

IL LABORATORIO NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE EMOFILICO

Raimondo De Cristofaro

Servizio Malattie Emorragiche e Trombotiche
Fondazione Policlinico Universitario «A. Gemelli» IRCCS,
Istituto di Medicina Interna e Geriatria
Università Cattolica S. Cuore

Roma



Background

- ✓ Il medico che deve gestire i pazienti emofilici necessita del supporto della medicina di laboratorio in tutti gli step del *percorso diagnostico-terapeutico dei pazienti*
- ✓ Oltre alla diagnosi iniziale necessaria all'impostazione del trattamento, a seconda della gravità della patologia, il laboratorio è quindi indispensabile per il *monitoraggio della terapia e della profilassi*
- ✓ Anche nella *preparazione di un intervento chirurgico* il laboratorio è fondamentale per la sicurezza dell'intervento, evitando importanti complicanze.
- ✓ Il laboratorio è essenziale anche per la *identificazione e la titolazione degli inibitori*, che rappresentano la più importante complicanza clinica della terapia sostitutiva.

5 CONVEGNO INTERREGIONALE

UPDATE SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON MALATTIE EMORRAGICHE

Ragioniamo su un caso clinico

- Un paziente maschio di 30 anni necessita di cure odontoiatriche per dolenzia acuta a un dente.
- Anamnesi: Nessuna malattia internistica riferita, nessun precedente intervento chirurgico o del cavo orale, nessun trauma o ferita maggiore.
- Non assume farmaci, né in cronico né nei giorni immediatamente precedenti
- Anamnesi familiare: la nonna materna aveva effettuato un accesso in ospedale per un inspiegabile sanguinamento gastrointestinale.

Ragioniamo su un caso clinico

- L'odontoiatra procede ad avulsione dentaria.
- Nessun evento significativo fino a sera, quando il paziente presenta un sanguinamento profuso del cavo orale.
- La mattina seguente il paziente, ancora sanguinante, sviluppa ipotensione (40-80 mmHg).
- Il paziente si reca in un PS dove si rileva Hb= 7 gr/dl, con aPTT ai limiti (32.9 sec [vn 32 sec], PT 11 sec [INR 1.06]).
- Riceve emotrasfusione con successivo valore di Hb=9.9 gr/dl

Ragioniamo su un caso clinico

- La profusa emorragia del cavo orale senza apparenti fattori di rischio noti fa ipotizzare una malattia emorragica sottostante

Come procedere?

- La medicina moderna ha beneficiato del contributo della medicina basata sull'evidenza



- Sviluppo di punteggi e algoritmi standardizzati per aiutare i medici

ISTH-Bleeding Assessment Tool

SYMPTOMS (up to the time of diagnosis)	SCORE				
	0 ¹	1 ¹	2	3	4
Epistaxis	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> - > 5/year or - more than 10 minutes	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Packing or cauterization or antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion or replacement therapy (use of hemostatic blood components and rFVIIa) or desmopressin
Cutaneous	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> For bruises 5 or more (> 1cm) in exposed areas	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Extensive	<input type="radio"/> Spontaneous hematoma requiring blood transfusion
Bleeding from minor wounds	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> - > 5/year or - more than 10 minutes	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy, or desmopressin
Oral cavity	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Present	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis or antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
GI bleeding	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Present (not associated with ulcer, portal hypertension, hemorrhoids, angiodysplasia)	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis, antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Hematuria	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Present (macroscopic)	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis, iron therapy	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Tooth extraction	<input type="radio"/> No/trivial or none done	<input type="radio"/> Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Reported in ≥25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Resuturing or packing	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Surgery	<input type="radio"/> No/trivial or none done	<input type="radio"/> Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Reported in ≥25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Surgical hemostasis or antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Menorrhagia	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Consultation only* or - Changing pads more frequently than every 2 hours or - Clot and flooding or - PBAC score>100#	<input type="radio"/> - Time off work/school > 2year or - Requiring antifibrinolytics or hormonal or iron therapy	<input type="radio"/> - Requiring combined treatment with antifibrinolytics and hormonal therapy or - Present since menarche and > 12 months	<input type="radio"/> - Acute menorrhagia requiring hospital admission and emergency treatment or - Requiring blood transfusion, Replacement therapy, Desmopressin, or - Requiring dilatation & curettage or endometrial ablation or hysterectomy)
Post-partum hemorrhage	<input type="radio"/> No/trivial or no deliveries	<input type="radio"/> Consultation only* or - Use of syntocin or - Lochia > 6 weeks	<input type="radio"/> - Iron therapy or - Antifibrinolytics	<input type="radio"/> - Requiring blood transfusion, replacement therapy, desmopressin or - Requiring examination under anaesthesia and/or the use of uterin balloon/package to tamponade the uterus	<input type="radio"/> - Any procedure requiring critical care or surgical intervention (e.g. hysterectomy, internal iliac artery ligation, uterine artery embolization, uterine brace sutures)
Muscle hematomas	<input type="radio"/> Never	<input type="radio"/> Post trauma, no therapy	<input type="radio"/> Spontaneous, no therapy	<input type="radio"/> Spontaneous or traumatic, requiring desmopressin or replacement therapy	<input type="radio"/> Spontaneous or traumatic, requiring surgical intervention or blood transfusion
Hemarthrosis	<input type="radio"/> Never	<input type="radio"/> Post trauma, no therapy	<input type="radio"/> Spontaneous, no therapy	<input type="radio"/> Spontaneous or traumatic, requiring desmopressin or replacement therapy	<input type="radio"/> Spontaneous or traumatic, requiring surgical intervention or blood transfusion
CNS bleeding	<input type="radio"/> Never			<input type="radio"/> Subdural, any intervention	<input type="radio"/> Intracerebral, any intervention
Other bleedings[^]	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Present	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis, antifibrinolytics	<input type="radio"/> Blood transfusion or replacement therapy or desmopressin

ISTH-Bleeding Assessment Tool Score

- Normal range is <4 in adult males
- <6 in adult females and
- <3 in children¹

¹ ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller B, James P, Neunert C, Lillicrap D; ISTH/SSC joint VWF and Perinatal/Pediatric Hemostasis Subcommittees Working Group. J Thromb Haemost. 2010 Sep;8(9):2063-5

ISTH-Bleeding Assessment Tool: il punteggio del nostro caso (1)

ISTH-SSC Bleeding Assessment Tool
Reset

SCORE 5

SYMPTOMS (up to the time of diagnosis)	SCORE				
	0 [§]	1 [§]	2	3	4
Epistaxis	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> - > 5/year or - more than 10 minutes	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Packing or cauterization or antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion or replacement therapy (use of hemostatic blood components and rFVIIa) or desmopressin
Cutaneous	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> For bruises 5 or more (> 1cm) in exposed areas	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Extensive	<input type="radio"/> Spontaneous hematoma requiring blood transfusion
Bleeding from minor wounds	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> - > 5/year or - more than 10 minutes	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy, or desmopressin
Oral cavity	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Present	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis or antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
GI bleeding	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Present (not associated with ulcer, portal hypertension, hemorrhoids, angiodysplasia)	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis, antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Hematuria	<input type="radio"/> No/trivial	<input type="radio"/> Present (macroscopic)	<input type="radio"/> Consultation only*	<input type="radio"/> Surgical hemostasis, iron therapy	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Tooth extraction	<input type="radio"/> No/trivial or none done	<input type="radio"/> Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Reported in ≥25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Resuturing or packing	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin
Surgery	<input type="radio"/> No/trivial or none done	<input type="radio"/> Reported in ≤25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Reported in ≥25% of all procedures, no intervention**	<input type="radio"/> Surgical hemostasis or antifibrinolytic	<input type="radio"/> Blood transfusion, replacement therapy or desmopressin

Punteggio totale: 5 **Probabilità significativa di malattia emorragica congenita**

Nel nostro paziente all'emocromo e ad esami coagulativi di II livello:

- Piastrine: 390000/ μ l
- Von Willebrand antigene: 90%
- Von Willebrand attività (cofattore ristocetinico): 82%

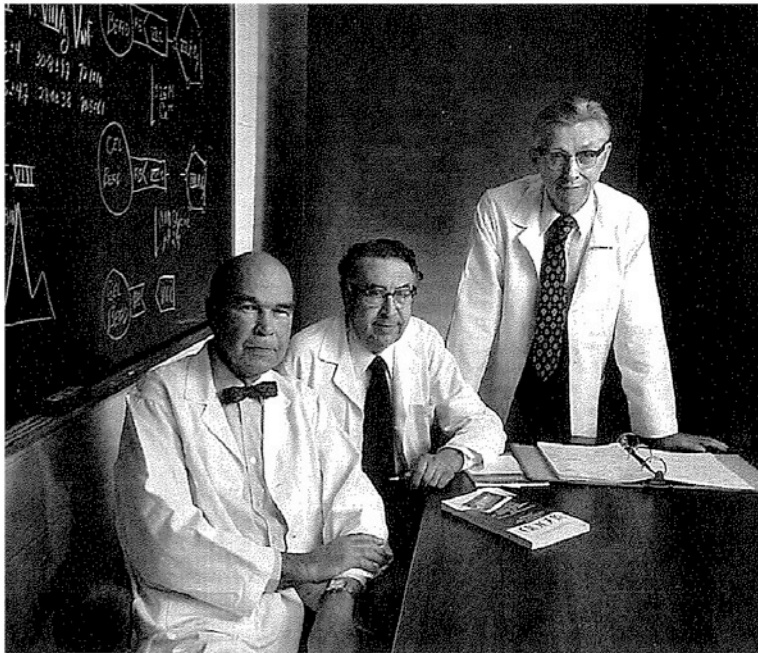
Nel nostro paziente all'emocromo e ad esami coagulativi di II livello:

- FXII: 119%
- FXI: 94%
- FIX: 91%
- **FVIII: 18%**
- FII: 110%
- FVII: 88%
- FV: 80%
- FX: 90%



Emofilia A lieve

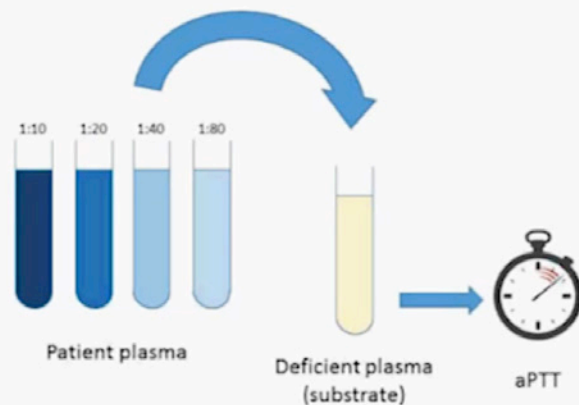
Effect of anti-hemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage anti-hemophilic factor assay procedure.



Robert Langdell Robert Wagner Ken Brinkhous

Effect of anti-hemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilic and a simple one-stage anti-hemophilic factor assay procedure.

- One stage FVIII:C and FIX:C are readily available specific test
- FVIII- or FIX- deficient plasma is incubated with serial dilutions of patient plasma and reference plasma
- aPTT times are recorded



L'importanza del parallelismo di curva per la determinazione dell'inibitore del FVIII

Parallel-line bioassay

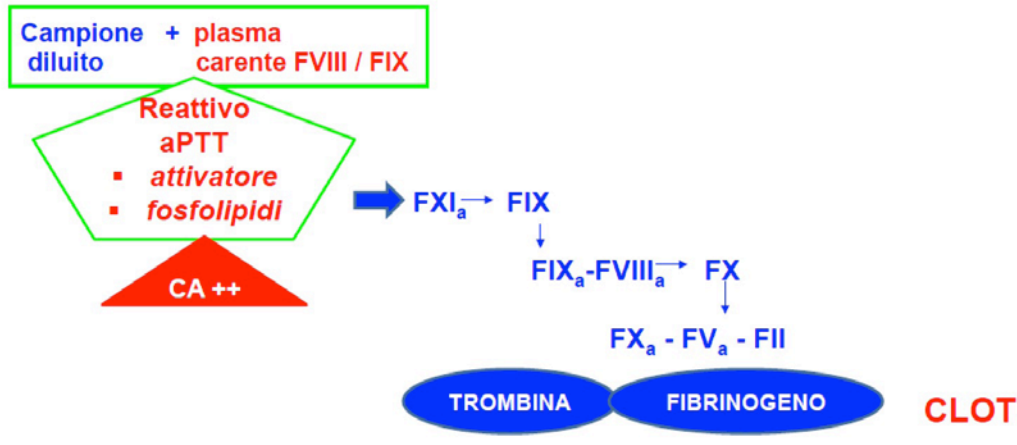


Factor VIII Functional Assays

- One-stage assay
- Two-stage assay
- Chromogenic assay

ONE-STAGE CLOTTING ASSAY FVIII / FIX

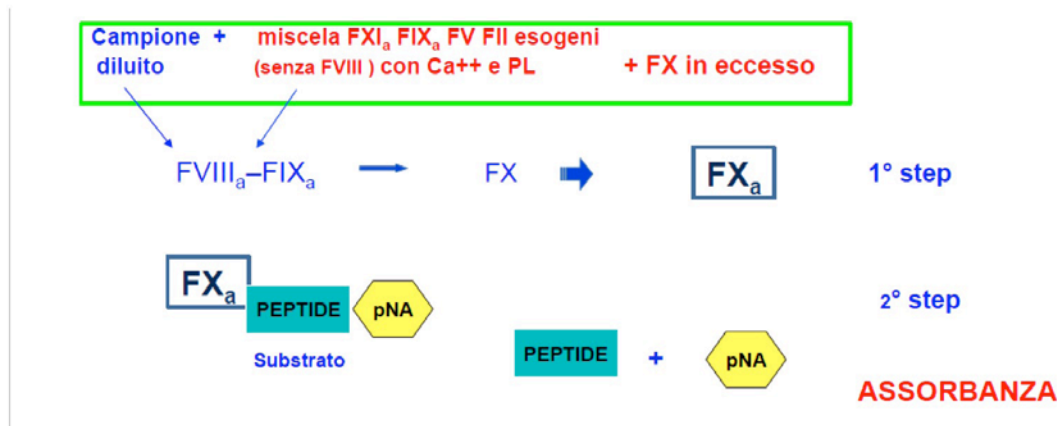
- Basato su un aPTT
- Misura quanto il plasma campione corregge l'allungamento del tempo di coagulazione di un plasma totalmente carente del fattore da dosare
- L'entità della correzione è direttamente proporzionale al contenuto di fattore VIII/IX del plasma test
- Il livello di fattore è testato contro una curva di riferimento costruita sui tempi di coagulazione ottenuti testando, nelle stesse condizioni, diluizioni seriali di un plasma standard a concentrazione nota di fattore



Two-stage chromogenic FVIII assay

Per FVIII:

- Misura la quantità di FX aggiunto in eccesso in un reattivo costituito da una miscela ottimale di fattori ($FXI_a + FIX_a + FV + FII +$ fosfolipidi + Ca^{++}) che è convertita in FX_a dall'azione del FIX_a del reattivo e del $FVIII_a$ del plasma campione diluito — il FX_a prodotto nel primo step agisce, in un secondo step, su un substrato specifico staccando il cromogeno ad esso legato e producendo una reazione colorimetrica
- L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale al contenuto di FX_a prodotto e di conseguenza al livello di FVIII presente nel plasma campione
- Il livello di fattore è testato contro una curva di riferimento ottenuta testando allo stesso modo diluizioni seriali di un plasma standard a concentrazione nota di fattore



Measurement of FVIII for Clinical Management

➤ FVIII-specific assays

- FVIII:C a) chromogenic
 b) one-stage
- FVIII:Ag

➤ Global hemostatic assays:

a) Thrombin generation

b) Thromboelastography

Perché nel nostro caso clinico l'APTT non era anomalo, sebbene ai limiti superiori di normalità?



- L'emostasi di solito richiede livelli di attività del fattore di coagulazione almeno pari al 30% del normale.
- **L'APTT può essere normale con un livello di fattore tra il 15 e il 18% del normale, dimostrando la potenziale insensibilità di questo test per la diagnosi di disturbi congeniti lievi ma clinicamente significativi**

ONE-STAGE (OSA)

- Curva di calibrazione «low range»

VANTAGGI

- Ampia disponibilità di reattivi con alta stabilità a bordo, ideali per l'automazione sui coagulometri disponibili
- Costi contenuti
- Maggior familiarità ed esperienza clinica

SVANTAGGI

- Meno riproducibili
- Molti reattivi diversi
 - a) origine e concentrazione fosfolipidi
 - b) attivatore (silice, acido ellagico, ...)
 - c) plasma carente (immunodepleto o carente congenito)
- Con alcuni reattivi minor accuratezza di misura a livelli molto bassi
- Più variabilità interlaboratori

CHROMOGENIC (CSA)

- Curva di calibrazione «low range»

SVANTAGGI

- Reattivo dedicato e più delicato da usare in automazione sui coagulometri disponibili
- Più caro
- Poco conosciuti nel laboratorio clinico

VANTAGGI

- Più riproducibili
- Minor variabilità nei reattivi

- Misure più accurate e precise
- Minor variabilità interlaboratori

► I livelli di fattore dosati con i due test possono essere anche marcatamente diversi

Factor Assays and New FVIII Products

Bioengineered Recombinant Factor Concentrates

Single Chain FVIII

PEGylated FVIII and FIX - Significant one-stage assay variability
FVIII & FIX Fc Fusions

Potential Solutions

- Product specific one-stage assay standard
- One-stage assay result "conversion factor"
- **Chromogenic factor assays**

Guida di consenso per il monitoraggio di laboratorio dei fattori di coagulazione modificati

Documento di consenso di SISET, AICE, SIBioC and SIPMeL

1 - In linea di principio, sia i test di coagulazione a uno stadio che i test cromogenici sono utili per valutare i livelli post-infusione di fattori di coagulazione modificati.

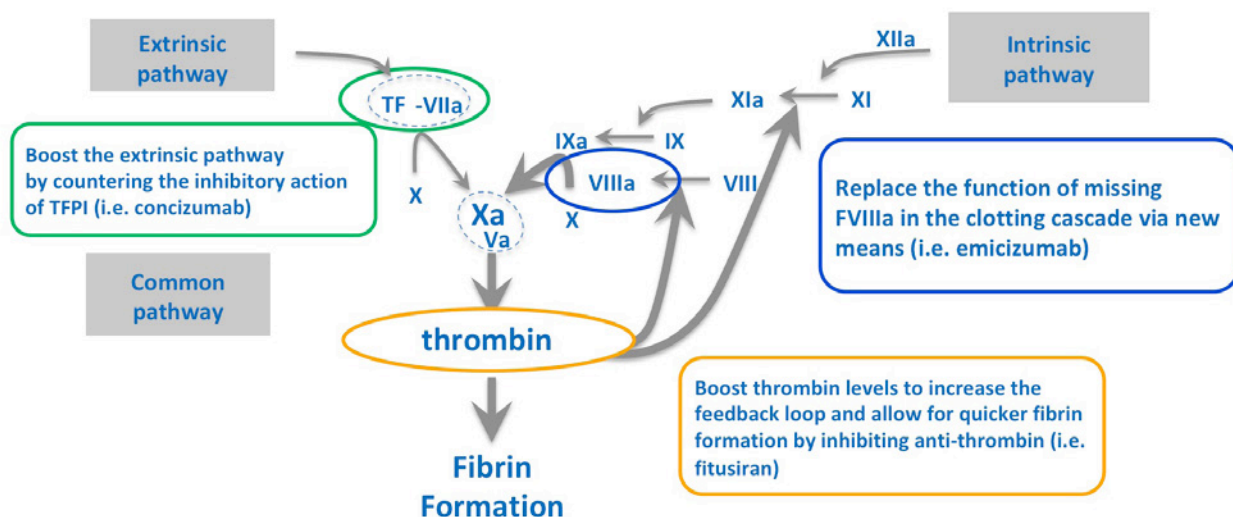
2 - Tuttavia, per alcuni prodotti disponibili in commercio dovrebbero essere attesi risultati discrepanti a seconda della metodica utilizzata.

3 - Ogni volta che sono disponibili informazioni in letteratura o dalla pratica clinica, **si consiglia di utilizzare il tipo di dosaggio o procedura standard specifici del prodotto, che si sono dimostrati efficaci nel ridurre al minimo le differenze tra i dosaggi.**

4 - **Il metodo utilizzato per l'etichettatura della potenza del prodotto utilizzato è la soluzione temporanea più pragmatica.**

5 - **In definitiva, la soluzione potrebbe essere quella di passare da saggi di coagulazione in una fase a saggi cromogenici.**

Non-replacement approaches for Haemophilia A ¹



These compounds and their uses are investigational and have not been approved or licensed for any medical condition. The efficacy and safety of these molecules have not been established yet and are currently being evaluated

FVIII, activated factor VIII; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; mAb, monoclonal antibody

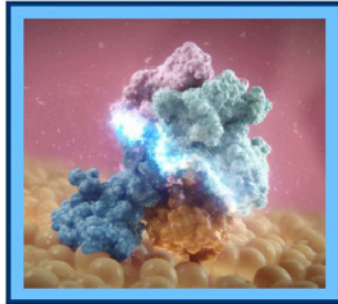
Figure adapted from Achneck et al. Circulation 2010;122:2068-2077
¹ Hammann J, Colbeau S Am J Hematol 91:1252-1260, 2016

5 CONVEGNO INTERREGIONALE

UPDATE SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON MALATTIE EMORRAGICHE

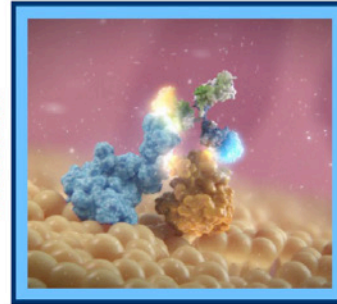
Emicizumab MoA compared with FVIII

Factor VIII



- Where sufficient FVIII is present, it will bind with thrombin to become activated (FVIIIa)
- This FVIIIa then binds with FIXa to form the tenase complex on the surface of platelets
- The complex then binds with FX to allow its activation by FIXa
 - this part of the coagulation cascade can not occur in the absence of FVIII

Emicizumab



- As a bispecific, monoclonal antibody, emicizumab replaces the haemostatic function of FVIII by binding to FIXa and FX, which allows the coagulation cascade to continue normally
- FVIII inhibitors do not bind to or neutralise emicizumab, therefore have no impact on its haemostatic activity

a, activated; F, factor; MoA, mechanism of action

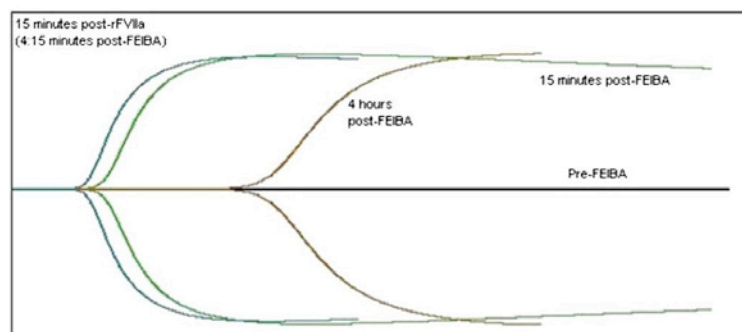
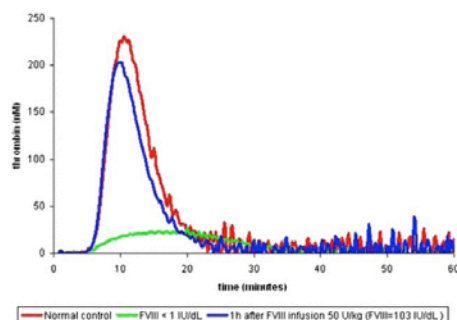
Factor Assays and New Hemophilia Products

Non-Factor Replacement Therapies

- ❖ FVIII mimetics (Emicizumab)
- ❖ Rebalancing hemostasis strategies (Fitusiran, Concizumab etc)

Potential Laboratory Tests for Monitoring

- Global hemostasis assays - Thrombin generation assays/Thromboelastography
- FVIII chromogenic assays (human reagents) for Emicizumab



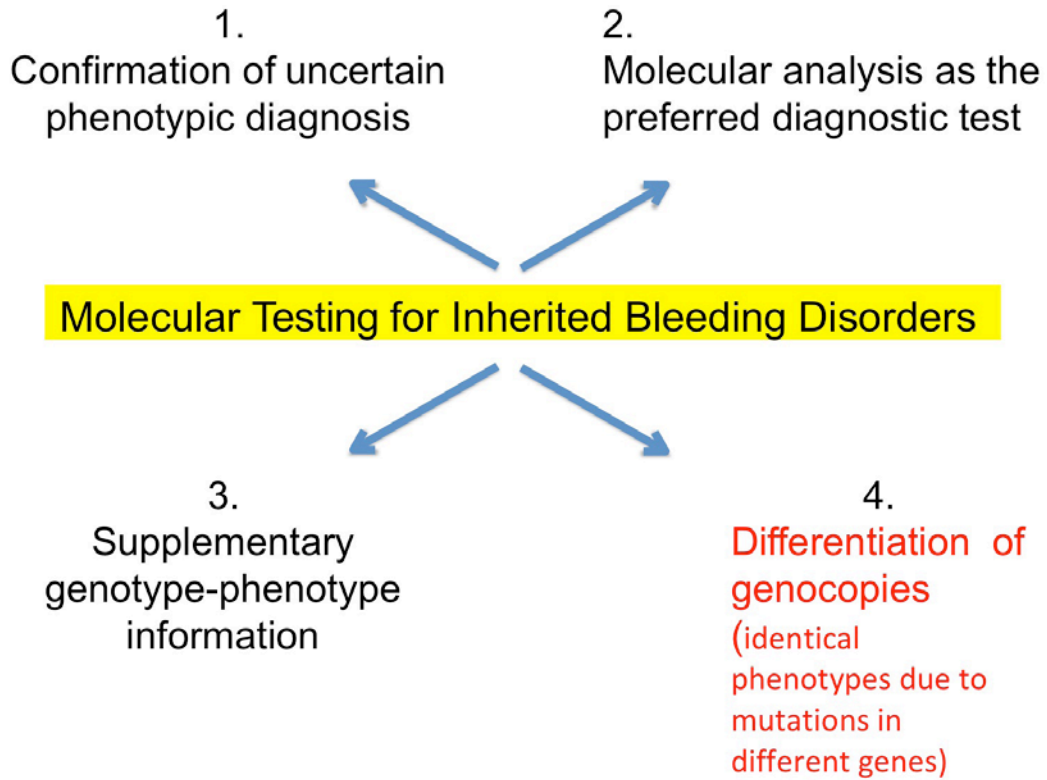
Factor Assays and New Hemophilia Products: problems concerning their measurements

- Gli anticorpi bispecifici (bsAb) sono intrinsecamente diversi dal FVIII e mancano di molti degli stessi meccanismi regolatori
- Queste differenze complicano l'assegnazione e l'interpretazione dell'attività equivalente a quella del FVIII
- *L'incapacità di assegnare l'equivalenza di FVIII compromette la nostra capacità di valutare il potenziale emostatico delle terapie basate sull'uso dei bsAb.*

Indicazioni per una corretta gestione laboratoristica di esami effettuati in pazienti trattati con emicizumab

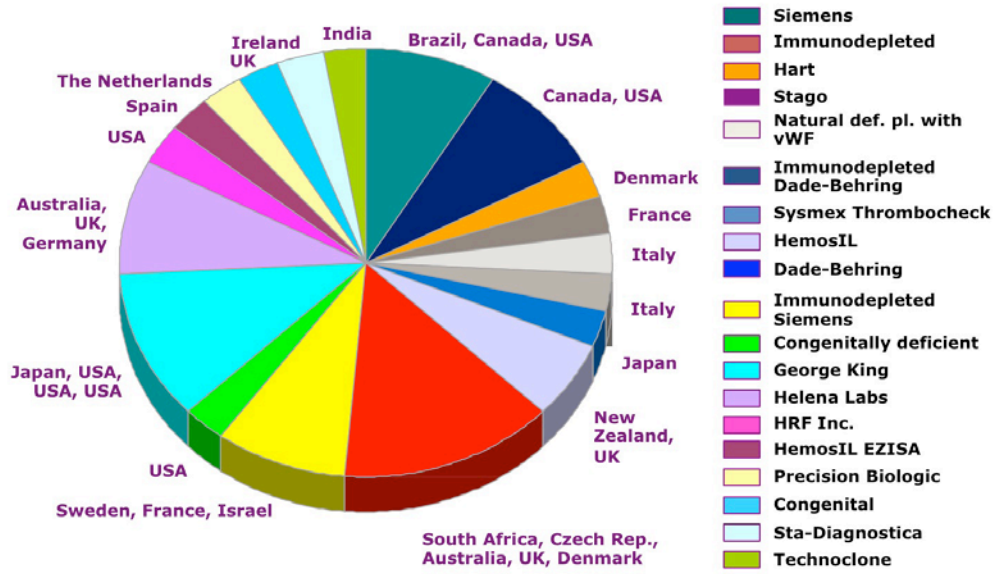
- 1) evitare saggi di coagulazione basati su APTT, come l'attività del FVIII a uno stadio basata su APTT e saggi di inibitore del FVIII con metodo Bethesda;
- 2) ove possibile, sostituire i test basati su APTT con test cromogenici o basati su test immunologici;
- 3) **utilizzare il dosaggio Bethesda cromogenico (fattore IXa bovino e fattore X) per misurare gli inibitori del fattore VIII;**
- 4) per misurare emicizumab, utilizzare un cromogeno (fattore IXa umano e fattore X) o diluire un test a uno stadio con il calibratore e i controlli di emicizumab

Genetic tests

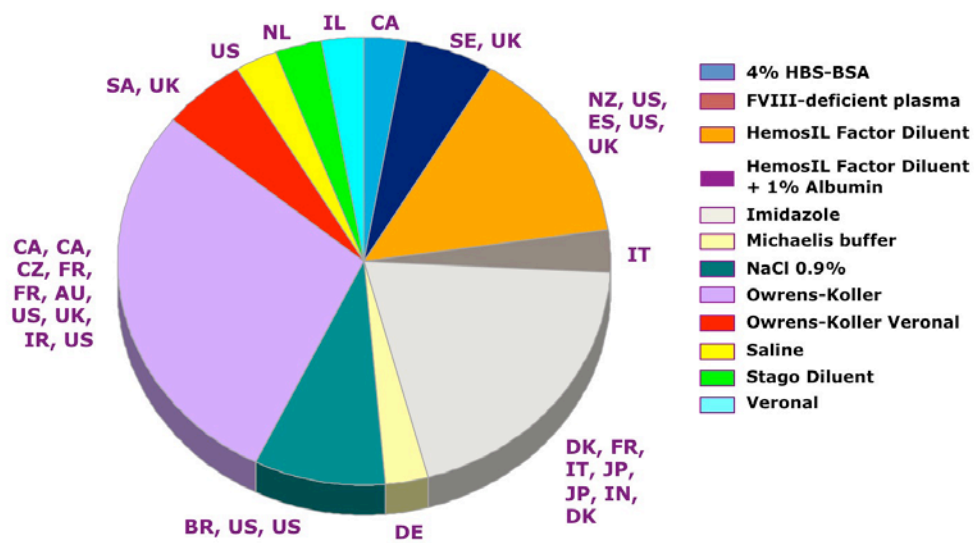


Grazie per l'attenzione

FVIII-deficient Plasma



Buffer for Dilution



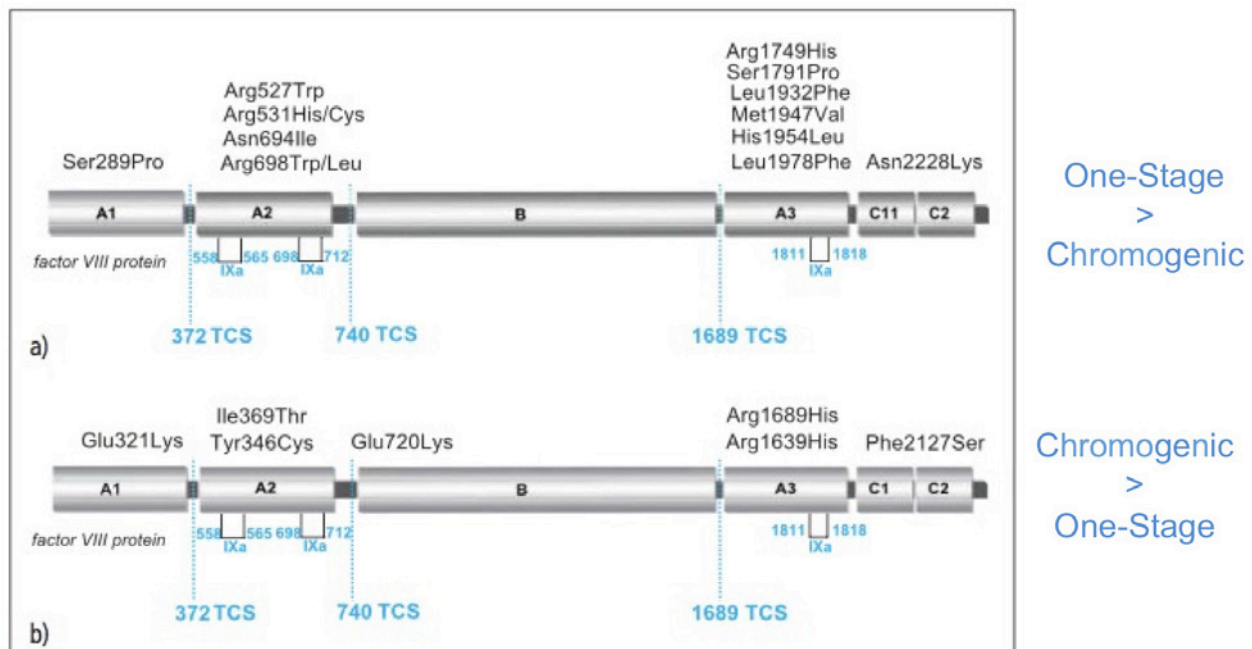
5 CONVEGNO INTERREGIONALE

UPDATE SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON MALATTIE EMORRAGICHE

Il saggio Bethesda (mod. Nijmegen) per la determinazione dell'inibitore del FVIII

- Per definizione 1 BU/ml è la concentrazione dell'anticorpo anti-FVIII che inibisce del 50% l'attività del FVIII dopo 2 hr di incubazione a 37 °C
- IL plasma del paziente è diluito in serie (1:2-1:1024) con tampone imidazolo (o plasma carente) in modo tale da diluire anche l'inibitore
- Plasma normale di controllo è diluito serialmente come il plasma del paziente con plasma carente
- Incubazione per 2 hr a 37 °C
- Si misura poi FVIII. La diluizione 1:2 del plasma normale è definita come 100% dell'attività residua

F8 Mutations Resulting in FVIII Assay Discrepancies

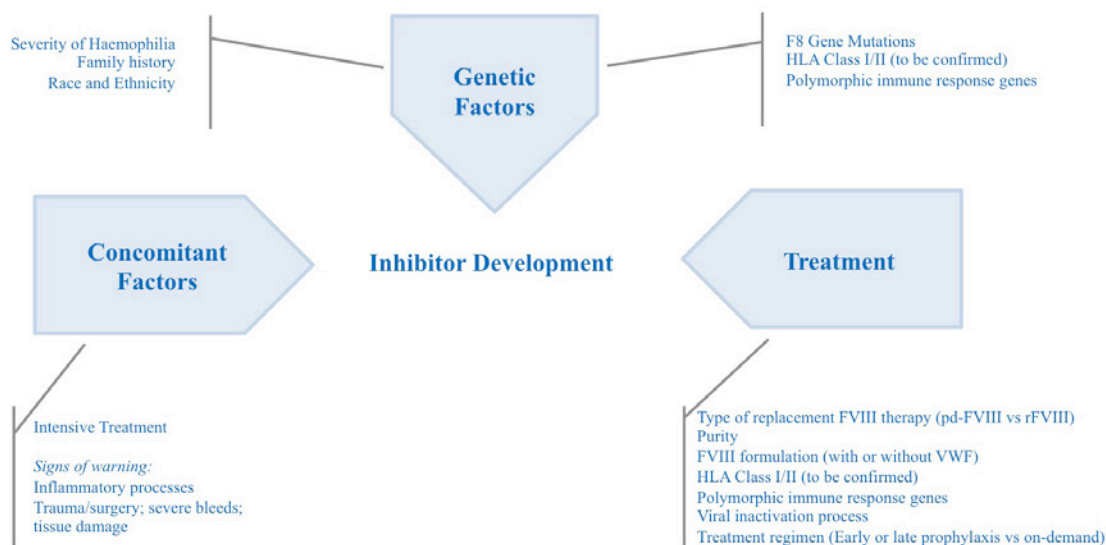


FVIII Genotype and Inhibitor Risk in Severe Hemophilia A PUPs

Multi-domain deletions	~60-80%
Light chain nonsense mutns	30-40%
Intron 22 inversion	20-25%
Single domain deletions	15-25%
Small non-A run insertions/deltns	15-20%
Heavy chain nonsense mutns	10-20%
FVIII missense mutns	<10%
Small A run insertions/deltns	<5%
Splicing mutns.	<5%

Una grave complicanza dell'emofilia A : la comparsa dell'inibitore

Risk Factors for development of FVIII inhibitors^{1,2}



F, factor; HLA, human leukocyte antigen; vWF, von Willebrand factor; pd, plasma derived; r, recombinant

¹ Castman G et al. Semin Thromb Hemost. 2016 Jul;42(5):607-12; ²Autismak J. Blood. 2015;125:2045-51.



GUIDELINE FOR THE MANAGEMENT OF PATIENTS WITH HAEMOPHILIA UNDERGOING SURGICAL PROCEDURES

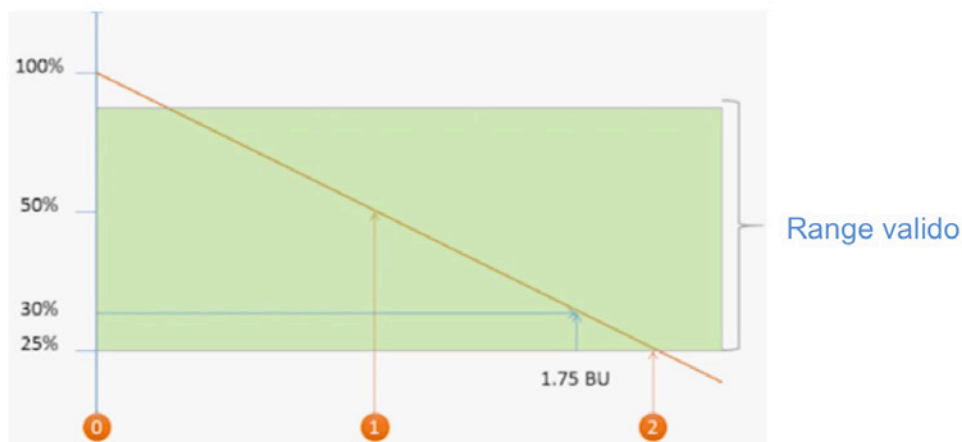
Perioperative management of the bleeding patient

BJA

British Journal of Anaesthesia, 117 (S3): iii18–iii30 (2016)

doi: 10.1093/bja/aew358
Review Article

Il saggio Bethesda (mod. Nijmegen) per la determinazione dell'inibitore del FVIII



Esempio: diluizione 1:20, 30% attività residua: $1.75 \text{ BU} \times 20 = 35 \text{ BU/ml}$

One-stage clotting assay - APTT

Timer starts with the addition of calcium to initiate the reaction and stops when the reaction reaches a preset increase in one of the following:

- Turbidity (optical measurement)
- Viscosity (mechanical measurement)

Gu JM, Ramsey P, Evans V, et al. Haemophilia. 2014;20:593-600;Barrowcliffe TW, Hubbard AR, Kitchen S. Haemophilia. 2012;18:61-65

One-stage FVIII:C Assay

Test PPP + FVIII deficient PPP + Activator + Phospholipid



- Micronized silica
- Ellagic acid
- Kaolin
- Cellite

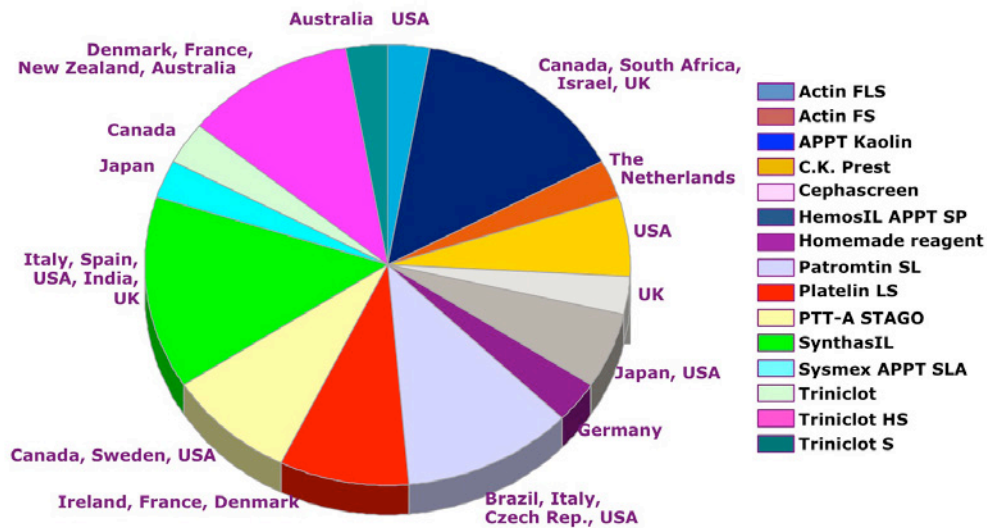
One-stage FVIII:C Assay

Test PPP + FVIII deficient PPP + Activator + Phospholipid



- Total PL
- % PS

APTT reagents



5 CONVEGNO INTERREGIONALE

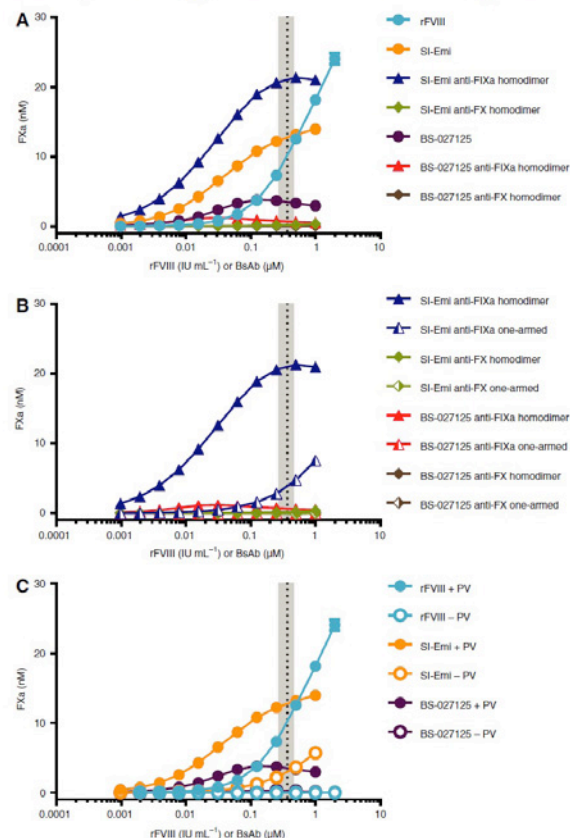
UPDATE SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON MALATTIE EMORRAGICHE

Two-stage chromogenic FVIII assay

- The European Pharmacopoeia recommends use of the chromogenic-based assay in order to assign concentrate potency
- Most clinicians in Europe and North America rely on the one-stage APTT-based assay in the management of their patients

1. Leong L, et al. J Thromb Haemost 2011; 9 (Suppl. 2): Poster P-TU-223.
2. Gu JM et al. Haemophilia. 2014; 20. 593-600
3. Viuff D et al. Haemophilia. 2011; 17. 659-702

Factor Assays and New Hemophilia Products: problems concerning their bioequivalence with rFVIII



5 CONVEGNO INTERREGIONALE

UPDATE SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON MALATTIE EMORRAGICHE

La gestione peri-operatoria del paziente emofilico

How many times...?

The second and subsequent doses are given at intervals of approximately one half-life of the infused product.

A typical half-life for standard half-life factor IX products is approximately 18 to 24 hours.

Approximate half-lives for longer-lasting factor IX products range from 54 to 104 hours.

Molecular Genetic Testing for Hemophilia

Il saggio Bethesda (mod. Nijmegen) per la determinazione dell'inibitore del FVIII

Perché è importante misurare in laboratorio il livello e/o l'attività del FVIII:

- FVIII:** i livelli del fattore sono correlati con il fenotipo dell'emofilia nelle sue forme grave / moderata / lieve
- I saggi globali** (ad es. TGA) possono aiutare ulteriormente nella stratificazione del rischio e nella personalizzazione della terapia ottimale
- La valutazione del titolo di inibitore** è fondamentale per la gestione dei pazienti con anticorpi anti-FVIII (pazienti con emofilia congenita o acquisita)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 79, pp. 6461-6464, November 1982
Biochemistry

Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX

(cDNA hybridization/DNA sequence analysis/blood coagulation)

KOTOKU KURACHI AND EARL W. DAVIE

Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington 98195

Contributed by Earl W. Davie, July 29, 1982

and George Brownlee, Oxford University

Factor IX Gene Cloned in Nov 1982

Characterization of the human factor VIII gene

Jane Gitschier, William I. Wood, Therese M. Goralka, Karen L. Wion, Ellson Y. Chen,
Dennis H. Eaton, Gordon A. Vehar*, Daniel J. Capon & Richard M. Lawn

Departments of Molecular Biology and * Protein Biochemistry, Genentech, Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, California 94080, USA

The complete 186,000 base-pair (bp) human factor VIII gene has been isolated and consists of 26 exons ranging in size from 69 to 3,106 bp and introns as large as 32.4 kilobases (kb). Nine kb of mRNA and protein-coding DNA has been sequenced and the mRNA termini have been mapped. The relationship between internal duplications in factor VIII and evolution of the gene is discussed.

and Genetics Institute

Factor VIII Gene Cloned in Nov 1984

5 CONVEGNO INTERREGIONALE

UPDATE SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON MALATTIE EMORRAGICHE

Spectrum of Hemophilia Mutations

> 2,100 different *F8* mutations

<http://hadb.org.uk/WebPages/PublicFiles/MutationSummary.htm>

> 1,100 different *F9* mutations

<http://www.factorix.org/>

Molecular Testing for Inherited Bleeding Disorders

Molecular Analysis as the Preferred Diagnostic Test

- a) Prenatal diagnosis

- a) Carrier detection

Molecular Testing for Inherited Bleeding Disorders

Differentiation of Genocopies

(identical phenotypes due to mutations in different genes)

Ragioniamo su un caso clinico (2)

- Una donna bianca di 28 anni si reca da un ginecologo per un aumento del sanguinamento mestruale.
- Già al menarca (13 anni) la donna riferisce che il suo sanguinamento mestruale era talmente profuso da costringerla ad assentarsi dalla scuola per diversi giorni ogni mese.
- E' costretta a cambiare il tampone vaginale ogni 30-60 min. per i primi tre giorni.
- Sua madre e sua sorella le avevano riferito che questo fenomeno era normale per le donne della loro famiglia, almeno nel ramo della nonna materna.
- La paziente aveva avuto due gravidanze senza complicanze emorragiche al parto, e le consegne furono.
- Nega ematuria, sanguinamento gastrointestinale, sebbene aveva talora epistassi che avevano richiesto intervento medico con tamponamento. Qualche mese prima aveva sperimentato una grave menorragia associata a dismenorrea.
- In quella occasione aveva scoperto che l'aspirina o l'ibuprofene le alleviavano il dolore ma non il suo sanguinamento, che anzi era esacerbato.

Ragioniamo su un caso clinico (2)

- Nel corso dei pochi mesi seguenti, le sue mestruazioni erano progressivamente peggiorate in termini di sanguinamento.
- Aveva quindi iniziato a sentirsi debole e cercato una terapia.
- Il suo ginecologo ha notato che la sua Hb era di 8,2 g / dL e il suo MCV era di 79 fL.
- Aveva una sideremia di 25 µg / dL e TIBC di 412 µg / dL.
- Il suo esame pelvico era normale e il ginecologo raccomandò una Dilatazione e raschiamento (D&C).
- Ha iniziato quindi terapia marziale con 325 mg di FeSO₄ tid e su consiglio di un'amica ha cercato una valutazione ematologica.
- Una iniziale valutazione del tempo di sanguinamento forniva un valore di 10½ minuti (vn fino a 5 min)

Ragioniamo su un caso clinico (2)

- Tipica manifestazione clinica di sanguinamento cutaneo mucoso
- Somministrazione di un BAT specifico (Vicenza Bleeding Score)
- La Quantificazione e la definizione della storia emorragica è obbligatorio per la diagnosi di VWD
- L'uso di un questionario standardizzato ha permesso la quantificazione della storia emorragica mediante un punteggio «emorragico» quantitativo (BS)

A BS > 3 (> 5 in females) has a good sensitivity and specificity (64.2 and 99.1%)¹

Hemorrhagic symptoms	Score			
	0	1	2	3
Epistaxis	no or trivial	present	packing/cauterization/desmopressin	transfusion/replacement
Cutaneous symptoms	no or trivial	petechiae/ bruises	hematomas	medical consultation
Minor wounds	no or trivial	present (1-5 episodes/year)	medical attention	surgical/transfusion
Oral cavity bleeding	no or trivial	present	medical attention	surgical/transfusion
Gastrointestinal bleeding	no or trivial	present	medical attention	surgical/transfusion
Post-partum hemorrhage	no or trivial	present/medic. attention/ iron therapy	transfusion/ dilatation/ curettage/ suturing	hysterectomy
Muscle hematomas hemarthrosis	no or trivial	present	medical attention	transfusion/intervention/ replacement therapy
Tooth extraction (most severe episode)	no or trivial	present	suturing/packing	transfusion
Surgery (for each intervention)	no or trivial	present	suturing/ resurgery	transfusion
Menorrhagia	no or trivial	present	consultation/ pill use/ iron therapy	transfusion/hysterectomy/ dilatation/curettage/ replacement therapy

1. Rodeghiero et al, JTH 2005

A BS > 3 (> 5 in females) has a good sensitivity and specificity (64.2 and 99.1%)¹

Hemorrhagic symptoms	Score			
	0	1	2	3
Epistaxis	no or trivial	present	packing/cauterization/desmopressin	transfusion/replacement
Cutaneous symptoms	no or trivial	petechiae/ bruises	hematomas	medical consultation
Minor wounds	no or trivial	present (1-5 episodes/year)	medical attention	surgical/transfusion
Oral cavity bleeding	no or trivial	present	medical attention	surgical/transfusion
Gastrointestinal bleeding	no or trivial	present	medical attention	surgical/transfusion
Post-partum hemorrhage	no or trivial	present/medic. attention/ iron therapy	transfusion/ dilatation/ curettage/ suturing	hysterectomy
Muscle hematomas hemarthrosis	no or trivial	present	medical attention	transfusion/intervention/ replacement therapy
Tooth extraction (most severe episode)	no or trivial	present	suturing/packing	transfusion
Surgery (for each intervention)	no or trivial	present	suturing/ resurgery	transfusion
Menorrhagia	no or trivial	present	consultation/ pill use/ iron therapy	transfusion/hysterectomy/ dilatation/curettage/ replacement therapy

1. Rodeghiero et al, JTH 2005

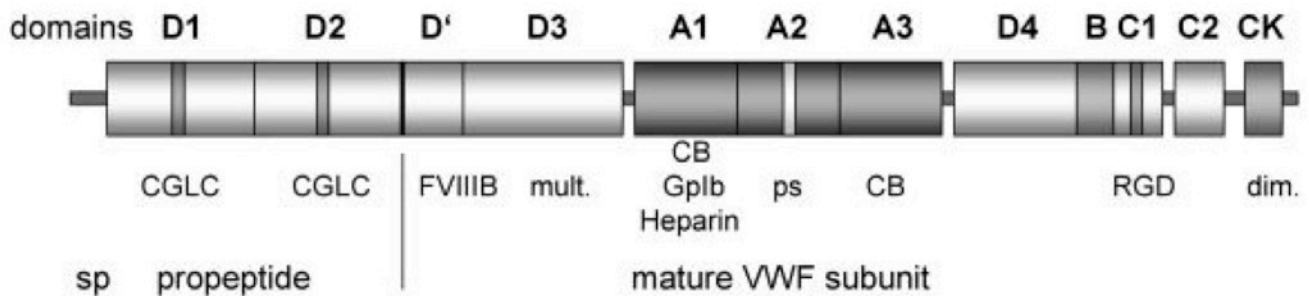
Ragioniamo su un caso clinico (2)

- Una iniziale valutazione ematologica forniva i seguenti risultati:
 - tempo di sanguinamento: 10½ minuti (vn fino a 5 min)
 - PT, aPTT, fibrinogeno e piastrine nella norma
 - FVIII: 22%
 - VWF:ricof: 24% e VWF:Ag: 30%.
 - Gruppo sanguigno A (livelli normali di VWF per gli individui del gruppo A: 50-200%.

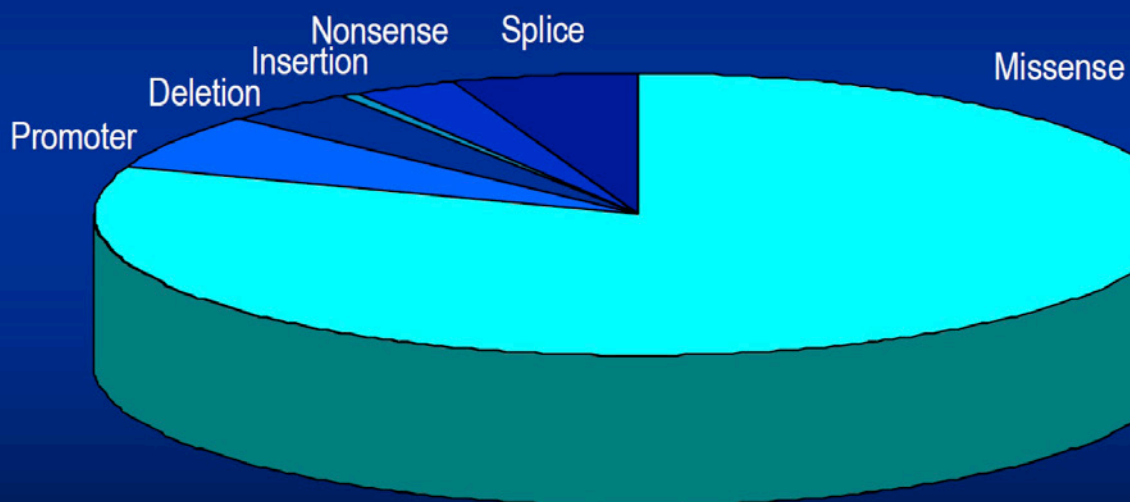
Valori dei parametri di laboratorio attesi nella VWD

	Normal	Type 1	Type 2A	Type 2B	Type 2M	Type 2N	Type 3	PLT-VWD*
VWF:Ag	N	L, ↓ or ↓↓	↓ or L	↓ or L	↓ or L	N or L	absent	↓ or L
VWF:RCo	N	L, ↓ or ↓↓	↓↓ or ↓↓↓	↓↓	↓↓	N or L	absent	↓↓
FVIII	N	N or ↓	N or ↓	N or ↓	N or ↓	↓↓	1-9 IU/dL	N or L
RIPA	N	often N	↓	often N	↓	N	absent	often N
LD-RIPA	absent	absent	absent	↑↑↑	absent	absent	absent	↑↑↑
PFA-100® CT	N	N or ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
BT	N	N or ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
Platelet count	N	N	N	↓ or N	N	N	N	↓
VWF multimer pattern	N	N	abnormal	abnormal	N	N	absent	abnormal

Structural and functional domains of pre-pro-VWF. sp, signal peptide; CGLC, amino acid consensus sequence of disulfide isomerases; FVIII B, factor VIII binding site; mult., multimerization site; CB, collagen binding site; Gplb, platelet Gplb binding site; Heparin, Heparin binding site; ps, proteolytic site; RGD, GplIb/IIIa binding site; dim., dimerization site.



MCMDM-1VWD Mutations



5 CONVEGNO INTERREGIONALE

UPDATE SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON MALATTIE EMORRAGICHE

Ragioniamo su un caso clinico (2)

- Fu testata nella paziente per via endovenosa DDAVP a 0,3 µg / kg.
- Mezz'ora dopo il suo sanguinamento si fermò.
- Il tempo di sanguinamento (4 min) si normalizzò, il FVIII=102%, VWF:act=97% e VWF:Ag=120%.
- Mediante successivo uso di spray nasale di DDAVP il primo giorno del ciclo mestruale si è osservata una progressiva normalizzazione dei livelli di Hb e della sideremia.

Iter diagnostico semplificato della malattia di von Willebrand

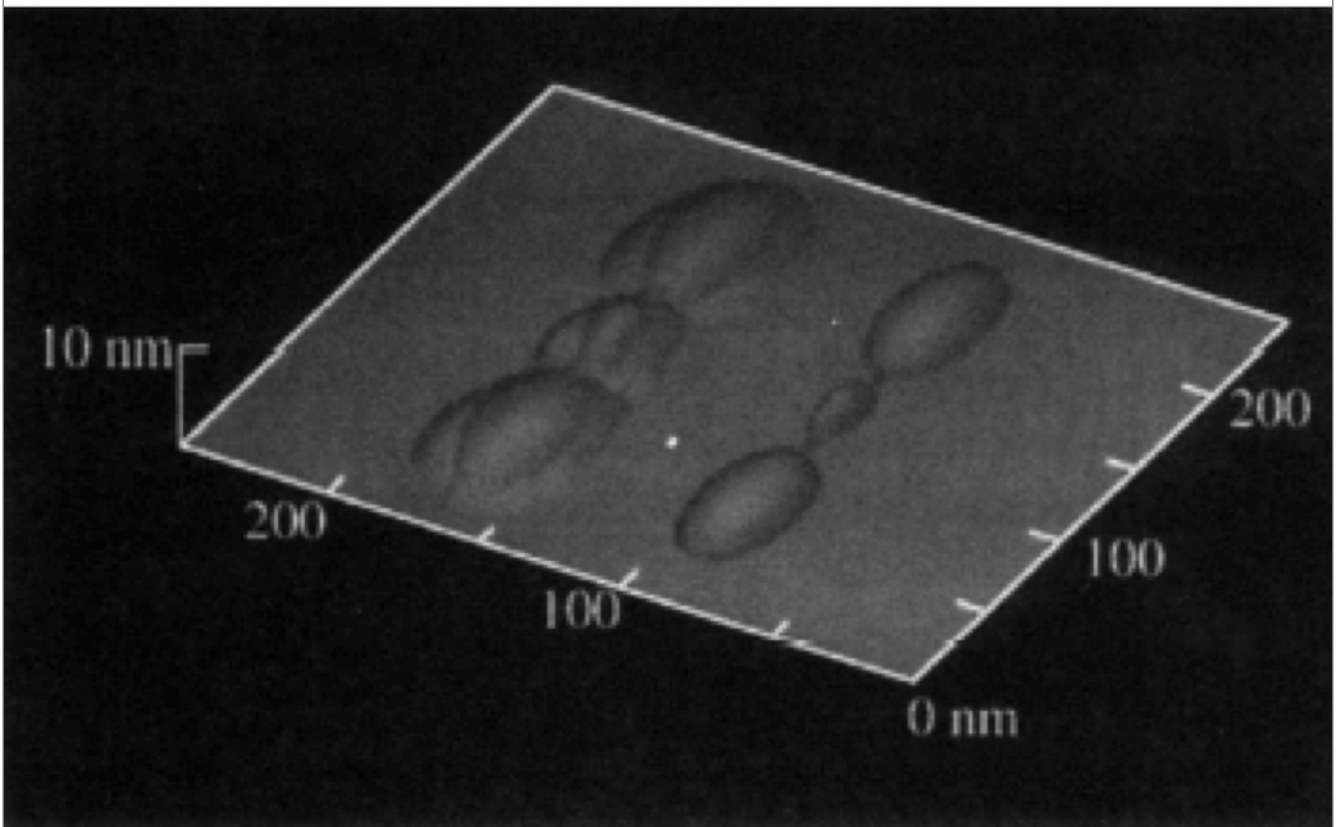
Punti chiave

- I pazienti presentano ecchimosi e porpora, di solito delle mucose*, e raramente sanguinamento articolare.
- I test di screening rivelano una normale conta piastrinica, INR normale, e, talvolta, lieve prolungamento del PTT.
- I test di conferma comprendono dosaggio dell'Ag del fattore di von Willebrand totale, dosaggio funzionale del fattore di von Willebrand (dosaggio del colatore ristocetina del fattore di von Willebrand) e dosaggio dei livelli plasmatici di fattore VIII.
- Un trattamento, a base di desmopressina o talvolta concentrati di fattore VIII di media purezza, è somministrato per un sanguinamento attivo e prima di una procedura invasiva.

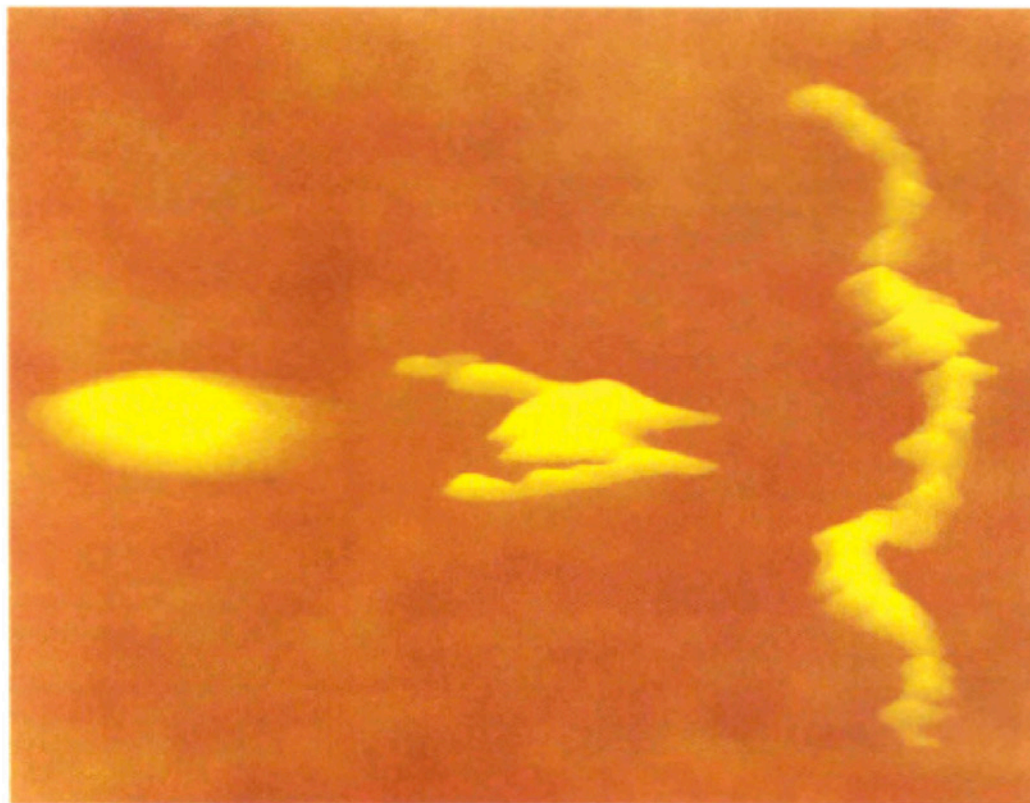
* Soprattutto mucosa gengivale dopo avulsioni dentarie

Clinical Use of Factor VIII Assays

- At diagnosis
- At times of interventions - eg. surgeries
- Pharmacokinetic determinations
- Apparent resistance to factor replacement



No Shear → Shear Applied by AFM Probe → 35 Dyn/cm² Applied by Rotating Disk



Globular
vWF

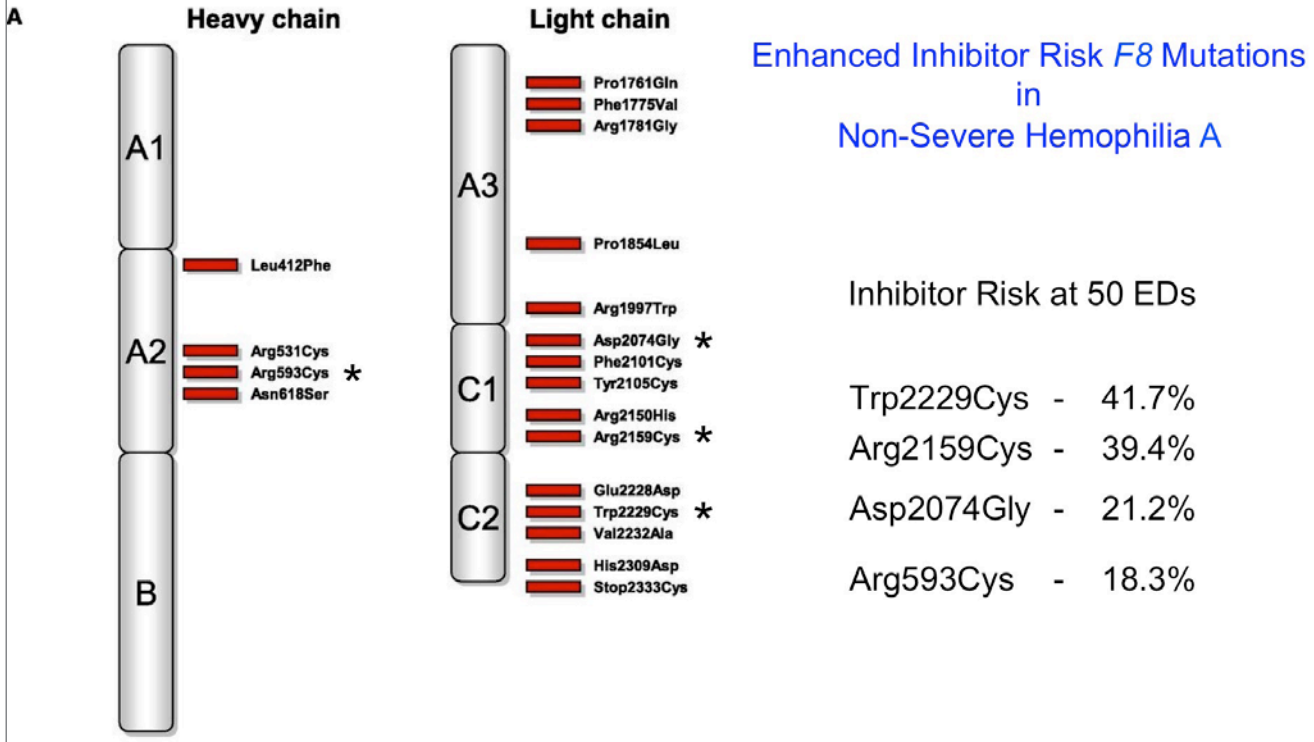
Short Extended
Chain

Extended
Chain

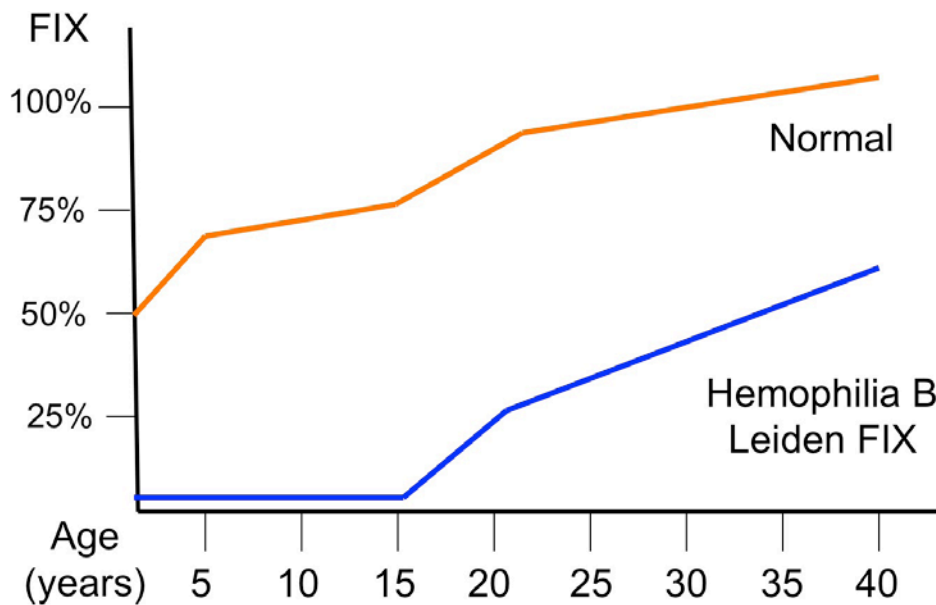
Molecular Testing for Inherited Bleeding Disorders

Supplementary Genotype – Phenotype Information

- FVIII/FIX Inhibitor risk
- Hemophilia B Leiden



Post-Pubertal Changes to F.IX in Normal Subjects and Hemophilia B Leiden Patients



Hemophilia B Leiden Mutations

