



IL RUOLO DEL LABORATORIO NELLA DIAGNOSTICA E FOLLOW UP DEI PAZIENTI

Dott.ssa Alessandra Valpreda

RUOLO DEL LABORATORIO

- ❑ **DIAGNOSI**
- ❑ **IMPOSTAZIONE E MONITORAGGIO DELLA PROFILASSI**
- ❑ **DETERMINAZIONE DELL'INIBITORE**

COLLABORAZIONE

LABORATORISTA ↔ CLINICO

DIAGNOSI

Clinica :

anamnesi personale e familiare e sintomi clinici suggestivi per malattia emorragica congenita



Laboratorio :

- Rileva il difetto della MEC – carenza, anche lieve, di FVIII/FIX
- Assegna correttamente il grado di severità dell'emofilia
- Fa diagnosi differenziale



CONFERMA DIAGNOSTICA

TEST E ... PUNTI CRITICI

aPTT [↑] con PT e TT n.n. = difetto via intrinseca della coagulazione
[TT n.n. esclude eparina]

- ▶ **Usare reagente per aPTT in grado di rilevare carenze lievi (30-40 %)**
Testare sempre il proprio reattivo in questo senso

aPTT MIX (1:1 plasma pz.+ pl.norm.) corretto = carenza fattore via intrinseca
[la correzione esclude presenza di lupus anticoagulant]

- ▶ **Scelta del plasma normale per la miscela**

Dosaggio FVIII / FIX [FXI n.n. esclude emofilia C] = diagnosi emofilia A / B
[FVIII:Ag n.n. esclude malattia di von Willebrand]

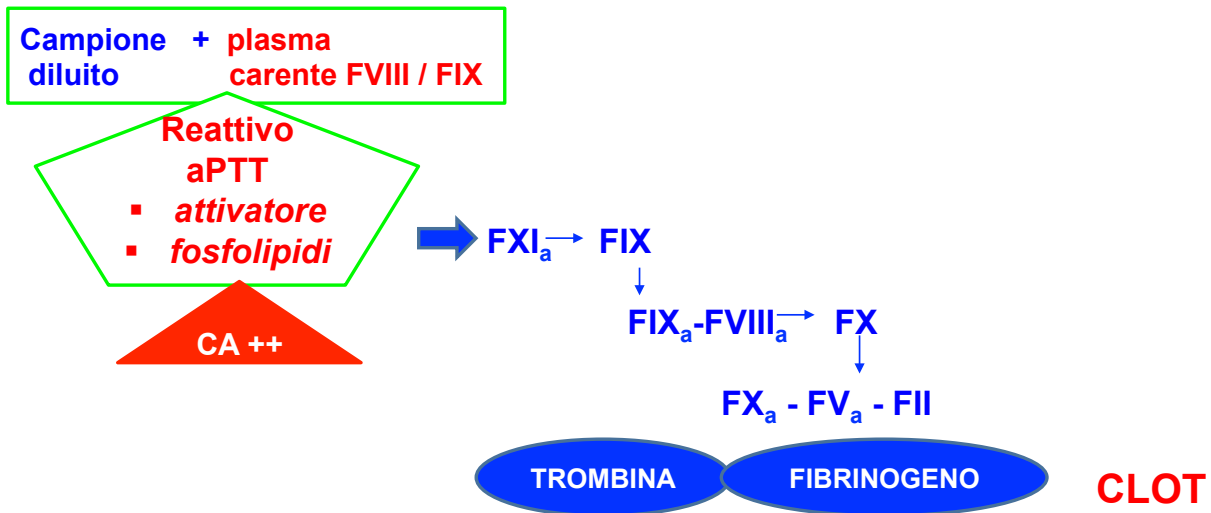
- ▶ **Curve di calibrazione adeguate a determinare anche i livelli più bassi di fattore per l'assegnazione del grado di emofilia**

**ONE-STAGE CLOTTING
ASSAY (OSA)**

**CHROMOGENIC
SUBSTRATE ASSAY (CSA)**

ONE-STAGE CLOTTING ASSAY FVIII / FIX

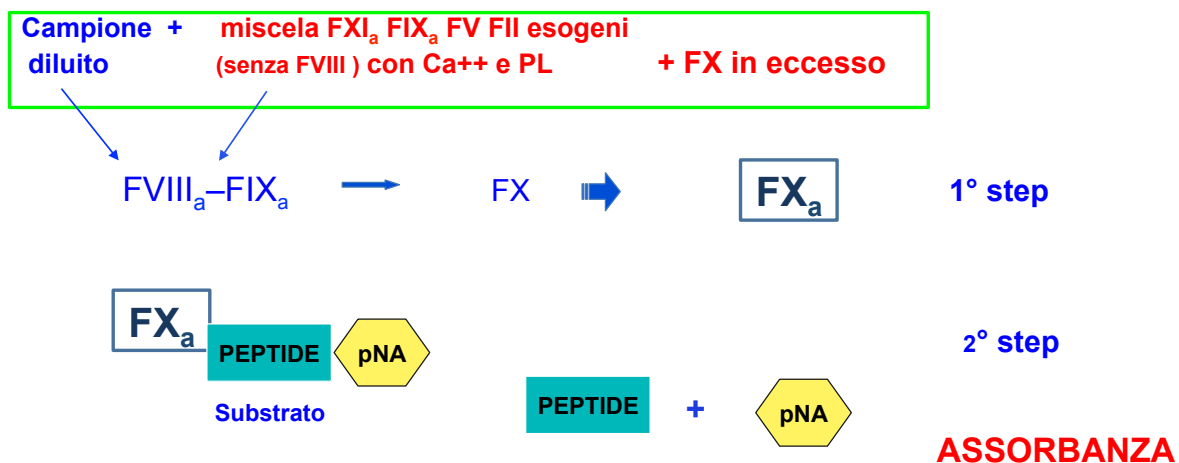
- Basato su un aPTT
- Misura quanto il plasma campione corregge l'allungamento del tempo di coagulazione di un plasma totalmente carente del fattore da dosare
- L'entità della correzione è direttamente proporzionale al contenuto di fattore VIII/IX del plasma test
- Il livello di fattore è testato contro 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



CHROMOGENIC ASSAY FVIII / FIX (TWO-STAGE)

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 stato contro una curva di riferimento ottenuta testando allo stesso modo diluizioni seriali di un plasma standard a concentrazione nota di fattore



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

DISCREPANZE NEI TEST PER FVIII

DEFINIZIONE : una differenza di due volte tra i livelli di FVIII tra i due test

SPIEGAZIONE : Sono state associate ad alcune mutazioni genetiche che generano una molecola di FVIII con una struttura anomala e quindi poi disfunzionale nella forma attivata e che viene rilevata in modo diverso da test diversi

TIPI :

1) Test cromogenico rileva livelli più bassi del one-stage (Rogers J.S., 1976)

- più frequenti
- associate a mutazioni genetiche che coinvolgono i siti di interfaccia dei domain A1-A2-A3 causando una più rapida dissociazione di A2 dalla molecola di FVIII_a e maggior instabilità

► è influenzato il test cromogenico che ha un tempo di reazione più lungo

2) One stage rileva livelli inferiori (Mumford A.D., 2002)

- Più rare
- Associate a mutazioni che coinvolgono i siti di clivaggio della trombina e quelli di legame con il FIX_a e causano minor attivazione della molecola di FVIII o minor legame con il FIX_a

► è più influenzato il test one stage rispetto al cromogenico in cui l'effetto è compensato dall'eccesso di trombina e FIX_a del reattivo

DISCREPANZE PER FVIII: STUDI DI PREVALENZA

Parquet-Gernez A1, Mazurier C, Goudemand M

Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs--characterization of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays Parquet-Gernez A1, Mazurier C, Goudemand M.

Thromb Haemost. 1988 Apr 8;59(2):202-6

Duncan EM1, Duncan BM, Tunbridge LJ, Lloyd JV

Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII methods in a subgroup of patients with haemophilia A.

Br J Haematol. 1994 Aug;87(4):846-8

Cid AR1, Calabuig M, Cortina V, Casaña P, Haya S, Moret A, Cabrera N, Aznar JA

One-stage and chromogenic FVIII:C assay discrepancy in mild haemophilia A and the relationship with the mutation and bleeding phenotype

Haemophilia. 2008 Sep;14(5):1049-54. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01781.x. Epub 2008 Jun 5.

Poulsen AL1, Pedersen LH, Hvas AM, Poulsen LH, Thykjaer H, Ingerslev J

Assay discrepancy in mild haemophilia A: entire population study in a National Haemophilia Centre

Haemophilia. 2009 Jan;15(1):285-9. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01899.x

Bowyer AE1, Van Veen JJ, Goodeve AC, Kitchen S, Makris M

Specific and global coagulation assays in the diagnosis of discrepant mild hemophilia A.

Haematologica. 2013 Dec;98(12):1980-7. doi: 10.3324/haematol.2013.088088. Epub 2013 Jun 28..

.Anche per l'emofilia B lieve sono state rilevate discrepanze nei livelli di FIX rilevati con test diversi, ma per lo più le segnalazioni riguardano differenze tra tests one-stage (disponibilità del test cromogenico per il FIX è molto limitata)

Pouplard C, Trossaert M, LE Querrec A, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y.

Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B.

Haemophilia. 2009 Jan;15(1):365-8. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01896.x. Epub 2008 Sep 22

DISCREPANZE : COME IMPATTANO SULLA DIAGNOSI

EVIDENZE EMERSE

- Per pazienti con emofilia grave i risultati sono simili per entrambi i test in quanto dosano un FVIII di normale struttura
- Nei pazienti con emofilia lieve/ moderata, che hanno anomalie di struttura del FVIII, le differenze tra i test sono rilevate sistematicamente e si riscontrano in più del 30% dei pazienti con grado lieve
- Prevalgono le discrepanze che rilevano livelli più bassi con il cromogenico
- I sintomi emorragici correlano di più con i risultati del test cromogenico

IMPLICAZIONI DIAGNOSTICHE

Se si usa solo OSA

- Mancata diagnosi di emofilia lieve → no rischio → no profilassi quando serve
- Errore nell'assegnazione del grado di emofilia → sottostima del rischio in un emofilico moderato
- Soggetto con livelli normali di FVIII considerato emofilico lieve → trattamenti non necessari

SUGGERIMENTO

In fase diagnostica di una emofilia lieve/moderata i livelli basali di FVIII dovrebbero essere testati con entrambi i test

(Makris M. and Peyvandi F. – Haemophilia 2014; 20:301-303)

Report on Survey 225

Report issued: September 2017

FACTOR VIII:C ASSAY Sample 17/34 was prepared from a donor with mild haemophilia A.
349 centri partecipanti: 327 (93,7 %) utilizzano OSA
con 22 reagenti diversi per aPTT
13 plasmi carenti diversi
14 plasmi di riferimento diversi

U.K. National External Quality Assessment
Scheme for Blood Coagulation

Report on Survey 224

Report issued: July 2017

FACTOR IX:C ASSAY Sample 17/25 was obtained from a pool of normal plasma
309 centri partecipanti: 301 (97,4 %) utilizzano OSA
con 19 reagenti diversi per aPTT
13 plasmi carenti diversi
12 plasmi di riferimento diversi

LA FARMACOPEA EUROPEA RACCOMANDA :
per FVIII CROMOGENICO per FIX ONE-STAGE

IMPOSTAZIONE E MONITORAGGIO DELLA PROFILASSI

Clinica :

- concetto del trattamento di profilassi (standard o pre-chirurgica) personalizzato sul singolo paziente
- disponibilità di una gamma di nuovi concentrati di FVIII/FIX, in particolare a lunga emivita, per il trattamento sostitutivo

PASSAGGIO DI INFORMAZIONI AL LABORATORIO :
QUALE CONCENTRATO, QUALE LIVELLO TARGET IPOTIZZATO ?



Laboratorio :

- valutazione del recovery di fattore in vivo nelle prove di cinetica postinfusione (prodotti diversi scelti per pazienti diversi)
 - monitoraggio dell'efficacia del trattamento (mantenimento del livello stabilito per il singolo paziente)
- scelta del test per quantificare i livelli di fattore post infusione

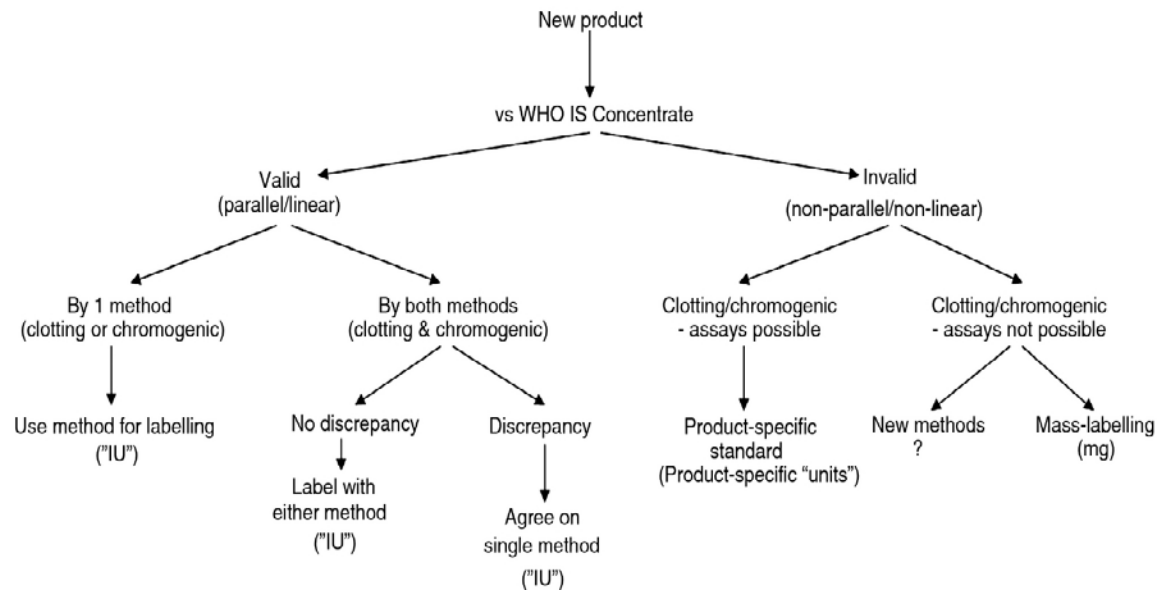
Official Communication of the SSC

Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates.

Hubbard AR1, Dodt J, Lee T, Mertens K, Seitz R, Srivastava A, Weinstein M;

Factor VIII and Factor IX Subcommittee of The Scientific and Standardisation Committee of The International Society on Thrombosis and Haemostasis.

J Thromb Haemost. 2013 May;11(5):988-9.



Decision tree for potency labelling of new factor VIII products.



26 June 2014
EMA/135928/2014

Human Medicines Development and Evaluation

This report and its annex summarise the information and views expressed by the participants in the workshop and may not be understood or quoted as being made on behalf of or reflecting the position of the European Medicines Agency, the European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, or one of their committees or working parties

Workshop report: Characterisation of new clotting factor concentrates (FVIII, FIX) with respect to potency assays used for labelling and testing of post infusion samples

Workshop held on 28-29 November 2013 at the European Medicines Agency (EMA) and organised jointly by EMA (with Biologics Working Party and Blood Products Working Party support) and the European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM).

Il workshop ha discusso su 2 aspetti:

- i test più appropriati per assegnare la potenza dei singoli prodotti e per le analisi post infusione
- l'ipotesi di una eventuale revisione delle indicazioni della Farmacopea Europea che raccomanda il test cromogenico per l'assegnazione della potenza ai concentrati di FVIII e il one-stage per quelli di FIX

MANUFACTURER'S CHARACTERIZATION OF PRODUCT POTENCY

- ▶ La potenza assegnata deve correlare con i metodi più diffusamente usati nei laboratori clinici per testare i campioni post infusione
- ▶ La misura della potenza di un concentrato, in particolare dei nuovi prodotti a lunga emivita, può essere altamente dipendente dal metodo e dai reagenti utilizzati

Su questi presupposti si basano le raccomandazioni della ISTH per i produttori:

- ♦ Si testa il concentrato di FVIII/FIX contro WHO IS per i concentrati utilizzando entrambi i metodi, cromogenico e one-stage e per quest'ultimo utilizzando differenti reagenti per aPTT
- ♦ Si valuta (secondo criteri di linearità dose-risposta, curve di parallelismo, ...) se uno solo o entrambi i test forniscono stime di potenza valide, rapportabili ai WHO IS ed esprimibili in IU
- ♦ Per assegnare la potenza si usa il metodo che soddisfa i criteri
- ♦ Se entrambi risultano validi, ma danno valori di potenza significativamente differenti, la decisione sul metodo da adottare deve essere guidata
 - a) dal comportamento in vitro del prodotto
 - b) dai dati di efficacia in vivo
- ♦ Con studi di farmacocinetica su campioni di plasma si stabilisce il rapporto tra la dose di concentrato, basata sulla potenza assegnata, e il recovery atteso di fattore «in vivo», che può essere metodo/reagente dipendente
- ♦ I produttori devono fornire una linea guida per la dose e anche informazioni su quali test di monitoraggio possono o no essere usati, in modo tale che il clinico possa impostare la dose appropriata per il paziente e correlare i risultati di recovery ottenuti nel laboratorio locale con quelli forniti dal produttore

MISURA DEI LIVELLI POST-INFUSIONE : DISCREPANZE CSA/OSA 1

FVIII – La scelta dei produttori segue le raccomandazioni → (CSA)

- **pdFVIII e rFVIII-full length** : risultati analoghi con discrepanze ≤ 20 %
[Raut S. J.Thromb.Haemost.2003; 1:1927 - Barrowcliffe TW. Semin.Thromb.Hemost. 2002; 28:247]
 - ▶ ***entrambi i test vanno bene – prodotti di comparazione per gli studi***
- **B-domain-deleted rFVIII 1° generazione** : con OSA livelli 20-50% più bassi se testati usando un plasma di riferimento standard - ratio CSA/OSA » 1
[Ingerslev J. J.Thromb.Haemost.2004; 2:623 - EMA 2009 Assessment report for Refacto AF]
 - ▶ ***un reference standard prodotto specifico risolve il problema della sottostima***
- **New B-domain-deleted rFVIII a diverso grado di delezione** : in generale discrepanze inferiori a quelli di 1° generazione – studi di comparazione con ricombinanti full length per
 - B-domain truncated rFVIII** [Viuff D. Haemophilia 2011; 17:695]
 - B-domain deleted rFVIII-Fc long acting** [Summer JM. Haemophilia 2014; 20:294]anche con diversi reagenti per aPTT
 - ▶ ***si possono usare entrambi i test perché le discrepanze, circa 20%, non risultano clinicamente significative***
per entrambi i prodotti OSA sovrastimano l'attività a livelli molto bassi (ratio CSA / OSA < 0,7)

MISURA DEI LIVELLI POST-INFUSIONE : DISCREPANZE CSA/OSA 2

- **B-domain-deleted rFVIII-PEGylated long acting :**
[Krogh-Meiborn T. J.Thromb.Haemost 2013; 11 suppl.:1042]
[Gu JM. Haemophilia 2014; 20:593]
OSA che utilizza reattivo per aPTT con attivatore silice sottostima i livelli mentre la PEGylazione non influenza CSA
 - ▶ **in alternativa al cromogenico si può usare OSA ma utilizzando un reattivo aPTT con acido ellagico come attivatore**
si ipotizza anche l'uso di un uno standard di riferimento prodotto specifico
- **PEGylated full lenght rFVIII long acting : risultati analoghi**
[Turecek PL. J.Thromb.Haemost 2015; 13 suppl.2:834]
 - ▶ **si possono usare entrambi i test**
- **B-domain-truncated rFVIII-single chain long acting: discrepanze clinicamente significative (50%) - OSA sottostima i livelli**
[st. Ledger K. J.Thromb.Hemost. 2015;13Suppl:540]
 - ▶ **il grado di sottostima però è prevedibile perchè i risultati sono altamente riproducibili**
si può usare un fattore di correzione (proposto = 2)

MISURA DEI LIVELLI POST-INFUSIONE : DISCREPANZE NEI TEST

FIX – La scelta dei produttori segue le raccomandazioni → (OSA)

- **rFVIII-full lenght emivita standard :** OSA sovrastima i livelli con discrepanze intorno al 30 % rispetto al CSA ma soprattutto molta variabilità (> 40%) tra gli OSA tests in dipendenza dai reattivi per aPTT e dai reference usati
[Wilmot HV. Haemophilia 2014; 20:891]
 - ▶ **si può utilizzare il reattivo che meglio previene la sovrastima del FIX**
- **rFIX-Fc long acting :** le discrepanze legate ai diversi reattivi utilizzati in OSA, sottostima (silice) o sovrastima (ac.ellagico), sono contenute entro il 30% e non hanno ripercussioni cliniche importanti [Sommer JM. J.Thromb.Hemost. 2014; 112:932]
 - ▶ **si possono usare entrambi i tipi di reattivi**
- **glicoPEGylated rFIX long acting :** discrepanze molto significative (fino al 70%) se si utilizza reattivo [Bowyer AE. J.Thromb.Hemost. 2016; 14:1]
 - ▶ **o solo CSA o un OSA ben selezionato**
- **rFIX-albumin long acting**

IL MONITORAGGIO NEL LABORATORIO CLINICO

Scelta ideale

- usare il metodo che da risultati simili a quelli del test utilizzato dai produttori per assegnare la potenza allo specifico concentrato infuso dal paziente
- seguendo le strategie in accordo con le raccomandazioni proposte dai produttori:
 - a) CSA e/o OSA
 - b) OSA con il reattivo aPTT più adatto a testare il concentrato infuso
 - c) standard di riferimento prodotto-specifico
 - d) fattori di correzione per allineare i risultati

Scelta possibile ???

- Impensabile avere una gamma di metodi/reattivi pari alla gamma dei fattori sostitutivi attualmente disponibili
- Dipende dalla flessibilità consentita dall'organizzazione del laboratorio

SUGGERIMENTO

Nella nuova era dei preparati a lunga emivita il laboratorio di un centro emofilia dovrebbe pensare di introdurre l'utilizzo di un test cromogenico e avere a disposizione almeno due o più reattivi aPTT

DETERMINAZIONE DELL'INIBITORE

Clinica : evento emorragico in profilassi
recovery inferiore ai livelli attesi



SOSPETTO DI
INIBITORE



Laboratorio :

RISPOSTA TEMPESTIVA

1) aPTT MIX

a tempo zero



PARZIALE CORREZIONE

dopo 2h a 37° C



RIALLUNGAMENTO

- ▶ si evidenzia la tempo dipendenza della cinetica di 1° ordine tipica degli inibitori del FVIII nell'emofilia congenita

2) DOSAGGIO DEL FATTORE


3) TITOLAZIONE DELL' INIBITORE

anche 24 ore dopo

TITOLAZIONE DELL' INIBITORE

Principio : si misura il livello di inibizione esercitato in vitro da diluizioni scalari del plasma paziente sull'attività del FVIII di una quantità fissa di plasma normale, con cui vengono miscelate in rapporto 1:1

Metodi : Bethesda → Nijmegen → Nijmegen modificato



sensibilità per i livelli bassi di inibitore

Test : a seconda del test utilizzato per misurare l'attività del FVIII (one-stage o cromogenico) si misura il titolo dell'inibitore con

- Nijmegen-Bhetesda clotting assay
- Chromogenic Bhetesda assay

▶ **Non ci sono differenze significative tra test one-stage e cromogenico nel determinare il titolo dell'inibitore**

[Miller CH. J.Thromb.Haemost.2013;11:1300]

MONITORAGGIO DEGLI AGENTI BYPASSANTI

- FEIBA (complesso protrombinico attivato)
- NOVOSEVEN (FVII_a ricombinante)

Inducono l'emostasi senza modificare il FVIII/FIX plasmatici

▶ **Non serve dosare i fattori per valutare l'efficacia di questi trattamenti bypassanti**

NECESSITA' DI ALTRI TEST DI LABORATORIO ?

Tromboelastometria

Test di generazione di trombina (TGA)

- (EMICIZUMAB)
- (FITUSIRAN)

QUALI CAMBIAMENTI IN LABORATORIO ?

GRAZIE PER L'ATTENZIONE