunciato, è uno dei fattori di rischio determinanti la TVPd ed esso è a sua volta spesso strettamente correlato alla presenza di patologie

concomitanti; di conseguenza è implicito che nei pazienti con importanti comorbidità (es. eteroplasia(65)) si verifichi una mortalità più elevata. Infine, sono esigui i dati di letteratura (e con numerosità dei casi limitata) riguardanti la sede e il numero di vene coinvolte e il tipo di progressione della TVPd(63, 64), caratteristiche che potrebbero essere correlate con il rischio di complicanze.

## **2.7 Profilassi e terapia**

La profilassi farmacologica con eparina e/o con nuovi farmaci antitrombotici nei pazienti ospedalizzati sia in ambito chirurgico che medico riduce drasticamente l'incidenza di TEV e in quindi anche delle TVPd(52, 82-92).

Le linee guida suggeriscono di trattare con terapia anticoagulante orale, senza distinzione, tutte le TVP per almeno 3 mesi(1, 2); tuttavia, per quanto riguarda le TVPd, la raccomandazione deriva da un unico studio randomizzato di Lagerstedt et al(93) basato su un numero ristretto di pazienti (n=51) e fonte di numerose critiche(44, 57). Vi sono inoltre evidenze favorevoli sull'utilizzo delle calze elastocompressive, da sole o associate a terapia farmacologica, nel ridurre l'incidenza delle TVP nei pazienti ospedalizzati anche nell'ambito di reparti ad elevate intensità di cura(94-96).

In considerazione di quanto suddetto, del rischio ridotto di embolizzazione, del timore di emorragie maggiori in corso di terapia anticoagulante la tendenza è a trattare le TVPd per un tempo inferiore a quello indicato dalle linee guida e talvolta con dosaggi non "propriamente" anticoagulanti. Tale decisione è in parte sostenuta dallo studio di Pinede et al. che non ha rilevato differenze statisticamente significative nel trattare le TVPd isolate per 6 o per 12 settimane in termini di efficacia e/o complicanze emorragiche(97). Inoltre un recente studio randomizzato e prospettico di Schwarz et al(98) non ha rilevato differenze statisticamente significative in termini di ricanalizzazione e/o progressione di TVP distali in oltre 100 pazienti con TVPd trattati con nadroparina a dosaggio anticoagulante e elastocompressione versus sola elastocompressione per 3 mesi. A conferma di quanto detto, le strategie terapeutiche differiscono notevolmente tra i centri di angiologia italiani(81). Sono già in corso studi per stabilire quale terapia sia più adatta in termini di efficacia e rischio di complicanze e alcuni di questi sono già pubblicati(78).

Un'alternativa è quella di non trattare le TVPd in considerazione del presunto basso

rischio di complicanze. Schellong et al.(70) propone di stratificare il rischio nel singolo paziente con TVPd anche se non sono identificati precisamente i modi per farlo. Sicuramente i pazienti affetti da eteroplasia(65, 67) e/o costantemente allestati(44) sono da candidare al trattamento perchè ad elevato-elevatissimo rischio. Una possibilità è quella di ripetere l'ECD a una settimana dalla diagnosi di TVPd dato che, secondo uno studio di Kearon et al. del 2003(99), nella maggior parte dei casi in questa lassità di tempo si verifica l'estensione prossimale. Tale approccio, applicato in un recente studio di Palareti et al(57), non ha tuttavia ridotto il rischio di complicanze tromboemboliche a 3 mesi nei pazienti con TVPd non trattate.

Infine, per quanto riguarda la recidiva, la percentuale di TVPd dopo un trattamento anticoagulante orale per 3 mesi risulta sovrapponibile a quelle delle TVP prossimali (2.0% vs 2.7%,  $p=0.07$ )(65).

Sono quindi necessari ulteriori studi per verificare queste nuove indicazioni terapeutiche e implementarle nelle linee guida.

## **2.8 Revisione della letteratura**

I dati dei grandi studi e dei trial sulle TVPd provengono soprattutto dalle unità operative di angiologia (ospedaliera e ambulatoriali), di chirurgia (generale e ortopedica) e infine di medicina (medicina interna e terapia intensiva) . Gran parte di questi sono stati disegnati per studiare solo le TVPd sintomatiche. I dati di letteratura sulle TVPd asintomatiche, che risulterebbero essere numerose, provengono da studi di casistica più limitata e prevalentemente in ambito chirurgico. Sono infatti esigui gli studi che hanno analizzato questo tipo di casistica nei pazienti afferenti ad un reparto di medicina interna e/o d'urgenza e prevalentemente il loro scopo principale era quello di stabilire l'accuratezza diagnostica dell'ECD.

Uno di questi è lo studio prospettico di Bressolette et al(51) ha valutato l'accuratezza diagnostica dell'ECD al fine di determinare la presenza di TVP asintomatiche sia prossimali che distali in 122 pazienti consecutivi afferenti ad un reparto di medicina interna. I pazienti sono stati sottoposti dapprima a ECD entro 48 ore dall'ingresso e successivamente a venografia nel caso fosse stata rilevata una TVP prossimale e/o distale. L'ECD è stato inoltre ripetuto sullo stesso paziente al giorno 8, 10 e ogni 5 giorni durante la degenza. L'ECD si è quindi dimostrato uno strumento dotato di

elevata sensibilità e specificità per la diagnosi di TVP rilevando l'11,5% di TVPd. I pazienti senza TVP sono stati sottoposti a follow-up di 3 mesi mediante questionario telefonico o valutazione clinica ma non strumentale: nessuno presentava segni e/o sintomi suggestivi per TEV e il 14% era deceduto. Non erano presenti dati riguardo il trattamento dei pazienti con TEV.

Anche lo studio di Tomkowski et al.(55) aveva come scopo quello di determinare l'accuratezza diagnostica dell'ECD come strumento di screening per le TVP nei pazienti con patologia medica acuta. Rispetto al precedente, questo studio faceva parte di un protocollo che valutava l'utilizzo della tromboprolifiassi farmacologica con fondaparinux 2,5mg/die rispetto al placebo. I pazienti (n=160) considerati a rischio moderato per TEV, sono stati sottoposti ad ECD e quindi trattati con profilassi antitrombotica o no. Dopo un periodo variabile di 6-15 giorni è stato eseguito l'esame venografico. Le TVP totali rilevate erano il 7,5% ed erano tutte asintomatiche e il 58,3% erano TVPd. La sensibilità e il valore predittivo positivo dell'ECD si è dimostrata inferiore a quella della venografia, tuttavia è necessario segnalare che la diagnosi delle TVP con l'ECD è stata effettuata solo uno strumento di elevata accuratezza per la diagnosi delle TVP prossimali. Non erano presenti dati riguardo al follow-up e/o al trattamento.

Vaitkus et al.(61) hanno eseguito un'analisi post-hoc su 1738 pazienti dello studio PREVENT ("Prospective Evaluation of Dalteparin Efficacy for Prevention of VTE in Immobilized Patients Trial")(86) ricercando la presenza di TVP prossimali o distali asintomatiche al 21° giorno di followup tramite l'ECD. Sono state così rilevate 11% TVP di cui il 60% distali (il 6,7% di tutti i pazienti). A 3 mesi la mortalità era significativamente più elevata in quelli con TVP prossimale rispetto ai pazienti sani, ma non in quelli con TVPd. Come affermato dagli stessi autori, vi era comunque un aumentato trend di mortalità nei pazienti con TVPd e quindi sono necessari ulteriori dati per verificare se esiste questa associazione.

Uno tra i lavori con casistica più ampia, di tipo multicentrico e prospettico, che ha studiato le TVPd sintomatiche è il RIETE(65). Sono stati arruolati oltre 11000 pazienti consecutivi sintomatici e con evidenza strumentale di TVP degli arti inferiori senza EP che successivamente sono stati ricoverati nei reparti di medicina interna. Il follow-up a 3 mesi comprendeva una valutazione clinica al fine di valutare la presenza di eventi emorragici e sintomi e/o segni suggestivi di recidiva di VTE (confermati poi



dalla diagnosi strumentale). Il 17,3% dei pazienti con TVPd era frequentemente portatore di uno o più fattori di rischio transitori quali l'immobilizzazione, la chirurgia e il recente viaggio. Il 90% dei pazienti è stato trattato con farmaci anticoagulanti. Durante il follow-up è stata notata una mortalità più elevata nei pazienti con TVP prossimale rispetto a quelli con TVPd (6.3% versus 2.2%;  $p<0.001$ ) e in quest'ultimi non era correlata con VTE; il numero di recidive era simile tra i due gruppi di pazienti (2.7% versus 2.0%,  $p=0.07$ ). Infine, il numero di eventi emorragici era significativamente più basso nei pazienti con TVPd rispetto a quelli con TVP prossimale (1.0% versus 2.0%,  $p<0.002$ ), probabilmente come riferito dagli autori, per la migliore condizione clinica generale dei pazienti e perchè erano trattati con dosaggi inferiori di farmaci anticoagulanti.

Uno studio simile e dello stesso gruppo di autori è l'OPTIMEV(49) che ha confrontato TVPd e TVP prossimali sintomatiche in termini di fattori di rischio e *outcome* a 3 mesi (recidiva di TEV, sanguinamento maggiore, decesso). Sono stati arruolati 6141 pazienti con sospetto di TVP degli arti inferiori: la percentuale di TVPd era del 26,3% ed era superiore a quello delle TVP prossimali (rispettivamente 56.8% vs. 43.2%, $p=0.01$ ). Come nello studio precedente le TVPd si associavano in modo significativo ai fattori di rischio transitori (recente intervento chirurgico, immobilizzazione, recente viaggio) mentre le TVP prossimali a quelli legati a stati cronici (etp attivo, insufficienza cardiaca e respiratoria, età superiore ai 75 anni). La maggior parte dei pazienti con TVP sono stati trattati con terapia anticoagulante (82,2% delle TVPd e 92% delle TVP prossimali). Durante i 3 mesi di follow-up il tasso di recidiva era simile nei due gruppi (2,2% TVPd vs. 2,5% TVP prossimali) così come quello degli eventi emorragici [OR 0,8 (IC 95%, 0,3-2,4),  $p=ns$ ]. La mortalità era più elevata nei pazienti con TVP prossimale rispetto a quelli con TVPd (8,0% vs. 4,4%,  $p<0,05$ ) e in quelli con TVP multiple indifferentemente se erano distali o prossimali. Da segnalare che, rispetto ai controlli, le TVPd erano associate ad una mortalità più elevata OR 2,0 (IC 95%, 1,1-3,5),  $p<0,05$ ].

Il recente studio prospettico di Palareti et al., il CALTHRO(57), aveva lo scopo di valutare l'evoluzione delle TVPd sintomatiche non trattate in ambito ambulatoriale. Nella prima fase 431 pazienti sono stati sottoposti a ECD delle sole vene prossimali, è stata calcolata la probabilità pre-test (PCP) ed eseguito un prelievo del D-dimero se quest'ultima risultava negativa. I pazienti che proseguivano lo studio, ovvero quelli

con PCP probabile e/o positività del D-Dimero e che non avevano una TVP prossimale, erano invitati a tornare dopo 5-7 giorni per essere sottoposti a nuovo esame ECD, Non instauravano nel frattempo alcuna terapia antitrombotica ma solo indicando di indossare calze elastocompressive e ad assumere FANS nel caso di dolore. Nella seconda fase, dopo l'esecuzione dell'ECD a 5-7 giorni senza che ne fosse comunicato l'esito sia al paziente che al medico sperimentatore, il paziente è stato valutato per un follow-up di 3 mesi alla fine del quale è stata effettuata l'ultima valutazione clinica e strumentale. La percentuale di TVPd diagnosticate all'arruolamento il 15,3% (n=65). Al secondo esame ECD (a 5-7 giorni) sono state registrate due TVP prossimali (4,6%) e questi pazienti sono usciti dallo studio. Gli outcome (comparsa di TVP prossimale e/o distale e/o di EP) registrati nei pazienti che hanno effettuato il follow-up a 3 mesi (n=417) erano significativamente più elevati nei pazienti con TVPd rispetto a quelli senza TVPd (5/64; 7.8%; 95% CI: 3–17 vs. 3/351; 0.8%; 95% CI: 0–2; p=0.003). Tuttavia, come suggerisce lo stesso autore, se vengono escluse le due TVP prossimali al controllo ECD a 5-7 giorni, tale associazione si riduce al limite della significatività (p=0,049).

Lo studio prospettico di Labropoulos et al.(64) ha valutato l'evoluzione della propagazione e la lisi del trombo in relazione al tipo di vena coinvolta in 48 pazienti con TVPd, ospedalizzati e non. Le vene peroniere sono risultate le vene più frequentemente coinvolte dalla trombosi, peraltro come già rilevato in altri studi(62, 63) ed erano spesso singole. Durante i 10 giorni di follow-up, 19 pazienti sono stati trattati con eparina o Warfarin: solo 1 paziente, che non era in trattamento, ha avuto una EP dimostrata. La propagazione in senso ascendente si è verificata nel 13% dei casi, in senso discendente nel 4% e in entrambe le direzioni nel 10%. Nell 11% si è verificata la lisi parziale o completa del trombo mentre nel 12 % è stata rilevata una nuova TVPd. L'estensione nelle vene prossimali si è verificata nel 13%, di questi 11% era in trattamento anticoagulante e non vi erano differenze significative tra i pazienti trattati e non (p=0,28). In conclusione il rimodellamento precoce della TVPd avviene, come indica lo stesso autore, nel 44% dei casi ed è indipendente dalle vena coinvolta e dalle caratteristiche morfologiche della trombosi.

In uno studio di Park YJ et al.(100) sono stati valutati i fattori di rischio di ricanalizzazione tardiva nei pazienti con TVPd. Nei pazienti con TVPd isolata l'anticoagulazione è risultata associata a un minor tasso di ricanalizzazione tardiva rispetto al trattamento conservativo (calze elastocompressive e deambulazione).

Inoltre sono risultati fattori di rischio indipendenti per ricanalizzazione tardiva l'immobilizzazione e la presenza di neoplasie.

Nel *Worcester Venous Thromboembolism Study*(101), ha dimostrato una prevalenza delle TVPd in comunità del 11,1%. La percentuale di recidiva e di embolia polmonare non era significativamente diversa da quella delle TVP prossimali dopo 6 mesi di follow-up. Tuttavia le TVPd mostravano un rischio di recidiva/estensione precoce più alto. Infine è stato notato che dopo 6 mesi il rischio di sanguinamento maggiore in corso di terapia anticoagulante era minore rispetto alle TVP prossimali, probabilmente per il minor numero di pazeinti con TVPd trattati con dosaggi adeguati di anticoagulazione.

## **3 RICERCHE PERSONALI**

### ***3.1 Scopo dello studio***

Scopo principale dello studio è stato quello di valutare l'incidenza, le principali caratteristiche morfologiche e la prognosi delle TVPd isolate asintomatiche in pazienti ricoverati per patologie mediche acute afferenti al reparto di Medicina Interna ad Orientamento all'Alta Complessità Assistenziale 3 dal Pronto Soccorso o dall'Osservazione Breve dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi.

### ***3.2 Disegno dello studio***

#### FASE 1

Ogni paziente appena accettato in reparto (esclusi quelli con diagnosi già nota o TVP -prossimale o distale- e/o EP come motivo di ricovero) è stato sottoposto ad esame obiettivo e raccolta dei principali dati anamnestici volti a definire e trattare la causa del ricovero. Parallelamente sono stati acquisiti gli elementi clinici e anamnestici utili a stratificare il rischio e a valutare la probabilità clinica pretest di TEV:

-presenza/assenza di sintomi suggestivi per TVP degli arti inferiori (dolore, senso di pesantezza)

-presenza/assenza di segni clinici suggestivi per TVP degli arti inferiori (edema monolaterale/bilaterale, discromie cutanee, presenza di varici e/o ulcere venose);  
misurazione circonferenza degli arti inferiori al di sotto del ginocchio mediante metro a nastro

-valutazione della presenza/assenza di fattori di rischio per TEV (familiarità per TEV, presenza di fattori di rischio acquisiti)

-Score di Wells

I dati così acquisiti sono stati utili ad identificare il paziente con caratteristiche

cliniche suggestive per TVP degli arti inferiori (sintomatica) e/o ad elevato rischio per TEV.

E' stato inoltre valutato il grado di mobilità/deambulazione (tipo di andatura) del paziente (allettamento, plegia di uno e/o di entrambi, gli arti letto-poltrona, deambulazione a piccoli passi, con appoggio, zoppia e normale)

L'anamnesi ha incluso anche la valutazione della presenza/assenza di fattori di rischio per malattie cardiache e/o vascolari arteriose.

## FASE 2

-Prelievo ematico per la determinazione del Ddimero mediante metodo immunoturbidimetrico (HemosIL D-dimer HS)

-Esecuzione di ecocolordoppler (ECD) venoso degli arti inferiori per porre diagnosi di TVP. Se l'esame è risultato positivo per diagnosi di TVP prossimale, i dati personali e clinici sono stati registrati al fine di valutare l'incidenza di questa e il paziente è uscito dallo studio. Se invece è stata rilevata una TVPd o l'esame è risultato negativo, il paziente è passato alla fase successiva.

## FASE 3

Ai pazienti con ECD positivo è stato chiesto di firmare un consenso per la partecipazione allo studio<sup>a</sup> ovvero di dare l'autorizzazione a trattare i dati personali, prelevare un campione ematico per la ricerca dei fattori di rischio trombofilici, compreso quelli genetici, dare la disponibilità ad essere contattato telefonicamente per le visite di follow-up (vedi dopo). La terapia anticoagulante è stata effettuata e/o adattata dopo attenta valutazione clinica globale e dei criteri di esclusione (v. sotto\*).

\*Criteri di esclusione per la terapia:

-gravidanza e/o puerperio

-chirurgia oftalmica, cerebrale, spinale nei 12 mesi precedenti

-insufficienza renale con Clearance inferiore o uguale a 30 ml/min, calcolata con la formula di MDRD

---

<sup>a</sup> Criteri di esclusione allo studio: età inferiore ai 18 anni o incapacità a fornire il consenso informato, aspettativa di vita del paziente inferiore a 3 mesi, evidente scarsa compliance alla terapia, rifiuto del consenso

- insufficienza epatica severa
- conta piastrinica inferiore a 100'000 /uL
- diagnosi, attuale o entro tre mesi il ricovero, di emorragia maggiore<sup>b</sup>
- ipertensione arteriosa grave
- indicazione a terapia anticoagulante (dicumarolica/eparinica o altri) per altri motivi diversi dalla TEV
- controindicazione alla terapia con eparina a basso peso molecolare (EBPM), fondaparinux o altri anticoagulanti

E' stato inoltre eseguito studio mirato all'identificazione delle caratteristiche morfologiche della TVPd:

- Numero e tipo di vene coinvolte (gemellari mediali o laterali, tibiali posteriori, peroniere, soleali)
- Diametro e lunghezza della vena trombizzata
- Distanza della trombosi dal cavo popliteo espressa in centimetri

Al paziente con TVPd è stato prelevato un campione di sangue al fine di eseguire i seguenti esami:

- Ricerca del polimorfismo Fattore V Leiden
- Ricerca del polimorfismo G20210A del gene della Protrombina
- Dosaggio degli inibitori naturali della coagulazione (proteine C e S, antitrombina)
- Dosaggio dell'omocisteina

I pazienti arruolati sono stati così divisi:

- con TVPd
- senza di TVP (gruppo di controllo)

Nei pazienti con diagnosi di TVP è stata iniziata terapia con EBPM o fondaparinux che è stata proseguita dopo la dimissione per 6 settimane e sono state prescritte

<sup>b</sup> *Definizione di emorragia maggiore*: fatale, intracranica, retroperitoneale, emoperitoneo, emotorace, ematoma spinale, emarto (non traumatico e in articolazione maggiore), intraoculare, shock emorragico, emorragia con perdita di oltre 2g/dl di emoglobina, emorragia per la quale è necessario il ricorso a chirurgia o manovre invasive.

calze elastiche di II grado tipo gambaletto dal lato della trombosi, se non controindicate (arteriopatia obliterante degli arti inferiori, ulcere arteriose, infezione della cute, ipersensibilità accertata al tessuto della calza, ridotta disponibilità economica del paziente, incapacità a indossarle) .

#### FASE 4

Prima visita di follow-up (dopo circa 1 settimana dall'ammissione in reparto). Durante la visita è stato effettuato ECD degli arti inferiori da un secondo operatore eseguito secondo i criteri descritti nella fase 2 per verificare la presenza/assenza di comparsa di nuova TVP e/o la progressione della/e precedente/i rilevata/e. Nel caso fosse stata rilevata una nuova TVPd o estensione della precedente è stato deciso di variare la terapia antitrombotica <sup>c</sup>. Nel caso sia stata rilevata una TVP prossimale il paziente è uscito dallo studio e ha proseguito l'iter-diagnostico terapeutico più idoneo. I pazienti che sono rimasti negativi non hanno proseguito il follow-up ma sono stati ricontattati telefonicamente dopo 3 mesi per valutare la mortalità e/o richiedere se vi sono stati episodi di TEV.

#### FASE 5

Seconda visita di follow-up (dopo 6 settimane dall'ammissione in reparto). Durante la visita sono stati effettuati:

- valutazione del grado di mobilità del paziente dal momento della dimissione.
- racordo anamnestico nelle ultime 6 settimane
- ECD degli arti inferiori eseguito secondo i criteri descritti nella fase 2 e valutando i seguenti punti:
  - Comparsa di nuova TVP (in sede prossimale o distale, arto omolaterale o controlaterale)
  - Ricanalizzazione della/e TVPd precedentemente rilevata/e (assente, parziale, completa) valutato mediante la compressione sul vaso e la valutazione del residuo post-trombotico(102, 103)

<sup>c</sup> Definizione di Variazione Terapeutica: potenziare la terapia antitrombotica (eparina o fondaparinux) scegliendo un farmaco di efficacia maggiore (esl dicumarolico) dopo aver attentamente valutato il rischio/beneficio in considerazione della malattia di base, delle comorbilità e del rischio emorragico nel singolo paziente.

- Presenza/assenza di estensione della/e trombosi in senso prossimale (coinvolgimento della vena poplitea e femorale)

- Sospensione/variazione della terapia antitrombotica<sup>c</sup>

#### FASE 6

Follow-up a 12 settimane dalla diagnosi:

- valutazione del grado di mobilità del paziente dal momento della dimissione

- raccordo anamnestico nelle ultime 12 settimane

- ECD degli arti inferiori eseguito secondo i criteri descritti in fase 4

- Eventuali ulteriori indicazioni terapeutiche

#### FASE 7

Follow-up finale telefonicamente a 30 mesi.



### **3.3 Pazienti esaminati**

Sono stati arruolati 380 pazienti consecutivi; di questi 46 sono stati esclusi dall'analisi statistica (24 maschi e 22 femmine) per i seguenti motivi: non collaborazione del paziente (n=9; 19,6%), impossibilità ad effettuare un ECD tecnicamente valido (n=7; 15,2%), diagnosi di ammissione per TEV (n=14; 30,4%), rifiuto del paziente ad essere sottoposto ad ECD e/o fornire il consenso informato (n=16; 34,8%).

I restanti 334 pazienti, di età compresa tra 19 e 104 anni (mediana: 79) sono stati sottoposti ad ECD venoso degli arti inferiori e a successiva analisi statistica.

### **3.4 Materiali e metodi**

#### **a) Prelievi**

I campioni di sangue venoso periferico sono stati prelevati dalla vena antecubitale con ago n°19 G.

Per la determinazione dell' AT, della PC e della PS il sangue è stato anticoagulato con citrato di sodio 0,129M e i campioni sono stati immediatamente posti a 4°C e centrifugati a 2000 g per 15 minuti a 4°C.

Per il dosaggio dell'omocisteina plasmatica i campioni sono stati prelevati utilizzando EDTA K2 come anticoagulante, immediatamente posti a 4°C e centrifugati, entro 30 minuti, a 2000 g per 15 minuti a 4°C

Per lo studio dei polimorfismi genetici il sangue intero è stato prelevato con EDTA K2 come anticoagulante e immediatamente posto a 4°C dopo il prelievo.

I campioni di plasma e di sangue intero così ottenuti sono stati suddivisi e conservati a -80°C fino al momento del loro utilizzo.

- **Determinazione dell'AT**

L'attività dell'AT è stata valutata con metodo cromogenico usando un kit commerciale (AT, Instrumentation Laboratory, Milano).

Il deficit di AT è stato definito come presenza di valori di attività <70%.

- **Determinazione della PC**

L'attività della PC è stata valutata con metodo cromogenico utilizzando

un kit commerciale (PC, Instrumentation Laboratory, Milano).

Il deficit di PC è stato definito come presenza di valori di attività <75%.

- **Determinazione della PS**

La PS libera è stata valutata mediante metodo immunoturbidimetrico, utilizzando un kit commerciale (PS-FREE, Instrumentation Laboratory, Milano).

Il deficit di PS è stato definito come presenza di valori di PS libera <75% nei maschi e <65% nelle femmine.

- **Determinazione dei polimorfismi genetici**

1. Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto dal sangue venoso periferico mediante amplificazione in PCR del frammento genomico di interesse utilizzando le sequenze nucleotidiche specifiche.

- *Polimorfismo G1691A del fattore V :*

Oligonucleotidi

5' – TAC AGT GAC GTG GAC ATC AT – 3'

5' – TGA AAG GTT ACT TCA AGG AC – 3'

*Polimorfismo G20210A del fattore II*

Oligonucleotidi

5' – TCC TAG AAA CAG TTG CCT GGC -3'

5' - ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG -3'

Analisi dei polimorfismi:

Il polimorfismo G1691A del fattore V ed il polimorfismo G20210A del fattore II sono stati messi in evidenza attraverso l'analisi della rispettiva Melting Curve: le miscele di reazione sono state incubate in un termocicizzatore Light Cycler DNA (Roche Italia) che sfrutta l'uso di due specifiche sonde oligonucleotidiche marcate con due differenti fluorofori e selezionate in modo tale da ibridare con la sequenza target.

- **Determinazione dell' omocisteina**

I livelli di omocisteina plasmatica (libera e/o legata alle proteine) sono stati determinati attraverso metodo immunoenzimatico con rilevazione in fluorescenza a luce polarizzata (FPIA) (IMX Abbott Laboratories,

Oslo, Norvegia). L'iperomocisteinemia è stata definita in presenza di valori di omocisteina a digiuno  $> 19 \mu\text{mol/L}$  nei maschi e  $>13 \mu\text{mol/L}$  nelle femmine o in presenza di valori di omocisteina dopo test da carico con metionina  $>38 \mu\text{mol/L}$  nei maschi e  $>35 \mu\text{mol/L}$  nelle femmine.

#### **b) esame ECD**

L'esame ECD è stato condotto al letto del malato con apparecchio Philips Envisor HD e/o con Esaote MyLab Seven utilizzando una sonda lineare (5-7,5 MHz) e, ove necessario, convex (4 MHz).

Le vene prossimali sono state esaminate con il paziente supino dalla femorale comune fino alla poplitea esercitando una moderata pressione con la sonda su tutto l'asse in sezione trasversa. E' stata inoltre eseguita valutazione della presenza/assenza di segnale di flusso mediante tecnica *color-doppler* dopo attivazione (spremitura del vaso a valle della sonda). I criteri per la diagnosi di TVP prossimale erano l'assenza di completa e/o parziale comprimibilità del vaso (CUS) e/o del segnale color-doppler all'interno del vaso.

Le vene distali sono state esaminate con tecnica simile con il paziente supino e/o, dove possibile, con il paziente a sedere con le gambe fuori del letto. Sono state così visualizzate le vene gemellari mediali e laterali, le tibiali posteriori, le peroniere e le soleali. I criteri per la diagnosi di TVPd erano l'assenza di comprimibilità del vaso e l'assenza di segnale di flusso alla compressione distale della vena. Nel caso l'esame fosse positivo per TVPd, ne sono state studiate le seguenti caratteristiche: distanza dal cavo popliteo, diametro e lunghezza della trombosi, occlusione parziale o completa della vena. L'eventuale residuo trombotico e grado di pervietà del vaso sono stati valutati secondo i criteri di Siragusa e Prandoni<sup>99,100</sup>.

### **3.5 Analisi Statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita con l'impiego del programma SPSS 20.0.

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  DS per i dati parametrici mentre come mediana e range per i non parametrici.

Per confrontare i singoli gruppi è stato utilizzato il test U Mann-Whitney a campioni

indipendenti per dati non parametrici e il test di Fisher per quelli parametrici.

Per valutare l'associazione tra la TVPd e fattori di rischio, patologie concomitanti, fattori predittivi per TEV, è stata utilizzata l'analisi di regressione logistica univariata. I fattori che sono risultati associati in modo significativo alla malattia sono stati inseriti in un'analisi di regressione logistica multivariata.

I valori di  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

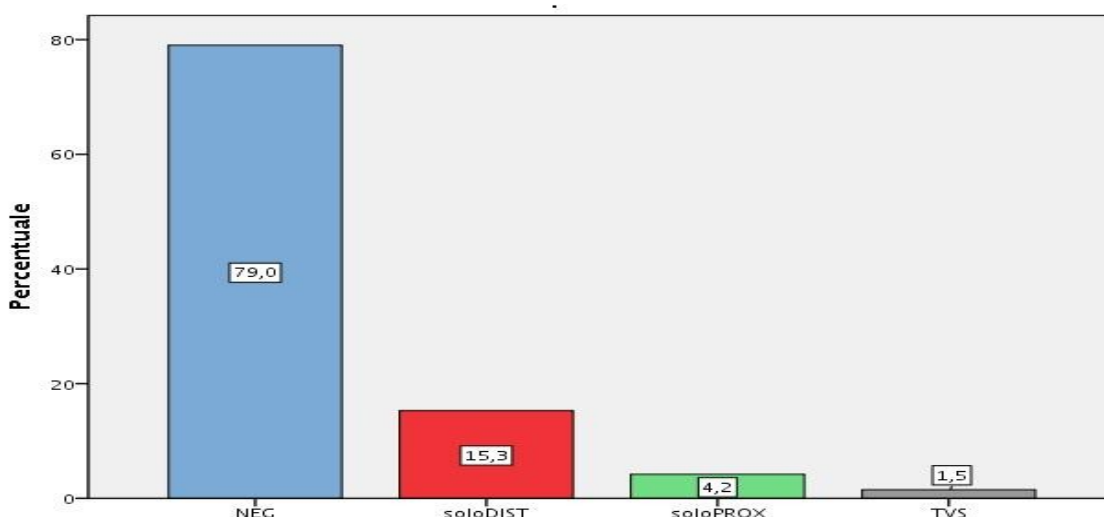
## 3.6 Risultati

### 3.6.1 Caratteristiche Cliniche

I pazienti arruolati erano 334 composti da 126 (37,7%) maschi e 208 (62,3%) femmine. L'età mediana era di 79 (19-104) anni.

L'esecuzione dell'ECD al momento dell'ammissione del paziente in reparto ha permesso di rilevare 14 TVP prossimali (4,2%), 51 TVP distali (15,3%) e 5 TVS (1,5%). Di questi solo in 3 pazienti (1%) è stata documentata un' EP.

I pazienti con TVPd isolata erano 51 (15,3%) su tutti i pazienti esaminati. L'età media in questo gruppo era  $83 \pm 9,1$  (62-96) anni di questi il 20% erano maschi (n=10) e l'80% femmine (n=41)



**Figura 6: diagnosi ECD al momento dell'ammissione dei pazienti in reparto**

Escludendo dall'analisi i pazienti con TVP prossimale e con TVS (n=19), la frequenza delle TVPd risultava pari al 16,2% (n=51/315).

Il gruppo di pazienti senza TVP, e senza TVS, erano il 83,8% (n=264); di questi il 41,3% (n=109) erano maschi e il 58,7% erano femmine (n=155). L'età media in questo gruppo era  $76,4 \pm 12,6$  (19-104) anni.

Il sesso femminile era maggiormente associato alla presenza di TVPd in modo statisticamente significativo (79,1% vs. 20,9%, p=0,004): tale differenza è tuttavia verosimilmente ascrivibile al maggiore numero di pazienti femmina esaminati.

L'età dei pazienti era più elevata in quelli con TVPd e la differenza risultava statisticamente significativa (83 vs. 76,4 anni) (**Tabella 3**).

	<b>Pazienti con TVPd</b>	<b>Pazienti senza TVPd</b>	<b>Totale</b>	<b>Significatività</b>
<b>N° pazienti (%)</b>	51 (16,2 %)	264 (83,8%)	315	
<b>M / F</b>	10 / 41*	109 / 155*	119/196	*p=0,004
<b>Età</b>	83 ± 9,1 <sup>#</sup>	76,4 ± 12,6 <sup>#</sup>	75,4 ± 14	<sup>#</sup> p=0,001

**Tabella 3: descrizione della popolazione dei pazienti esaminata**

Sintomi (dolore, pesantezza) e/o segni obiettivi (differenza di diametro, eritema, edema monolaterale/bilaterale, presenza di varici e/o ulcere venose) suggestivi per TVP sono presenti in 57/315 (18.1%) pazienti. Nel gruppo TVPd nessuno ha presentato sintomi riferibili a TVP mentre 10/51 (19.6%), ad un esame obiettivo accurato, hanno mostrato segni aspecifici per TVP (vene varicose, ulcere, eritema).

### **3.6.2 Fattori di rischio cardiovascolari**

L'anamnesi di ogni paziente ha permesso di valutare i principali fattori di rischio cardiovascolari (CV) nei due gruppi di pazienti: ipertensione arteriosa, diabete mellito, dislipidemia, tabagismo attuale o pregresso.

Almeno 1 fattore di rischio CV era presente nel 85 % dei pazienti con TVPd (n=43/51) e nell' 82% dei pazienti senza TVPd (n=216/264).

Non vi erano differenze statisticamente significative tra il numero di fattori di rischio e la patologia studiata.

In particolare nessun singolo fattore di rischio CV correlava in modo statisticamente significativo con la presenza di TVPd (ipertensione p=0,368; diabete mellito p=0,412; dislipidemia p=1,000; tabagismo p=0,635).

### 3.6.3 Patologia medica acuta presente al momento del ricovero

Sono state classificate in 10 classi le patologie che sono risultate il principale motivo di ricovero del paziente. Nella classe *neurologia* sono state considerate le patologie neurologiche di origine centrale e/o periferica (tia, emorragia cerebrale, stroke ischemico, emorragia cerebrale, epilessia, psicosi, confusione mentale acuta, emicrania, etc.). In quella denominata come *pneumologia* facevano parte le patologie dell'apparato respiratorio superiore ed inferiore (broncopolmonite, riacutizzazione di BPCO, infezione delle alte vie respiratorie). Nella classe *cardiologia* era presente lo scompenso cardiaco acuto e la sindrome coronarica acuta (SCA) quali l'angina instabile (UA) e l'infarto del miocardio. In quella definita come *gastroenterologia* sono state incluse le patologie del tratto gastro-enterico (sanguinamento di origine digestiva superiore o inferiore, pancreatite, subocclusione intestinale, malattia da reflusso gastro-esofageo (MRGE), diverticolite, gastroenterite, complicanze inerenti la cirrosi epatica, colecistite, gastrite, duodenite, etc). La classe *etp* faceva riferimento alla patologia neoplastica come motivo principale di ricovero. In quella denominata *nefro-urologia* vi rientravano tutte le patologie di carattere nefrologico (disidrone e disidratazione, insufficienza renale acuta) e urologico (infezione delle vie urinarie). All'interno del campo *reumatologia* erano presenti le patologie di carattere reumatologico. Infine nel campo *altro* sono state inserite le patologie che non era possibile inserire nelle classi suddette (sincope sepsi e setticemia, anemia acuta, ipertensione accelerata, pancitopenia, dermo-ipodermite arto inferiore, etc).

Di queste solo la classe *nefro-urologia* era associata in modo statisticamente significativo al gruppo di pazienti con TVPd [OR 3,54 (95%IC 1,5 – 8,3), p=0,003].

Nella **Tabella 4** sono illustrate le suddette classi con le relative incidenze.

Classe	Frequenza n (%) pazienti con TVPd <sup>1</sup>	Frequenza n (%) pazienti senza TVPd <sup>2</sup>	Totale n (%) ( <sup>1</sup> + <sup>2</sup> )	P ( <sup>1</sup> vs <sup>2</sup> )
<b>NEUROLOGIA</b>	8 (15,7)	37 (14,0)	45 (14,3)	0,827
<b>PNEUMOLOGIA</b>	10 (19,6)	38 (14,4)	48 (15,2)	0,394
<b>CARDIOLOGIA</b>	6 (11,8)	33 (12,5)	39 (12,4)	1,000
<b>GASTRO ENTEROLOGIA</b>	6 (11,8)	29 (11,0)	35 (11,1)	0,811
<b>ETP</b>	3 (5,9)	22 (8,3)	25 (7,9)	0,778
<b>NEFRO-UROLOGIA</b>	10 (19,6)	17 (6,4)	27 (8,6)	<b>0,003</b>
<b>REUMATOLOGIA</b>	1 (2,0)	2 (0,8)	3 (1,0)	0,412
<b>ALTRO</b>	2 (3,9)	29 (11,0)	31 (9,8)	0,195

**Tabella 4: classificazione delle patologie motivo di ricovero del paziente**

Le patologie concomitanti in ciascun gruppo di pazienti sono riassunte nella **Tabella 5**. Non vi erano differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

Patologia	Pazienti con TVPd	Pazienti senza TVPd	p
Scopenso cardiaco	10/51 (19,6%)	38/264 (14,4%)	0,394
Fibrillazione atriale	11/51 (21,6%)	45/264 (17%)	0,688
Insufficienza respiratoria	10/51 (19,6%)	50/264 (18,9%)	1,000
ETP	6/51 (11,8%)	38/264 (14,4%)	1,000
Patologia infettiva concomitante	12/51 (23,6%)	36/264 (13,6%)	0,825
Patologia reumatologica	2/51 (4%)	4/264 (1,5%)	0,195
Malattia infiammatoria intestinale	1/51 (2%)	1/264 (0,4%)	--
Insufficienza renale	12/51 (23,5%)	60/264 (22,7%)	0,834

**Tabella 5: patologie concomitanti presenti nei due gruppi di pazienti.**

### 3.6.4 Fattori di rischio per TEV

La familiarità per TEV era nota in 263/315 pazienti. Nel gruppo TVPd era presente nel 3,9% dei pazienti (n=2/51) e presente nel 7,1 % di quello senza TVPd (n=8/113) (p=0,591).

La storia personale di TEV era nota in 243/315 pazienti ed è stata documentata nel 2,5% dei pazienti con TVPd (n=6/243) e nell' 9% di quelli senza TVPd (n=22/243) (p=0,595).

Sono stati quindi analizzati i fattori di rischio acquisiti ed trombofilici.



### Fattori di rischio acquisiti

La storia clinica ha permesso di identificare i comuni fattori di rischio acquisiti per TEV quali la presenza di eteroplasia (etp), l'immobilizzazione (definita come allettamento da almeno 72 ore prima della valutazione ECD), il trauma, il trattamento chirurgico recente, l'uso di estro-progestinici (pillola e/o terapia ormonale sostitutiva), la gravidanza e il puerperio. Nella **Tabella 6** sono riportati le frequenze relative ai fattori di rischio per TEV.

<b>Patologia</b>	<b>Pazienti con TVPd</b>	<b>Pazienti senza TVPd</b>	<b>p</b>
Eteroplasia	6/51 (11,8%)	36/264 (13,6%)	0,825
Immobilizzazione	6/51 (11,8%)	22/264 (8,3%)	0,423
Trauma	1/51 (2%)	6/264 (2,3%)	1,000
Chirurgia	0/51 (0%)	0/264 (0%)	--
Estro-progestinici	0/51 (0%)	1/264 (0,4%)	1,000
Gravidanza e puerperio	0/51 (0%)	0/264 (0%)	--
Nessun fattore di rischio	13/51 (25,5%)	65/264 (24,6%)	1,000

**Tabella 6: fattori di rischio acquisiti**

La mediana del BMI nel gruppo di pazienti con TVPd era 24,0 (17,5 – 35,8) e in quelli senza TVPd era 24,2 (14,7 – 37,2). Non vi erano differenze statisticamente significative tra i due gruppi (p=1,000).

E' stata effettuata un'analisi approfondita riguardo il grado di mobilità del paziente nei 3 giorni prima del ricovero. Sono stabiliti i seguenti gradi di mobilizzazione come descritto nella **Tabella 7**.

<b>Grado di mobilità</b>	<b>Descrizione</b>
Normale	Capacità di mobilizzarsi autonomamente senza ausili
Con appoggio	Deambulazione con ausilio
Zoppia	Andatura zoppicante
Piccoli passi	Deambulazione a piccoli passi
Letto-poltrona	Incapacità a deambulare autonomamente anche con ausilio. Il paziente effettua deambula con difficoltà per brevissimi tratti (es. recarsi in bagno con aiuto), ha quindi una disautonomia parziale o completa nelle BADL.
Allettato	Il paziente non può deambulare ma è capace di muovere gli arti

	autonomamente nel letto.
Plegia arti inferiori	Monolaterale o bilaterale. Il paziente non può deambulare e/o muovere uno e/o entrambi gli arti (es. per esito di ictus e/o altra patologia neurologica centrale o periferica)

**Tabella 7: classificazione e descrizione dei vari gradi di mobilità del paziente.**

Ad una prima analisi i pazienti sono stati raggruppati in due classi: a basso grado di mobilità (BGM) se il paziente camminava a piccoli passi, viveva tra letto-poltrona, era allettato o presentava un'emiplegia unilaterale o bilaterale; sono stati classificati a elevato grado di mobilità (EGM) i pazienti che erano capaci di deambulare normalmente, con appoggio o che presentavano zoppia.

I pazienti BGM (n=91/315, 28,9%) rispetto a quelli EGM (n=224/315, 71,1%) avevano un rischio significativamente più elevato di sviluppare una TVPd all'analisi multivariata aggiustata per età e sesso [OR 7,4 (IC 3,7-15,0), p<0,001].

Ad un'analisi multivariata corretta per età, sesso, patologie nefro-urologiche e D-dimero (>225 ug/l), la classe BGM risultava ancora associata alla TVPd [OR 6,0 (IC 2,4-15,2), p<0,001].

Successivamente sono stati analizzati singolarmente i vari gradi di mobilità (**Tabella 8**).

Grado di mobilità	Pazienti con TVPd	Pazienti senza TVPd	Significatività
Normale	10/51 (19,6%)	<b>171/264(64,8%)</b>	<b>&lt;0,001</b>
Con appoggio	4/51 (7,8%)	12/264 (4,5%)	0,304
Zoppia	1/51 (2%)	8/264 (3%)	1,000
Piccoli passi	<b>11/51 (21,6%)</b>	14/264 (5,3%)	<b>0,001</b>
Letto-poltrona	<b>19/51 (37,3%)</b>	16/264 (6,1%)	<b>&lt;0,001</b>
Allettato	4/51 (7,8%)	21/264 (8%)	1,000
Plegia arti inferiori	2/51 (3,9%)	5/264 (1,9%)	0,317

**Tabella 8: gradi di mobilizzazione in ciascun gruppo di pazienti.**

Il rischio di TVPd era statisticamente più elevato nei pazienti con grado di mobilità *letto-poltrona* [OR 9,20 (95%IC 4,30 – 19,68), p=0,000] e *piccoli passi* [OR 4,91 (IC 2,08 – 11,57), p=0,001]. La percentuale di pazienti con grado di mobilità *normale* era statisticamente più elevata nei pazienti senza TVPd [OR 0,14 (IC 0,51 – 0,37), p<0,001]

#### Fattori di rischio trombofilici

Il 49% dei pazienti con TVPd (n=25/51) sono stati sottoposti ad uno screening per

l'identificazione dei fattori di rischio trombofilici. In particolare, sono stati ricercati i seguenti fattori di rischio correlati all'emostasi: AT, PC, PS, polimorfismi dei fattori V (fattore V Leiden) e II (G20210A), omocisteina a digiuno.

Undici su 24 pazienti (45,8%) non avevano alcun fattore di rischio trombofilico, mentre il 54,2 % dei pazienti (13/24) ne aveva almeno uno e il 25 % (6/24) ne aveva almeno due.

#### *Antitrombina*

La determinazione dell' AT è stata valutata 24/25 dei pazienti con TVPd. I livelli medi di AT sono risultati pari a  $94,9 \pm 25,7$  %.

Un deficit di AT è stato diagnosticato in 4/24 pazienti (16,7 %) del gruppo TVPd.

Tutti i pazienti con deficit di AT (1 maschio e 3 femmine) risultavano malnutriti e/o con insufficienza epatica. Nessuno di questi pazienti aveva una storia personale e/o familiare suggestiva per TEV.

#### *Proteina C*

La determinazione della PC è stata valutata in 24/25 dei pazienti con TVPd. I livelli medi di PC sono risultati pari a  $110,1 \pm 36,6$  %.

Il deficit di questo fattore era presente nel 37,5% dei pazienti (n=9/24). Tutti i pazienti con deficit di PC (1 maschio e 3 femmine) risultavano malnutriti e/o con insufficienza epatica. Nessun paziente presentava storia personale e/o familiare suggestiva per TEV.

#### *Proteina S*

La determinazione della PS è stata valutata in 24/25 dei pazienti con TVPd. I livelli medi di PS sono risultati pari a  $75,4 \pm 24,4$  %.

Il deficit di questo fattore era presente nel 33,3% (n=8/24). Quattro pazienti con deficit di Ps (1 maschio e 3 femmine) risultavano malnutriti e/o con insufficienza epatica. Nessun paziente presentava storia personale e/o familiare suggestiva per TEV.

#### *Omocisteina*

La determinazione di questo fattore è stata valutata in 24/25 dei pazienti con TVPd. I livelli medi sono risultati pari a  $12,0 \pm 6,2$  %. Elevati livelli di omocisteina sono stati

rilevati nel 25% (n=6/24) del gruppo con TVPd. In 1/6 dei pazienti con elevati valori di questo fattore era positiva la storia personale per TVP (distale) degli arti inferiori.

#### *Fattore V Leiden*

La ricerca del fattore V Leiden è stata effettuata 24/25 dei pazienti con TVPd. Nessun paziente era portatore di questo polimorfismo.

#### *Polimorfismo del gene della protrombina (G2010A)*

La ricerca di questo polimorfismo è stata effettuata in 24/25 dei pazienti con TVPd ed era presente in forma eterozigote in 1/24 (4,2%). Il paziente non presentava storia personale e/o familiare per TEV.

### **3.6.5 Fattori predittivi per TVPd**

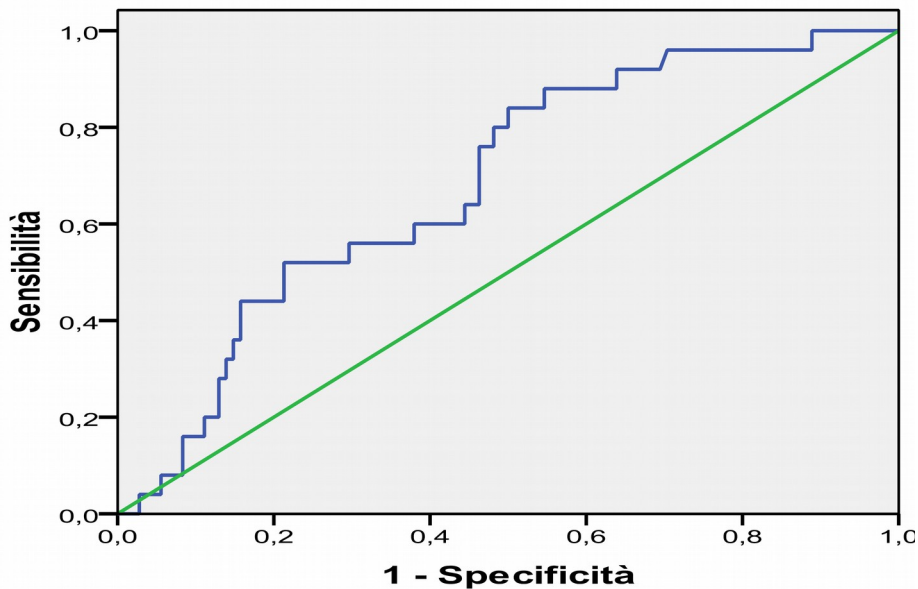
#### Score di Wells

La valutazione dello score di Wells è stata effettuata non considerando la *diagnosi alternativa altrettanto probabile o più probabile di quella di TVP* dato che per definizione non vi era sospetto clinico di TVP nei pazienti esaminati. I pazienti classificati ad *alto rischio* secondo lo Score di Wells ( $\geq 2$ ) erano 12/51 (23,5%) nel gruppo TVPd e 69/264 (26,1%) in quello senza TVPd. Non vi erano differenze statisticamente significative tra i due gruppi ( $p=0,729$ ).

#### D-dimero

La mediana dei valori di D-dimero nel gruppo di pazienti con TVPd era 902 (range 143 - 3413) ug/l mentre in quelli senza TVP era 448 (range 100 - 7863) ug/l.

E' stata valutata la correlazione tra elevati livelli plasmatici di D-dimero e la presenza di TVPd. E' stato scelto dapprima il valore di cut-off del laboratorio locale per il test utilizzato (250 ug/l), che nella nostra popolazione studiata ha una sensibilità del 92% e una specificità del 33%, risultando significativamente associato a TVPd [OR 5,5 (IC 1,8 – 16,5),  $p=0,002$ ]. Abbiamo successivamente calcolato il valore di cut-off di D-dimero con sensibilità e specificità più adeguati per la popolazione studiata (sensibilità 96% e specificità 30% con valore predittivo negativo - VPN - pari al 97%): 225 ug/l (Figura 7). Valori superiori a tale cut-off risultavano significativamente associati allo sviluppo di TVPd [OR 10,0 (IC 2,3 – 43,3),  $p=0,002$ ].



**Figura 7: curva ROC dei valori di D-dimero**

#### Precedenti ricoveri

Tra i pazienti ospedalizzati almeno una volta nei 6 mesi precedenti l'arruolamento, 16/51 (31,4%) appartenevano al gruppo con TVPd e 49/264 (18,6%) a quelli senza TVP. Non vi erano differenze statisticamente significative tra i due gruppi ( $p=0,057$ ).

#### **3.6.6 Profilassi antitrombotica precedente al ricovero**

Il 16% ( $n=50/315$ ) dei pazienti effettuava una profilassi antitrombotica prima del ricovero almeno da 3 giorni (5,5% erano in terapia anticoagulante orale). La percentuale di pazienti che effettuava profilassi antitrombotica era pari al 5,9% nel gruppo con TVPd ( $n=3$ ) e al 18,2% in quello senza TVPd ( $n=48/245$ ). Non vi erano differenze statisticamente significative tra i due gruppi ( $p=0,112$ ). Ventuno dei 51 pazienti che effettuavano profilassi (41%) presentavano un ridotto grado di mobilità (BGM) precedente il ricovero.

### 3.6.7 Gruppo di pazienti con TVPd

#### Caratteristiche morfologiche delle TVPd

Nella **Tabella 9** sono mostrate le caratteristiche morfologiche delle TVPd (numero, sede, lato, diametro, lunghezza, distanza dalla piega del cavo popliteo (PCP) e/o dalla vena poplitea, occlusione parziale o totale del vaso).

Caratteristica				
Numero, n (%)	Singola	28 (55)		
	Multiple	23 (45)		
Lato, n (%)	Destro	20		
	Sinistro	11		
	Bilaterale	20		
Sede, n	<i>Gemellare mediale, 17</i>	9 dx	7 sn	1 bil.
	<i>Gemellare laterale, 3</i>	1 dx	0 sn	2 bil.
	<i>Peroniera, 9</i>	4 dx	4 sn	1 bil.
	<i>Tibiale posteriore, 4</i>	1 dx	2 sn	1 bil.
	<i>Soleale, 39</i>	16 dx	10 sn	13 bil.
Distanza dalla PCP <sup>§</sup> ,cm		9,0 ± 4,4		
Distanza dalla PCP < 1cm <sup>b</sup> ,n		3		
Diametro della trombosi <sup>§</sup> ,mm		6,3 ± 2,8		
Lunghezza della trombosi <sup>§</sup> ,cm		4,1 ± 2,6		
a – distanza del limite superiore della trombosi dal cavo popliteo misurata mediante centimetro a nastro				
b – distanza del limite superiore della trombosi dalla vena poplitea misurata mediante ECD, se applicabile.				
§ – media ± deviazione standard				

**Tabella 9: caratteristiche morfologiche delle TVPd.**

Sono state analizzate le associazioni tra le caratteristiche delle TVPd e i vari gradi di mobilità (**Tabella 10**).

	Normale	Con appoggio	Zoppia	Piccoli passi	Letto-poltrona	Allettato	Paraplegia
Lato							
<i>Monolaterale</i>	7/51 (13,7%)	2/51 (3,9%)	1/51 (2%)	4/51 (7,8%)	13/51 (25,5%)	3/51 (5,9%)	1/51 (2%)
<i>Bilaterale</i>	3/51 (5,9%)	2/51 (3,9%)	0/51 (0%)	6/51 (11,8%)	6/51 (11,8%)	1/51 (2%)	1/51 (2%)
Sede							
<i>Gemellare mediale</i>	3/10 (30%)	2/4 (50%)	0/1 (0%)	2/11 (18,2%)	6/19 (31,6%)	2/4 (50%)	2/2 (100%)
<i>Gemellare laterale</i>	0/10 (0%)	0/4 (0%)	0/1 (0%)	2/11 (18,2%)	1/19 (5,3%)	0/1 (0%)	0/2 (0%)
<i>Peroniera</i>	2/10 (20%)	2/5 (50%)	0/1 (0%)	2/11 (18,2%)	3/19 (15,8%)	1/4 (25%)	0/2 (0%)
<i>Tibiale posteriore</i>	0/10 (0%)	0/5 (0%)	0/1 (0%)	0/11 (0%)	3/19 (15,8%)	1/4 (25%)	0/2 (0%)
<i>Soleale</i>	6/10 (60%)	4/4 (100%)	1/1 (100%)	10/11 (90,1%)	16/19 (84,2%)	1/4 (25%)	1/2 (50%)
Distanza dalla PCP, cm*	9,6 ± 4,18	6,5 ± 5,5	0	7,7 ± 4,1	8,79 ± 5,0	5 ± 4,6	7 ± 2,8
Diametro, cm*	6,6 ± 1,0	5 ± 0	0	6,2 ± 1,6	6,6 ± 3,0	7,6 ± 0	3,5 ± 4,3
Lunghezza, cm*	3,1 ± 0,6	4,9 ± 3,5	3	4,6 ± 1,8	5,3 ± 2,9	4,3 ± 2,1	2,2 ± 1,1
<small>§ p=0,037 * media ± deviazione standard</small>							

**Tabella 10: correlazioni tra caratteristiche delle TVPd e i vari gradi di mobilità**

La classe BGM era statisticamente associata solo alla lunghezza della trombosi (p=0,016).

### Follow-up

Dei 51 pazienti con TVPd solo di 35 (68,6%) è stato possibile effettuare il follow-up ECD completo a 1, 6 e 12 settimane. I restanti 16 pazienti sono stati comunque contattati telefonicamente ma hanno rifiutato la valutazione clinica e strumentale. Di seguito sono riportati i dati relativi al followup (**Tabella 11**).

Settimana	Ricanalizzazione n (%)			Estensione prossimale n (%)	Nuova TVPd n (%)
	0	< 40	> 40		
<b>1°</b>	30/35 (85,7)	2/35 (5,7)	2/35 (5,7)	1/35 (2,9)*	0/35 (0)
<b>6°</b>	15/30 (50)	6/30 (20)	6/30 (20)	0/10 (0)	3/30 (10%)
<b>12°</b>	4/17 (23,5)	0/17 (0)	11/17 (64,7)	1/17 (5,9)	1/17 (5,9)

\* paziente portatrice di CVC femorale.

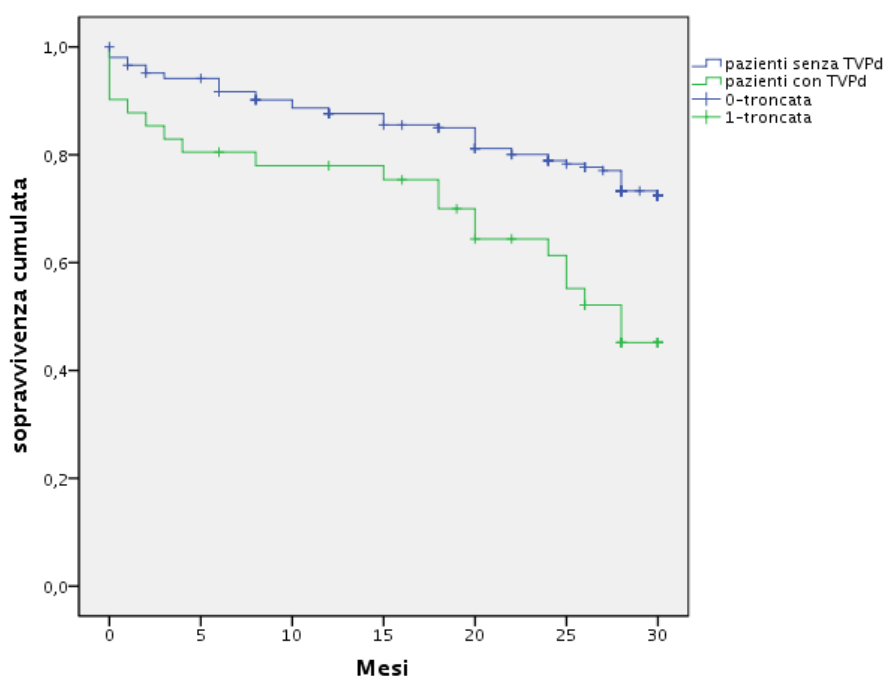
**Tabella 11: follow-up a 1, 6 e 12 settimane (1)**

Nella tabella successiva (**Tabella 12**) sono descritti i casi di sanguinamento maggiore (SAE) e di mortalità durante il followup:

Settimana	Sanguinamento maggiore (SAE) n (%)	Decesso n (%)
1°	1/35 (2,9%)	3/35 (8,6)
6°	0/35 (0)	1/34 (2,9)
12°	0/35 (0)	1/33 (3,0)

**Tabella 12: follow-up a 1, 6 e 12 settimane (2)**

La mortalità è risultata elevata particolarmente nelle prime settimane. La sopravvivenza nei pazienti con TVPd a 30 mesi è risultata significativamente minore (p al log rank test = 0,001) (**Figura 8**)



**Figura 8: curve di Kaplan-Meier riguardo la mortalità dei pazienti con TVPd (linea verde) e senza TVPd (linea blu)**



## 4 DISCUSSIONE

Questo studio è stato condotto su pazienti ospedalizzati per patologia medica acuta afferenti ad un reparto di Medicina Interna dal Pronto Soccorso o dall'Osservazione Breve esclusi quelli con diagnosi già nota di TEV o TVP -prossimale o distale- e/o EP come motivo di ricovero. Al momento dell'ingresso è stata effettuata una valutazione attenta del paziente volta a ricercare la presenza di minimi segni e/o sintomi suggestivi per TEV. Questo ha permesso di porre sospetto clinico di TVP prossimale e/o EP e successivamente di confermare la diagnosi con esami strumentali. Tali segni e sintomi erano presenti nel 24% dei pazienti con TVPd, tuttavia non sono risultati sufficienti a discriminare i pazienti con TVPd da quelli negativi ( $p=0,839$ ). L'incidenza delle TVPd in questa popolazione era del 15,3%, percentuale che risulta sovrapponibile a quella riportata in recenti studi condotti su pazienti medici(57) e inferiore a quella di studi condotti su pazienti post-intervento di chirurgia ortopedica maggiore(59, 104, 105).

I pazienti esaminati avevano nel complesso un'età avanzata ed erano prevalentemente di sesso femminile, dato compatibile con la casistica che può essere esaminata in un reparto di medicina interna. E' comunque risultata altamente significativa l'associazione tra età avanzata e TVPd ( $p=0,001$ ), in accordo con i dati già presenti in letteratura(106, 107). Anche il sesso femminile è risultato un fattore di rischio per TVPd ( $p=0,004$ ), tuttavia tale dato va interpretato con cautela essendo la popolazione in studio prevalentemente di quel sesso.

All'analisi dei fattori di rischio acquisiti (etp, immobilizzazione completa, trauma, chirurgia, utilizzo di estroprogestinici, gravidanza e puerperio) nessuno di essi è risultato significativamente associato a TVPd; tuttavia, la valutazione e caratterizzazione di vari gradi di mobilità del paziente che sono stati definiti mediante parametri clinici e anamnestici, ha permesso di identificare nei pazienti a *basso grado di mobilità* (BGM) una popolazione a più alto rischio di sviluppo di TVPd. All'analisi multivariata *il basso grado di mobilità* è risultato tra l'altro l'unico fattore di rischio indipendente per TVPd.

Tra le patologie motivo di ricovero solo quelle di tipo nefrologico (disidratazione e/o disionie, insufficienza renale acuta) e urologico (infezione delle vie urinarie) sono risultate significativamente associate alla TVPd [OR 3,54 (95%IC 1,5 – 8,3),  $p=0,05$ ]. In letteratura vi sono studi che hanno dimostrato una correlazione tra TVP e

insufficienza renale cronica(108), ma sono esigui i dati riguardo la patologia nefrologica acuta. Questo risultato potrebbe essere riconducibile al fatto che tali patologie sono spesso diretta conseguenza dell'assenza di autonomia nelle BADL con grave riduzione della mobilità in un ambito sociale spesso compromesso. A conferma di quanto detto, l'associazione della TVPd con la patologia *nfro-urologica*, all'analisi multivariata insieme al basso grado di mobilità, perdeva la significatività statistica. In accordo con quanto riportato in letteratura(49, 65) anche in questo studio le TVPd sembrano non associarsi in modo significativo ai fattori di rischio "cronici" quali le patologie concomitanti siano esse singole o multiple.

E' stata inoltre ricercata la presenza di fattori di rischio trombofilici (deficit di AT, PC, PS, iperomocisteinemia, fattore V Leiden e polimorfismo G2010A della protrombina) in una parte dei pazienti con TVPd rilevando deficit degli inibitori della coagulazione peraltro in pazienti con gravi stati di malnutrizione e/o con insufficienza epatica. Nessuno di loro presentava storia familiare e/o personale di TEV; tuttavia, per la mancanza di un gruppo di controllo non è stato possibile trarre alcuna conclusione.

Le TVPd, come già detto, sono frequentemente clinicamente mute e pertanto possono essere utili test predittivi per candidare il paziente ad essere sottoposto a ECD. Essenzialmente sono stati studiati e valutati in ogni paziente lo score di Wells, il valore di D-dimero e la presenza di recenti ricoveri, anche se quest'ultimo parametro potrebbe essere considerato un eventuale fattore di rischio. Lo score di Wells, considerato positivo se il punteggio era superiore o uguale a 2, non è risultato associato a TVPd. E' necessario però fare una considerazione: la valutazione di questo test è stata eseguita escludendo la possibilità di "*diagnosi alternativa*" dato che, per definizione, non vi era alcun sospetto di TVPd nei pazienti esaminati. Lo score di Wells non è quindi applicabile in questo contesto perché è stato costruito per pazienti ambulatoriali sintomatici. Il D-dimero invece è risultato associato a sviluppo di TVPd per valori superiori a 225 ng/L [OR 10,0 (IC 2,3 – 43,3), p=0,002], valore di cut-off peraltro inferiore a quello indicato dal laboratorio d'analisi di questo ospedale. Il significato che assume il D-dimero in questa popolazione, anziana e prevalentemente di sesso femminile, è quindi altamente discriminante per la presenza di TVPd. La presenza di eventuali ricoveri entro i sei mesi precedenti l'arruolamento nello studio non è risultato un fattore predittivo per TVPd.

Mediante l'analisi delle caratteristiche delle TVPd è stata rilevata un'associazione significativa tra la lunghezza della trombosi e il *basso grado di mobilità* che conferma

il reale rischio del paziente con deficit di deambulazione.

Nella nostra casistica le vene più frequentemente coinvolte erano le *soleali* seguite dalle *gemellari mediali*, *peroniere*, *tibiali posteriori* e *gemellari laterali* in contrasto con alcuni dati già presenti in letteratura(62-64). Tuttavia va necessariamente considerato il tipo di popolazione esaminata e anche il grado di mobilità.

Alla dimissione i pazienti con TVPd sono stati trattati con eparina a basso peso molecolare a dosaggio anticoagulante e ricontattati per una nuova valutazione clinica e ECD a 6 e 12 settimane. I dati di follow-up sono esigui sia per l'elevata mortalità rilevata già nelle prime settimane sia per la scarsa collaborazione dei pazienti che non sono tornati alle visite di follow-up. Per quanto riguarda la mortalità, all'analisi delle curve di Kaplan-Meier, a fine follow-up è stata evidenziata una mortalità aumentata nei pazienti con TVPd; tuttavia è necessario segnalare che la mortalità non era da ascrivere a complicanze legate alla trombosi visto il lungo periodo intercorso tra l'ultima visita e il follow-up finale, quanto ad altri fattori quale l'età avanzata e le comorbidità.

Le nuove TVPd rilevate durante il follow-up si sono verificate prevalentemente nei pazienti che non hanno condotto correttamente la terapia anticoagulante prescritta e soprattutto nelle prime settimane di follow-up (30% dei casi). Anche i casi di estensione nelle vene prossimali si sono verificati nella stessa tipologia di pazienti e in un caso dopo il posizionamento di un accesso venoso periferico in femorale comune. Durante il follow-up non si sono verificati episodi di EP. Al momento quindi non è possibile trarre conclusioni definitive sul valore prognostico della TVPd.

Alcuni studi(57) hanno dimostrato che la decisione di non trattare le TVPd espone il paziente ad un elevato rischio di *outcome* definiti come la progressione della TVP nelle vene prossimali e/o la comparsa di EP; di conseguenza, sembra necessario trattare le TVPd come indicato anche dalle linee guida(1, 2).

In conclusione, questo studio ha dimostrato un'elevata incidenza di TVPd asintomatiche e clinicamente silenti in una tipologia di popolazione che è sempre più comune trovare in un reparto di medicina interna e che probabilmente non differisce molto da alcune realtà presenti sul territorio.

I dati di questo lavoro sottolineano l'importanza clinica delle TVPd anche in termini prognostici. Non solo infatti i pazienti allettati, in senso stretto, sono a rischio di trombosi, bensì anche coloro che hanno un grado di mobilità ridotto. Per quanto riguarda la prognosi, la mortalità dei pazienti con TVPd è risultata più elevata,

sebbene non sembri correlata direttamente con la presenza di trombosi, dato che non sono stati registrate embolie polmonari nel follow-up, unica complicanza dotata di elevata mortalità in questo tipo di patologia; tuttavia è necessario sottolineare che la presenza di TVPd risulti più elevata nei pazienti con basso grado di mobilità, categoria di pazienti che risulta affetta da più patologie, ad elevato rischio di complicanze, e quindi a più alta mortalità. La presenza di TVPd, seppur asintomatica (per definizione in questo studio) può essere interpretata come precoce segno di significativa compromissione sistemica nel singolo paziente che quindi necessita di una maggiore attenzione dal punto di vista clinico e assistenziale. Questo studio sottolinea l'importanza e la necessità di effettuare un'adeguata profilassi antitrombotica nel paziente anziano con ridotto grado di mobilità, specie se recentemente ricoverato in un reparto medico internistico. E' la reale difficoltà a effettuare uno screening ECD in questa tipologia di pazienti nella pratica quotidiana che deve stimolare studi volti alla ricerca di nuovi test preclinici capaci di identificare con sufficiente sensibilità e specificità i pazienti da candidare all'esame ecografico delle vene. I dati presentati dimostrano che i pazienti a maggiore rischio sono quelli anziani con deficit deambulatorio, e non necessariamente allettati; la valutazione della deambulazione con semplici parametri clinici, come quelli presentati in questo studio, unita alla valutazione dosaggio del D-dimero potrebbero essere già utili ad identificare i pazienti a maggior rischio. Sono necessari ulteriori studi per individuare e validare su larga scala questi nuovi test di valutazione preclinici al fine di stratificare il rischio nel singolo paziente e a scegliere il trattamento con il miglior rapporto rischio/beneficio.

## 5 BIBLIOGRAFIA

1. Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comerota AJ. **Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)**. *Chest* 2008; 133: 454S-545S.
2. Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, Gutterman DD, Schünemann HJ. **Executive summary: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines**. *Chest* 2012; 141: 7S-47S.
3. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ3.. **Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study**. *Archives of Internal Medicine* 1998; 158: 585-93.
4. White RH. **The epidemiology of venous thromboembolism**. *Circulation* 2003; 107: 14-8.
5. Virchow, R. (1856). Phlogose und thrombose in Gefabsystem. In Virchow R (ed): *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt, von Meidinger Sohn.
6. Slack SM, Cui Y, Turitto VT.. **The effect of flow on blood coagulation and thrombosis**. *Thrombosis and Haemostasis* 1993; 70: 129.
7. Nachman RL, Silverstein R.. **Hypercoagulable states**. *Annals of Internal Medicine* 1993; 119: 819-27.
8. Neri Serneri GG. **Nuovi aspetti di fisiologia e di fisiopatologia del sistema coagulativo**. *Acta Medica Roma* 1987; : 13-30.
9. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ3.. **Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study**. *Archives of Internal Medicine* 2000; 160: 809-15.
- 1.0 Anderson FAJ, Spencer FA.. **Risk factors for venous thromboembolism**. *Circulation* 2003; 107: 19-16.
11. Rosendaal FR. **Risk factors for venous thrombotic disease**. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 610-9.

12. Prisco D, Ciuti G, Falciani M.. **Hemostatic changes in normal pregnancy.** *Haematologica Reports 2005; 1: 1-5.*
13. Martinelli I. **Risk factors in venous thromboembolism.** *Thrombosis and Haemostasis 2001; 86: 395-403.*
14. Lee AYY, Levine MN.. **Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes.** *Circulation 2003; 107: 117-21.*
15. Prandoni P, Lensing AW, Büller HR, Cogo A, Prins MH, Cattelan AM, Cuppini S, Noventa F, ten Cate JW.. **Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer.** *The New England Journal of Medicine 1992; 327: 1128-33.*
16. Piccioli A, Lensing AWA, Prins MH, Falanga A, Scannapieco GL, Ieran M, Cigolini M, Ambrosio GB, Monreal M, Girolami A, Prandoni P. **Extensive screening for occult malignant disease in idiopathic venous thromboembolism: a prospective randomized clinical trial.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH 2004; 2: 884-9.*
17. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U.. **Inherited thrombophilia: Part 1.** *Thrombosis and Haemostasis 1996; 76: 651-62.*
18. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U.. **Inherited thrombophilia: Part 2.** *Thrombosis and Haemostasis 1996; 76: 824-34.*
19. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM.. **Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management.** *Blood 1996; 87: 3531-44.*
20. Rosendaal FR. **Venous thrombosis: a multicausal disease.** *Lancet 1999; 353: 1167-73.*
21. Lane DA, Caso R.. **Antithrombin: structure, genomic organization, function and inherited deficiency.** *Bailliere's Clinical Haematology 1989; 2: 961-98.*
22. Dahlbäck B. **The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis.** *Thrombosis Research 1995; 77: 1-43.*
23. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H,

- van der Velden PA, Reitsma PH.. **Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.** *Nature* 1994; 369: 64-7.
24. Rodeghiero F, Tosetto A.. **Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism.** *Annals of Internal Medicine* 1999; 130: 643-50.
25. 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: 3698-703.
26. Eldibany MM, Caprini JA.. **Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview.** *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2007; 131: 872-84.
27. Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR.. **Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis.** *The New England Journal of Medicine* 1996; 334: 759-62.
28. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R.. **Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2005; 3: 292-9.
29. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang C, Stampfer M.. **Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial.** *JAMA : the Journal of the American Medical Association* 2004; 291: 565-75.
30. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest JJ. **Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease.** *The New England Journal of Medicine* 2006; 354: 1567-77.
31. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K. **Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction.** *The New England Journal of Medicine* 2006; 354: 1578-88.
32. Den Heijer M, Willems HPJ, Blom HJ, Gerrits WBJ, Cattaneo M, Eichinger S, Rosendaal FR, Bos GMJ.. **Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial.** *Blood*

2007; 109: 139-44.

33. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHWM, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA.. **International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)**. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2006; 4: 295-306.
34. Rand JH. **The antiphospholipid syndrome**. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2007; : 136-42.
35. Wheeler HB. **Diagnosis of deep vein thrombosis. Review of clinical evaluation and impedance plethysmography**. *American Journal of Surgery* 1985; 150: 7-13.
36. Wells PS, Hirsh J, Anderson DR, Lensing AW, Foster G, Kearon C, Weitz J, D'Ovidio R, Cogo A, Prandoni P.. **Accuracy of clinical assessment of deep-vein thrombosis**. *Lancet* 1995; 345: 1326-30.
37. Prisco D. **Valutazione critica delle nuove metodiche per lo studio dei prodotti di degradazione della fibrina**. *Rec Progr Med* 1989; 80: 263-267.
38. Prisco D, Grifoni E.. **The role of D-dimer testing in patients with suspected venous thromboembolism**. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2009; 35: 50-9.
29. Siragusa S. **D-dimer testing: advantages and limitations in emergency medicine for managing acute venous thromboembolism**. *Internal and Emergency Medicine* 2006; 1: 59-66.
40. Prisco D, Conti AA, Giurlani L, Falciani M.. **Clinical application of fibrinolysis laboratory tests: a review**. *Annali Italiani di Medicina Interna : Organo Ufficiale della Societa Italiana di Medicina Interna* 1998; 13: 81-7.
41. Legnani C, Palareti G, Prisco D.. **Linee guida sull'impiego clinico del D-dimero**. *Riv Med Lab-JLM* 2004; 5: 225-239.
42. Reber G, de Moerloose P.. **D-dimer assays for the exclusion of venous thromboembolism**. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2000; 26: 619-24.
43. Stein PD, Hull RD, Patel KC, Olson RE, Ghali WA, Brant R, Biel RK, Bharadia V, Kalra NK.. **D-dimer for the exclusion of acute venous**



**thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review.** *Annals of Internal Medicine* 2004; 140: 589-602.

44. Righini M, Bounameaux H.. **Clinical relevance of distal deep vein thrombosis.** *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2008; 14: 408-13.
45. Rabbia, C. & Matricardi, L. (2006). *Eco-Color-Doppler Vascolare*. Minerva Medica.
46. Palareti G, Schellong S.. **Isolated distal deep vein thrombosis: what we know and what we are doing.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2012; 10: 11-9.
47. Alimi YS, Barthelemy P, Juhan C.. **Venous pump of the calf: a study of venous and muscular pressures.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 1994; 20: 728-35.
48. Ibegbuna V, Delis KT, Nicolaidis AN, Aina O.. **Effect of elastic compression stockings on venous hemodynamics during walking.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 2003; 37: 420-5.
49. Galanaud J, Sevestre-Pietri M, Bosson J, Laroche J, Righini M, Brisot D, Boge G, van Kien AK, Gattolliat O, Bettarel-Binon C, Gris J, Genty C, Quere I. **Comparative study on risk factors and early outcome of symptomatic distal versus proximal deep vein thrombosis: results from the OPTIMEV study.** *Thrombosis and Haemostasis* 2009; 102: 493-500.
50. Oger E. **Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France.** EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 83: 657-60.
51. Bressollette L, Nonent M, Oger E, Garcia JF, Larroche P, Guias B, Scarabin PY, Mottier D.. **Diagnostic accuracy of compression ultrasonography for the detection of asymptomatic deep venous thrombosis in medical patients--the TADEUS project.** *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 86: 529-33.
52. Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, Heit JA, Samama CM, Lassen MR, Colwell CW. **Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).** *Chest* 2008; 133: 381S-453S.

53. Cogo A, Lensing AW, Prandoni P, Hirsh J.. **Distribution of thrombosis in patients with symptomatic deep vein thrombosis. Implications for simplifying the diagnostic process with compression ultrasound.** *Archives of Internal Medicine* 1993; 153: 2777-80.
54. Anand SS, Wells PS, Hunt D, Brill-Edwards P, Cook D, Ginsberg JS.. **Does this patient have deep vein thrombosis?.** *JAMA : the Journal of the American Medical Association* 1998; 279: 1094-9.
55. Tomkowski WZ, Davidson BL, Wisniewska J, Malek G, Kober J, Kuca P, Burakowska B, Oniszh K, Gallus A, Lensing AWA.. **Accuracy of compression ultrasound in screening for deep venous thrombosis in acutely ill medical patients.** *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 97: 191-4.
56. Quéré I, Galanaud J, Becker F, Laroche J, Righini M, Lévesque H.. **[Distal deep-venous thrombosis: diagnostic and therapeutic issues].** *La Revue de Medecine Interne / Fondée ... Par la Societe Nationale Francaise de Medecine Interne* 2008; 29: 491-7.
57. Palareti G, Cosmi B, Lessiani G, Roderigo G, Guazzaloca G, Brusi C, Valdre L, Conti E, Sartori M, Legnani C.. **Evolution of untreated calf deep-vein thrombosis in high risk symptomatic outpatients: The blind, prospective CALTHRO study.** *Thrombosis and Haemostasis* 2010; 104: [Epub ahead of print].
58. Ouriel K, Green RM, Greenberg RK, Clair DG.. **The anatomy of deep venous thrombosis of the lower extremity.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 2000; 31: 895-900.
59. Schellong SM, Beyer J, Kakkar AK, Halbritter K, Eriksson BI, Turpie AGG, Misselwitz F, Kälebo P.. **Ultrasound screening for asymptomatic deep vein thrombosis after major orthopaedic surgery: the VENUS study.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2007; 5: 1431-7.
60. Yamaguchi T, Hasegawa M, Niimi R, Sudo A.. **Incidence and time course of asymptomatic deep vein thrombosis with fondaparinux in patients undergoing total joint arthroplasty.** *Thrombosis Research* 2010; 126: e323-6.
61. Vaitkus PT, Leizorovicz A, Cohen AT, Turpie AGG, Olsson C, Goldhaber SZ.. **Mortality rates and risk factors for asymptomatic deep vein thrombosis in medical patients.** *Thrombosis and Haemostasis* 2005; 93: 76-9.
62. Mattos MA, Melendres G, Sumner DS, Hood DB, Barkmeier LD, Hodgson

- KJ, Ramsey DE.. **Prevalence and distribution of calf vein thrombosis in patients with symptomatic deep venous thrombosis: a color-flow duplex study.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 1996; 24: 738-44.
63. Labropoulos N, Webb KM, Kang SS, Mansour MA, Filiung DR, Size GP, Buckman J, Baker WH.. **Patterns and distribution of isolated calf deep vein thrombosis.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 1999; 30: 787-91.
64. Labropoulos N, Kang SS, Mansour MA, Giannoukas AD, Moutzouros V, Baker WH.. **Early thrombus remodelling of isolated calf deep vein thrombosis.** *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery : the Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 2002; 23: 344-8.
65. Galanaud JP, Quenet S, Rivron-Guillot K, Quere I, Sanchez Muñoz-Torrero JF, Tolosa C, Monreal M. **Comparison of the clinical history of symptomatic isolated distal deep-vein thrombosis vs. proximal deep vein thrombosis in 11 086 patients.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2009; 7: 2028-34.
66. Schwarz T, Langenberg K, Oettler W, Halbritter K, Beyer J, Siegert G, Gehrisch S, Schroeder HE, Schellong SM.. **Deep vein and isolated calf muscle vein thrombosis following long-haul flights: pilot study.** *Blood Coagulation & Fibrinolysis : an International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 2002; 13: 755-7.
67. Beck-Razi N, Kuzmin A, Koren D, Sarig G, Brenner B, Haim N, Gaitini D.. **Asymptomatic deep vein thrombosis in advanced cancer patients: the value of venous sonography.** *Journal of Clinical Ultrasound : JCU* 2010; 38: 232-7.
68. Kassai B, Boissel J, Cucherat M, Sonie S, Shah NR, Leizorovicz A.. **A systematic review of the accuracy of ultrasound in the diagnosis of deep venous thrombosis in asymptomatic patients.** *Thrombosis and Haemostasis* 2004; 91: 655-66.
69. Galanaud J, Sevestre M, Genty C, Laroche J, Zizka V, Quéré I, Luc Bosson J. **Comparison of the clinical history of symptomatic isolated muscular calf vein thrombosis versus deep calf vein thrombosis.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 2010; 52: 932-8, 938.e1-2.

70. Schellong SM. **Distal DVT: worth diagnosing? Yes.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2007; 5 Suppl 1: 51-4.
71. Kearon C, Ginsberg JS, Hirsh J.. **The role of venous ultrasonography in the diagnosis of suspected deep venous thrombosis and pulmonary embolism.** *Annals of Internal Medicine* 1998; 129: 1044-9.
72. Goodacre S, Sampson F, Stevenson M, Wailoo A, Sutton A, Thomas S, Locker T, Ryan A.. **Measurement of the clinical and cost-effectiveness of non-invasive diagnostic testing strategies for deep vein thrombosis.** *Health Technology Assessment (Winchester, England)* 2006; 10: 1-168, III-IV.
73. Rose SC, Zwiebel WJ, Nelson BD, Priest DL, Knighton RA, Brown JW, Lawrence PF, Stults BM, Reading JC, Miller FJ.. **Symptomatic lower extremity deep venous thrombosis: accuracy, limitations, and role of color duplex flow imaging in diagnosis.** *Radiology* 1990; 175: 639-44.
74. Yucel EK, Fisher JS, Eggin TK, Geller SC, Waltman AC.. **Isolated calf venous thrombosis: diagnosis with compression US.** *Radiology* 1991; 179: 443-6.
75. Bradley MJ, Spencer PA, Alexander L, Milner GR.. **Colour flow mapping in the diagnosis of the calf deep vein thrombosis.** *Clinical Radiology* 1993; 47: 399-402.
76. Cornuz J, Pearson SD, Polak JF.. **Deep venous thrombosis: complete lower extremity venous US evaluation in patients without known risk factors--outcome study.** *Radiology* 1999; 211: 637-41.
77. Elias A, Mallard L, Elias M, Alquier C, Guidolin F, Gauthier B, Viard A, Mahouin P, Vinel A, Bocalon H.. **A single complete ultrasound investigation of the venous network for the diagnostic management of patients with a clinically suspected first episode of deep venous thrombosis of the lower limbs.** *Thrombosis and Haemostasis* 2003; 89: 221-7.
78. Parisi R, Visonà A, Camporese G, Verlato F, Lessiani G, Antignani PL, Palareti G.. **Isolated distal deep vein thrombosis: efficacy and safety of a protocol of treatment. Treatment of Isolated Calf Thrombosis (TICT) Study.** *International Angiology : a Journal of the International Union of Angiology* 2009; 28: 68-72.
79. Ohgi S, Tachibana M, Ikebuchi M, Kanaoka Y, Maeda T, Mori T.. **Pulmonary embolism in patients with isolated soleal vein thrombosis.** *Angiology* 1998; 49: 759-64.

80. Gillet J, Perrin MR, Allaert FA.. **Short-term and mid-term outcome of isolated symptomatic muscular calf vein thrombosis.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 2007; 46: 513-9; discussion 519.
81. Palareti G, Agnelli G, Imberti D, Moia M, Ageno W, Pistelli R, Rossi R, Verso M.. **Do italian vascular centers look for isolated calf deep vein thrombosis? Analysis of isolated calf deep vein thromboses included in the "Master" registry.** *International Angiology : a Journal of the International Union of Angiology* 2008; 27: 482-8.
82. Planes A, Vochelle N, Darmon JY, Fagola M, Bellaud M, Huet Y.. **Risk of deep-venous thrombosis after hospital discharge in patients having undergone total hip replacement: double-blind randomised comparison of enoxaparin versus placebo.** *Lancet* 1996; 348: 224-8.
83. Samama MM, Cohen AT, Darmon JY, Desjardins L, Eldor A, Janbon C, Leizorovicz A, Nguyen H, Olsson CG, Turpie AG, Weisslinger N.. **A comparison of enoxaparin with placebo for the prevention of venous thromboembolism in acutely ill medical patients. Prophylaxis in Medical Patients with Enoxaparin Study Group.** *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 793-800.
84. Alikhan R, Cohen AT, Combe S, Samama MM, Desjardins L, Eldor A, Janbon C, Leizorovicz A, Olsson C, Turpie AGG.. **Prevention of venous thromboembolism in medical patients with enoxaparin: a subgroup analysis of the MEDENOX study.** *Blood Coagulation & Fibrinolysis : an International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 2003; 14: 341-6.
85. Alikhan R, Cohen AT, Combe S, Samama MM, Desjardins L, Eldor A, Janbon C, Leizorovicz A, Olsson C, Turpie AGG. **Risk factors for venous thromboembolism in hospitalized patients with acute medical illness: analysis of the MEDENOX Study.** *Archives of Internal Medicine* 2004; 164: 963-8.
86. Leizorovicz A, Cohen AT, Turpie AGG, Olsson C, Vaitkus PT, Goldhaber SZ. **Randomized, placebo-controlled trial of dalteparin for the prevention of venous thromboembolism in acutely ill medical patients.** *Circulation* 2004; 110: 874-9.
87. Ageno W, Turpie AGG.. **Clinical trials of deep vein thrombosis prophylaxis in medical patients.** *Clinical Cornerstone* 2005; 7: 16-22.
88. Cohen AT, Davidson BL, Gallus AS, Lassen MR, Prins MH, Tomkowski W, Turpie AGG, Egberts JFM, Lensing AWA. **Efficacy and safety of fondaparinux for the prevention of venous thromboembolism in older**

- acute medical patients: randomised placebo controlled trial.** *BMJ (Clinical Research Ed.)* 2006; 332: 325-9.
89. Cohen AT, Turpie AGG, Leizorovicz A, Olsson C, Vaitkus PT, Goldhaber SZ. **Thromboprophylaxis with dalteparin in medical patients: which patients benefit?.** *Vascular Medicine (London, England)* 2007; 12: 123-7.
90. Cohen AT, Tapson VF, Bergmann J, Goldhaber SZ, Kakkar AK, Deslandes B, Huang W, Zayaruzny M, Emery L, Anderson FAJ. **Venous thromboembolism risk and prophylaxis in the acute hospital care setting (ENDORSE study): a multinational cross-sectional study.** *Lancet* 2008; 371: 387-94.
91. Labarère J, Sevestre M, Belmin J, Legagneux A, Barrellier M, Thiel H, Le Roux P, Pernod G, Bosson J. **Low-molecular-weight heparin prophylaxis of deep vein thrombosis for older patients with restricted mobility: propensity analyses of data from two multicentre, cross-sectional studies.** *Drugs & Aging* 2009; 26: 263-71.
92. Cohen AT, Nandini B, Wills JO, Ota S.. **VTE prophylaxis for the medical patient: where do we stand? - a focus on cancer patients.** *Thrombosis Research* 2010; 125 Suppl 2: S21-9.
93. Lagerstedt CI, Olsson CG, Fagher BO, Oqvist BW, Albrechtsson U.. **Need for long-term anticoagulant treatment in symptomatic calf-vein thrombosis.** *Lancet* 1985; 2: 515-8.
94. Walker L, Lamont S.. **Graduated compression stockings to prevent deep vein thrombosis.** *Nursing Standard : Official Newspaper of the Royal College of Nursing* 2008; 22: 35-8.
95. Sachdeva A, Dalton M, Amaragiri SV, Lees T.. **Elastic compression stockings for prevention of deep vein thrombosis.** *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* 2010; 7: CD001484.
96. Boddì M, Barbani F, Abbate R, Bonizzoli M, Batacchi S, Lucente E, Chiostrì M, Gensini GF, Peris A.. **Reduction in deep vein thrombosis incidence in intensive care after a clinician education program.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 2010; 8: 121-8.
97. Pinede L, Ninet J, Duhaut P, Chabaud S, Demolombe-Rague S, Durieu I, Nony P, Sanson C, Boissel JP. **Comparison of 3 and 6 months of oral anticoagulant therapy after a first episode of proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism and comparison of 6 and 12 weeks of therapy after isolated calf deep vein thrombosis.** *Circulation* 2001; 103:

2453-60.

98. Schwarz T, Buschmann L, Beyer J, Halbritter K, Rastan A, Schellong S.. **Therapy of isolated calf muscle vein thrombosis. A randomized, controlled study.** *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter 2010*; : .
99. Kearon C. **Natural history of venous thromboembolism.** *Circulation 2003*; 107: 122-30.
100. Park YJ, Lee K, Kim D, Roh Y, Kim N, Kim D, Kim Y.. **Risk factors for delayed recanalization of calf vein thrombosis.** *J Korean Surg Soc 2012*; 82: 306-11.
101. Spencer FA, Kroll A, Lessard D, Emery C, Glushchenko AV, Pacifico L, Reed G, Gore JM, Goldberg RJ.. **Isolated calf deep vein thrombosis in the community setting: the Worcester Venous Thromboembolism study.** *Journal of Thrombosis and Thrombolysis 2012*; 33: 211-7.
102. Siragusa S, Malato A, Anastasio R, Cigna V, Milio G, Amato C, Bellisi M, Attanzio MT, Cormaci O, Pellegrino M, Dolce A, Casuccio A, Bajardi G, Mariani G.. **Residual vein thrombosis to establish duration of anticoagulation after a first episode of deep vein thrombosis: the Duration of Anticoagulation based on Compression UltraSonography (DACUS) study.** *Blood 2008*; 112: 511-5.
103. Prandoni P, Lensing AWA, Prins MH, Bernardi E, Marchiori A, Bagatella P, Frulla M, Mosena L, Tormene D, Piccioli A, Simioni P, Girolami A.. **Residual venous thrombosis as a predictive factor of recurrent venous thromboembolism.** *Annals of Internal Medicine 2002*; 137: 955-60.
104. Calfon M, Seddighzadeh A, Piazza G, Goldhaber SZ.. **Deep vein thrombosis in orthopedic surgery.** *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis : Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 2009*; 15: 512-6.
105. Clayton RAE, Gaston P, Watts AC, Howie CR.. **Thromboembolic disease after total knee replacement: experience of 5100 cases.** *The Knee 2009*; 16: 18-21.
106. Clark A, Harvey I, Fowkes FGR.. **Epidemiology and risk factors for varicose veins among older people: cross-sectional population study in the UK.** *Phlebology 2010*; 25: 236-40.
107. Barba R, Zapatero A, Losa JE, Marco J, Plaza S, Canora J, Casas JM..

**Venous thromboembolism in acutely ill hospitalized medical patients.**  
*Thrombosis Research 2010; 126: 276-9.*

108. Derakhshanfar A, Gholyaf M, Niayesh A, Bahiraii S.. **Assessment of frequency of complications of arterio venous fistula in patients on dialysis: a two-year single center study from Iran.** Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation : an Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, *Saudi Arabia 2009; 20: 872-5.*