



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

DOCUMENTO DI CONSENSO

PROCEDURE PER IL LABORATORIO DI EMOSTASI: TEST DI MISCELA E MISURA DEL FATTORE VIII E IX

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

Edizione Agosto 2022 - Revisione Febbraio 2023



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

DOCUMENTO DI CONSENSO

PROCEDURE PER IL LABORATORIO DI EMOSTASI: TEST DI MISCELA E MISURA DEL FATTORE VIII E IX

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

Edizione Agosto 2022 - Revisione Febbraio 2023

Presentazione

Come da scopi statutari, l'Associazione Italiana Centri Emofilia (AICE) dedica particolare impegno alla divulgazione scientifica sui problemi della diagnosi e trattamento dell'emofilia e delle altre malattie emorragiche congenite (MEC). In quest'ottica, viene proposto un Documento di Consenso dal titolo: *"Procedure per il Laboratorio di Emostasi: Test di Miscela e Misura del Fattore VIII e IX"*.

Com'è noto, la gestione del paziente emofilico richiede solide competenze cliniche e di laboratorio. In particolare, la sfida che oggi il laboratorio si trova a dover affrontare è di enorme rilevanza a fronte di due aspetti concomitanti. Negli ultimi anni abbiamo assistito a enormi progressi nel trattamento dell'emofilia, specie in regime di profilassi, grazie allo sviluppo di nuove molecole modificate di fattore VIII e IX ricombinanti, ma anche di nuovi farmaci mimetici della funzione del fattore VIII o, ancora, di farmaci che modificano l'equilibrio pro- vs. anticoagulante, fino ad approcci di terapia genica, strategie tutte estremamente innovative e impensabili fino a pochi anni orsono. Le molecole modificate, strutturalmente diverse rispetto al fattore nativo, o i farmaci che impiegano meccanismi d'azione diversi da quelli della terapia sostitutiva, impongono una revisione di alcuni 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 avere risvolti negativi. La presenza di un laboratorio specialistico dedicato presso il centro emofilia sembra destinata a essere un ricordo del passato. Molti dei laboratori specialistici sono stati integrati in strutture complesse apparentemente di più facile organizzazione e più vantaggiosi dal punto di vista economico. Ciò non è di per sé un male, a patto che il personale di laboratorio dei servizi centralizzati sia messo nella condizione di mantenere la competenza e la professionalità necessarie alle sfide che la moderna gestione dell'emofilia richiede. Per questi motivi, dunque, AICE ha prodotto un documento in lingua italiana, redatto secondo i canoni del consenso, stilato da un gruppo di esperti, prima, e con l'apporto e il contributo di tutti i Soci, dopo, che descrive in maniera semplice i principi dei due metodi per la misura dei fattori VIII e IX (coagulante e cromogenico) e l'esecuzione del test di miscela, altra procedura fondamentale nell'indagine di laboratorio per l'emostasi. Nel moderno laboratorio le analisi sono eseguite in maniera automatizzata da macchine che richiedono uno scarso intervento dell'operatore, che si limita, spesso, all'alimentazione dei reagenti e dei campioni. Ciò, da una parte assicura l'affidabilità della misura, dall'altra rischia di tradursi in una scarsa o mancata comprensione del metodo che sta alla base della misura e può portare a una involuzione culturale, o peggio ancora, all'incapacità di intervenire quando la macchina fallisce il suo compito.

Penso, allora, che la lettura e comprensione di questo documento possa essere utile per l'operatore di laboratorio, inducendo una maggiore attenzione a accuratezza e affidabilità dei test eseguiti e, di conseguenza, una migliore gestione del trattamento dell'emofilia che, oltre che sui criteri clinici, su quei test fa affidamento.

Desidero ringraziare Tiziano Martini del centro emofilia di Cesena, che ha curato la prima stesura del documento, i colleghi del Gruppo di Lavoro Qualità Laboratori dell'AICE (Coordinatori: A.C. Molinari e R.C. Santoro. Membri: L. Contino, R. De Cristoforo, A.B. Federici, S. Testa e A. Valpreda), il Consiglio Direttivo e, infine, tutti i soci AICE che hanno voluto fornire commenti e revisioni per una piena condivisione di tutti i principi riportati in 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 Angelo Claudio Molinari e Rita Carlotta Santoro e costituito da Laura Contino, Raimondo De Cristofaro, Augusto B. Federici, Tiziano Martini, Sophie Testa, Alessandra Valpreda, con la supervisione di Armando Tripodi, in qualità di esperto nominato dal Presidente AICE.

La prima stesura del documento è stata curata da Tiziano Martini. La versione risultante dalle revisioni dei membri del Gruppo di Lavoro Qualità dei Laboratori, cui ha contribuito Antonio Coppola, Segretario AICE, è stata approvata dal Consiglio Direttivo (Presidente: A. Rocino; Vice-Presidente: R.C. Santoro; Consiglieri: A.C. Molinari, C. Santoro, E. Zanon; Rappresentante ISS: A. Giampaolo) e dal Comitato Scientifico AICE (Presidente: A. Tripodi; Componenti: R. De Cristofaro, G. Di Minno, F. Peyvandi, M. Pinotti, P. Simioni) e inviata, quindi, a tutti i Soci via posta elettronica il 22/08/2022.

Hanno fatto pervenire commenti e/o proposte di revisione i Soci: Alessandra Borchiellini, Isabella Cantori, Dorina Cultrera, Anna Chiara Giuffrida, Lucia Dora Notarangelo, Bernardino Pollio e Rossana Rossi. La versione finale del documento è stata sottoposta ad approvazione dei Soci mediante consultazione online attraverso il sito ufficiale dell'AICE (www.aiceonline.org), indetta il 01/09/2022 e conclusasi il 23/09/2022.

Il documento è stato pubblicato sul sito dell'AICE in data 25/09/2022. Una nuova versione, con la revisione di alcuni dati delle tabelle del documento, è stata pubblicata in data 08/02/2023.

TEST DI MISCELA

1.	Introduzione	9
2.	Principio	9
3.	Materiali	10
4.	Metodi	10
5.	Affidabilità del test di miscela	11
6.	Pro e contro	12
	Riferimenti bibliografici	12

MISURA DELL'ATTIVITÀ COAGULANTE DEL FATTORE VIII 'A UNO STADIO'

1.	Introduzione	13
2.	Principio	13
3.	Materiali	14
4.	Metodi	16
5.	Sensibilità analitica della misura	18
6.	Pro e contro	18
7.	Uso	19
	Riferimenti bibliografici	19

MISURA DELL'ATTIVITÀ CROMOGENICA DEL FATTORE VIII

1.	Introduzione	21
2.	Principio	21
3.	Materiali	22
4.	Metodi	23
5.	Sensibilità analitica della misura	24
6.	Pro e contro	24
7.	Uso	25
	Riferimenti bibliografici	25

TEST DI MISCELA

1. Introduzione

Il test di miscela è relativamente semplice e rappresenta un importante strumento di indagine nel laboratorio di emostasi. Il test è volto a stabilire la causa dell'allungamento di un test di screening globale, come il tempo di protrombina (PT) e il tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), in special modo in pazienti per i quali non è nota, con certezza, la condizione clinica e la possibile causa del prolungamento [1]. Consiste nell'esecuzione del test risultato allungato, su una miscela costituita dal plasma del paziente e plasma "normale". Il test di miscela per aPTT ha lo scopo di discriminare se l'allungamento osservato nel plasma in esame sia dovuto alla carenza di uno o più fattori (F) fra quelli indagati da tale test (FXII, pre-callicreina, chininogeno ad alto peso molecolare, FXI, FIX, FVIII, FX, FV, FII, fibrinogeno), o alla presenza di un anticoagulante circolante diretto contro uno degli stessi fattori, oppure contro i fosfolipidi di membrana. Analogamente, il test di miscela per il PT permette di indagare la carenza di FVII, FX, FV, FII, fibrinogeno o la presenza di anticoagulanti circolanti diretti contro questi fattori. In considerazione delle caratteristiche comuni, in questo documento saranno descritte le procedure relative al test di miscela per aPTT.

2. Principio

La miscela, costituita da plasma del paziente e plasma normale, viene sottoposta alla misura dell'aPTT. Il rationale è che, se la causa dell'allungamento riscontrato è la carenza di uno o più fattori, il tempo di coagulazione della miscela si accorcerà e sarà più simile a quello del plasma normale [2]. Il plasma normale contiene, infatti, livelli di attività di tutti i fattori della coagulazione compresi fra 50 e 200 U/dL, con una media molto prossima a 100 U/dL, soprattutto se preparato da un pool di plasmi raccolti da un numero ragionevolmente elevato di soggetti normali. Ragionando per estremi, potremmo assumere che il plasma normale contenga un livello medio di attività di 100 U/dL di tutti i fattori della coagulazione e che il plasma del paziente sia totalmente carente per uno o più fattori; la miscela (in parti uguali) ottenuta avrà un livello di attività del/i fattore/i carente/i pari a 50 U/dL, ovvero un valore sufficiente per generare un risultato del test di coagulazione nell'intervallo di normalità.

Al contrario, la presenza di un anticoagulante circolante (un anticorpo diretto verso uno dei fattori della coagulazione o l'anticoagulante lupico, diretto contro i fosfolipidi) o, ancora, di farmaci anticoagulanti, come eparina o inibitori diretti del fattore II (protrombina) o del fattore X, cosiddetti DOAC (anticoagulanti orali ad azione diretta), non indurrà la normalizzazione del test eseguito sulla miscela. In questi casi, infatti, la presenza dell'anticoagulante circolante inibirà sia il/i fattore/i del paziente, sia quello/i del plasma normale. Occorre, inoltre, ricordare che alcuni anticoagulanti circolanti possono determinare un effetto inibitorio immediato, mentre altri necessitano di incubazione (due ore a 37°C). Esempi classici del primo e secondo caso sono, rispettivamente, gli anticoagulanti diretti contro i fosfolipidi (anticoagulanti lupici) e gli inibitori diretti contro il FVIII. Tuttavia, pur essendo la tempo-dipendenza una regola generale, essa prevede alcune eccezioni. Ad esempio, inibitori del FVIII, se ad alto titolo, possono avere sulla miscela un effetto immediato, mentre assai raramente gli anticoagulanti lupici necessitano

di incubazione [1,3,4]. Da queste considerazioni deriva l'esigenza di eseguire, in alcune situazioni, in base a opportune valutazioni di tipo clinico-anamnestico, test di miscela senza e con incubazione (v. oltre).

3. Materiali

3.1 Strumentazione

Il test di miscela per PT/aPTT può essere eseguito allestendo manualmente la miscela, oppure in maniera automatizzata, su coagulometri che dispongano dell'apposito algoritmo [1].

3.2 Reagenti

- Reagenti aPTT:
 - Tromboplastina parziale
 - Attivatore
 - Fosfolipidi
 - Cloruro di calcio
 - Soluzione tampone
- Pool di plasma normale (PPN)
- Plasma in esame

3.3 Pool di plasma normale (PPN)

Il PPN dovrebbe essere preparato a partire da una miscela di plasmi (in parti uguali) di almeno 20 soggetti adulti sani (preferibilmente in egual rapporto maschi/femmine), con storia personale e familiare negativa per malattie emorragiche o trombotiche, così da avere un livello di attività, per ciascun fattore della coagulazione, attorno a 100 U/dL [1,3]. Inoltre, dovrebbe avere un basso numero di piastrine residue su ciascun plasma e sul pool ($<10 \times 10^9/L$) e dovrebbe essere documentata l'assenza dell'anticoagulante lupico.

Il PPN può essere preparato in casa, mescolando i plasmi normali in un recipiente di plastica e suddividendolo in piccole aliquote in provette di plastica con tappo. Le aliquote saranno poi congelate rapidamente e conservate a $-70^{\circ}C$, temperatura alla quale è garantita la stabilità dei singoli fattori della coagulazione per almeno un anno. Poco prima dell'uso, le aliquote saranno scongelate rapidamente per esposizione (max 2-3 minuti) in bagno termostatico a $37^{\circ}C$, omogeneizzati per rapide inversioni delle provette in cui sono contenute e usate entro 2 ore. Si possono usare PPN liofilizzati del commercio che presentino le stesse caratteristiche.

4. Metodi

4.1 Test di miscela senza preincubazione

Una miscela di eguali volumi (rapporto 1:1) viene realizzata con PPN e plasma del paziente, e su questa si esegue l'aPTT [1,3,5-7]. Parallelamente, come controllo, viene eseguito l'aPTT sul PPN. Chang et al [8] hanno suggerito che la correzione dell'aPTT, in un test di miscela 4:1 (4 parti del plasma del paziente + 1 parte di PPN) possa presentare una sensibilità e una specificità maggiore, rispetto al test di miscela 1:1, soprattutto là dove la potenza dell'anticoagulante fosse relativamente debole.

4.2 Test di miscela con preincubazione

La miscela viene incubata a 37°C per 60-120 minuti, per documentare l'eventuale presenza di un inibitore tempo-dipendente; al termine dell'incubazione viene eseguito l'aPTT. È importante incubare anche il plasma paziente e il PPN separatamente, eseguendo poi l'aPTT come controllo [1,4].

4.3 Interpretazione dei risultati

Uno dei punti cruciali del test di miscela è l'interpretazione del risultato. Sono state proposte diverse metodologie, che saranno di seguito discusse.

4.3.1 Metodo del range di normalità

Si valuta se il valore dell'aPTT misurato sulla miscela rientra nel range di normalità, determinato presso il laboratorio e valido per lo stesso reagente in combinazione con il coagulometro usato per la misura. Il vantaggio di questo metodo è, senza dubbio, la facilità e l'immediatezza. È un metodo relativamente robusto nei casi in cui l'aPTT del plasma in esame è francamente prolungato. Mostra, però, la sua debolezza nelle situazioni in cui l'aPTT è solo lievemente allungato. In questo caso, la miscela potrebbe determinare un aPTT nel range di normalità, sia nel caso di un deficit di fattore, sia nel caso di un inibitore a basso titolo (per una pseudo-correzione, ovvero una semplice diluizione dell'inibitore) [5,9].

4.3.2 Metodo dell'indice di anticoagulante circolante (ICA)

L'ICA (o indice di Rosner), inizialmente sviluppato per la ricerca dell'anticoagulante lupico [10], è definito dalla seguente formula:

$$ICA = [(TC_{\text{miscela}} - TC_{\text{PPN}}) / TC_{\text{paziente}}] \times 100$$

dove TC rappresenta il tempo di coagulazione. Si tratta di un calcolo relativamente facile che può essere implementato sui moderni coagulometri. Maggiore è il valore numerico dell'ICA, più alta è la probabilità che la miscela non corregga l'aPTT. Il valore di cut-off è di solito attorno a 10-15% [1,3,4,10,11], ma dipende dal reagente/strumento usato e, pertanto, deve essere determinato in maniera specifica dal laboratorio su un congruo numero di campioni di plasma di soggetti normali.

5. Affidabilità del test di miscela

Dal test di miscela ci si attende una ragionevole certezza di discriminazione tra situazioni di carenza di fattore/i e presenza di un anticoagulante circolante. La performance dipende in prima istanza dalla composizione dei reagenti del test oggetto dello studio. Esiste in commercio una notevole varietà di reagenti a diversa composizione e con diversa sensibilità alla carenza di fattori, piuttosto che alla presenza di anticoagulante lupico. Inoltre, l'efficacia del test è influenzata dall'entità del prolungamento del aPTT del paziente. È più probabile che il test di miscela dia risultati affidabili e facilmente interpretabili, se il tempo di coagulazione del plasma del paziente è francamente prolungato. Utile, in ogni caso, acquisire un'esperienza diretta con il reagente in uso, magari facendo delle simulazioni con plasmi noti per carenza o per presenza di inibitori (anticoagulante lupico o inibitori diretti contro fattori della coagulazione).

6. Pro e Contro

6.1 Pro

1. Metodologia relativamente semplice
2. Utile anche per la ricerca dell'anticoagulante lupico
3. Test poco costoso e di facile automatizzazione

6.2 Contro

1. Difficoltà di interpretazione del risultato qualora il tempo di coagulazione del paziente fosse scarsamente prolungato
2. Necessità di stabilire cut-off specifici per l'interpretazione dei risultati
3. Non è sempre possibile attribuire i costi da imputare al paziente o al servizio sanitario regionale, poiché nei prontuari regionali il test miscela non è spesso considerato fra le procedure codificate erogabili.

Riferimenti bibliografici

1. Kershaw G. Performance and interpretation of mixing tests in coagulation. In: Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols. Ed. Favaloro EJ, Lippi G. 2017; chapter 6, 85-90.
2. Favaloro E. Coagulation mixing studies: Utility, algorithmic strategies and limitations for lupus anticoagulant testing or follow up of abnormal coagulation tests. *Am J Haematol* 2020;95:117-28.
3. Kershaw G, Orellana D. Mixing tests: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin times. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:283-90.
4. Kershaw G, Detection and measurement of factor Inhibitors. *Methods Mol Biol* 2017; 1646:295-304.
5. Mohammed S, Ule Priebbenow V, Pasalic L, Favaloro EJ. Development and implementation of an expert rule set for automated reflex testing and validation of routine coagulation tests in a large pathology network. *Int J Lab Hematol* 2019;41:642-9.
6. Pengo V, Bison E, Banzato A, Zoppellaro G, Jose SP, Denas G. Lupus anticoagulant testing: diluted russell viper venom time (dRVVT). *Methods Mol Biol* 2017;1646:169-76.
7. Tripodi A, Chantarangkul V. Lupus anticoagulant testing: activated partial thromboplastin time (APTT) and silica clotting time (SCT). *Methods Mol Biol* 2017;1646:177-83.
8. Chang S, Tillema V, Scherr D. A "percent correction" formula for evaluation of mixing studies. *Am J Clin Pathol* 2002;117:62-73.
9. Blennerhassett R, Favaloro EJ, Pasalic L. Coagulation studies: achieving the right mix in a large laboratory network. *Pathology* 2019;51:718-22.
10. Rosner E, Pazner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 1987;57:144-7.
11. Benzon HT, Park M, McCarthy RJ, Kendall MC, Lindholm PF. Mixing studies in patients with prolonged activated partial thromboplastin time or prothrombin time. *Anesth Analg* 2019;128:1089-96.

MISURA DELL'ATTIVITÀ COAGULANTE DEL FATTORE VIII 'A UNO STADIO'

1. Introduzione

Le misure di attività "a uno stadio" (OSA, one-stage assay), basate sul tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), sono largamente usate per misurare l'attività biologica procoagulante dei fattori della coagulazione che sono considerati, nella visione "classica" e (molto) semplificata della cascata coagulativa, appartenenti alla via "intrinseca" della coagulazione, ovvero i fattori (F) VIII, IX, XI e XII.

Il termine "a uno stadio" sta a significare che le misure in questione consistono in un'unica reazione, come nell'aPTT. Si realizza cioè un aPTT "modificato", il cui risultato è la misura del tempo necessario per la formazione del coagulo.

2. Principio

Le misure OSA per il FVIII si basano sulla capacità del plasma del paziente di correggere il prolungamento dell'aPTT di un plasma totalmente carente per il fattore. Questa correzione è confrontata con quella determinata da un plasma standard con livelli noti e certificati di FVIII (Figura 1).

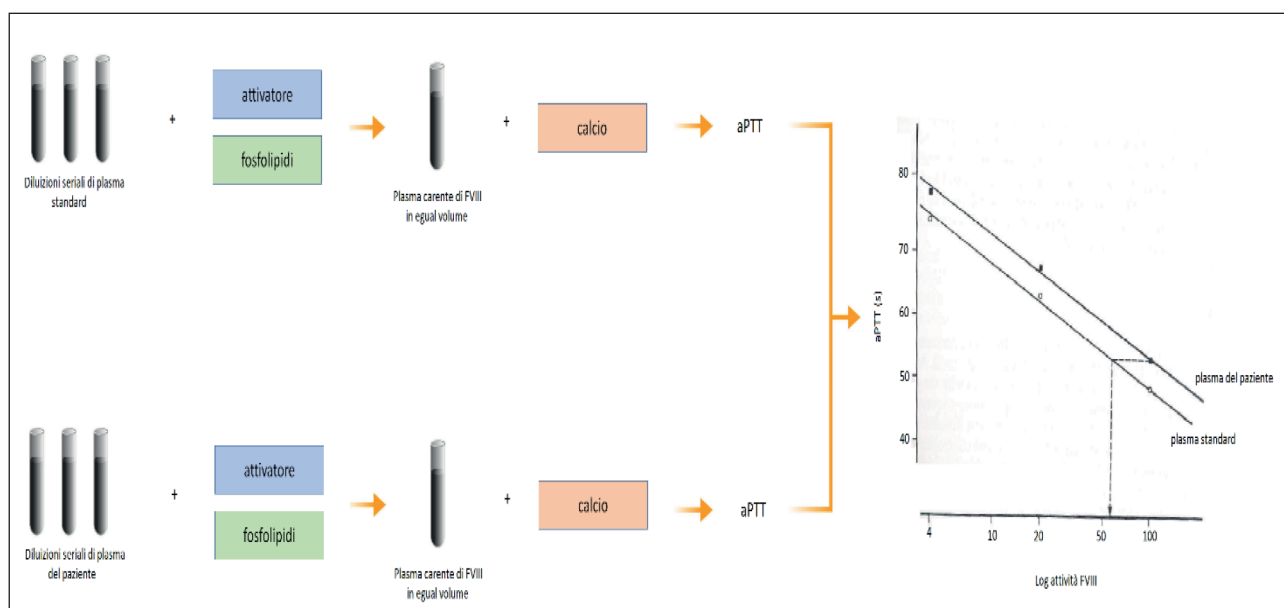


Figura 1. Rappresentazione schematica della misura di attività coagulante mediante OSA del FVIII. Nell'esempio illustrato le diluizioni del plasma del paziente e dello standard sono 1:10, 1:50 e 1:250. Come si vede dal grafico dell'esempio citato (v. testo per maggiori dettagli), l'attività del FVIII nel plasma del paziente corrisponde a 57 U/dL. Lo standard presenta una potenza di 85 U/dL, rispetto allo standard internazionale di riferimento; pertanto, il risultato finale della misura del livello di FVIII nel plasma del paziente è $(57 \times 85)/100 = 48$ UI/dL. In caso il plasma del paziente sia stato diluito in maniera maggiore o minore, rispetto allo standard, il risultato finale dovrà essere moltiplicato o diviso per il fattore di diluizione.

Il primo test diagnostico per l'emofilia A fu messo a punto nel 1953 e si basava sull'evidenza che il plasma di un soggetto emofilico mostra, rispetto a quello di un soggetto normale, un aPTT prolungato che viene corretto dall'aggiunta di un plasma normale. La metodica proposta dagli autori consisteva nella quantificazione dell'attività del fattore antiemofilico attraverso il grado di questa correzione [1].

Con lo stesso principio metodologico è possibile misurare anche l'attività biologica del FIX. In questo caso, reagenti e metodica sono gli stessi, ma il plasma substrato è carente di FIX, anziché FVIII, e il plasma standard è calibrato in termini di FIX.

3. Materiali

3.1 Strumentazione

Le misure OSA possono essere eseguite in modalità completamente automatizzata su tutti i moderni coagulometri, benché essi utilizzino due diverse tipologie di rilevazione finale della formazione del coagulo: foto-ottica o elettromeccanica. Nella modalità foto-ottica la formazione del coagulo è misurata valutando la variazione di densità ottica (ΔDO) del campione; con la modalità elettromeccanica, un sensore di movimento rileva nel campione in esame la formazione della fibrina. Uno studio su oltre 2.000 determinazioni ha dimostrato una sostanziale equivalenza fra le due metodiche [2].

3.2 Reagenti

- Plasma carente di FVIII
- Plasma standard contenente FVIII a livello noto
- Plasma del paziente
- Reagenti per la determinazione dell'aPTT:
 - Tromboplastina "parziale" (priva di fattore tissutale)
 - Attivatore (in grado di innescare la via di contatto, convertendo il FXII in FXIIa).
 - Fosfolipidi (esercitano in vitro il ruolo esercitato in vivo dalle piastrine).
 - Cloruro di calcio (funzionale alla reintroduzione degli ioni calcio chelati dall'anticoagulante presente nel sangue citratato).
 - Soluzione tampone (per eseguire le diluizioni).

3.3 Plasma carente di FVIII

Il plasma carente deve contenere livelli di FVIII pari a zero (o <1 U/dL) in maniera che il livello di attività di FVIII del paziente sia l'unico determinante del tempo di coagulazione misurato con l'aPTT.

Inoltre, secondo le raccomandazioni CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) [3], il plasma carente deve avere le seguenti caratteristiche:

- Privo di inibitore
- Livelli di attività degli altri fattori della coagulazione (incluso il fattore di von Willebrand, VWF) normali.

Il plasma carente può essere quello di un paziente con emofilia A grave (plasma carente congenito), o ottenuto da un plasma normale trattato con metodiche di immunoadsorbimento o deplezione chimica del FVIII. Il plasma carente congenito di FVIII non viene quasi più utilizzato. In esso, infatti, il FVIII residuo, a causa della profilassi con concentrati di FVIII praticata dal paziente, non sempre è <1 U/dL. Inoltre, questo tipo di plasma può contenere inibitori e potrebbe essere potenzialmente rischioso per l'operatore, a causa della presenza di agenti patogeni responsabili di infezioni trasmissibili. Il plasma carente più usato è ottenuto per lo più mediante metodiche di immunoadsorbimento con anticorpi anti-FVIII umano e può presentare livelli di VWF ridotti, che possono impattare,

in maniera considerevole, sui livelli misurati di FVIII. In particolare, i plasmi carenti artificiali hanno dimostrato, in talune osservazioni, una potenza misurata fino a due volte inferiore rispetto a quella misurata con plasmi carenti congeniti [4]. In alcuni plasmi carenti di FVIII del commercio, il VWF è potenziato ad hoc. Inoltre, è opportuno considerare che durante il processo di produzione si possono generare minime quantità di FV attivato, che potrebbero causare un accorciamento del tempo di coagulazione, inducendo misure di livelli di attività falsamente elevati.

3.4 Plasma standard

È un plasma con livelli noti di FVIII, che rappresenta il riferimento per la misura del FVIII nel plasma del paziente. Per tale ragione, le autorità di standardizzazione raccomandano che i plasmi standard commerciali siano realizzati e calibrati contro uno standard internazionale di riferimento "*primario*", custodito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) [5]. Gli standard commerciali possono essere usati direttamente come "standard secondari" o usati per la calibrazione degli standard "*locali*", che i singoli laboratori possono mettere a punto. Questo tipo di calibrazione iterativa consente di risparmiare notevoli quantità di standard primari di riferimento, lasciando inalterata la continuità e tracciabilità del sistema. Gli standard primari di riferimento hanno un valore assegnato in unità internazionali (IU). 1 IU è definita come la quantità (attività) dell'analita presente in 1 mL di un pool di plasma fresco normale [6]. L'assegnazione della potenza del primo standard primario era basata sull'analisi di un pool di plasmi normali collezionati ad hoc e considerata arbitrariamente come 1 U/mL. Al primo standard storico sono seguiti numerosi altri, preparati in successione e ognuno calibrato contro il suo predecessore, in maniera da mantenere la continuità del sistema. La preparazione, calibrazione e custodia degli standard è affidata dalla WHO al National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). L'attuale standard WHO per il FVIII è l'ottavo della serie ed è stato stabilito nel 2010 [7]. L'ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis), tramite il suo comitato di standardizzazione (SSC), si occupa della calibrazione degli standard "*secondari*", che sono forniti ai laboratori clinici e ai fabbricanti di reagenti per calibrare le loro preparazioni [8].

3.5 Attivatore

Gli attivatori usati per l'aPTT sono sostanze in grado di sostenere una reazione di attivazione da contatto delle componenti della cascata coagulativa definite "*sistema di contatto*", soprattutto il FXII ma anche il chininogeno ad alto peso molecolare e la precallicreina.

Gli attivatori possono essere di natura particolata e inorganica (caolino, silice micronizzata) o solubili e organici (acido ellagico, fosfatidi vegetali) [9,10]. Il caolino è attualmente poco usato a causa della sua opacità che rende difficoltosa la lettura foto-ottica dei coagulometri. Gli attivatori non hanno tutti la stessa sensibilità analitica nel rilevare carenze di FVIII, in particolare nei deficit lievi [9]. Difficile dare informazioni generalizzabili sul tipo di attivatore in relazione alla sensibilità analitica, perché questa dipende, in buona misura, dalla combinazione di attivatore, fosfolipidi e tipo di coagulometro. La **Tabella 1**, riporta la composizione dei reagenti commerciali di più largo uso.

Tabella 1. Principali reagenti per aPTT e rispettivo attivatore.

Nome commerciale	Azienda produttrice	Attivatore
APTT SynthASil	Werfen	Silice
APTT-SP	Werfen	Silice
Pathromtin SL	Siemens	Silice
STA-PTT Automate	Stago	Silice
Triniclot Auto/HS	Stago	Silice
APTT SynthAFax	Werfen	Acido Ellagico
Actin FS/FSL	Siemens	Acido Ellagico
DG Synth	Grifols	Acido Ellagico
CK Prest	Stago	Caolino

3.6 Fosfolipidi

La componente fosfolipidica (il cui compito è riprodurre in vitro la funzione della superficie piastrinica) varia nei diversi reagenti per la determinazione dell'aPTT, sia per origine (cervello animale, soia o sintetica) che per composizione (fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositolo, fosfatidiletanolamina, sfingomieline, ecc.) [9,10]. La qualità e quantità dei fosfolipidi rappresentano, probabilmente, i principali determinanti della maggiore o minore sensibilità analitica dell'aPTT agli anticorpi anti-fosfolipidi. La sensibilità del OSA al FVIII può essere influenzata sia dalla composizione dei fosfolipidi che dalla concentrazione degli stessi. Difficile, allo stato attuale delle conoscenze, ricavare informazioni precise dai dati della letteratura disponibile.

3.7 Soluzione tampone

Il plasma standard e il plasma paziente sono diluiti in modo da prolungare i tempi di coagulazione, creando così una finestra di discriminazione più ampia per l'interpretazione dei risultati. Infatti, se si usasse plasma non diluito, non sarebbe possibile distinguere un deficit di FVIII lieve da uno moderato, poiché i risultati dell'aPTT sarebbero molto simili. Le diluizioni vengono eseguite impiegando soluzioni tampone (pH 7,4), contenenti Imidazolo o il tampone di Owren.

4. Metodi

4.1 Curva di calibrazione

Quanto di seguito riportato è valido in linea generale, ma ci possono essere variazioni in rapporto all'uso di specifici reagenti e coagulometri. Pertanto, si raccomanda di seguire le istruzioni che accompagnano i kit commerciali.

La curva di calibrazione è costruita preparando diluizioni seriali del plasma standard in soluzione tampone che vengono, poi, mescolate con un egual volume di plasma carente; su queste viene eseguito l'aPTT.

La diluizione di partenza può variare in base alla strumentazione o al tipo di reagente ma, in genere, è 1:10 (1 parte di plasma + 9 parti di tampone) [11]. Essa viene arbitrariamente considerata come contenente FVIII a livello pari a 100 U/dL anche se, in realtà, il livello di

attività del FVIII è quello assegnato dal produttore. Si eseguono, successivamente, ulteriori diluizioni scalari che, secondo le raccomandazioni CLSI [3] e le più recenti linee guida della World Federation of Hemophilia (WFH) [12], debbono essere non meno di tre (1:10, 1:20, 1:40). Le diverse diluizioni saranno modulate secondo un fattore fisso che varia, solitamente, da 2 a 5. Si allestisce, quindi, una miscela, utilizzando ciascuna diluizione del plasma standard e il plasma carente, in rapporto 1:1 (1 parte di plasma standard diluito + 1 parte di plasma carente). Su questo materiale si esegue l'aPTT. I tempi di coagulazione ottenuti sono riportati in un grafico per la cui costruzione si usa, in genere, una scala lineare (asse verticale) per i tempi di coagulazione e una scala log per le diluizioni (o meglio attività di FVIII) sull'asse orizzontale (**Figura 1**) [13]. I punti vengono rappresentati da una linea retta, che nei moderni coagulometri è tracciata automaticamente e che l'algoritmo del coagulometro usa per convertire i tempi di coagulazione determinati nel plasma del paziente (trattato alla stessa maniera dello standard) in attività FVIII.

4.2 Plasma del paziente

Secondo il principio del metodo di misura di attività biologica, il plasma del paziente deve essere sottoposto allo stesso trattamento del plasma standard.

Di norma, vengono eseguite le stesse diluizioni scalari eseguite per il plasma standard, utilizzando il tampone, e ciascuna diluizione viene addizionata con un pari volume di plasma carente, prima di eseguire l'aPTT. Le diluizioni del plasma da esaminare possono essere diverse da quelle usate per il plasma standard e sono, di solito, scelte sulla base dei valori attesi di FVIII, in maniera che i tempi di coagulazione della curva paziente siano simili, ma più lunghi di quelli della curva standard [13].

I risultati ottenuti sul plasma del paziente vengono riportati nello stesso grafico sul quale sono stati riportati quelli del plasma standard, ottenendo una curva che avrà la stessa pendenza di quella relativa allo standard, ma che differisce per intercetta sull'asse verticale. La distanza fra le due rette è funzione della diversa potenza biologica fra standard e plasma in esame (**Figura 1**). Nel caso le due rette non fossero parallele, qualora si possa escludere un errore metodologico, ci si trova di fronte a una delle seguenti condizioni [15]:

1. La presenza di anticoagulanti circolanti (inibitore anti-FVIII o contro altri fattori, oppure anticoagulante lupico);
2. Assai più raramente, presenza di eparina o altri farmaci anticoagulanti.

In generale, in tutte queste situazioni l'attività del FVIII aumenta, progressivamente, in funzione delle maggiori diluizioni.

Il passaggio finale è l'estrapolazione del livello di attività di FVIII del plasma del paziente, rispetto allo standard. Nel procedimento manuale si traccia una linea verticale perpendicolare, in corrispondenza della diluizione di partenza (1:10), definita arbitrariamente come 100 U/dL, fino a intersecare ambedue le curve (standard e paziente). Si traccia una linea orizzontale dal punto di incontro fra la linea precedente e la retta del paziente, fino a incontrare la retta dello standard. Dal punto di intersezione con quest'ultima si traccia una linea, verticale, che raggiunge l'asse orizzontale (**Figura 1**). Il punto di intersezione sull'asse orizzontale corrisponde all'attività (in U/dL) del FVIII del paziente. Tale valore dovrà essere corretto per l'attività di FVIII nel plasma standard, secondo la formula:

$$(C \times P)/100$$

dove C è l'attività certificata del plasma standard e P il valore dell'attività del plasma rilevato nel

plasma del paziente, come derivato dal grafico [13].

Ovviamente, un calcolo esclusivamente grafico e manuale comporta un certo grado di approssimazione. I coagulometri di ultima generazione sono dotati di software in grado di fornire all'operatore:

- La curva di calibrazione del plasma standard (che viene sottoposta a validazione mediante la valutazione del coefficiente di correlazione) e quella del plasma del paziente;
- Il numero e il grado delle diluizioni;
- Gli aPTT e i livelli di attività del FVIII corrispondenti a ognuna delle diluizioni.

Il metodo di calcolo sopra descritto, basato sul principio delle rette parallele, non è sempre applicato. Molti laboratori utilizzano metodi di calcolo semplificati, che prevedono una curva di taratura costruita secondo tre diluizioni scalari per lo standard e una sola per il plasma paziente. Questa modalità di calcolo ha il vantaggio della semplicità e può essere usata per la misura del FVIII in situazioni generali, ma non dovrebbe essere usata per la gestione del paziente emofilico. AICE raccomanda il calcolo per rette parallele, come sopra descritto, che consente di verificare il parallelismo, principio base del metodo biologico di misura delle attività. Tutti i coagulometri di ultima generazione sono in grado di eseguire il calcolo semplificato, ma anche quello per rette parallele e là dove lo strumento non prevede quest'ultima modalità, è possibile costruire (con l'aiuto di personale esperto dell'azienda produttrice) dei semplici algoritmi di calcolo implementabili su pc.

5. Sensibilità analitica della misura

La sensibilità analitica della misura OSA per il FVIII è definita come la capacità del metodo di identificare bassi livelli di fattore e/o la capacità di distinguere due campioni con attività simile, ma non identica. Pertanto, un metodo sensibile dovrebbe consentire, non solo di identificare le carenze tipiche dell'emofilico grave (<1 U/dL), ma anche di discriminare fra livelli attorno a 1 U/dL, rispetto a livelli attorno a 3 U/dL. La sensibilità di OSA dipende essenzialmente dall'attivatore e dai fosfolipidi [9]. Numerose sono le composizioni dei reagenti commerciali in termini di attivatore e fosfolipidi e questo spiega la grande variabilità in termini di sensibilità analitica dei prodotti in commercio. A questo bisogna aggiungere che, spesso, la sensibilità dell'aPTT potrebbe essere buona per l'anticoagulante lupico e/o eparina, ma più scarsa per i singoli fattori, o viceversa. Tutto ciò rende problematica una scelta univoca nel caso il laboratorio possa disporre di un solo reagente per usi multipli.

6. Pro e Contro

6.1 Pro

1. Ampia disponibilità di reagenti commerciali ad alta stabilità, ideali per l'automazione sui coagulometri
2. Costi contenuti
3. Familiarità con il metodo da parte dell'operatore e consolidata esperienza nella pratica clinica.

6.2 Contro

1. Alta variabilità inter-laboratorio a causa della disponibilità di molti reagenti commerciali a

diversa composizione: fosfolipidi (origine e concentrazione), attivatore (silice, acido ellagico, ecc.), plasma carente (immuno-depleto o carente congenito)

2. Necessità di almeno tre diluizioni del plasma paziente
3. Potenziale inaccuratezza, nel caso di misurazione dei livelli di FVIII dopo somministrazione di concentrati contenenti molecole modificate.

7. Uso

1. Diagnosi di emofilia A e determinazione della gravità della malattia (lieve, moderata, grave): le più recenti linee guida WFH [12] raccomandano l'esecuzione sia della misura OSA che cromogenica; per la diagnosi di emofilia B, a causa della esiguità dei dati disponibili, non sono state formulate analoghe raccomandazioni
2. Monitoraggio della terapia sostitutiva dell'emofilia A e B; a questo proposito, esistono numerose criticità riguardo alla misura dopo infusione di concentrati di FVIII (o FIX) ricombinanti a struttura modificata e quelli a emivita estesa; per maggiori dettagli consultare gli specifici documenti AICE [16,17]
3. Determinazione del titolo dell'inibitore contro i FVIII/IX, secondo il metodo Bethesda
4. Determinazione della potenza dei concentrati di FVIII; per FDA è il metodo raccomandato; per la European Pharmacopoeia [18] è raccomandato anche il metodo cromogenico; non esistono ancora precise raccomandazioni per i concentrati di FIX [19].

Riferimenti bibliografici

1. Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J Lab Clin Med* 1953;41:637-47.
2. Bai B, Christie DJ, Gorman RT, Wu JR. Comparison of optical and mechanical clot detection for routine coagulation testing in a large volume clinical laboratory. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008;19:569-76.
3. One stage Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Test, Approved Guideline – Second Edition. CLSI document H47 A2, 2008.
4. Barrowcliffe TW, Standardization of FVIII & FIX assays. *Haemophilia* 2003;9:397-402.
5. Verbruggen B, Meijer P, Novakova I, Van Heerde W. Diagnosis of factor VIII deficiency. *Haemophilia* 2008;14 (Suppl 3):76-82.
6. Raut S, Hubbard AR. International reference standards in coagulation. *Biologicals* 2010;38:423-9.
7. Raut S, Daniels S, Heath AB, SSC Sub-Committee on Factor. Value assignment of the WHO 8th International Standard for factor VIII, concentrate (07/350). *J Thromb Haemost* 2012; 10:1175-6.
8. <https://www.isth.org/page/PlasmaStandard>. Accesso 31.07.2022.
9. Castellone DD, Adcock DM. Factor VIII activity and inhibitor assays in the diagnosis and treatment of hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2017;43:320-30.
10. Shetty S, Ghosh K, Mohanty D. Comparison of four commercially available activated partial thromboplastin time reagents using a semi-automated coagulometer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:493-7

11. Ledford-Kraemer M. Factor VIII activity assays. CLOT-ED (Coagulation Lysis or Thrombosis – An educational resource) <http://www.ecat.nl/wp-content/uploads/2013/02/FVIIIAssays2006.pdf>. Accesso 31.07.2022.
12. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020;26 (Suppl 6):1-158.
13. 1-stage APTT-based factor assays – Practical-Haemostasis.com (A practical guide to haemostasis). https://practical-haemostasis.com/Factor%20Assays/1_stage_aptt_factor_assay.html. Accesso 31.07.2022.
14. Duncan E, Rodgers S. One stage factor VIII assays. In: *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols*. Ed. Favaloro EJ, Lippi G. 2017; chapter 20:247-63.
15. Kitchen S, Preston E. Assay of factor VIII and other clotting factors. In: *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis 2013*; chapter 10:105-14.
16. 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.
17. Il ruolo del laboratorio di emostasi nella gestione del paziente con emofilia. A cura del Gruppo di Lavoro Qualità dei Laboratori AICE. <https://aiceonline.org/?p=17617>. Accesso 31.07.2022.
18. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 10th edition. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. Accesso 31.07.2022.
19. Hubbard AR, 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. Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates. *J Thromb Haemost*. 2013;11:988-9.

MISURA DELL'ATTIVITÀ CROMOGENICA DEL FATTORE VIII

1. Introduzione

La misura di attività cromogenica del fattore (F) VIII (CSA, chromogenic substrate assay) è un test "a due stadi": nel primo stadio si genera FX attivato (FXa) e nel secondo se ne determina la quantità, che sarà proporzionale all'attività del FVIII del campione in esame (Figura 1).

In origine la misura a due stadi, sviluppata negli anni '50 del secolo scorso nel Regno Unito [1], prevedeva un secondo stadio di tipo coagulativo, nel quale l'attività del FXa generato nel primo stadio era misurata tramite la velocità di formazione del coagulo di una miscela di FII, FV, fosfolipidi, fibrinogeno e calcio. Nei primi anni '70 del secolo scorso tale metodica è caduta in disuso, a favore di quella con lettura finale cromogenica, mediante un substrato sintetico, che viene riconosciuto e modificato in maniera specifica dal FXa [2].

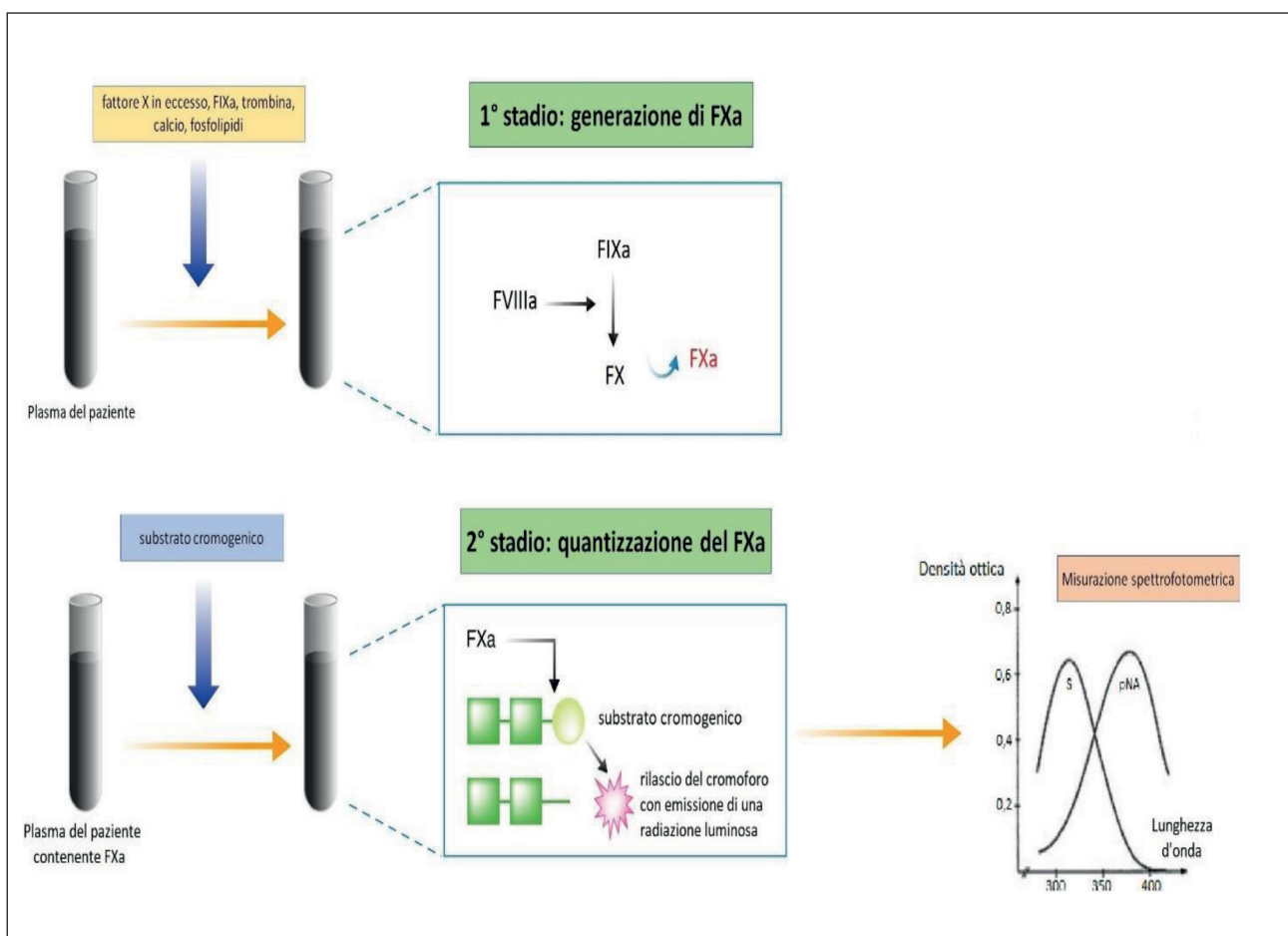


Figura 1. Rappresentazione schematica della misura dell'attività cromogenica del FVIII.

2. Principio

Il CSA si basa sulla misurazione della variazione di densità ottica (ΔDO) di un substrato cromogenico, determinata dalle modificazioni strutturali indotte dall'azione del FXa che riconosce il substrato sintetico come target specifico. La variazione di DO è proporzionale alla concentrazione del FXa generato nel primo stadio della reazione [3].

In generale, i substrati cromogenici sono piccoli peptidi sintetici, la cui sequenza aminoacidica mima quella del substrato naturale; il peptide lega a un estremo un gruppo prostetico (detto cromoforo) che, dopo il taglio proteolitico operato dall'enzima, è rilasciato in soluzione dando

origine a una radiazione (colore) di una determinata lunghezza d'onda, che sarà poi misurata mediante uno spettrofotometro. L'intensità della radiazione è direttamente proporzionale all'attività proteolitica dell'enzima e, dunque, alla sua attività [4]. Il cromoforo più largamente usato è la para-nitroanilina (pNA), incolore, quando legata al peptide, ma di colore giallo, quando libera, facilmente misurabile a 405 nm.

Con lo stesso principio metodologico è possibile misurare anche l'attività cromogenica del FIX. In questo caso, reagenti e metodica sono gli stessi, ad eccezione del reagente contenente il FIXa, che viene sostituito con il FVIIIa, e del calibratore, che è certificato per il FIX.

3. Materiali

3.1 Strumentazione

Il test può essere eseguito con metodica manuale (provetta o micro-piastra) oppure sui moderni coagulometri in maniera completamente automatizzata.

Esistono due metodi per la misura della DO generata dall'enzima [5]:

1. Metodo *cinetico*: lettura della variazione di DO a 405 nm che si genera fra due tempi nel corso della reazione (ad es., 10-30 o 120-140 secondi, a seconda dei reagenti usati).
2. Metodo *al punto finale*: il decorso della reazione è bloccato dall'aggiunta di una sostanza a carattere acido (es. acido acetico o acido citrico) e la DO è misurata a 405 nm; al valore ottenuto si sottrae l'assorbanza misurata su una soluzione tampone, che costituisce il "bianco".

3.2 Reagenti

- Kit contenente tutti i reagenti necessari in forma standardizzata
- Plasma standard
- Plasma del paziente

3.3 Kit per la misura dell'attività cromogenica del FVIII

Il kit per la misura dell'attività cromogenica del FVIII dei diversi produttori (**Tabella 1**) contengono tutti i componenti necessari a concentrazioni ottimali, in maniera che il fattore limitante la generazione di FXa sia solo il FVIII del plasma in esame [5]:

- FX esogeno in eccesso (R1)
- Un complesso di fattori per l'attivazione del FX (R2) che comprendono:
 - FIXa
 - Trombina, che serve per attivare il FVIII presente nel plasma che, in presenza di calcio e fosfolipidi, agisce da cofattore per il FIXa nella conversione del FX in FXa
 - Ioni calcio
 - Fosfolipidi
- Un substrato cromogenico (R3), che è idrolizzato dal FXa, determinando le variazioni di DO proporzionali alla sua attività
- Soluzione tampone.

Tabella 1: Principali kit per CSA disponibili sul mercato.

Nome commerciale	Azienda produttrice	Reagenti (R1-R2-R3)	Tampone
Chromogenix Coatest SP4	Werfen	FIXa ^b , FX ^b , FV ^b , FII ^b , PL, CaCl ₂	Tris-1% BSA
Chromogenix Coamatic FVIII	Werfen	FIXa ^b , FX ^b , FV ^b , FIIa ^b , PL, CaCl ₂	Tris-1% BSA
Technoclone Technochrom FVIII:C	Diapharma	FIXa ^a , FX ^b , FIIa ^a , PL, albumina, CaCl ₂	Imidazolo 2%, albumina
Hyphen Biomed Biophen FVIII	Hyphen Biomed	FIXa ^a , FIIa ^a , FX ^a , PL, CaCl ₂	Tris-1% BSA
Siemens FVIII chromogenic	Siemens	FIXa ^b , FIIa ^b , FX ^b , PL, CaCl ₂	NaCl 0,9%
TriniCHROM	Stago	FIXa ^a , FII ^a , FX ^b , Ca, PL	Sodio azide

^aorigine umana. ^borigine bovina. Abbreviazioni: BSA, sieroalbumina bovina; PL, fosfolipidi

3.4 Plasma calibratore

È un plasma con livelli noti e certificati di FVIII che rappresenta il riferimento per la misura del FVIII nel plasma del paziente. Le autorità di standardizzazione raccomandano che i plasmi calibratori commerciali e quelli preparati localmente siano calibrati contro uno standard internazionale di riferimento "primario", custodito dalla organizzazione mondiale della sanità (WHO) [6]. Questo tipo di calibrazione iterativa consente di risparmiare notevole quantità di standard primari, lasciando inalterata la continuità e tracciabilità del sistema.

Gli standard primari hanno un valore assegnato in unità internazionali (IU). 1 IU è definita come la quantità (attività) dell'analita presente in 1 mL (oppure 100 U/dL) di un pool di plasma fresco normale. L'assegnazione della potenza del primo standard primario era basata sull'analisi di un pool di plasmi normali, collezionati ad hoc e considerata arbitrariamente come 1 U/mL [7]. Al primo standard primario storico, sono seguiti numerosi altri, preparati in successione e ognuno calibrato contro il suo predecessore, in maniera da mantenere la continuità e tracciabilità del sistema. La preparazione, calibrazione e custodia degli standard è affidata dal WHO, al National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). L'attuale standard primario WHO per il FVIII è l'ottavo della serie ed è stato stabilito nel 2010 [8].

Sono anche disponibili standard secondari, calibrati contro lo standard primario, a cura della ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis), tramite il suo comitato di standardizzazione (SSC) [9]. Gli standard secondari sono forniti alle compagnie commerciali per la preparazione e certificazione dei loro calibratori.

4. Metodi

4.1 Curva di calibrazione

Quanto di seguito riportato è valido in linea generale, ma ci possono essere variazioni in rapporto a specifici reagenti e coagulometri. Pertanto, si raccomanda di seguire le istruzioni che accompagnano i kit commerciali.

Come per la misura del FVIII mediante OSA, anche per il CSA è necessario allestire una curva di calibrazione, utilizzando il plasma standard a titolo noto. La curva si realizza eseguendo diluizioni scalari del plasma standard con soluzione tampone. La prima diluizione è variabile e dipende dal reagente usato. Essa rappresenta, per definizione, il valore di FVIII pari a 100 U/dL. Si eseguono poi le diluizioni corrispondenti a 50, 25 e 0 U/dL. Su ciascuna di esse si esegue la procedura analitica con uno dei due metodi descritti in precedenza [5].

I valori di DO ottenuti sulle diluizioni sono riportati su un sistema di assi (scala lineare), nel quale le variabili: attività del FVIII (riportata sull'asse delle ascisse) e il ΔDO (riportata sull'asse delle ordinate) sono rappresentate con una linea retta [10]. Anche per il CSA è utile allestire una curva di calibrazione con diluizioni più basse (es., 25, 12.5, 6.25, 0 U/dL, nel caso in cui i livelli attesi di FVIII siano molto bassi (inferiori a 5 U/dL).

4.2 Plasma del paziente

Valutazioni eseguite in singoli centri documentano deviazioni molto modeste dal parallelismo fra la curva del plasma standard e quella delle misure eseguite sul plasma in esame a più diluizioni. Pertanto, a differenza di quanto accade per il metodo OSA, nel caso del CSA le linee guida WFH [11] non raccomandano di eseguire sul plasma del paziente diluizioni multiple. Esso può essere sottoposto alla prima diluizione prevista per il calibratore (o diversa, se necessario). Il valore di attività del FVIII del plasma del paziente si ottiene dal valore della sua DO mediante estrapolazione grafica sulla curva di calibrazione, o mediante algoritmo matematico. Se il plasma del paziente è stato sottoposto alla stessa (prima) diluizione del calibratore, il valore che si ottiene è il valore finale, che dovrà essere corretto per l'attività specifica del calibratore, rispetto allo standard primario, secondo la formula:

$$(C \times P)/100$$

dove C è l'attività certificata dello standard e P il valore dell'attività del plasma paziente derivato dal grafico [10].

5. Sensibilità analitica della misura

La sensibilità analitica della misura CSA per il FVIII si definisce come la capacità di identificare bassi livelli di fattore e/o di distinguere due campioni con attività simile, ma non identica, ovvero in grado di identificare le carenze tipiche dell'emofilia grave (<1 U/dL), ma anche di discriminare fra livelli intorno a 1 U/dL rispetto a livelli intorno a 3 U/dL. A livelli di attività di FVIII 3-5 U/dL, la misura CSA è considerata più sensibile rispetto a quella OSA [12]. Infatti, mentre ambedue le misure danno risultati simili nella diagnosi di emofilia A grave, nelle forme lievi e moderate si registrano discrepanze in circa il 30% dei pazienti. Le ragioni di tali discrepanze non sono ancora interamente note. Potrebbero essere dovute a mutazioni nel gene del FVIII che riguardano i siti di interfaccia dei domini A1-A2-A3 e che causerebbero una ridotta stabilità del FVIII, influenzando maggiormente la misura CSA che rileva, quindi, attività ridotte, in funzione di un tempo di reazione più lungo, rispetto a quella del OSA [13-18]. Più raramente, sono imputabili a mutazioni nei siti di legame della trombina o del FIXa o del fattore di von Willebrand (VWF), i cui effetti sarebbero in grado di influenzare maggiormente il metodo OSA, rispetto al CSA, in cui l'eccesso di trombina e FIXa nei reagenti compensa tali difetti [13,19-21]. Discrepanze fra livelli di FIX sono stati riportati nella diagnosi dell'emofilia B con metodi OSA, utilizzando diversi reagenti aPTT, ma ancora esigui sono i dati disponibili per poter prevedere eventuali discrepanze di misura fra CSA e OSA.

6. Pro e Contro

6.1 Pro

4. Buona riproducibilità intra- e inter-laboratorio

5. Scarsa variabilità fra diversi lotti dello stesso reagente
6. Non necessita di plasma carente
7. Scarsa influenza da parte dell'anticoagulante lupico e attivazione accidentale.

6.2 Contro

4. Relativa scarsa stabilità dei reagenti dopo ricostituzione
5. Costi (per test) relativamente elevati, se si considera che i reagenti attuali non sono confezionati per singoli test, ma per serie analitiche con numeri di campioni difficilmente riscontrabili nell'attività giornaliera di un centro AICE. Questo problema è però risolvibile, congelando il materiale ricostituito in piccole aliquote a -70°C.

7. Uso

1. Diagnosi di emofilia A e valutazione della gravità della malattia (lieve, moderata, grave): le più recenti linee guida WFH [11] raccomandano l'esecuzione sia della misura OSA che di quella CSA. Non esistono ancora analoghe raccomandazioni per l'emofilia B
2. Monitoraggio della terapia sostitutiva dei pazienti con emofilia A e B. A questo proposito esiste una ampia letteratura che riguarda la misura dopo infusione di concentrati di FVIII/FIX ricombinanti a struttura modificata e di quelli a emivita estesa. Per maggiori dettagli consultare gli specifici documenti AICE [22,23]
3. Determinazione della potenza dei concentrati di FVIII/FIX; per FDA il metodo raccomandato per il FVIII è OSA; per la European Pharmacopoeia sono raccomandati sia OSA che CSA [24]; non esistono analoghe raccomandazioni per la misura dei livelli di FIX.

Riferimenti bibliografici

1. Ledford-Kraemer M. Factor VIII activity assays. CLOT-ED (Coagulation Lysis or Thrombosis – An educational resource). <http://www.ecat.nl/wp-content/uploads/2013/02/FVIIIAssays2006.pdf>. Accesso 31.07.2022
2. Seghatchian MJ, Miller-Andersson M. A colorimetric evaluation of factor VIII:C potency. *Med Lab Sci* 1978; 35:347-54.
3. Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman D. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost* 2016;14:248-61.
4. Chemistry Libretext (Libretext Project) – Spectrophotometry (Chapter 2.1.5) [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry). Accesso 31.07.2022
5. Rodgers S, Duncan E. Chromogenic factor VIII assays for improved diagnosis of Hemophilia A. In: Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols. Ed. Favaloro EJ, Lippi G. 2017; chapter 21:265-76.
6. Verbruggen B, Meijer P, Novakova I, Van Heerde W. Diagnosis of factor VIII deficiency. *Haemophilia* 2008;14 (Suppl 3):76-82.
7. Raut S, Hubbard AR. International reference standards in coagulation. *Biologicals* 2010;38:423-9.
8. Raut S, Daniels S, Heath AB, SSC Sub-Committee on Factor. Value assignment of the WHO 8th International Standard for factor VIII, concentrate (07/350). *J Thromb Haemost*

2012;10:1175-6.

9. <https://www.isth.org/page/PlasmaStandard>. Accesso 31.07.2022
10. 2-stage factor VIII assays – Practical-Haemostasis.com (A practical guide to haemostasis). https://practical-haemostasis.com/Factor%20Assays/2_stage_factor_assays.html. Accesso 31.07.2022
11. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020;26 (Suppl 6):1-158.
12. European Medicines Agency. Workshop report: characterisation of new clotting factors concentrates (FVIII, FIX) with respect to potency assays used for labelling and testing of post-infusion samples. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/workshop-report-joint-european-medicines-agency/european-directorate-quality-medicines-healthcare-workshop-characterisation-new-clotting-factor_en.pdf. Accesso 31.07.2022
13. Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb Haemost* 2014;111:851-61.
14. Schwaab R, Oldenburg J, Kemball-Cook G, Albert T, Juhler C, Hanfland P, Ingerslev J. Assay discrepancy in mild haemophilia A due to a factor VIII missense mutation (Asn694Ile) in a large Danish family. *Br J Haematol* 2000;109:523-8.
15. Pipe SW, Saenko EL, Eickhorst AN, Kemball-Cook G, Kaufman RJ. Hemophilia A mutations associated with 1-stage/2-stage activity discrepancy disrupt protein-protein interactions within the triplicated A domains of thrombin-activated factor VIIIa. *Blood* 2001;97:685-91.
16. Cid AR, Calabuig M, Cortina V, Casana 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;14:1049-54.
17. Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, Waseem N, Bagnall R, Lloyd JV. Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His 1954→Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999;105:1123-6.
18. Celie PH, van Stempvoort G, Jorieux S, Mazurier C, van Mourik JA, Mertens K. Substitution of Arg527 and Arg531 in factor VIII associated with mild haemophilia A: characterization in terms of subunit interaction and cofactor function. *Br J Haematol* 1999;106:792-800.
19. Bowyer AE, van Veen JJ, Goodeve A, Kitchen S, Makris M. Specific and global coagulation assays in the diagnosis of discrepant mild hemophilia A. *Haematologica* 2013;98:1980-7.
20. Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJ, Manning RA, Kemball-Cook G. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol* 2002;118:589-94.
21. Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346→Cys mutation results in factor VIII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype – is this mild haemophilia A? *Haemophilia* 2008;14:78-80.
22. 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.
23. Il ruolo del laboratorio di emostasi nella gestione del paziente con emofilia. A cura del Gruppo di Lavoro Qualità dei Laboratori AICE. <https://aiceonline.org/?p=17617>. Accesso 31.07.2022.
24. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 10th edition. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. Accesso 31.07.2022.

