

Misura della proteina S e della resistenza alla proteina C attivata. Risultati della Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)-CISMEL*

A. Tripodi, V. Chantarangkul

Centro Emofilia e Trombosi Angelo Bianchi Bonomi, Dipartimento di Medicina Interna, Università e IRCCS Ospedale Maggiore, Milano, Italia

*Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi in Ematologia e Laboratorio

Premessa. Gli esercizi di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) hanno, fra gli altri, lo scopo di fornire all'organizzatore e quindi indirettamente al laboratorio, informazioni utili per la standardizzazione metodologica e per la scelta delle procedure analitiche idonee ad indagare in maniera efficace le condizioni cliniche oggetto dello studio di laboratorio.

Metodi. Analisi dei dati di tre Esercizi VEQ in coagulazione organizzati dal CISMEL nei quali i partecipanti hanno misurato su tre plasmi i livelli di proteina S e la resistenza alla proteina C attivata.

Risultati. Tre esercizi consecutivi VEQ dimostrano

come la presenza della mutazione del fattore V Leiden può portare ad una sottostima importante dei livelli di proteina S misurata con metodo funzionale coagulante. Gli stessi esercizi documentano come il metodo per la resistenza alla proteina C attivata su plasma diluito in plasma carente di fattore V sia altamente specifico per la mutazione Leiden.

Conclusioni. Gli esercizi di VEQ eseguiti in cieco su un campione di laboratori rappresentativo della situazione nazionale confermano due dati importanti e permettono di disegnare una strategia diagnostica ottimale per il paziente trombofilico.

Protein S and activated protein C resistance measurements. Results of the External Quality Assurance Scheme (EQAS) organized by the CISMEL

Background. One of the aims of the External Quality Assurance Scheme (EQAS) is to provide information useful to standardize laboratory methods and to help choosing the most appropriate laboratory strategy to investigate clinical conditions.

Methods. We looked at the results coming from the EQAS in coagulation organized by the CISMEL group in three different exercises where participants analyzed three well characterized plasmas for protein S and activated protein C resistance.

Results. Three consecutive exercises showed that the

functional anticoagulant assay for protein S is affected by the presence of the factor V Leiden mutation and that the method for the measurement of activated protein C resistance based on predilution of test plasma in factor V deficient plasma is highly specific for factor V Leiden.

Conclusions. EQAS exercises carried out across the country with samples unknown to the participants confirm two important findings that may be used to design a diagnostic strategy for the investigation of patients with thrombophilia.

Key words. Protein S; activated protein C resistance; factor V Leiden

Introduzione

Lo scopo principale dei programmi di valutazione esterna della qualità (VEQ) è quello di fornire al laboratorio partecipante uno strumento idoneo a paragonare i propri risultati con quelli prodotti da altri

laboratori che lavorano in condizioni analoghe. Un altro scopo della VEQ, non meno importante del precedente, è quello di fornire all'organizzatore e quindi indirettamente anche ai partecipanti, informazioni utili per la standardizzazione metodologica e per la scelta delle procedure analitiche più idonee ad

indagare con la migliore efficacia le diverse condizioni cliniche oggetto dello studio di laboratorio.

Il CISMEL (Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi in Ematologia e Laboratorio) per tramite del suo Sottocomitato per l'Emostasi organizza da due decenni un programma nazionale interlaboratorio (interlaboratory coagulation survey, ICS) che, oltre ai parametri tradizionali, tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale attivato, fibrinogeno ed antitrombina, include da qualche anno taluni fra i più importanti parametri per lo studio della trombofilia, quali la proteina C, la proteina S e la resistenza alla proteina C attivata (APC). Lo scopo di questo articolo è di riferire i risultati degli ultimi tre esercizi per quanto riguarda la determinazione della proteina S e della resistenza APC.

Disegno

La partecipazione alla VEQ-ICS-CISMEL è volontaria e si rivolge ai laboratori pubblici e privati che operano nell'ambito del servizio sanitario nazionale e che hanno un interesse specifico per lo studio dell'emostasi. Il numero dei partecipanti registrati è di circa 250 per quanto concerne i parametri tradizionali, ma si riduce a circa 80 per quanto concerne i parametri di trombofilia. Per ognuno dei tre esercizi considerati nel presente rapporto i partecipanti hanno ricevuto 3 flaconi di plasma liofilizzato, le istruzioni per la loro ricostituzione ed un foglio di raccolta dati, sul quale riportare i risultati ottenuti per i parametri richiesti secondo le metodiche analitiche localmente in uso. In alcuni casi è stato anche chiesto un giudizio sui risultati, espresso come *normale*, *patologico*, o *dubbio*. Dopo l'analisi centralizzata dei risultati, i partecipanti hanno ricevuto un tabulato di risposta con i dati relativi alla posizione dei propri risultati rispetto a quelli di tutti i partecipanti e, là dove possibile, anche rispetto a quelli di gruppi omogenei.

Descrizione dei plasmi

Dei tre campioni inviati in ciascun esercizio uno era normale per tutti i parametri; uno era carente parziale, artificialmente adsorbito per ridurre l'attività dei fattori vitamina K dipendenti ed uno era da paziente con mutazione del fattore V (R506Q) Leiden allo stato eterozigote.

Risultati

Proteina S

Esercizio I. La Tabella I (pannello in alto) mostra i risultati per i tre plasmi (A normale, B parzialmente-carente e C da paziente con mutazione eterozigote

per il fattore V Leiden) ottenuti dai partecipanti, suddivisi per tutti i metodi e per i metodi antigene totale, antigene libero e attività funzionale anticoagulante. La stragrande maggioranza dei partecipanti ha eseguito la misura con metodo funzionale anticoagulante. Mentre le stime medie dei livelli di proteina S erano vicine all'atteso per i plasmi A (normale) e B (carente parziale), la stima media per il plasma C (da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden) era di circa il 43%, quindi nettamente inferiore all'atteso 100%. La sottostima dei livelli di proteina S per il plasma C era concorde per la maggior parte dei laboratori che usavano il metodo funzionale coagulante. Troppo pochi i partecipanti che usavano il metodo per l'antigene della libera (n = 5) per ricavare informazioni comparative fra i due metodi.

Esercizio II. La Tabella I (pannello centrale) mostra i risultati per i tre plasmi (A normale, B da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden e C parzialmente carente) ottenuti dai partecipanti. Come per il precedente esercizio si osserva una sottostima significativa (di circa il 50%) dei livelli di proteina S funzionale anticoagulante nel plasma da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden. Si può anche osservare come i partecipanti (n = 27) che usavano il metodo per l'antigene della proteina S libera stimavano sullo stesso plasma livelli significativamente più alti e vicini all'atteso 100%.

Esercizio III. La Tabella I (pannello in basso) mostra i risultati per i tre plasmi (A normale, B parzialmente carente e C da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden) ottenuti dai partecipanti. A conferma di quanto visto nei precedenti esercizi, la sottostima della proteina S funzionale anticoagulante per il plasma da paziente con mutazione del fattore V Leiden è ancora considerevole, mentre la stima dei partecipanti che usavano l'antigene della libera (n = 43) è vicina all'atteso 100%. È anche interessante notare come il numero dei partecipanti che usano l'antigene della libera sia gradatamente cresciuto da 5 (Esercizio I) a 43 (Esercizio III).

Resistenza APC

Esercizio I. La Tabella II (pannello in alto) mostra i risultati per i tre plasmi (A normale, B parzialmente carente e C da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden) ottenuti dai partecipanti e suddivisi per tutti i metodi e per i metodi senza (aPCratio - V) e con (aPCratio + V) pre-diluizione del plasma test in plasma carente di fattore V. I risultati di APC ratio (tempo di coagulazione con APC/tempo di coagulazione senza APC) sono stati normalizzati per i risultati del pool locale. Le stime medie non differiscono per i due metodi (con o senza pre-diluizione in plasma carente di fattore V). L'interpretazione data dai partecipanti è stata normale nel 100% e nell'87% dei casi per il plasma A (normale) ed il plasma B (carente parziale), rispettivamente. Per il plasma C (eterozigo-

te per il fattore V Leiden) l'interpretazione è stata *patologico* nel 100% dei casi per il metodo con pre-diluizione in plasma carente di fattore V, mentre con il metodo senza pre-diluizione, l'interpretazione è stata *patologico* nell'89% dei casi, *dubbio* nel 6% e *normale* per il restante 5% dei casi.

Esercizio II. La Tabella II (pannello centrale) mostra i risultati per i tre plasmi (A normale, B da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden e C parzialmente carente) ottenuti dai partecipanti. Come per il precedente esercizio non si ravvisano importanti differenze nelle stime medie a seconda del metodo. L'interpretazione data dai partecipanti è stata *normale* nel 97% e nel 96% dei casi per il plasma A (normale) per i metodi senza o con pre-diluizione, rispettivamente. Per il plasma C (carente parziale), l'interpretazione è stata normale nel 79% e nel 70% dei casi per i metodi senza o con pre-diluizione, rispettivamente. Per il plasma B (eterozigote per il fattore V Leiden) l'interpretazione è stata *patologico* o *dubbio* nel 96% e nel 4% dei casi per il metodo con pre-diluizione in plasma carente di fattore V, mentre con il metodo senza pre-diluizione, l'interpretazione è stata *patologico* o *dubbio* nel 93% e nel 7% dei casi.

Esercizio III. La Tabella II (pannello in basso) mostra i risultati per i tre plasmi (A normale, B parzialmente carente e C da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden) ottenuti dai partecipanti. Come per i precedenti esercizi non si ravvisano importanti differenze nelle stime medie a seconda del metodo. L'interpretazione data dai partecipanti per il plasma A (normale) è stata *normale* nell'83% e nell'87% dei casi per il metodo senza o con pre-diluizione, rispettivamente. Per il plasma B (carente parziale), l'interpretazione è stata normale nel 62% e nell'83% dei casi con i metodi senza o con pre-diluizione, rispettivamente.

Per il plasma C (eterozigote per il fattore V Leiden) l'interpretazione è stata *patologico* o *dubbio* nel 90% e nel 6% dei casi per il metodo con pre-diluizione in plasma carente di fattore V, mentre con il metodo senza pre-diluizione, l'interpretazione è stata *patologico* nel 97% e *normale* nel restante 3% dei casi.

Complessivamente il plasma eterozigote per la mutazione fattore V Leiden è stato diagnosticato come tale, sulla base di uno o l'altro dei test su plasma, nel 100% dei casi nel I e II esercizio e nel 97% dei casi nel III.

Tabella I. Proteina S. Risultati inviati dai partecipanti in tre esercizi. I Esercizio. Plasmi: A normale, B parzialmente carente e C da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden. II Esercizio. Plasmi: A normale, B da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden e C parzialmente carente. III Esercizio. Plasmi: A normale, B parzialmente carente e C da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden.

I Esercizio												
Metodo	Plasma A				Plasma B				Plasma C			
	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV
Tutti	67	96.52	15.82	16.4	66	46.48	14.97	32.2	69	46.41	22.89	49.3
Antigene totale	2	99.00			2	34.00			2	103.50		
Antigene libero	5	89.80	9.20	10.2	5	36.80	3.90	10.6	5	81.20	3.56	4.4
Coagulante	60	96.99	16.41	16.9	59	47.73	15.28	32.0	63	42.97	20.86	48.5

II Esercizio												
Metodo	Plasma A				Plasma B				Plasma C			
	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV
Tutti	73	94.25	10.27	10.9	75	79.67	31.11	39.0	74	33.26	10.15	30.5
Antigene totale	1	113.0			1	107.0			1	64.0		
Antigene libero	27	92.82	8.89	9.6	27	115.05	14.35	12.5	28	35.69	4.45	12.5
Coagulante	44	94.11	10.20	10.8	46	58.48	15.63	26.7	45	30.31	12.21	40.3

III Esercizio												
Metodo	Plasma A				Plasma B				Plasma C			
	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV
Tutti	66	82.7	10.47	11.4	75	23.8	6.76	28.4	83	73.7	27.05	36.7
Antigene totale	2	86.0			2	45.0			2	92.0		
Antigene libero	43	94.4	9.52	10.1	42	25.5	3.16	12.4	44	93.8	10.66	11.4
Coagulante	36	67.4	27.40	40.6	33	19.4	9.87	50.9	35	46.5	12.35	26.0

§ dopo esclusione dei dati aberranti.

Tabella II. Resistenza APC. Risultati inviati dai partecipanti in tre esercizi. I Esercizio. Plasmi: A normale, B parzialmente carente e C da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden. II Esercizio. Plasmi: A normale, B da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden e C parzialmente carente. III Esercizio. Plasmi: A normale, B parzialmente carente e C da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden.

I Esercizio												
Metodo	Plasma A				Plasma B				Plasma C			
	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV
Tutti	42	1.01	0.06	5.9	38	0.96	0.13	13.0	43	0.58	0.06	10.4
aPCratio-V*	16	1.03	0.08	8.2	13	1.02	0.18	17.2	16	0.56	0.09	17.0
aPCratio+V*	22	1.00	0.04	4.3	24	0.92	0.08	8.3	24	0.61	0.03	5.5

II Esercizio												
Metodo	Plasma A				Plasma B				Plasma C			
	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV
Tutti	51	1.00	0.09	9.1	52	0.65	0.08	12.5	32	0.93	0.05	5.2
aPCratio-V*	30	1.02	0.12	11.4	31	0.62	0.09	14.9	31	1.19	0.51	42.5
aPCratio+V*	21	0.99	0.04	4.1	22	0.69	0.07	9.5	18	0.92	0.04	4.5

III Esercizio												
Metodo	Plasma A				Plasma B				Plasma C			
	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV	no §	media	SD	CV
Tutti	55	0.93	0.06	6.8	38	0.94	0.12	12.8	58	0.62	0.09	13.7
aPCratio-V*	23	0.93	0.08	8.7	17	1.06	0.36	33.6	24	0.60	0.10	17.2
aPCratio+V*	27	0.93	0.06	6.6	24	0.93	0.07	7.6	25	0.66	0.04	6.4

§ dopo esclusione dei dati aberranti

*aPC-ratio, rapporto normalizzato contro il pool locale. Metodi senza (-V) e con (+V) diluizione in plasma carente di fattore V.

Discussione

Nello studio della trombofilia i metodi per le misure della proteina S e della resistenza APC sono, seppure per aspetti diversi, di notevole interesse. L'analisi dei dati della VEQ-ICS-CISMEL eseguita in tre diversi esercizi su questi due parametri è l'occasione per alcune osservazioni che crediamo possano essere di interesse per il laboratorio. Seppure confermata dai più, la carenza congenita di proteina S non è da tutti accettata come un fattore di rischio per tromboembolismo venoso¹. La ragione di ciò è probabilmente da ricercare nella sua misura, che è gravata da una serie di incertezze². Ad esempio, non è ancora noto quale sia la funzione che di essa si debba misurare. La proteina S, infatti, può esplicare la sua funzione anticoagulante sia indirettamente come cofattore dell'APC³, sia direttamente inibendo l'attività dei complessi protrombinasi e tenasi⁴. Attualmente i metodi di misura funzionali disponibili commercialmente esplorano solo la sua funzione cofattoriale nei riguardi dell'APC^{5,6} e potrebbe, pertanto, essere che la visione che noi abbiamo delle funzioni anticoagulanti della proteina S sia solo parziale. I metodi funzionali finora descritti sono, come riportato in letteratura^{7,8}, gravati dall'effetto dovuto al fattore V Lei-

den, che può portare in tali plasmi ad una importante sottostima nella misura della proteina S funzionale, a fronte di un antigene normale, inducendo quindi il laboratorio a considerare erroneamente la diagnosi di carenza disfunzionale di proteina S. I dati della VEQ-ICS-CISMEL confermano queste conclusioni, dando ulteriore rilevanza al fenomeno, perché ottenuti sul campo, in esercizi eseguiti in cieco e ripetuti tre volte a distanza di tempo, ma con lo stesso disegno. I dati della letteratura dimostrano come l'effetto indesiderato del fattore V Leiden sul dosaggio funzionale della proteina S possa essere attenuato incrementando la diluizione del plasma sul quale si esegue il test⁸. Apparentemente nessuno dei partecipanti ai nostri esercizi ha utilizzato tale modifica. Resta il fatto che il laboratorio non sempre è a conoscenza dello stato di portatore di fattore V Leiden del campione sul quale si accinge a misurare la proteina S. La soluzione più immediata sarebbe quella di utilizzare una diluizione maggiore di quella standard, indipendentemente dalla conoscenza o meno dello stato di portatore per il fattore V Leiden. Tuttavia, è bene ricordare che la diluizione del plasma, ma anche il tempo intercorrente fra la preparazione della diluizione e l'esecuzione del test, potrebbe modificare l'affinità della proteina S per il C4b binding

protein⁹, variando quindi la quota della proteina S libera, la sola che è rilevata dal test funzionale. Come si vede, la soluzione non è semplice. D'altro canto, la decisione di eseguire ambedue le diluizioni (standard e aumentata), seppure pragmatica, sarebbe gravata da costi probabilmente eccessivi. Il consiglio di usare il solo test immunologico per il dosaggio della proteina S libera (piuttosto che la totale) gode attualmente di un consenso pressoché unanime presso gli esperti¹⁰⁻¹², ma comporta fatalmente l'impossibilità di diagnosticare le carenze disfunzionali di proteina S, la cui frequenza e rilevanza clinica sono allo stato attuale difficili da stabilire. L'urgenza per il laboratorio di disporre in tempi brevi di metodi funzionali per la proteina S affidabili e scevri da artefatti metodologici, risulta in tutta la sua evidenza.

La resistenza APC¹³, sostenuta in massima parte dalla presenza della mutazione fattore V Leiden¹⁴ è l'alterazione trombofilica ereditaria più frequente¹⁵, anche se non è fra le più gravi dal punto di vista del rischio trombotico, almeno quando si presenta isolatamente¹⁶. Si capisce, pertanto, l'importanza per il laboratorio di disporre di metodi funzionali su plasma capaci di dare una risposta rapida, poco costosa, ma che sia paragonabile a quella che darebbe la diagnostica molecolare per il fattore V Leiden. Gli esercizi VEQ-ICS-CISMEL, oggetto del presente rapporto, documentano come i metodi su plasma per la resistenza siano in grado di identificare con una alta accuratezza diagnostica un plasma da paziente con mutazione eterozigote per il fattore V Leiden. Il dato conferma quanto già riportato dalla letteratura internazionale¹⁷, ma acquista ulteriore rilevanza perché ottenuto sul campo, in cieco e in un campione di laboratori che, seppure non particolarmente numeroso, rappresenta la situazione media nazionale.

Esistono diverse strategie diagnostiche per l'identificazione dei pazienti resistenti all'azione anticoagulante dell'APC. La prima prevede di identificare direttamente la mutazione fattore V Leiden con l'analisi molecolare. Considerando che circa l'85% delle resistenze fenotipiche sono spiegate con la presenza della mutazione fattore V Leiden, questa strategia è scarsamente efficace perché porterebbe alla mancata diagnosi delle resistenze (acquisite) non dovute al fattore V Leiden, che pure possono essere causa di tromboembolismo venoso indipendentemente dal fattore V Leiden^{18,19}. L'alternativa potrebbe essere l'esecuzione del test per la resistenza su plasma non diluito, per identificare le resistenze acquisite, seguita dall'analisi molecolare per la ricerca della mutazione Leiden solo nei casi positivi per resistenza, riscontrati con il test precedente. Questa strategia, pur migliore della precedente non è esente da critiche perché per essere efficace presupporrebbe una elevata sensibilità del test per la resistenza nei riguardi del fattore V Leiden, cosa che purtroppo non sempre è¹⁰, anche a causa dei livelli variabili della forza

procoagulante del plasma che possono influenzare i risultati. Come conseguenza del nostro ragionamento sembrerebbe che la strategia migliore sia l'esecuzione del test per la resistenza su plasma non diluito in aggiunta all'analisi molecolare su tutti i pazienti. Questa strategia consentirebbe la massima efficacia diagnostica, ma sarebbe gravata da costi piuttosto elevati, dovuti all'analisi molecolare che per altro, contrariamente a quanto comunemente si crede, non è neanche esente da problemi interpretativi²⁰⁻²². Noi pensiamo che un compromesso accettabile possa essere l'esecuzione su tutti i pazienti di ambedue i test su plasma (senza e con prediluizione del plasma test in plasma carente di fattore V), seguita dall'analisi molecolare per identificare la mutazione fattore V Leiden, ma solo nei casi positivi (e dubbi) per uno o entrambi i test su plasma²³. Questa strategia, forte della buona specificità per il fattore V Leiden¹⁷ dimostrata dal test su plasma diluito in plasma carente di fattore V, consentirebbe la massima efficacia diagnostica con il minimo della spesa.

Bibliografia

1. Liberti G, Bertina RM, Rosendaal FR. Hormonal state rather than age influences cut-off values of protein S: reevaluation of the thrombotic risk associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1093-6.
2. Goodwin AJ, Rosendaal FR, Kottke-Marchant K, Bovill EG. A review of the technical, diagnostic, and epidemiologic considerations for protein S assays. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126: 1349-66.
3. Dahlback B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol*. 2004; 79: 109-16.
4. van Wijnen M, van 't Veer C, Meijers JC, Bertina RM, Bouma BN. A plasma coagulation assay for an activated protein C-independent anticoagulant activity of protein S. *Thromb Haemost* 1998; 80: 930-5.
5. Preda L, Tripodi A, Valsecchi C, Lombardi A, Finotto E, Mannucci PM. A prothrombin time-based functional assay of protein S. *Thromb Res* 1990; 60: 19-32.
6. Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli JL, Leroy-Matheron C, Amiral J, Meyer D, et al. A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate. *Thromb Haemost* 1989; 62: 1144-5.
7. Faioni EM, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannucci PM. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost* 1993; 70: 1067-71.
8. Faioni EM, Boyer-Neumann C, Franchi F, Wolf M, Meyer D, Mannucci PM. Another protein S functional assay is sensitive to resistance to activated protein C. *Thromb Haemost* 1994; 72: 648.
9. Persson KE, Hillarp A, Dahlback B. Analytical considerations for free protein S assays in protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1144-7.
10. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996; 76: 824-34.

11. Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001; 47: 1597-606.
12. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 1998; 128: 8-14.
13. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1004-8.
14. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.
15. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-22.
16. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-73.
17. Tripodi A, Negri B, Bertina RM, Mannucci PM. Screening for the FV:Q506 mutation—evaluation of thirteen plasma-based methods for their diagnostic efficacy in comparison with DNA analysis. *Thromb Haemost* 1997; 77: 436-9.
18. de Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood*. 1999; 93: 1271-6.
19. Rodeghiero F, Tosetto A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1999; 130: 643-50.
20. Preston FE, Kitchen S, Jennings I, Woods TA. A UK National External Quality Assessment scheme (UK Neqas) for molecular genetic testing for the diagnosis of familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1999; 2: 1556-7.
21. Tripodi A, Peyvandi F, Chantarangkul V, Menegatti M, Mannucci PM. Relatively poor performance of clinical laboratories for DNA analyses in the detection of two thrombophilic mutations. A cause for concern. *Thromb Haemost* 2002; 88: 690-1.
22. Chantarangkul V, Menegatti M, Tagliabue L, Peyvandi F, Tripodi A. Assessment of performance of clinical laboratories for DNA analyses to detect three thrombophilia mutations. *Haematologica* 2004; 89 (Suppl. 8): 156.
23. Tripodi A. Laboratory diagnosis of thrombophilic states: where do we stand? *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 245-8.