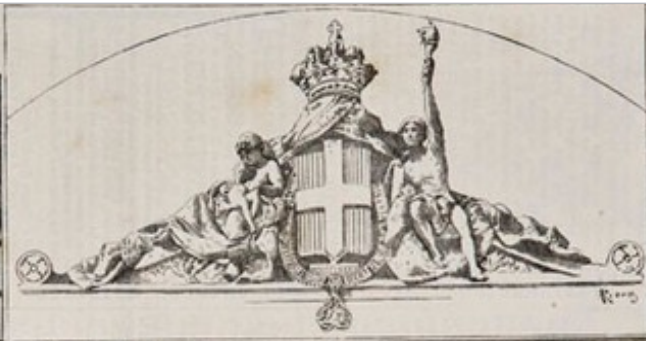


ADAMTS13: I NUOVI TEST DIAGNOSTICI



Barbara Montaruli

SC Laboratorio Analisi AO Ordine Mauriziano

Novità in coagulazione attraverso i Centri di Emostasi e Trombosi

12 Novembre 2021

PORPORA TROMBOTICA TROMBOCITOPENICA PTT

- Microangiopatia trombotica si osserva nel microcircolo secondario accumulo di multimeri fattore VW e formazioni di microtrombi piastrinici con secondario danno d'organo (SNC, rene, miocardio, apparato gastroenterico).
- Se non rapidamente riconosciuta mortalità del 10-20% e alta percentuale di danni permanenti in particolare neurologici.

Deficit adamts 13

Accumulo
multimeri VW

Aggregazione piastrinica
e formazione
di microtrombi
piastrinici

- ADAMTS13 deve essere misurata su campione prelevato prima inizio terapia
- Un test rapido è mandatorio
- Pochi laboratori hanno test rapidi
- Pochi laboratori fanno test 7/7gg
- Maggior parte lab. lavorano in batch ed utilizzano test complessi che necessitano di competenze specifiche spesso con tempi di esecuzione lunghi

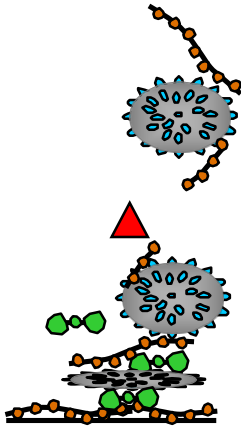
- Anemia emolitica microangiopatica
- Trombocitopenia
- Compromissione renale
- Compromissione neurologica
- Febbre
- Quadro clinico eterogeneo (interessamento multiorgano)

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

VWF, ADAMTS13 e PTT

Feedback Regulation of Platelet Adhesion



Proteolysis by ADAMTS13

- Taglia VWF Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶
- **Aumentata** causa VWD (type 2A)
(Diminuiscono multimeri alto PM che ci sono nella norma)
- **Diminuita** causa PTT (aumentano tantissimo multimeri alto PM)

Controllo della dimensione della taglia dei multimeri del vWF è essenziale

PORPORA TROMBOTICA TROMBOCITOPENICA PTT: SOSPETTO CLINICO E LABORATORISTICO

DIAGNOSI DI MICROANGIOPATIA TROMBOTICA (TMA)

- Piastrine < 150.000 mm³ o < 25% del valore basale
- Emolisi meccanica
 - > LDH e/o
 - Hb < 10 g%
 - < Aptoglobina
 - Schistociti > 2%

Inoltre:

- Reticolocitosi
- > Billirubina Indiretta
- > Creatininemia (frequente) e/o anomalie orinarie (proteinuria/microematuria)

associati o non (in base alla gravità) a uno o più
SINTOMI CLINICI

- Neurologici (Confusione, Cefalea, Afasia, Epilessia, Disartria, calo visus, encefalopatia, coma)
- Gastrointestinali (Diarrea, diarrea ematica)
- Cardiologici (infarto, aritmie, scompenso)
- Polmonari (emoptoe)
- Ipertensione severa di recente insorgenza

- Sospetto della malattia di basa sull'osservazione del quadro clinico e laboratoristico iniziale del paziente eventualmente applicando modelli specifici per la valutazione del rischio (Plasmic e French score).
- La chiave per la conferma della diagnosi di PTT resta comunque la dimostrazione del deficit di ADAMTS13 su un campione di plasma prelevato prima di avviare qualunque terapia

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

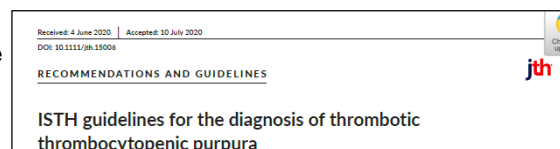
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

PARAMETRI	PLASMIC SCORE	FRENCH SCORE
Conta PLTS < 30.000 uL	(+1)	(+1)
Creatinina sierica	< 2mg/dl (+1)	<2.26 mg/dl (+1)
Emolisi Bilirubina indiretta > 2 mg/dl o reticolociti > 2.5% o aptoglobina non dosabile	(+1)	*
Anamnesi neoplastica negativa anno precedente	(+1)	*
Nessun trapianto d'organo solido o cellule emopoietiche	(+1)	*
INR < 1.5	(+1)	*
MCV < 90 fL	(+1)	*
Probabilità di deficit grave dell'ADAMTS13 attività (<10%)	0-4: 0-4% 6: 5-24% 6-7: 62-82%	0:2% 1_70% 2:94%

PLASMIC Score > o uguale a 6

- alta predittività di ADAMTS13 < 10%
- prelevare campione per dosaggio ADAMTS13 attività e anticorpi
- iniziare immediatamente PEX,
- inviare campioni per ADAMTS13 e autoanticorpi in laboratorio



PTT CONGENITA

- Congenita (Upshaw-Schulman Syndrome)
- incidenza 1:1.000.000
- autosomica recessiva causata da mutazioni in omozigosi o eterozigosi composte nel gene dell'ADAMTS 13
- ADAMTS13 non è funzionale
- Ittero neonatale
- Alcuni presentano primo episodio da giovane adulto
- Infezioni, gravidanza, stress possono essere scatenanti
- Recidive a intervalli regolari ogni 3-4 settimane.

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

PTT ACQUISITA

- **Autoimmune**

- Circa il 25% dei pz con TTP e deficit grave ADAMTS13 soffrono di un'altra patologia immunologica: più frequente LES spesso ANA positivi.
- 97% IgG (IgG4 90% dei casi), 11% IgA, 20% IgM
- AutoAb contro ADAMTS13
 - Diretti contro sito attivo enzima
 - Diretti non contro sito attivo, aumentano clearance enzima

- ✓ **Al 1 evento acuto di TTP:**

il 18 % di pazienti presentavano solo IgG4. ;

il 14% non presentavano IgG4

il 68% IgG4 in combinazione con altre IgG

- ✓ **In tutti i successivi episodi:**

si evidenziavano sempre anticorpi IgG4 di cui in combinazione con altre IgG solo nel 35% dei casi .

✧ I livelli di IgG4 erano inversamente correlati con i livelli di IgG1

✧ I pazienti con alto titolo IgG4 e basso di IgG1 recidivavano maggiormente

Ferrari et al 2009 JTH 2009

- **Secondaria alla stimolazione massiva endotelio**

CLASSI AB ANTI ADAMTS13

- Non tutti gli Ab anti ADAMTS13 sono in grado di neutralizzare l'attività proteasica e il 15 % degli anticorpi presenti nei plasmi con PTT in fase acuta sono NON neutralizzanti (IgG e IgM)
- Anticorpi NON inibitori possono evolvere in ipermutazioni somatiche in una seconda fase della malattia in anticorpi inibitori

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombotici

Torino, 12-13 novembre 2021

Test diagnostici ADAMTS13

• Attività ADAMTS13

- Attività normale range 60 (40%??) - 150 %
- Grave deficit attività < 5-10% conferma grave deficit ADAMTS13 causa di MT (congenita/acquisita)
- Livello di attività >10% non causa MT

• Anticorpo ADAMTS13

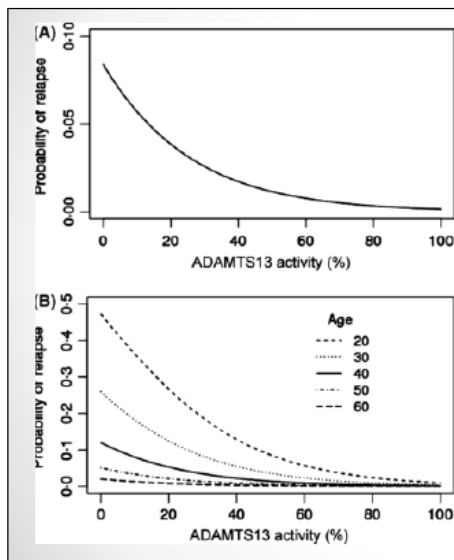
- Individuazione di autoanticorpi (IgG) contro ADAMTS13

• Sequenziamento ADAMTS13

- Conferma la diagnosi congenita causa di grave deficit ADAMTS13 = sindrome di Upshaw-Schulman (USS)

Tsai HM. Semin ThrombHemost. 2012;38:469-482

Attività ADAMTS-13 IN REMISSIONE



Bassa attività di ADAMTS13 durante la remissione clinica come fattore di rischio Per la comparsa di recidive, fornisce nuova strategia di screening per individuare i Pazienti che potrebbero beneficiare della profilassi prima della recidiva della malattia

Attività ridotta e giovane età sono associate ad un alto rischio di recidiva nei tre mesi dalla remissione clinica.

Jin 2008

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS 13 ATTIVITA'

Il dosaggio di laboratorio dell'ADAMTS 13 attività è un grande problema nel processo diagnostico di PTT. I principali inconvenienti sono ascrivibili a:

- ADAMTS13 deve essere misurata su campione prelevato prima inizio terapia
- Un test rapido è necessario
- Pochi laboratori hanno test rapidi
- Pochi laboratori fanno test 7/7 gg e h24
- Maggior parte lab. lavorano in batch ed utilizzano test complessi che necessitano di competenze specifiche con tempi di esecuzione lunghi
- rarità e occasionalità dei pazienti in cui si effettuano i dosaggi
- esecuzione dei test solo in centri e laboratori specializzati
- lunga tempistica della metodica di riferimento (che impiega circa 4 ore per completarsi)
- TAT lunghi (a volte giorni), incompatibili con l'urgenza clinica della condizione, per la difficoltà di disporre di personale prontamente disponibile.

11

Attività ADAMTS-13 RACCOMANDAZIONI DIAGNOSI LABORATORIO

Received: 7 April 2020 | Revised: 15 June 2020 | Accepted: 2 July 2020
DOI: 10.1111/jjh.13295

REVIEW

International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of ADAMTS13

Ian Mackie¹ | Ilaria Mancini² | Joshua Muia³ | Johanna Kremer Hovinga⁴ |
Sukesh Nair⁵ | Sam Machin¹ | Ross Baker⁶

Citrated (0.109 mol/L sodium citrate) platelet-poor plasma is normally used for ADAMTS13 assays. Samples should be prepared to ensure platelet depletion ($<10 \times 10^9/L$; ie centrifugation at 2000 g for 15 minutes). This should be performed at room temperature (18-20°C), particularly if other haemostasis assays might be per-

2.1 | Consensus recommendations on sample collection and handling for ADAMTS13 assays

- Citrated plasma (centrifuged to ensure platelet depletion) should normally be used.
- Heparin plasma or serum samples may be used depending on the assay type and if it is validated for these sample types.
- EDTA plasma is not suitable for ADAMTS13 assays.
- Samples should be centrifuged and plasma separated from the cells as rapidly as possible after blood collection to avoid in vitro changes.
- Unless assays are performed immediately, plasma samples should be stored and shipped below -40°C to avoid potential proteolysis.

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

ADAMTS-13 RACCOMANDAZIONI DIAGNOSI LABORATORIO ATTIVITA'

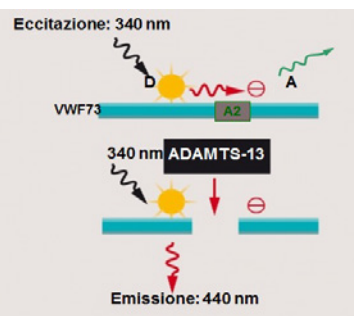
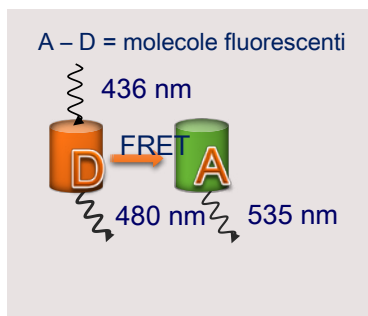


More recently, particle-based automated assays have been developed. An automated chemiluminescence assay utilizes a two-step immunoassay involving magnetic particles coated with GST-VWF73 peptide substrate and chemiluminescent detection based on an isoluminol labelled monoclonal antibody that reacts with the cleaved peptide. It is a rapid assay (33 minutes), with good sensitivity and precision.

- If decreased ADAMTS13 activity (<20 IU/dL) is detected in a new patient, an ADAMTS13 antibody assay or inhibitor test should be performed. If the results do not match the clinical picture, potential EDTA contamination should be considered and where possible, fresh blood samples obtained.

- Functional FRET-based assays or chromogenic activity ELISA methods are recommended as front line assays as they are sensitive, show good precision and are simpler to use, being completed in a few hours.
- Rapid point of care assays may have utility as screening methods or "out of hours" emergency tests, but there is currently limited performance data.
- Every calibrator should be traceable to the International Standard Plasma (12/252) for assaying ADAMTS13 activity in citrated plasma samples.
- When reporting results: indicate the type of assay performed and use the correct units (eg IU/dL) for activity and antigen assays. If calibrants traceable to the IS are not available, use percentage of pooled normal plasma. State the reference range for the method.
- High and low activity controls should be included in each assay run. Do not use commercial controls in methods other than those intended for their use.
- Protocols should be validated after any modification.
- If gross icterus interferes in some FRET assay methods, the problem can sometimes be resolved by assaying at a higher dilution, treatment with bilirubin oxidase, or using a chromogenic activity ELISA. A comment regarding potential assay interference should be added to the laboratory report.
- If artefactual, in vitro haemolysis is likely (eg secondary to difficult venipuncture or use of a small gauge needle), fresh blood samples should be obtained. If this is not possible, a comment regarding potential assay interference should be added to the laboratory report.
- Wherever possible, use the same ADAMTS13 assay when studying a patient longitudinally to manage treatment.

FRET fluorescence resonance energy transfer



- LOD = 3.3%
- Range = 3.3-105%
- CV Intra = 6%
- CV Inter = 9.5%
- Normal Range = 45-147%
- Tempo esecuzione = 1h
- Richiede competenze specifiche

ADAMTS13 Activity Assay Valsecchi et al.

Thrombosis and Haemostasis Vol. 119 No. 11/2019

Per il dosaggio di ADAMTS13 si coinvolge un frammento modificato del dominio A2 del VWF

La metodica misura il cambiamento di fluorescenza nel tempo

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombotici

Torino, 12-13 novembre 2021

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay

- Plasma normale o VWF purificato (VWF73) incubato con il plasma del campione da testare
 - il VWF è tagliato da ADAMTS13 e il VWF residuo è misurato dal suo legame al collagene usando un ELISA con coniugato un anticorpo anti-VWF
 - il substrato residuo è inversamente proporzionale all'attività di ADAMTS13
- VWF ricombinante come substrato
 - misura il prodotto
 - la quantità di colore rilasciato è direttamente proporzionale all'attività di ADAMTS13 (Wu 2006)

ADAMTS13 Activity Assay Valsecchi et al.

Thrombosis and Haemostasis Vol. 119 No. 11/2019

- LOD = 0.2% (0.002 IU/ml)
- Range = 0.2-105% (0.002-1.05 IU/ml)
- CV Intra = 5.4%
- CV Inter = 8.0%
- Normal Range = 40-130%
- Tempo esecuzione = 3.5 ore
- Richiede tempo e competenze specifiche

DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS13 ATTIVITA' CLIA

Test quantitativo, completamente automatizzato

Stabilità reagenti a bordo 8 settimane (4°C)

Dosaggio immunologico in 2 fasi per quantificare attività ADAMTS13 usando particelle magnetiche come fase solida e sistema di rilevazione in CLIA.

Campione miscelato con tampone presente nel kit e con particelle magnetiche che usando un ab monoclonale specifico anti glutatione S transferasi (GST) sono coattate con substrato peptidico ricombinante GST-VW73 contenente il sito di clivaggio dell'ADAMTS13.

ADAMTS13 presente nel campione scinde il substrato legato alle particelle in proporzione alla sua attività

Dopo separazione magnetiche e lavaggio è aggiunto ab monoclonale marcato con isoluminolo che reagisce con peptide clivato

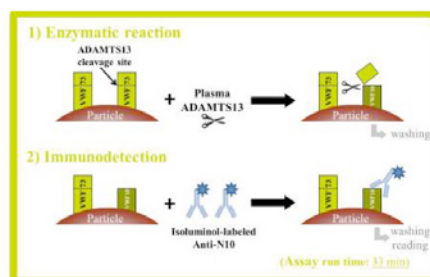
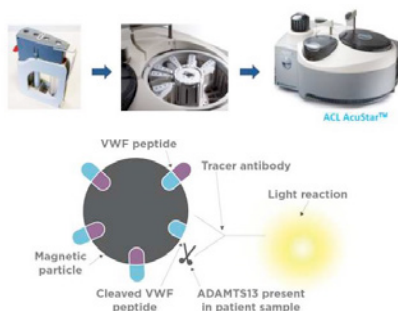
Dopo ulteriore separazione magnetica e lavaggio sono aggiunti 2 trigger la reazione di chemiluminescenza è misurata come unità di luce relativa dal sistema ottico ACUSTAR. Le RLU sono direttamente proporzionali all'attività di ADAMTS13.

Master-Curva su cui viene letta concentrazione attività è logistica a 4 parametri, lotto dipendente

- LOD: 0.2%
- Range: 0.2-150%
- CV Intra: $\leq 4.4\%$
- CV Inter: $\leq 5.1\%$
- Normal Range: 67-129%
- Tempo esecuzione: 33 min
- Rapido e automatizzato

ADAMTS13 Activity Assay Valsecchi et al.

Thrombosis and Haemostasis Vol. 119 No. 11/2019



16

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombotici

Torino, 12-13 novembre 2021

DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS13 ATTIVITA' TEST RAPIDO IMMUNOCROMATOGRAFICO

Laboratory testing for ADAMTS13: Utility for TTP diagnosis/ exclusion and beyond

Emmanuel J. Favaloro^{1,2,3} | Leonardo Pasalic^{1,2} | Brandon Henry⁴ |
Giuseppe Lippi⁵

Received: 9 April 2021 | Revised: 10 May 2021 | Accepted: 12 May 2021
DOI: 10.1002/ajh.26241

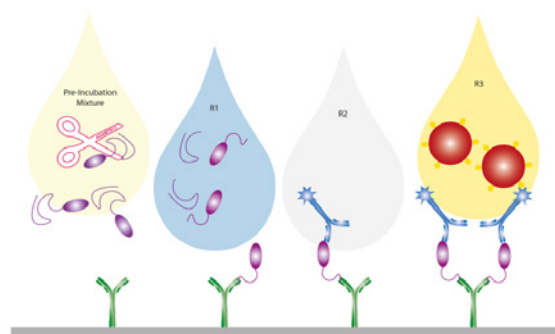
MA).¹³ Data on the semi-quantitative screening assay has recently been published by Moore et al.¹⁸ In brief, combining all site data, the screen exhibited 88.7% sensitivity, 90.4% specificity, 74.6% positive predictive value, and 96.2% negative predictive value, which was considered comparable to published data for quantitative assays. Data on

17

DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS13 ATTIVITA' TEST RAPIDO IMMUNOCROMATOGRAFICO

The TECHNOSCREEN[®] ADAMTS13 is a semiquantitative flow through assay for the determination of ADAMTS13 activity levels in human citrated plasma. This assay is intended as a screening tool for estimating ADAMTS13 activity.

Patient plasma is incubated with a vWF fragment. ADAMTS13 specific cleavage of the vWF is then detected with a cleavage site specific antibody by the amount of color development. The amount of cleavage directly correlates to the ADAMTS13 activity level in the plasma sample.



18

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS13 ATTIVITA' TEST RAPIDO IMMUNOCROMATOGRAFICO

TECHNOSCREEN® ADAMTS13 Activity

PREPARATION

PRE-INCUBATION TUBE

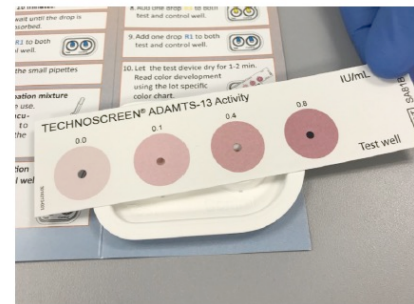
R1

R2

R3

TEST PROCEDURE

- PRE-INCUBATION MIXTURE**
For the pre-incubation mixture, use the large pipette and add 300µl of plasma sample to a fresh pre-incubation tube and mix by inverting min. 3x.
- Incubate for 20 minutes.**
For all steps wait until the drop is completely absorbed.
- Add one drop R1 to both test and control well.
- Mix the pre-incubation mixture** by inverting min. 3x before use. Add 60µl pre-incubation mixture to the test well using the small pipette.
- Add 60µl pre-incubation mixture to the control well using a fresh small pipette.
- Add one drop R2 to both test and control well.
- Add one drop R3 to both test and control well.
- Add one drop R1 to both test and control well.
- Let the test device dry for 1-2 min. Read color development using the lot specific color chart.



200 patient samples with different ADAMTS13 activity levels were tested both using the TECHNOSCREEN® ADAMTS13 Activity Test and the TECHNOZYM® ADAMTS13 Activity ELISA. Visual interpretation was performed by multiple independent investigators.

Based on a cut off of 0.1 IU/ml:

- positive predictive value 99%
- negative predictive value 80%
- sensitivity 94%
- specificity 97%

Attività ADAMTS-13 RACCOMANDAZIONI DIAGNOSI LABORATORIO

Received 7 April 2020 | Revised 18 June 2020 | Accepted 2 July 2020
DOI: 10.1111/wh.13219

REVIEW

International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of ADAMTS13

Ian Mackie¹ | Ilaria Mancini² | Joshua Mui³ | Johanna Kremer Hovings⁴ | Suresh Nair⁵ | Sam Machin¹ | Ross Baker⁶

Variable	Likely sources of discrepancy
Calibrant	Normal plasma or rADAMTS13
Diluent	Inactivated plasma, buffer, pH and ionic strength
Dilution factor	Immune complex dissociation (causes falsely increased activity)
Reagents	Denaturants may cause Immune complex dissociation ²⁷ (causes falsely higher activity)
Substrate type	Peptide length and sequence (influences sensitivity to defects involving the distal ADAMTS13 domains)
Interfering substances	Plasma colour (icterus, haemolysis, etc.) may influence FRET assays (causing false lower activity), but causative substances are washed away in CBA and chromogenic assays ^{24,28}
Haemoglobin	Increased plasma haemoglobin can protect VWF from ADAMTS13 cleavage ^{24,27,28} (reduced activity), but may have less effect on peptide substrates (higher values)

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

ADAMTS-13 RACCOMANDAZIONI DIAGNOSI LABORATORIO



5.1 | Consensus recommendations on clinical utility of assays

- ADAMTS13 activity <10 IU/dL is diagnostic for TTP in patients presenting with a clinical scenario and blood film consistent with TMA.
- An alternative diagnosis and repeat ADAMTS13 assay should be considered in TMA patients presenting with an indeterminate range of 10-20 IU/dL ADAMTS13 activity.
- Alternative diagnosis/therapy should be considered in patients with an ADAMTS13 activity >10 IU/dL, especially when >20 IU/dL, as they rarely respond to PEX.
- The overall clinical picture/treatment of the patient should always be reviewed with close interaction with clinicians. This is important to avoid unnecessary tests and to ensure that appropriate tests meet clinical needs, especially when non-TTP expert clinicians request assays. Clinical scoring systems such as the PLASMIC score may assist in providing guidance for the necessity of ADAMTS13 testing.
- ADAMTS13 antibody assays should be used to decide whether the patient has cTTP or iTTP; definite cTTP diagnosis requires ADAMTS13 genetic testing.
- Nomenclature, normal range, reporting units and methodology (eg inhibitory and noninhibitory antibodies) need further standardization.
- Follow-up ADAMTS13 activity testing is important as persistently low levels increase the risk of exacerbation and TTP relapse.
- ADAMTS13 antigen levels are not clinically useful in the absence of activity assays, but may prove helpful in predicting mortality risk in iTTP patients with high IgG ADAMTS13 antibody level, although further study is needed.

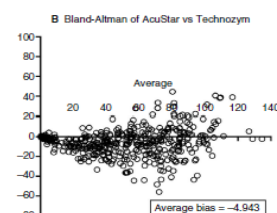
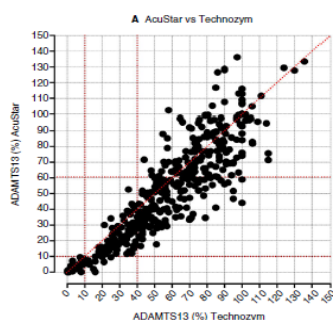
DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS13 ATTIVITA' CLIA

Received: 22 August 2020 | Accepted: 26 October 2020
DOI: 10.1111/jth.15177

ORIGINAL ARTICLE

A multicenter laboratory assessment of a new automated chemiluminescent assay for ADAMTS13 activity

Emmanuel J. Favalaro^{1,2,3} | Soma Mohammed^{1,2} | Kent Chapman^{2,4} | Deborah Cummings^{2,4} | Pinar Zekri^{1,2,3} | Paula Colucci^{2,3} | Edina Khatib¹



Patients/Methods: This multicenter (n = 8) assessment included testing of more than 700 test samples, with similar numbers of prospective (n = 348) and retrospective (n = 385) samples. The main comparator was the Technozym ADAMTS13 Activity ELISA. We also assessed comparative performance for detection of ADAMTS13 inhibitors using a Bethesda assay.

Results: Overall, the chemiluminescent assay yielded similar results to the comparator ELISA, albeit with slight negative bias. ADAMTS13 inhibitor detection was also comparable, albeit with slight positive bias with the AcuStar assay. Assay precision was similar with both assays, and we also verified assay normal reference ranges.

- Confronto Acustar vs FRET e 2 ELISA diversi
- No falsi negativi
- Hemosil Acustar molto sensibile alla identificazione di valori di ADAMTS13 <10 o al 5%
- Sembra sottostimare l'attività (bias-4.9) rispetto FRET e ELISA

TABLE 1 Summary of discrepant samples identified as 'severe' by Hemosil and 'low' by Technozym

Study site	Patient no./local study ID	Clinical diagnosis	If TTP - congenital (C)/acquired (A)	Hemosil ADAMTS13 (%)	Technozym ADAMTS13 (%)
B	10	TTP (under PEX)	A	5.9	12
B	14	TTP (congenital; trough pre-PEX)	C	6.8	16
D	59	TTP monitoring	A	4.8	12.7
D	13	TTP monitoring	A	6.3	11
D	24	TTP monitoring	A	9.7	19.9
D	36	TTP in remission	A	10	16.1
E	2	TTP (relapse)	A	0.1	16
G	30	TTP (under PEX)	A	6.5	21
G	37	TTP (under PEX)	A	7.5	12
G	26	TTP (under PEX)	A	9.5	25
F	35	HELLP/TTP ^a	(A)	2	15
F	26	TTP monitoring	A	7.6	11

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

VEQ ECAT ADAMTS ATTIVITA'

was excluded in the statistical evaluation.

SURVEY 2020 M4

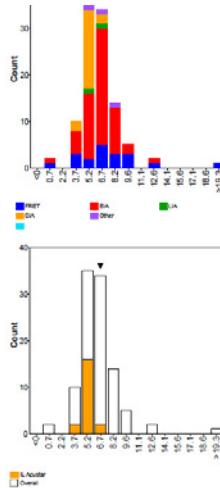
Classification Overview	Normal	BorderLine normal	Borderline abnormal	Abnormal	No classification
Total	3	0	1	111	0

Your Classification: Abnormal

Own Reagent

	n	assigned value	Uncert.	CV (%)	Range	your result	z-score	your result	z-score	your result	z-score
Total Group	103	6	0.21	28.3	1 - 29	6.3	0.12				
Chemiluminescence Immuno Assay	21	5	0.14	10.3	4 - 6	6.3	2.61				
IL Acustar ADAMTS13 activity	20	5	0.15	11.0	4 - 6	6.3	2.43				

	n	assigned value	Uncert.	CV (%)	Range
Total Group	103	6	0.21	28.3	1 - 29
FRET	19	7	0.85	45.9	1 - 29
Gen-Probe ADAMTS13 activity	1	8			-
Homemade	8	6			1 - 7
Immucor ADAMTS13 activity	4	10			3 - 29
Other	4	8			3 - 9
Sekisui Actifluor ADAMTS13 activity	2	11			3 - 12
Enzyme Immuno Assay	56	6	0.20	24.9	1 - 13
Homemade	2	4			3 - 5
Other	1	5			-
Technoclone ADAMTS13 activity	54	7	0.24	21.9	1 - 13
Technoclone ADAMTS13 activity/antigen	1	4			-
Latex Immuno Assay	2	5			5 - 6
Homemade	1	6			-
Other	1	5			-
Chemiluminescence Immuno Assay	21	5	0.14	10.3	4 - 6
Other	1	5			-
Other	3	7			5 - 6
Homemade	2	6			5 - 7
Other	1	8			-



23

VEQ ECAT ADAMTS ATTIVITA'

SURVEY 2021 M1

Classification Overview	Normal	BorderLine normal	Borderline abnormal	Abnormal	No classification
Total	21	12	20	77	2

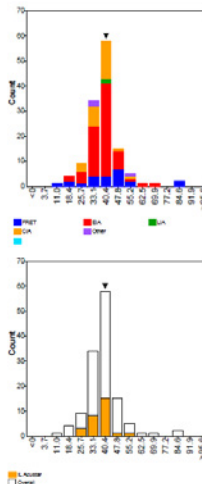
Your Classification: Abnormal

Own Reagent

	n	assigned value	Uncert.	CV (%)	Range	1808457	your result	z-score	your result	z-score	your result	z-score
Total Group	130	38	0.77	19.3	13 - 67	38.3	0.00					
Chemiluminescence Immuno Assay	28	37	1.27	14.4	28 - 56	35.3	0.19					
IL Acustar ADAMTS13 activity	28	37	1.27	14.4	28 - 56	38.3	0.19					

Other Reagents

	n	assigned value	Uncert.	CV (%)	Range
Total Group	130	38	0.77	19.3	13 - 67
FRET	23	41	3.53	32.6	13 - 87
Homemade	10	29	5.41	35.5	28 - 92
Immucor ADAMTS13 activity	4	48			41 - 57
Other	4	44			13 - 50
Sekisui Actifluor ADAMTS13 activity	2	55			22 - 67
Technoclone Technofluor ADAMTS13 activ	3	43			42 - 44
Enzyme Immuno Assay	74	38	0.88	15.5	20 - 61
Homemade	2	36			34 - 36
Technoclone ADAMTS13 activity	70	38	0.91	16.0	20 - 69
Technoclone ADAMTS13 activity/antigen	2	30			22 - 38
Latex Immuno Assay	2	39			37 - 42
Homemade	1	27			-
Other	1	42			-
Chemiluminescence Immuno Assay	28	37	1.27	14.4	28 - 56
Other	3	31			31 - 53
Homemade	2	42			31 - 53
Other	1	31			-



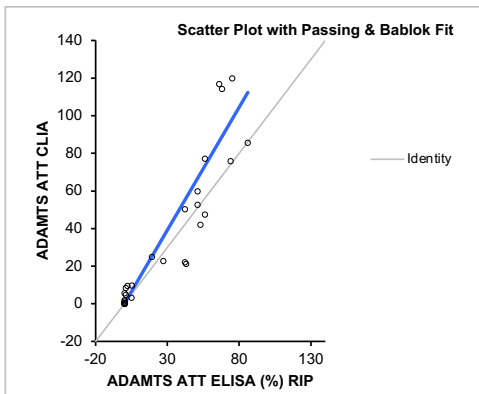
24

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

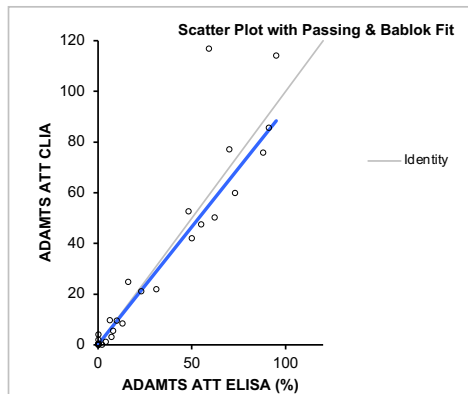
DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS13 ATTIVITA' CLIA

CONFRONTO CON ELISA STORICO



	Bias	95% CI
Constant	0.10	-0.07 to 0.30
Proportional	1.31	1.03 to 1.68
H ₀ : Constant bias = 0. H ₁ : Constant bias ≠ 0. H ₀ : Proportional bias = 1. H ₁ : Proportional bias ≠ 1.		

CONFRONTO CON ELISA RIPETUTO



	Bias	95% CI
Constant	0.11	-0.35 to 0.31
Proportional	0.93	0.86 to 1.10
H ₀ : Constant bias = 0. H ₁ : Constant bias ≠ 0. H ₀ : Proportional bias = 1. H ₁ : Proportional bias ≠ 1.		

25

INTRODUZIONE DOSAGGIO ADAMTS13 ATTIVITA' IN URGENZA

Oggetto : Adamts 13 attività eseguito in regime di semi urgenza anche il sabato e la domenica dalle ore 8 alle ore 18.

A partire dal 23 Dicembre 2019 l'esame Adamts 13 attività verrà eseguito 7 giorni su 7 dalle ore 8 alle ore 18. I campioni saranno accettati H24 7 giorni su 7.

- Campione : plasma - prelievo in provetta tappo azzurro (Na citrato)
- Preanalitica: se campione arriva entro 4 ore dal prelievo utilizzare provetta primaria mantenuta a temperatura ambiente, superate le 4 ore separare il plasma (1500 g per 15 minuti), congelarlo a -80°C ed inviarlo in ghiaccio secco.

- Frequenza analitica: 7 giorni su 7 dalle ore 8 alle ore 18, SEPARARE E CONGELARE IL PLASMA DOPO IL DOSAGGIO.

26

NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

INTRODUZIONE DOSAGGIO ADAMTS13 ATTIVITA' IN URGENZA

WARNING:

- PRIMA PROCESSARE CONTROLLI E POI CAMPIONE
RISOSPENDERE IL REATTIVO AGITANDO
CARTUCCIA

27

ADAMTS13 ANTICORPI

- **Anticorpi Inibitori**

Inibiscono l'attività proteolitica ADAMTS13 o ne accelerano la clearance del plasma legandosi a proteasi.

Bassi livelli attività e alto titolo anticorpi correlano con aumento recidive

- **Anticorpi non Inibitori**

Non neutralizzano attività ADAMTS13 in un test di inibizione.

Moderata attività/antigene ADAMTS13 può essere correlata con un aumento di clearance dal plasma per opsonizzazione o altri meccanismi non noti

Entrambi anticorpi possono essere
contemporaneamente presenti

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

ADAMTS13 ANTICORPI

- **Metodo Diretto**
 - **Test ELISA:** usa Adamts13 ricombinante come reagente per legare IgG anti Adamts13 presenti nel siero o nel plasma
 - Quantifica direttamente la presenza ab anti Adamts-13
- **Metodo Indiretto**
 - **Mixing test:** attività inibitoria dell'attività proteasica 1U Bethesda = inibizione del 50% dell'attività dell'Adamts13
 - Usato per determinare gli effetti che gli ab presenti nel siero o plasma del pz hanno su Adamts13
 - Se l'attività inibitoria è presente nel plasma del pz l'attività residua di Adamts 13 nel NP è bassa e non può tagliare vWF
 - Se non vi sono anticorpi l'attività residua di Adamts 13 nel NP è alta e taglia il vWF

ADAMTS 13 INIBITORI PROBLEMI

TEST ELISA

- Non distinguono tra anticorpi inibitori e non inibitori
- Possono sovrastimare presenza di anticorpi anti ADAMTS13
- Alto titolo di anticorpi non ADAMTS13 può causare falsi positivi

METODO BETHESDA PROBLEMI

- Non individua anticorpi non inibitori

Inhibitory antibodies is frequent and is often found in patients refractory to treatment and relapsing, especially when inhibitor levels are > 2 BU .

2816 FERRARI et al

BLOOD, 1 APRIL 2007 • VOLUME 109, NUMBER 7

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

DIAGNOSI DI LABORATORIO ADAMTS13 ANTICORPI PROBLEMI

Laboratory testing for ADAMTS13: Utility for TTP diagnosis/ exclusion and beyond

Emmanuel J. Favaloro^{1,2,3} | Leonardo Pasalic^{1,2} | Brandon Henry⁴ | Giuseppe Lippi⁵

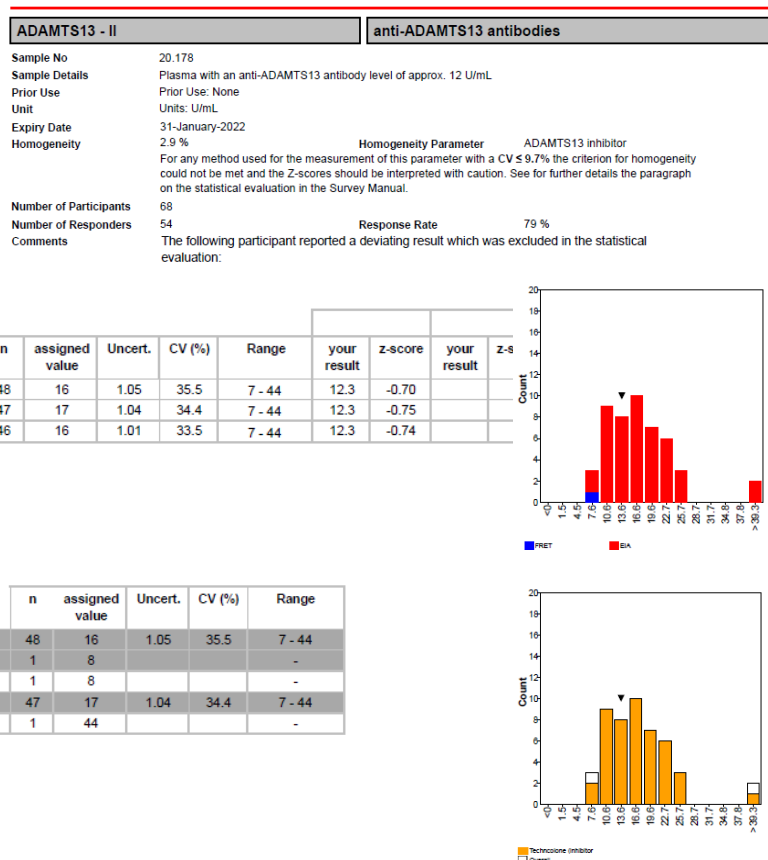
Received: 9 April 2021 | Revised: 10 May 2021 | Accepted: 12 May 2021
DOI: 10.1002/ajh.26241

The presence of ADAMTS13 inhibitors/antibodies is also very important to be assessed, especially in acquired TTP.² The most common approach here is the assessment for functional inhibitors (ie, auto-antibodies that block ADAMTS13 activity) using a Bethesda-like assay.¹³ However, some patients with acquired TTP may have non-functionally inhibiting antibodies that act to enhance the clearance of ADAMTS13 from circulation. Such antibodies can be assessed by alternative assays, such as ELISA. One commonly used ELISA assay is also available from Technoclone, and detects human immunoglobulin (Ig) G against ADAMTS13. One significant limitation of this assay, however, is the potential to detect non-ADAMTS13 antibodies that may be present in patients with general auto-immune conditions, particularly if high levels of such antibodies are present.

It is also important to note that Bethesda-like detection of ADAMTS13 inhibitors also shows variability, dependent on the analytical technique. For example, in the multicentre AcuStar study previously noted,¹³ slight differences in Bethesda titre were identified

using the AcuStar method compared to the reference (Technodone) assay. Thus, inhibitor detection using the HemosIL assay was similar to that using the Technozym assay, but with slight positive bias. Such positive bias was also noted in a second, as yet unpublished study, reported in abstract form, reporting that ADAMTS13 inhibitors were

31



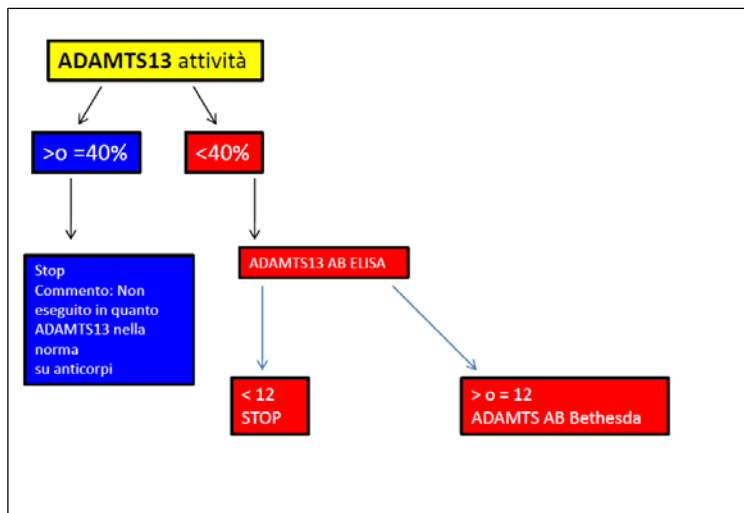
NOVITÀ IN COAGULAZIONE
attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

ADAMTS 13 INIBITORI

ANTICORPI ESEGUITI
NON IN URGENZA
LUN-VEN 8:00-16:00

- If decreased ADAMTS13 activity (<20 IU/dL) is detected in a new patient, an ADAMTS13 antibody assay or inhibitor test should be performed. If the results do not match the clinical picture, potential EDTA contamination should be considered and where possible, fresh blood samples obtained.



HTA ADAMTS13 IN CLIA: VALUTAZIONE IMPATTO CLINICO ED ECONOMICO PER IL DOSAGGIO DELLA ADAMTS13 ATTIVITA'

Chiara Novelli e Barbara Montaruli

- 4 Ospedali italiani
- 84 pz con richiesta ADAMTS13 attività per sospetto clinico PTT
- 6/84 (7%) ADAMTS13 <10%
- TAT per dosaggio compreso fra 4-170 ore
- TAT mediana = 24 ore
- Valutazione costi (PEX ecc...) risparmio nei vari Ospedali che si avrebbe utilizzando il dosaggio attività in CLIA varia da 3628 Euro (3 TTP sospette e 0 confermate) a 139658 Euro (81 TTP sospette e 6 confermate)

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

CONCLUSIONI

- **IL TEST RAPIDO, AUTOMATIZZATO IN CLIA PER IL DOSAGGIO DELL'ADAMTS13 ATTIVITA':**
 - Riduce PEX non necessarie
 - Guida i clinici nella scelta terapeutica migliore
 - Consente dosaggio 7/7 gg H24
 - Puo' essere eseguito da personale non specializzato (tutti i turnisti da me sanno come procedere)
 - Consente maggiore tracciabilità
 - Riduce i costi

CASO CLINICO 1: VANTAGGI MODELLO ORGANIZZATIVO ADEGUATO E TEST RAPIDO

Paziente 67 anni, accesso in PS per marcata astenia (ore 20)
OSPEDALE IMPERIA
Anamnesi patologica: LES

Esami ematochimici :

- Hb 7,5 g/dl
- PLT 35,000/uI
- aptoglobina 0
- LDH 850 UI/l (Vn < 214)
- striscio periferico negativo per schistociti
- coombs diretto positivo
- creatinina 1,2
- coagulazione normale

Paziente non sanguina viene idratata e trasfuse n.2 unità di eritrociti

PTT:

Patologia sistemica con coinvolgimento renale
Deficit di ADAMTS-13

Pentade:

1. Trombocitopenia
2. Coombs -
3. Insufficienza renale
4. Segni/sintomi neurologici
5. Febbre

SOSPETTO LABORATORIO

- piastrinopenia marcata (< 50x10⁹/L)
- presenza di schistociti allo striscio
- anemia con reticolocitosi periferica
- segni di emolisi intravascolare
- incremento di LDH
- test di Coombs negativo
- normalità degli indici emocoagulativi
- reperti laboratoristici di danno d'organo

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

CASO CLINICO 1: VANTAGGI MODELLO ORGANIZZATIVO ADEGUATO E TEST RAPIDO

Plasmic score 6 ma presenza di coombs diretto positivo e anamnesi indirizzano verso sindrome di Evans.

PARAMETRI	PLASMIC SCORE
Conta PLTS < 30.000 uL	(+1)
Creatinina sierica	< 2mg/dl (+1)
Emolisi Bilirubina indiretta > 2 mg/dl o reticolociti > 2.5% o aptoglobina non dosabile	(+1)
Anamnesi neoplastica negativa anno precedente	(+1)
Nessun trapianto d'organo solido o cellule emopoietiche	(+1)
INR < 1.5	(+1)
MCV < 90 fL	(+1)
Probabilità di deficit grave dell'ADAMTS13 attività (<10%)	0-4: 0-4% 6: 5-24% 6-7: 62-82%

CASO CLINICO 1: VANTAGGI MODELLO ORGANIZZATIVO ADEGUATO E TEST RAPIDO

Ore 01,00 controllo esami Hb 8,5 PLT 22,000 la paziente comincia ad assumere uno stato soporoso, controllo TC per sospetta Emorragia cerebrale (negativa).

Ore 5,00 peggioramento neurologico, piastrine in calo, vengono eseguiti PS prelievi per ADAMTS 13 inviati in laboratorio.

ORGANIZZAZIONE LABORATORIO HUB



**SMS: MIO
CELLULARE**

MAIL PERSONALE

testADAMTS13

Gentile Azienda Ospedaliero Ordine Mauriziano - S.C. Laboratorio Analisi - Torino, vi è stata inviata una richiesta di esame AdamTS con identificativo AdamTS n. 1136.

Richiedente: AOU Maggiore della carità - Dipartimento oncologico - Reparto di Ematologia - Novara AOU Maggiore della carità - Novara (tel. +3903213732194)
Contatto: Andrea Patriarca (tel. +3933199949337 email:ematologia-dh@maggioreosp.novara.it)

Tipo di campione: plasma

Consegna presso il laboratorio prevista: a partire da 20/05/20 1.00 (nel rispetto degli orari comunicati)

Stima tempistiche di esecuzione test: entro le 2.00 del 21/05/20

Per confermare clicchi su ACCETTO e inserisci il suo nominativo nella schermata successiva, nel caso non possa prendere in carico la richiesta clicchi su RIFIUTO.

ACCETTO **RIFIUTO**

Cordiali saluti,
Il Team ADAMTS13

39

CASO CLINICO 1: VANTAGGI MODELLO ORGANIZZATIVO ADEGUATO E TEST RAPIDO

Ore 6 lettura SMS e accettazione campione

Ore 9.00 Campione giunge in laboratorio

CQI già processati (congelati a -20°C)

Ore 9.40 Referto ADAMTS 13 (attività = 1.2% vn>60%)

Diagnosi di confermata a 14 circa ore dalla diagnosi presuntiva in altra regione

ADAMTS anticorpi vengono eseguiti nella giornata

- con metodica ELISA Ab = 39 U/ml (vn<12)
- Con metodica CLIA Bethesda = 1.6 UB/ml (vn<0.5 UB/ml)

ANTICORPI INIBITORI

NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombosi

Torino, 12-13 novembre 2021

CASO CLINICO 2:

- Paziente Maschio di 52 anni, proveniente da altro Ospedale per sospetta PTT
- Dosaggio ADAMTS13 attività = 44.9% (vn >60%)
- Dosati anticorpi perché richiesti (essendo >40% attività se fosse stato pz interno non avremmo eseguito dosaggio Ab)
- Anticorpi ELISA=34.9 U/ml (vn<12 U/ml) (dosaggio confermato su ricontrollo)
- Dosaggio Ab CliA Bethesda = 0.01 (vn<0.5UB/ml)

Nel commento:

INTERFERENZA SU DOSAGGIO ELISA DA ALTRI ANTICORPI (FALSO POSITIVO???)

GRAZIE DELL'ATTENZIONE!!!!!!!!!!



NOVITÀ IN COAGULAZIONE

attraverso i centri emostasi e trombotici

Torino, 12-13 novembre 2021