



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

DOCUMENTO DI CONSENSO

# **IL LABORATORIO DI EMOSTASI NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON EMOFILIA**

A CURA DEL GRUPPO DI LAVORO QUALITÀ DEI LABORATORI DELL'AICE

Edizione Luglio 2021





ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

DOCUMENTO DI CONSENSO

# **IL LABORATORIO DI EMOSTASI NELLA GESTIONE DEL PAZIENTE CON EMOFILIA**

A CURA DEL GRUPPO DI LAVORO QUALITÀ DEI LABORATORI DELL'AICE

Edizione Luglio 2021

## Prefazione

L'Associazione Italiana Centri Emofilia (AICE), fedele alla tradizione che la vede impegnata nell'opera di divulgazione scientifica, volta ad affrontare i problemi della diagnosi e trattamento delle emofilie, propone un nuovo Documento di Consenso dal titolo "Il laboratorio di Emostasi nella Gestione del Paziente con Emofilia".

Sono particolarmente lieto di curare la prefazione di questo documento e desidero ringraziare Angiola Rocino e il Consiglio Direttivo per questa opportunità.

Come è noto, la gestione del paziente emofilico si articola attraverso due interventi congiunti, che richiedono solide competenze cliniche e di laboratorio. In particolare, la sfida che oggi il laboratorio deve affrontare nella gestione dell'emofilia è di enorme rilevanza a causa di due aspetti concomitanti. Negli ultimi anni abbiamo assistito ad uno sviluppo tumultuoso di nuove molecole modificate di fattore VIII e IX, che tendono a sostituire i trattamenti con i fattori derivati dal plasma, ma anche di nuovi farmaci mimetici del fattore VIII, oppure farmaci che modificano il bilancio pro- vs anticoagulante dell'emofilico, o ancora la terapia genica, strategie semplicemente impensabili anni orsono. Questi nuovi prodotti, strutturalmente diversi dai fattori nativi, o che impiegano meccanismi d'azione decisamente rivoluzionari, impongono una revisione di molti dei concetti che sono stati finora la base del laboratorio.

Accanto a questa rivoluzione, largamente positiva, se ne osserva un'altra, che rischia per certi aspetti di essere negativa. La presenza di un laboratorio specialistico dedicato presso ciascun Centro Emofilia sembra destinata a essere un ricordo del passato. Molti dei laboratori specialistici sono stati chiusi a favore di strutture complesse di più facile (apparente) organizzazione e più profittevoli dal punto di vista economico. Tutto ciò non è di per sé un male, a patto che il personale dei servizi centralizzati sia messo nella condizione di mantenere la competenza e la professionalità necessarie alle sfide che la moderna cura dell'emofilia richiede.

Ecco allora che AICE ha pensato a un documento in lingua italiana, redatto secondo la consuetudine del consenso, prodotto da un gruppo di esperti prima e con l'apporto e il contributo di tutti i Soci dopo, che affronta in maniera organica e critica il ruolo del moderno laboratorio, dalla diagnosi al monitoraggio dei nuovi farmaci.

Dalla lettura del documento si capisce come alcuni dei problemi non siano ancora completamente risolti, anche perché lo sviluppo dei farmaci di solito precede lo sviluppo del laboratorio per il loro monitoraggio e bisognerà dunque attendere qualche tempo (auspicabilmente breve) affinché si possa avere un riallineamento fra le conoscenze sui nuovi farmaci per curare l'emofilia e le conoscenze per un sempre più accurato monitoraggio di laboratorio.

Desidero concludere sottolineando come uno dei principi basilari attorno al quale ruota la buona pratica per il trattamento dell'emofilia richieda una spiccata collaborazione fra clinica e laboratorio. Tale collaborazione, sebbene necessaria in passato, diventa determinante per il futuro e il mio auspicio è che tutti, clinici e operatori di laboratorio, traggano profitto dalla lettura di questo documento.



**Armando Tripodi,**

Presidente del Comitato Scientifico AICE

## **Sviluppo e cronologia del documento**

Il documento è stato redatto dal Gruppo di Lavoro Qualità dei Laboratori dell'AICE, presieduto da Angiola Rocino, Presidente AICE, coordinato da Rita Carlotta Santoro e Angelo Claudio Molinari e costituito da Laura Contino, Raimondo De Cristofaro, Augusto B. Federici, Tiziano Martini, Sophie Testa, Alessandra Valpreda, con il contributo fondamentale di Armando Tripodi, in qualità di esperto nominato dalla Presidente dell'AICE.

La versione risultante dalle revisioni dei membri del Gruppo di Lavoro, cui ha contribuito Antonio Coppola, Segretario AICE, è stata approvata dal Consiglio Direttivo dell'AICE (Presidente: A. Rocino; Vice Presidente: R.C. Santoro; Consiglieri: A.C. Molinari, C. Santoro, E. Zanon; Rappresentante ISS: A. Giampaolo) e dal Comitato Scientifico (Presidente: A. Tripodi; Componenti: R. De Cristofaro, G. Di Minno, F. Peyvandi, M. Pinotti, P. Simioni) e inviata, quindi, ai Soci AICE via e-mail il 27/07/2021.

A seguito dei commenti e/o proposte di revisione pervenuti dai Soci: A. Borchiellini, D. Cultrera, A.C. Giuffrida, M.G. Mazzucconi, M.E. Mancuso, F. Riccardi, G.F. Rivolta e R. Salviato, è stata redatta la versione finale del documento, che ha ottenuto il parere favorevole dei Soci, mediante consultazione online attraverso il sito ufficiale AICE ([www.aiceonline.org](http://www.aiceonline.org)), indetta il 09.08.2021 e conclusasi il 27.08.2021.

Il documento è stato pubblicato sul sito AICE in data 31.08.2021.

Indice		Pagina
1.	Introduzione	7
2.	Il ruolo del laboratorio nella gestione del paziente emofilico	8
3.	Metodi di misura per FVIII e FIX	8
4.	Discrepanze fra metodi di misura per la diagnosi di emofilia	9
5.	Discrepanze fra metodi di misura per il monitoraggio terapeutico	10
5.1.	Concentrati di FVIII e FIX a emivita standard	10
5.2.	Concentrati di FVIII e FIX a emivita prolungata	11
5.2.1.	Concentrati di FVIII a emivita prolungata	12
5.2.2.	Concentrati di FIX a emivita prolungata	13
5.3.	Come risolvere il problema della discrepanza tra metodi	13
6.	Nuove terapie non sostitutive e loro impatto sul laboratorio	15
7.	Terapia genica	17
8.	Conclusioni	17
	Bibliografia	18

## 1. Introduzione

La terapia dell'emofilia si è basata, negli ultimi decenni, sul trattamento sostitutivo, mediante somministrazione, per via endovenosa, di concentrati dei fattori carenti: emoderivati (crioprecipitati e concentrati purificati di fattori della coagulazione) e, successivamente, concentrati di fattore (F) VIII (FVIII) e IX (FIX), prodotti con la tecnologia del DNA ricombinante (1,2).

Accanto al trattamento "a domanda", a partire dal 1994, la profilassi con somministrazione di concentrati a intervalli regolari e preordinati, allo scopo di prevenire gli emartri, la comparsa di articolazioni bersaglio e il danno articolare che ne può derivare, è stata universalmente riconosciuta come l'approccio terapeutico ottimale (3). Inizialmente prevista con indicazione specifica per i pazienti con emofilia grave (FVIII/FIX <1 UI/dL), questa modalità di trattamento, intrapresa precocemente nei bambini, prima ancora che si manifesti un primo episodio emorragico intrarticolare e in assenza di qualsiasi segno clinico o strumentale di danno articolare (profilassi primaria) (4,5) è oggi ampiamente attuata anche negli adolescenti e negli adulti (profilassi secondaria o terziaria), tanto da essere considerata il gold standard per tutti i pazienti con fenotipo emorragico grave, compresi alcuni casi selezionati di pazienti con emofilia moderata con FVIII/FIX 1-5 UI/dL (5,6). I regimi terapeutici vengono, in genere, individualizzati tenendo in considerazione la storia emorragica, lo stato articolare, lo stile di vita, parametri farmacocinetici, le preferenze del paziente e le sue esigenze personali (5,6).

I vantaggi della terapia sostitutiva sono, tuttavia, limitati nel 30% circa degli emofilici A gravi (7,8) e nel 10% circa degli emofilici B gravi (9) dalla comparsa di anticorpi neutralizzanti il FVIII o FIX infuso con la terapia sostitutiva (inibitori), che rendono inefficace la terapia sostitutiva e inattuabile la profilassi.

L'emivita del FVIII e del FIX, rispettivamente, pari a circa 12 ore e 18 ore (10,11), ha reso difficile conseguire gli obiettivi precisi della profilassi, vale a dire una totale protezione nei confronti della comparsa di episodi emorragici articolari e del conseguente rischio di manifestazioni da artropatia cronica incontrovertibile e invalidante (12). Con i concentrati plasmaderivati e ricombinanti ad emivita standard si rende, infatti, necessaria la somministrazione a intervalli ravvicinati: generalmente, tre volte a settimana o a giorni alterni negli emofilici A e due volte a settimana negli emofilici B, rappresentando un notevole impegno per i pazienti e inficiandone l'aderenza alle prescrizioni.

In anni recenti sono stati sviluppati nuovi concentrati di FVIII e FIX ricombinante con caratteristiche di ridotta clearance e conseguente emivita prolungata, che permettono di diradare le infusioni e/o incrementare i livelli circolanti di fattore (13) offrendo, pertanto, l'opportunità di una più ampia personalizzazione dei regimi di profilassi, in relazione alle esigenze di protezione del paziente e alla convenienza del trattamento.

Inoltre, più recentemente, ai prodotti per la terapia sostitutiva si sono aggiunti farmaci non sostitutivi utilizzabili per la profilassi in emofilici gravi con e senza inibitore. È attualmente disponibile per l'uso nella pratica clinica un anticorpo monoclonale mimetico del FVIII,

*emicizumab*, il cui uso è indicato, pertanto, nei soli emofilici A, mentre sono in diversa fase di sperimentazione altri prodotti, analogamente non sostitutivi, aventi differenti meccanismi d'azione che potranno essere utilizzabili in regimi di profilassi tanto in emofilici A, quanto in emofilici B, con e senza inibitore (14,15). Il maggior vantaggio derivante dall'uso di tali farmaci innovativi è rappresentato dalla via di somministrazione sottocutanea e dalla loro lunga emivita. A questi nuovi farmaci bisogna aggiungere la terapia genica che presto entrerà nell'armamentario terapeutico per l'emofilia (15).

La disponibilità di diverse opzioni terapeutiche, eterogenee dal punto di vista biochimico e delle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche, impone nuove strategie di valutazione, non solo al clinico, ma anche agli specialisti del laboratorio, che devono gestire i test richiesti per i pazienti in trattamento con i diversi prodotti. Lo scopo di questo documento è, pertanto, fornire al laboratorio clinico le informazioni necessarie per orientarsi nel complesso scenario che caratterizza oggi il trattamento dell'emofilia.

## 2. Il ruolo del laboratorio nella gestione del paziente emofilico

La gestione dell'emofilia e, più in generale, di tutte le malattie emorragiche congenite (MEC), necessita del supporto del laboratorio, non solo per la diagnosi, ma per tutte le fasi del percorso assistenziale del paziente. Il laboratorio è, infatti, indispensabile per attuare un corretto monitoraggio della terapia e per la personalizzazione della profilassi, con il sempre più frequente ricorso alle valutazioni della risposta farmacocinetica individuale alle diverse molecole di FVIII e FIX oggi disponibili. Il laboratorio è inoltre fondamentale per il monitoraggio dell'efficacia terapeutica in occasione di interventi chirurgici, per la sorveglianza e la titolazione dell'inibitore e per la valutazione della risposta all'induzione dell'immunotolleranza (ITI) nei pazienti con inibitore ad alto titolo (3).

## 3. Metodi di misura del FVIII e FIX

Sebbene il numero e la varietà dei farmaci oggi disponibili offrano l'opportunità di scegliere il trattamento più adeguato alle esigenze del paziente, garantendogli la migliore qualità di vita possibile, il loro uso comporta una serie di problemi inerenti il monitoraggio di laboratorio di molecole che differiscono considerevolmente tra loro per struttura biochimica.

La misura basale del fattore carente e quella post-infusionale del fattore sostituito può essere effettuata mediante due tipi di metodiche: il **metodo coagulante a uno stadio**, che si basa sul tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), misurato su un plasma carente di FVIII o di FIX (16-21) al quale vengono aggiunte diluizioni scalari del plasma del paziente, e il **metodo cromogenico** che, di converso, è a due stadi. Nel primo viene attivato il fattore X (FX) esogeno, in condizioni sperimentali in cui tutti i fattori della coagulazione (eccetto il fattore da misurare) sono aggiunti dall'esterno a concentrazioni ottimali (22-26); nel secondo il FX attivato (FXa) che si genera è misurato fotometricamente mediante un substrato cromogenico sintetico. In ambedue i metodi la misura eseguita in parallelo con un calibratore, tarato per il contenuto



del fattore da misurare rispetto ad uno standard di riferimento, consente il calcolo dei risultati del plasma paziente in termini di UI/dL. Ciascuno dei due metodi presenta vantaggi e limiti ed entrambi possono essere utilizzati nella pratica clinica. Per maggiori dettagli metodologici si rimanda agli specifici documenti che l'AICE, la World Federation of Haemophilia (WFH) e altre Società scientifiche del settore hanno prodotto sull'argomento (5,27,28).

#### 4. Discrepanze fra metodi di misura per la diagnosi di emofilia

Nel corso degli anni sono state osservate discrepanze nei livelli di FVIII/FIX misurati alla diagnosi di emofilia mediante i due metodi. Le ragioni di tali discrepanze non sono state ancora del tutto chiarite ma sembrano essere per lo più correlate alla presenza di specifiche varianti del gene *F8* o *F9* responsabili dell'emofilia (24,29-31). Le maggiori discrepanze sono state, descritte per l'emofilia A lieve (32-34). Di solito, i livelli di attività misurati con il metodo coagulante sono più elevati, rispetto a quelli osservati con il metodo cromogenico, sebbene in qualche caso si verifichi il contrario. L'uso del solo metodo coagulante potrebbe comportare, quindi, una mancata diagnosi (o la diagnosi di una forma meno grave) con conseguenti rischi per la sicurezza del paziente. Discrepanze tra metodo coagulante e cromogenico sono state osservate, ad esempio, per alcune varianti "missenso" del gene *F8*. Nel caso di mutazioni che coinvolgono regioni di interfaccia tra i domini A1-A2-A3 (ad es. Arg527Trp, Arg1749His, ecc.)<sup>1</sup>, si determinerebbe una più rapida dissociazione del dominio A2 con conseguente minore stabilità della molecola. In questi casi, il metodo cromogenico misurerebbe livelli più bassi perché adotta tempi di incubazione più lunghi. Al contrario, in caso di mutazione nei siti di clivaggio della trombina e di interazione con il FIXa (ad es. Glu321Lys, Ile369Thr, Arg1689His, ecc.), il metodo cromogenico misurerebbe livelli più elevati a causa dell'eccesso di trombina e FIXa presente nei reagenti (24,31). Differenze nei risultati ottenuti con il metodo coagulante utilizzando diversi reagenti per la determinazione dell'APTT, potrebbero influenzare anche la diagnosi di emofilia B (35). Una maggiore attività del FIX nei pazienti con emofilia B lieve, caratterizzata da bassi livelli di attività e normale concentrazione di antigene FIX (FIX:Ag), è stata riscontrata per i metodi coagulanti, eseguiti con reagenti del commercio, quali Actin-FS, rispetto all'attività determinata usando STA-PTT A o STA-CK PREST. Non sono, tuttavia, disponibili dati su tutti i reagenti APTT reperibili in commercio (36). In conclusione, la diagnosi di emofilia A (soprattutto se lieve o moderata) dovrebbe basarsi sull'esecuzione di entrambi i test (coagulante e cromogenico), mentre tale indicazione non trova ancora supporto per la diagnosi di emofilia B, a causa della mancanza di dati specifici. Inoltre, negli emofilici A, in caso si riscontri discrepanza tra i risultati delle misure del FVIII con i test coagulante e cromogenico, è opportuno valutare il genotipo del paziente e verificare se la variante del gene

---

<sup>1</sup> Per queste varianti geniche, come per quelle citate successivamente, è riportata la numerazione Legacy, che fa riferimento alla sequenza aminoacidica della proteina matura. Oggi, questa numerazione è stata superata da quella raccomandata dalla Human Genome Variation Society (HGVS) che, tenendo conto anche degli aminoacidi del peptide segnale (46 aminoacidi), identifica questi ultimi con il segno negativo (-). Nei database specifici, comunque, le varianti geniche sono, in genere, identificate utilizzando entrambe le nomenclature, proprio per agevolare l'interpretazione di dati pubblicati prima dell'anno 2000.

*F8* responsabile della malattia, nel caso specifico, sia descritta tra quelle associate a discrepanza nel database internazionale delle varianti di *F8* (<https://f8-db.eahad.org>). Sono state, infatti, riportate numerose varianti associate a discrepanza tra i due metodi di misura, sia nel senso di riscontro di valori di FVIII più elevati misurati con metodo coagulante, rispetto al cromogenico, sia in senso inverso con valori di misura del FVIII più elevati utilizzando il metodo cromogenico, rispetto a quanto rilevato con metodo coagulante. Segnalazioni a tal riguardo continuano a essere pubblicate in letteratura e vengono costantemente aggiornate nel database. Risulta utile, pertanto, consultare un genetista esperto nella materia, per una corretta identificazione delle varianti *F8* associate a discrepanza nella misura dei livelli di FVIII con metodo coagulante e cromogenico e per una più corretta interpretazione dei risultati ottenuti.

## **5. Discrepanze fra metodi di misura per il monitoraggio terapeutico**

Come accennato, i pazienti con emofilia devono essere monitorati mediante test di laboratorio per valutare l'entità del recupero di attività del fattore carente dopo infusione di prodotti sostitutivi e monitorare i livelli di FVIII/FIX mantenuti in circolo a distanza di vari tempi dalla somministrazione del prodotto. Questo aspetto è di fondamentale importanza per i pazienti in profilassi, qualora si vogliano valutare le caratteristiche farmacocinetiche del prodotto infuso e per l'individualizzazione del regime di profilassi, come pure in caso di intervento chirurgico, per garantire che siano somministrate dosi ottimali di concentrato nel periodo peri-operatorio e nelle varie fasi del post-operatorio.

Numerose osservazioni della pratica clinica e della letteratura documentano come il metodo di misura possa influenzare la determinazione del livello di attività del FVIII/FIX post-infusione e generare un elevato grado di incertezza. Nei paragrafi successivi saranno discusse le problematiche più importanti che si possono riscontrare con l'uso di differenti prodotti per la terapia sostitutiva in rapporto ai metodi di misura del livello di FVIII/IX circolante e le possibili soluzioni di tali problematiche.

### **5.1. Concentrati di FVIII ricombinante a emivita standard**

L'introduzione nella pratica clinica di nuove molecole di FVIII ricombinante ha evidenziato discrepanze, anche significative, nei risultati della misura del livello di FVIII circolante post-infusione. Un tipico esempio è dato dalla discrepanza fra le attività misurate con diversi metodi dopo infusione del FVIII ricombinante privo del dominio B (*moroctocog alfa*). I risultati sono fortemente influenzati dal metodo utilizzato: il metodo cromogenico fornisce risultati significativamente più elevati (20-50% circa) rispetto a quelli ottenuti utilizzando il metodo coagulante. Tale differenza può essere minimizzata usando come calibratore lo standard specifico fornito dal produttore, che riallinea i risultati ottenuti utilizzando il metodo coagulante a quelli derivanti dall'utilizzo del metodo cromogenico (37).

Un'altra discrepanza significativa è rappresentata dalla misurazione dei livelli di FVIII osservati in caso venga utilizzato per la terapia sostitutiva il FVIII ricombinante a catena singola, troncato

nel dominio B e nei primi 4 aminoacidi del dominio A3 (*lonoctocog alfa*) (38). In questo caso, la discrepanza fra i due metodi sembrerebbe costante e prevedibile, qualunque siano i livelli di FVIII raggiunti a seguito dell'infusione del prodotto contenente tale molecola. Secondo i dati di uno studio internazionale, infatti, la discrepanza osservata sembrerebbe poter essere annullata moltiplicando il risultato del metodo coagulante per un fattore di 2 che sarebbe, a giudizio degli autori, indipendente dal reagente APTT utilizzato (38). Altri autori hanno, non di meno, dimostrato come il ricorso al fattore di conversione 2 non sia valido ed applicabile a tutti i reagenti APTT (39) e a tutti i livelli di FVIII raggiunti in corso di trattamento, senza incorrere in significativi errori di giudizio e conseguente compromissione della sicurezza per il paziente.

## 5.2. Concentrati di fattori ricombinanti a emivita prolungata

Il problema della discrepanza tra metodo coagulante e cromogenico si è ulteriormente accentuato con l'introduzione nella comune pratica clinica delle molecole modificate di FVIII e FIX a emivita prolungata. Le strategie utilizzate per ottenere tali molecole comprendono: la fusione con il frammento Fc dell'immunoglobulina G1 e il legame a catene di polietilenglicole (PEG) di diverso peso molecolare, nel caso dei concentrati di FVIII e FIX, o la fusione con albumina ricombinante per un concentrato di FIX (Tabella 1).

**Tabella 1.** Caratteristiche dei concentrati di FVIII e FIX a emivita prolungata e discrepanze tra metodi di misura del FVIII/FIX in corso di trattamento

	Principio attivo	Molecola	Modifiche molecolari	Linea cellulare	Discrepanze tra metodi di misura del FVIII/FIX
FVIII	efmorotocog alfa (rFVIII-Fc)	BDD-rFVIII	Fusione con Fc IgG1	HEK	Non significative
	rurioctocog alfa pegol	FL-rFVIII	Pegilazione random, 20 kDa	CHO	Non significative
	damotocog alfa pegol	BDD-rFVIII	Pegilazione sito-specifica, 60 kDa	BHK	Generalmente sottostima con metodo coagulante reagenti silice
	turoctocog alfa pegol	BDT-rFVIII	Glico-pegilazione sito-specifica, 40 kDa	CHO	Possibile sottostima con metodo coagulante reagenti silice
FIX	albutrepenonacog alfa	rFIX	Fusione con albumina ricombinante	CHO	Dati limitati
	eftrenonacog alfa	rFIX	Fusione con Fc IgG1	HEK	Dati limitati
	nonacog beta pegol	rFIX	Glico-pegilazione sito specifica, 40 kDa	CHO	Notevole sottostima con metodo coagulante reagenti silice, minore per reagenti acido ellagico

BHK, Baby hamster kidney; BDD, B-domain delecto; BDT, B-domain troncato; CHO, Chinese hamster ovary; FL, full-length (catena integra); HEK, Human embryonic kidney; rFIX, fattore IX ricombinante; rFVIII, fattore VIII ricombinante.

### 5.2.1. Concentrati di FVIII ricombinante a emivita prolungata

Il prolungamento dell'emivita comporta un'alterazione della struttura terziaria della molecola di FVIII e determina modifiche del suo comportamento in rapporto al metodo utilizzato per la determinazione del livello di FVIII plasmatico circolante post-infusione. Molte di tali molecole sono state studiate *in vitro* allo scopo di identificare eventuali discrepanze nel loro dosaggio utilizzando metodi diversi. L'analisi critica dei risultati ottenuti evidenzia una situazione quanto mai variegata, anche in rapporto ai limiti e alle caratteristiche degli studi, che possono essere così riassunti:

- (i) molti studi sono stati eseguiti in un singolo centro;
- (ii) il disegno non era sempre idoneo e ben definito e, a volte, gli studi non erano del tutto indipendenti;
- (iii) le valutazioni sono derivate da analisi effettuate su campioni preparati in laboratorio aggiungendo al plasma carente la molecola di FVIII da studiare;
- (iv) spesso non è stata considerata (per il metodo coagulante) la platea dei reagenti presenti sul mercato;
- (v) in nessun caso sono stati tenuti in considerazione endpoint clinici.

Difficile, dunque, trarre indicazioni per la normale pratica clinica e il monitoraggio di laboratorio. Ciò nonostante, alcune osservazioni emerse dalla letteratura meritano di essere segnalate, al fine di una maggiore comprensione della complessità dell'argomento. Uno studio comparativo sulla proteina di fusione rFVIII-Fc (*efmoroctocog alfa*) ha dimostrato in campioni di plasma addizionati del prodotto un'attività media più elevata (20% circa) utilizzando il metodo cromogenico, rispetto a quanto atteso (40). Un recupero più elevato, ma di entità non significativa, è stato osservato in un altro studio in cui il metodo cromogenico veniva utilizzato per misurare l'attività del FVIII in campioni di pazienti trattati con questo prodotto (41). Inoltre, non sono state riscontrate differenze rilevanti nel recupero di FVIII misurato con diversi reagenti APTT. Gli autori concludono che entrambi i metodi, coagulante e cromogenico, possono essere usati per il monitoraggio di laboratorio dell'efficacia di *efmoroctocog alfa* (41). Un altro studio, utilizzando entrambi i metodi di misura, ha dimostrato una variabilità nel recupero intra- e inter-laboratorio paragonabile per il FVIII ricombinante a catena intera modificato mediante legame al PEG (*rurioctocog alfa pegol*), rispetto alla analoga molecola non *pegilata* (42). Inoltre, non sono state rilevate discrepanze significative tra i valori ottenuti con diversi metodi coagulanti, sebbene reagenti APTT contenenti acido ellagico/fenolo, come attivatore, abbiano mostrato una tendenza a un maggiore recupero, rispetto a reagenti contenenti silice o caolino. Per quanto riguarda il FVIII ricombinante B-domain troncato glicopegilato (*turoctocog alfa pegol*), non tutti i reagenti APTT utilizzati per il metodo coagulante hanno dato risultati concordanti. Taluni studi suggeriscono che l'attività del FVIII può essere misurata, con ragionevole accuratezza, utilizzando reagenti contenenti acido ellagico o caolino (43) ma

può essere notevolmente sottostimata qualora si utilizzino reagenti contenenti silice (43,44). Un recupero adeguato (definito come variabilità <30%) è stato osservato in campioni post-infusione di *turoctocog alfa pegol* per tre dei quattro metodi cromogenici disponibili. Lo stesso prodotto ha dimostrato una ridotta linearità delle misurazioni, con conseguente eccessivo recupero, per concentrazioni di FVIII di 0,2 UI/mL (45). *Damoctocog alfa pegol* ha dimostrato un recupero accettabile con il metodo cromogenico e, per il metodo coagulante, con reagenti APTT contenenti acido ellagico, mentre utilizzando reagenti contenenti silice si rilevava, generalmente, una sottostima dell'attività FVIII (46).

### 5.2.2. Concentrati di FIX ricombinante a emivita prolungata

Circa i livelli post-infusione osservati a seguito del trattamento sostitutivo con concentrati di FIX a emivita prolungata, l'uso del *nonacog beta pegol* determina una sovrastima dei livelli di FIX ottenuti mediante l'uso del metodo coagulante, rispetto al cromogenico. Tale sovrastima si riscontra per i reagenti APTT contenenti silice, come attivatore, ma è inferiore utilizzando reagenti contenenti acido ellagico (47). Le ragioni sono da attribuirsi all'adsorbimento del FIX sulle particelle di silice con conseguente attivazione che non si verifica, nella stessa misura, per il FIX nativo presente nel pool di plasma normale usato come calibratore (47). Dati assai limitati sono disponibili per *albutrepenonacog alfa*, proteina di fusione del FIX con albumina umana ricombinante e per *eftrenonacog alfa*, FIX ricombinante di fusione con Fc delle IgG1 (48-50).

### 5.3. Come risolvere il problema della discrepanza fra metodi

Le modifiche strutturali indotte nelle nuove molecole di FVIII e FIX per prolungarne l'emivita circolante, riducendone la clearance, comportano un'alterazione della struttura terziaria della molecola e determinano modifiche nel loro comportamento in rapporto al metodo utilizzato per il loro dosaggio. In teoria, entrambi i metodi, coagulante e cromogenico, possono essere usati per il monitoraggio dei livelli di FVIII/FIX raggiunti dopo infusione con tale tipo di concentrati. Tuttavia, le osservazioni, sommariamente riportate nei paragrafi precedenti, indicano non solo che l'uso dei due metodi può dar luogo a risultati discrepanti, ma che queste si registrano, a volte, anche nell'ambito del solo metodo coagulante in rapporto all'impiego di differenti reagenti per l'APTT. Il motivo principale risiede nel fatto che le misure di attività biologica dei fattori della coagulazione richiedono l'uso di un plasma standard di riferimento, analizzato in parallelo al plasma del paziente, in relazione al quale esprimere i risultati. Lo standard di riferimento è di norma rappresentato da un pool di plasma di donatori contenente FVIII o FIX nativo. Al contrario, il plasma del paziente in esame può contenere fattori modificati. A causa di queste modifiche strutturali, è difficile intravedere una soluzione definitiva del problema. Si possono, tuttavia, ipotizzare alcune opzioni che potrebbero ridurre al minimo l'impatto delle discrepanze sulla pratica clinica. Queste sono di seguito riportate e criticamente discusse:

1. Una soluzione potrebbe essere rappresentata dall'uso, come standard, della stessa molecola modificata di FVIII o FIX utilizzata per la terapia sostitutiva, fornita dal

produttore, avendone precedentemente determinato il titolo. Questa sarebbe la soluzione più logica, perché conforme al principio del paragone fra molecole simili per struttura e funzione (ben riassunto dalla dizione anglosassone "like-vs-like").

Lo svantaggio inerente è rappresentato dal fatto che questa applicazione, sebbene usata con successo in altre branche della medicina di laboratorio [ad esempio il dosaggio degli anticoagulanti orali diretti (51)], complicherebbe l'iter con la necessità di avere un numero di standard pari al numero dei prodotti utilizzati per la terapia sostitutiva. Inoltre, i clinici dovrebbero abbandonare il concetto (ovvio e ragionevole) di interpretare i risultati rispetto a uno standard, che di solito viene ritenuto prossimo o equivalente al 100% della norma.

2. Altra soluzione potrebbe essere l'uso per la misurazione del livello di FVIII o FIX post-infusione dello stesso metodo (coagulante o cromogenico) utilizzato dal produttore per determinare la potenza del prodotto riportata in etichetta.

I vantaggi di questa soluzione sono tanto ovvi da non richiedere ulteriore discussione. Tuttavia, è importante ricordare come le stesse autorità regolatorie (FDA e EMA) non hanno ancora trovato un accordo univoco circa il metodo da usare per l'assegnazione della potenza dei concentrati: la farmacopea americana suggerisce il metodo coagulante; quella europea il metodo cromogenico.

3. Alcuni esperti suggeriscono di usare il metodo più adatto al prodotto. Soluzione ragionevole, ma difficile da implementare nella generalità dei casi, a meno di avere una profonda conoscenza delle caratteristiche di ciascun prodotto derivante da osservazioni cliniche, che spesso mancano, e che sarebbero comunque difficili da generalizzare.
4. Una ulteriore opzione potrebbe essere data dall'uso del solo metodo cromogenico. Questa alternativa (pragmatica) avrebbe il vantaggio di sfozzare il numero di metodi con evidente beneficio sulla standardizzazione. Oltretutto, l'uso del metodo cromogenico comporterebbe ulteriori vantaggi: eliminerebbe la necessità di disporre del plasma carente (fonte non trascurabile di variabilità); sarebbe più semplice da adattare su tutti i coagulometri; sarebbe più facilmente standardizzabile e più vicino ai principi della chimica clinica largamente adottati presso i laboratori generali. Al momento il suo costo unitario (cioè per singolo test) è superiore a quello del metodo coagulante, ma è destinato a ridursi con la maggiore diffusione del metodo. In ogni caso, il costo più elevato inciderebbe in maniera infinitesimale, se paragonato a quello dei prodotti per la terapia sostitutiva da monitorare.

**In conclusione, per i prodotti per la terapia sostitutiva per i quali la discrepanza fra metodi di dosaggio di laboratorio è evidente, l'AICE riconosce il valore dell'uso preferenziale del metodo cromogenico e incoraggia tutti i laboratori associati ai Centri per l'emofilia a dotarsi, al più presto, della possibilità di utilizzare tale metodo per il dosaggio del FVIII e del FIX. Per quest'ultimo esistono ancora pochi kit commerciali e l'esperienza è ancora limitata.**

## 6. Nuove terapie non sostitutive e loro impatto sul laboratorio

Negli ultimi anni sono stati sviluppati approcci terapeutici innovativi mediante farmaci il cui meccanismo d'azione non si basa sulla sostituzione del fattore carente (FVIII o FIX). Dei diversi prodotti in studio preclinico e clinico, al momento per quattro farmaci sono disponibili maggiori informazioni da trial volti ad esplorarne l'efficacia in regimi di profilassi in pazienti emofiliaci con e senza inibitore (1,14,15). *Emicizumab* è un anticorpo monoclonale umanizzato bi-specifico che mima *in vivo* e *in vitro* la funzione procoagulante del FVIII, facilitando l'interazione fra il FIXa e il FX, con conseguente attivazione di quest'ultimo. *Fitusiran* è un farmaco che limita l'espressione dell'antitrombina determinando, di fatto, un ribilanciamento dell'emostasi, permettendo un'emostasi adeguata anche in assenza di FVIII o FIX. Sullo stesso principio si basa il meccanismo d'azione di *concizumab* e *marstacimab*, anticorpi monoclonali che inibiscono selettivamente il TFPI (inibitore della via del fattore tissutale). *Emicizumab* è stato approvato dalle autorità regolatorie per la profilassi dell'emofilia A con e senza inibitore, mentre *fitusiran*, *concizumab* e *marstacimab* sono ancora in valutazione in trial clinici di profilassi degli episodi emorragici in emofiliaci A e B con e senza inibitore. Vengono, pertanto, di seguito discusse solo le problematiche di laboratorio relative all'uso clinico di *emicizumab* (28,52,53).

In ragione delle sue proprietà farmacocinetiche e della sua lunga emivita (4-5 settimane), *emicizumab* viene somministrato per via sottocutanea con periodicità inferiore a quella tipica della terapia sostitutiva; la dose è fissa e non necessita di aggiustamento posologico sulla base di test di laboratorio. La misura della sua concentrazione (o attività) plasmatica non è generalmente necessaria ai fini clinici, ma potrebbe esserlo in alcune condizioni particolari. Questa può essere determinata utilizzando il metodo coagulante per il FVIII, opportunamente modificato, o il metodo cromogenico con reagenti di origine umana e calibratori plasmatici a concentrazioni di *emicizumab* certificate dal produttore (54). Durante la profilassi con *emicizumab* l'APTT e tutti i test di coagulazione che si basano su questo test (Tabella 2) non sono attendibili (55).

**Tabella 2.** Influenza di emicizumab sui test di laboratorio comunemente utilizzati nei pazienti con emofilia A

Test	Risultati in presenza di emicizumab	Indicazioni
Tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT)	Iper-reattivo (accorciamento)	Non può essere usato/interpretato*
FVIII coagulante	Iper-reattivo (valori normali o al di sopra della norma)	Non può essere usato/interpretato
FVIII coagulante "modificato" e calibrato con emicizumab	Reattivo ad emicizumab (dose dipendente)	Può essere usato per misurare la concentrazione di emicizumab
FVIII cromogenico (reagenti di origine UMANA)	Reattivo ad emicizumab (dose dipendente)	Può essere usato per misurare la concentrazione di emicizumab
FVIII cromogenico (reagenti di origine BOVINA)	Reattivo a FVIII (non sensibile ad emicizumab)	Può essere usato per misurare l'attività del FVIII in presenza di emicizumab
Metodo Bethesda basato sul metodo FVIII coagulante	Falsi negativi	Non può essere usato per titolare inibitori anti FVIII
Metodo Bethesda basato sul metodo FVIII cromogenico (reagenti di origine BOVINA)	Reattivo al FVIII	Può essere usato per titolare inibitori anti FVIII

\*Salvo nel caso si sospetti mancata aderenza al trattamento o perdita di efficacia del farmaco per sviluppo di anticorpi neutralizzanti anti-emicizumab (l'allungamento APTT si osserva per concentrazioni di emicizumab molto ridotte, <5µg/mL)

L'APTT risulterà sempre normale (o accorciato) fin dalle prime somministrazioni e per concentrazioni almeno pari a 5 µg/mL, valori molto inferiori a quelli che generalmente si riscontrano nel paziente emofilico che pratica un regime di profilassi (40-80 µg/mL) (54). Inoltre, il valore di APTT non rispecchia lo stato del sistema coagulativo *in vivo* e la misura dei livelli plasmatici di FVIII, eseguita con metodo coagulante a uno stadio, fornisce un valore artificialmente elevato (40). Pertanto, l'APTT e il FVIII coagulante, misurato con metodo coagulante, non solo sono inutili ai fini del monitoraggio clinico-terapeutico, ma potrebbero trarre in inganno il clinico, soprattutto in situazioni (emergenza, pronto soccorso) nelle quali il medico non specialista non è dotato della necessaria esperienza. L'APTT può, tuttavia, essere utile per rivelare una mancata aderenza al trattamento o la perdita di efficacia di *emicizumab* a causa dello sviluppo di anticorpi neutralizzanti il farmaco (*anti-drug antibody, ADA*). In questi casi l'APTT risulta allungato a causa della ridotta concentrazione in circolo del farmaco o della sua inattivazione (52,53).

In conseguenza della sua specie-specificità, *emicizumab* è completamente insensibile ai fattori di origine bovina. Questa proprietà è stata sfruttata per allestire un metodo cromogenico con reagenti di origine bovina che consente di determinare il titolo dell'inibitore contro il FVIII, con opportune modifiche del metodo Bethesda (54). Analogamente lo stesso metodo può essere usato per la misura del FVIII in pazienti che, in corso di profilassi con *emicizumab*, dovessero avere necessità di trattamento sostitutivo con concentrato di FVIII (54).

Per quanto riguarda gli altri test coagulativi comunemente usati, il tempo di protrombina (PT) è scarsamente influenzato da *emicizumab*, potendo risultare solo lievemente allungato (55). La misura del fibrinogeno basato su PT (PT-derivato) risulta, invece, sottostimata e per ottenere un valore attendibile è necessario usare il metodo Clauss (55). Altri fra i più comuni parametri coagulativi, descritti nella Tabella 3, possono essere influenzati dalla presenza di *emicizumab* (55).

**Tabella 3.** Influenza di *emicizumab* su altri test coagulativi

Test	Risultati in presenza di <i>emicizumab</i>	Indicazioni
PT	Non influenzato (o leggermente allungato)	Può essere usato/interpretato
Fibrinogeno (metodo PT-derivato)	Sottostimato	Non può essere usato/interpretato
Fibrinogeno (metodo Clauss)	Non influenzato	Può essere usato/interpretato
D-Dimero	Non influenzato	Può essere usato/interpretato
Tempo di Trombina	Non influenzato	Può essere usato/interpretato
Antitrombina	Non influenzata	Può essere usato/interpretato
Proteina C anticoagulante (basato su APTT)	Sottostimata	Usare il metodo cromogenico
Proteina S anticoagulante (basato su APTT)	Sottostimata	Usare la misura dell'antigene
Resistenza alla proteina C attivata (basato su APTT)	APC ratio ridotto	Non può essere usato/interpretato
Test per la ricerca del lupus anticoagulant (LAC)	Iper-reattivo	Non può essere usato/interpretato



## 7. Terapia genica

La possibilità di “correggere” il difetto genico nella sintesi del FVIII e FIX dell'emofilo (terapia genica) ha attratto da molti anni l'attenzione di ricercatori, clinici e pazienti e rappresenta una realtà terapeutica ormai alla vigilia di essere utilizzata nella normale pratica clinica (15). Per maggiori dettagli, il lettore può riferirsi a specifiche rassegne della letteratura (56,57). In questo documento interessa mettere a fuoco gli elementi che si generano a seguito di questo trattamento e che hanno un impatto sulle misure del FVIII e FIX. I geni inseriti nei vettori virali usati per la terapia, in particolare per quanto riguarda *F8*, sono modificati rispetto a quelli nativi. Questo determina la produzione di molecole di FVIII o FIX, rilasciate nel plasma, strutturalmente diverse dai corrispondenti fattori nativi. È, pertanto, facile capire come l'attività del fattore prodotto possa risentire del tipo di metodo (coagulante o cromogenico) usato per la sua misura. L'esperienza è ancora limitata ma i dati disponibili permettono di prevedere che, anche per questo tipo di terapia, si possano determinare gli stessi problemi di valutazione della efficacia e sicurezza rilevati per i prodotti ricombinanti modificati di cui abbiamo discusso nei paragrafi precedenti. Anche in questo caso è, perciò, prevedibile che le autorità regolatorie debbano intervenire, suggerendo il tipo di metodo più idoneo da usare nel monitoraggio di pazienti sottoposti a terapia genica.

## 8. Conclusioni

In considerazione dei punti di forza e dei limiti sia dei metodi coagulanti a uno stadio che dei metodi cromogenici, per la diagnosi di emofilia A lieve o moderata si rende necessario l'uso di entrambi i metodi. Il recupero del FVIII o FIX dopo infusione di prodotti ricombinanti modificati può variare in maniera considerevole a seconda del metodo di misura utilizzato (coagulante o cromogenico) e, nel caso si utilizzi il metodo coagulante, può essere influenzato dal tipo di reagente APTT usato, a seconda che contenga acido ellagico/fenolo, caolino o silice, come attivatore. I metodi cromogenici sono, al momento, usati meno frequentemente, ma la loro implementazione in tutti i laboratori di riferimento dei Centri Emofilia afferenti ad AICE è fortemente consigliata in quanto minimizza le discrepanze fra metodi per la misurazione dei livelli di FVIII o FIX raggiunti dopo l'infusione di prodotti per la terapia sostitutiva ed è utile per superare molti dei limiti associati ai metodi coagulanti. Particolare attenzione deve essere posta ai pazienti in trattamento con *emicizumab*. Molti dei test di laboratorio, abitualmente utilizzati per il monitoraggio dei pazienti che ricevono terapia sostitutiva, possono infatti non essere attendibili. È indispensabile che la comunicazione e la collaborazione tra i clinici esperti in emofilia e il personale che opera nel laboratorio di riferimento sia efficace, puntuale, continua ed esaustiva, al fine di garantire che i test siano sempre eseguiti utilizzando il metodo e i reagenti più idonei. Solo in tal modo è possibile garantire che i risultati siano correttamente interpretabili. Un'interazione ottimale tra clinici e operatori di laboratorio, auspicabilmente formalizzata in percorsi e documenti condivisi, può assicurare che le valutazioni diagnostiche e le conseguenti decisioni terapeutiche siano le più adeguate per ciascun paziente.

## Bibliografia

1. Muczynski V, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ. Emerging therapeutic strategies in the treatment of hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2017;43:581-90.
2. Sankar AD, Weyand AC, Pipe SW. The evolution of recombinant factor replacement for hemophilia. *Transfus Apher Sci* 2019;58:596-600.
3. Berntorp E, Boulyjenkov V, Brettler D, et al. Modern treatment of haemophilia. *Bull World Health Organ* 1995;73:691-701.
4. Rocino A, Coppola A, Franchini M, et al; Italian Association of Haemophilia Centres (AICE) Working Party. Principles of treatment and update of recommendations for the management of haemophilia and congenital bleeding disorders in Italy. *Blood Transfus* 2014;12:575-9.
5. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020 (Suppl 6):1-158.
6. Principi di trattamento e aggiornamento delle raccomandazioni per la terapia sostitutiva dell'emofilia A e B. A cura del Gruppo di Lavoro Linee Guida AICE e approvate mediante consultazione dei Soci il 17.05.2018. Disponibile alla pagina web: <https://aiceonline.org/?p=9792>. Accesso 28.06.2021.
7. Franchini M, Coppola A, Rocino A, et al; on behalf the Italian Association of Hemophilia Centers (AICE) Working Group. Systematic review of the role of FVIII concentrates in inhibitor development in previously untreated patients with severe hemophilia A: a 2013 update. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39:752-66.
8. Peyvandi F, Mannucci PM, Garagiola I, et al. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. *N Engl J Med* 2016;374:2054-64.
9. Franchini M, Santoro C, Coppola A. Inhibitor incidence in previously untreated patients with severe haemophilia B: a systematic literature review. *Thromb Haemost* 2016;116:201-3.
10. Björkman S, Collins P; Project on Factor VIII/Factor IX Pharmacokinetics of the Factor VIII/Factor IX Scientific and Standardization Committee of The ISTH. Measurement of factor VIII pharmacokinetics in routine clinical practice. *J Thromb Haemost* 2013;11:180-2.
11. Björkman S. Pharmacokinetics of plasma-derived and recombinant factor IX - implications for prophylaxis and on-demand therapy. *Haemophilia* 2013;19:808-13.
12. Oldenburg J. Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens. *Blood* 2015;125:2038-44.
13. Mannucci PM. Benefits and limitations of extended plasma half-life factor VIII products in hemophilia A. *Expert Opin Investig Drugs* 2020;29:303-9.

14. Castaman G, Linari S. Current and emerging biologics for the treatment of hemophilia. *Expert Opin Biol Ther* 2019 A;19:801-10.
15. Mannucci PM. Hemophilia therapy: the future has begun. *Haematologica* 2020;105:545-53.
16. Bates SM, Weitz JI. Coagulation assays. *Circulation* 2005;112:e53-60.
17. CLSI. One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test: approved guideline (H47-A2) In: Marlar RA, ed. Vol. 28, 2nd ed.; Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
18. Toulon P, Eloit Y, Smahi M, et al. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016;38:389-96.
19. Ingerslev I. Laboratory assays in hemophilia In: Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK. eds. *Textbook of Hemophilia*. Chichester, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2010.
20. Kitchen S, Preston E. Assay of factor VIII and other clotting factors In: Kitchen S, Olson J, Preston E, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*. 2nd ed Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell; 2013.
21. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, et al. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2013;35:1-13.
22. Moser KA, Adcock Funk DM. Chromogenic factor VIII activity assay. *Am J Hematol* 2014;89:781-4.
23. Kitchen S, Signer-Romero K, Key NS. Current laboratory practices in the diagnosis and management of haemophilia: a global assessment. *Haemophilia* 2015;21:550-7.
24. Potgieter JJ, Damgaard M, Hillarp A. One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A. *Eur J Haematol* 2015;94 (Suppl 77):38-44.
25. Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost* 2016;14:248-61.
26. Kitchen S, Blakemore J, Friedman KD, et al. A computer-based model to assess costs associated with the use of factor VIII and factor IX one-stage and chromogenic activity assays. *J Thromb Haemost* 2016;14:757-64.
27. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M, on behalf of the WFH Laboratory Council. *Diagnosis of hemophilia and other bleeding disorders – A laboratory manual*. Second Edition, 2010. Disponibile alla pagina web: <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1283.pdf>. Accesso 28.06.2021.
28. Tripodi A, Santoro RC, Testa S, et al. Position paper on laboratory testing for patients with haemophilia. A consensus document from SISET, AICE, SIBioC and SIPMeL. *Blood Transfus* 2019;17:229-36.

29. Loomans JI, van Velzen AS, Eckhardt CL, et al. Variation in baseline factor VIII concentration in a retrospective cohort of mild/moderate hemophilia A patients carrying identical F8 mutations. *J Thromb Haemost* 2017;15:246-54.
30. Oldenburg J, Pavlova A. Discrepancy between one stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hamostaseologie* 2010;30:207-11.
31. Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with nonsevere phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb Haemost* 2014;111:851-61.
32. Parquet-Gernez A, 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. *Thromb Haemost* 1988;59:202-6.
33. Duncan EM, 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;87:846-8.
34. Bowyer AE, Van Veen JJ, Goodeve AC, Kitchen S, Makris M. Specific and global coagulation assays in the diagnosis of discrepant mild hemophilia A. *Haematologica* 2013; 98:1980-7.
35. 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;15:365-8.
36. Park CH, Seo JY, Kim HJ, Jang JH, Kim SH. A diagnostic challenge: mild hemophilia B with normal activated partial thromboplastin time. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21:368-71.
37. Pouplard C, Caron C, Aillaud MF, et al. The use of the new ReFacto AF Laboratory Standard allows reliable measurement of FVIII: C levels in ReFacto AF mock plasma samples by a one-stage clotting assay. *Haemophilia* 2011;17:e958-62.
38. St Ledger K, Feussner A, Kalina U, et al. International comparative field study evaluating the assay performance of AFSTYLA in plasma samples at clinical hemostasis laboratories. *J Thromb Haemost* 2018;16:555-64.
39. Bowyer A, Key N, Dalton D, et al. The coagulation laboratory monitoring of AfstylA single-chain FVIII concentrate. *Haemophilia* 2017;23:e469-70.
40. Sommer M, Moore N, McGuffie-Valentine B, et al. Comparative field study evaluating the activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in plasma samples at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia* 2014;20:294-300.

41. Pouplard C, Caron C, Kitchen S, et al. High agreement rate between ellagic acid-based one-stage and chromogenic assays for rFVIII<sub>FC</sub> post infusion samples in the A-LONG study (Abstract) *J Thromb Haemost* 2016;14(Suppl 1):58.
42. Turecek PL, Romeder-Finger S, Apostol C, et al. A world-wide survey and field study FVIII in clinical hemostasis laboratories to evaluate FVIII:C activity assay variability of ADYNOVATE and OBIZUR in comparison to ADVATE. *Haemophilia* 2016;22:957-65.
43. Hillarp A, Bowyer A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring FVIII activity of glycopegylated recombinant FVIII, N8-GP with commercially available one stage clotting assay and chromogenic assay: a two-centre study. *Haemophilia* 2017;23:458-65.
44. Tiefenbacher S, Robinson MM, Ross EL, et al. Comparison of FVIII activity of select novel recombinant FVIII replacement products in commonly used FDA approved one-stage clot assay systems. (Abstract) *J Thromb Haemost* 2015;13 (Suppl 2):566.
45. Pickering W, Hansen M, Kjalke M, Ezban M. Factor VIII chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. *J Thromb Haemost* 2016;14:1579-87.
46. Gu JM, Ramsey P, Evans V, et al. Evaluation of the activated partial thromboplastin time assay for clinical monitoring of PEGylated recombinant factor VIII (BAY 94-2027) for haemophilia A. *Haemophilia* 2014; 20:593-600.
47. Rosén P, Rosén S, Ezban M, Persson E. Overestimation of N-glycoPEGylated factor IX activity in a one-stage factor IX clotting assay owing to silica-mediated premature conversion to activated factor IX. *J Thromb Haemost* 2016;14:1420-7.
48. St Ledger K, Fuessner A, Kalina U, Jacobs I, Voigt C, Bensen-Kennedy D. Performance of a recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rFIX-FP) in the one-stage assay. *Haemophilia* 2016;22(Suppl 4):60.
49. Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, et al. Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. *Blood* 2012;120:2405-11.
50. Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, et al. Comparative field study: impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIX<sub>FC</sub>) activity. *Thromb Haemost* 2014;112:932-40.
51. Tripodi A, Ageno W, Ciaccio M, et al. Position Paper on laboratory testing for patients on direct oral anticoagulants. A Consensus Document from the SISET, FCSA, SIBioC and SIPMeL. *Blood Transfus* 2018;16:462-470.
52. Castaman G, Santoro C, Coppola A, et al. Emergency management in patients with haemophilia A and inhibitors on prophylaxis with emicizumab: AICE practical guidance in collaboration with SIBioC, SIMEU, SIMEUP, SIPMeL and SISET. *Blood Transfus* 2020;18:143-51.

53. Coppola A, Castaman G, Santoro RC, et al. Management of patients with severe haemophilia a without inhibitors on prophylaxis with emicizumab: AICE recommendations with focus on emergency in collaboration with SIBioC, SIMEU, SIMEUP, SIPMeL and Siset. *Haemophilia* 2020;26:937-45.
54. Tripodi A, Chantarangkul V, Novembrino C, et al. Emicizumab, the FVIII mimetic bi-specific monoclonal antibody and its measurement in plasma. *Clin Chem Lab Med* 2020;59:365-71.
55. Adamkewicz JI, Chen DC, Ido Paz-Prie. Effects and Interferences of Emicizumab, a Humanised Bispecific Antibody Mimicking Activated Factor VIII Cofactor Function, on Coagulation Assays. *Thromb Haemost* 2019;119:1084-93.
56. Ling G, Nathwani AC, Tuddenham EG. Recent advances in developing specific therapies for haemophilia. *Br J Haematol* 2018;181:161–72.
57. Batty P, Lillicrap D. Hemophilia gene therapy: approaching the first licensed product. *Hemasphere* 2021;5:e340.



