

Emofilia acquisita post-partum: l'importanza di una diagnosi precoce

Mariachiara Gagliardi¹, Luigi Capone², Gaetanina De stefano², Mariarosaria Cianciulli², Antonio Ciampa¹

¹ Centro Emostasi, AORN San Giuseppe Moscati, Avellino

² Laboratorio Patologia Clinica, AORN San Giuseppe Moscati, Avellino

ABSTRACT

Post-partum acquired haemophilia: the importance of a rapid diagnosis

Acquired haemophilia A (AHA) is a rare bleeding disorder caused by auto-antibodies against clotting factor VIII (FVIII). FVIII auto-antibodies are polyclonal immunoglobulin G directed against the FVIII pro-coagulant activity. There are well-established clinical associations with AHA such as malignancy, autoimmune disease and pregnancy. However, up to 50% of reported cases remain idiopathic. The clinical manifestations of AHA include spontaneous haemorrhages into skin, muscles and soft tissues, or mucous membranes. AHA should be suspected when a patient, with no previous history of bleeding, presents with bleeding and an unexplained prolonged activated partial thromboplastin time (aPTT). The diagnosis is confirmed by specific tests performed by the clinical laboratory. These include: a prolonged aPTT, not-corrected by incubation with normal plasma, the absence of lupus anticoagulant, the selective deficiency of FVIII and, finally, the measurement of the anti-FVIII inhibitor. Here we describe a case of a young women who had given birth two months before, presenting at the First Aid department with a large subcutaneous hematoma on the left lower limb. The coagulation tests showed a prolonged aPTT-Ratio (2.50; r.i. 0.85–1.20), not corrected by incubating a sample of the patient plasma with equal volumes of normal plasma (mixing study). A low FVIII level was detected (3.6 %; r.i. 50-150) and a FVIII inhibitor of 4.79 Bethesda unit (BU) was measured. Corticosteroid treatment was started with prompt resolution of AHA.

Parole chiave: emofilia acquisita, gravidanza, deficit di fattore VIII

CASO CLINICO

Nel febbraio del 2023 giungeva alla nostra attenzione una giovane donna di 34 anni, che aveva partorito da circa due mesi. La paziente si era recata al Pronto Soccorso dell'AORN S. Moscati per un ampio ematoma sottocutaneo all'arto inferiore sinistro riferendo di aver sempre goduto di buona salute. All'accettazione, l'emocromo evidenziava una conta leucocitaria nella norma ($9,3 \times 10^9/L$, i.r. $4,0-10,0 \times 10^9/L$), un numero di piastrine pari a $418 \times 10^9/L$ (i.r. $150-400 \times 10^9/L$) e un valore

di emoglobina (HGB) di 117 g/L (i.r. 130-170 g/L). I risultati degli esami di coagulazione, invece, mostravano un tempo di protrombina (PT) Ratio di 1,02 (i.r. 0,80-1,15) ed un tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) Ratio di 2,50 (i.r. 0,85-1,20). La paziente, precedentemente, non aveva mai presentato alterazione dei tempi di coagulazione. In seguito alla richiesta di consulenza presso il Centro Emostasi si procedeva con l'esecuzione di PT e aPTT su un nuovo campione, i quali confermavano i dati precedentemente ottenuti (PT-Ratio 1,00 e aPTT-Ratio 2,51). Per escludere una possibile contaminazione

Corrispondenza a: Mariachiara Gagliardi, Centro Emostasi, AORN San Giuseppe Moscati, Avellino. Email: lunachiara224@gmail.com

Ricevuto: 12.04.2023

Rivisto: 24.04.2023

Accettato: 27.04.2023

Pubblicato on-line: 17.05.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.031

eparinica, veniva eseguito il tempo di trombina (TT) che è risultato nella norma (Ratio 0,96; i.r. 0,85-1,20). Come da protocollo veniva eseguito un aPTT su miscela 1:1, di un pool di plasmi normali (PNP) e plasma della paziente, ottenendo una Ratio di 1,26 (i.r. 0,85-1,20). Se l'aPTT-Ratio, ottenuta su miscela, si normalizza cioè rientra nell'intervallo di riferimento dell'esame, si ritiene che la miscela abbia corretto l'alterazione, suggerendo una carenza fattoriale. Viceversa, se l'aPTT-Ratio si mantiene elevato, si ritiene che la miscela non abbia corretto l'alterazione a causa della presenza di un inibitore. Il test di miscela è necessario, quindi, per la discriminazione tra carenza fattoriale o la presenza di un inibitore. Nel caso specifico, poiché la miscela non correggeva, era chiaro che l'allungamento dell'aPTT era legato alla presenza di inibitori specifici o aspecifici. Per chiarire la natura di questi inibitori si è proceduto con l'esecuzione del tempo di veleno di vipera Russel diluito (dRVVT) per stabilire se la paziente fosse Lupus Anticoagulant (LAC) positiva. Tuttavia, alla luce dei risultati ottenuti questa possibilità veniva esclusa: la paziente presentava una dRVVT Screen-Ratio di 1,09, una dRVVT Confirm-Ratio di 1,04 ed una Ratio Normalizzata (Screen-Ratio/Confirm-Ratio) pari a 1,05 (v.r. <1,20). Esclusa, quindi la positività al LAC si è proseguito con la valutazione della presenza di eventuali inibitori specifici. Venivano misurati i fattori VIII, IX, XI, XII, Von Willebrand (VWF-Ag) e Von Willebrand RCo (Ristocetin Cofactor Activity) ottenendo rispettivamente 3,6%, 86%, 96%, 92%, 97% e 96% (i.r. IX e XI 65-150, VIII e XII 50-150; VWF-Ag per gruppo sanguigno 0: 41-125, per gruppi sanguigni A, AB, B: 61-157; VWF-RCo per gruppo sanguigno 0: 38-125, per gruppi sanguigni A, AB, B: 49-169). Considerando che i valori ottenuti deponevano fortemente per un caso di emofilia A acquisita (AHA), si procedeva alla ricerca e alla quantificazione dell'eventuale inibitore specifico, ricorrendo al metodo Bethesda-Nijmegen, il quale prevede l'incubazione a 37°C per 2 ore del solo plasma della paziente, della miscela 1:1 (plasma paziente - PNP) e della miscela 1:1 (PNP - tampone imidazolo). L'incubazione risulta una tappa fondamentale dell'intero iter diagnostico di AHA in quanto l'iterazione inibitore-FVIII è temperatura e tempo dipendente. Sulle tre miscele, alla fine dell'incubazione, sono state determinate le concentrazioni del FVIII. Infine, veniva calcolato il FVIII-residuo mediante la formula (1):

$$\text{FVIII RESIDUO \%} = \frac{[50 \times \text{FVIII\% (plasma paziente - PNP)}]}{\text{FVIII\% (PNP - tampone imidazolo)}}$$

Se l'attività residua del FVIII risulta un valore compreso tra 45% ± 6,5% l'inibitore è assente, viceversa se il valore del FVIII è <25%, l'inibitore è presente. L'inibitore viene quantificato ed espresso in Unità Bethesda (BU)/mL mediante la formula (1):

$$\text{BU/mL} = (2 - \log_{10} \text{FVIII RESIDUO \%}) / 0,301$$

La ricerca dell'inibitore ha dato esito positivo con una sua quantificazione di 4,79 BU/mL (Figura 1). Tutti gli esami sono stati eseguiti su coagulometro ACL TOP 500 (Werfen, Bedford, MA, USA) utilizzando i reagenti

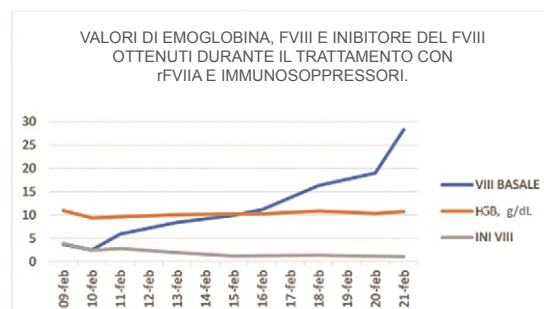


Figura 1

Nel grafico sono evidenziati gli andamenti dei valori di emoglobina (linea arancione), del FVIII (linea blu) e dell'inibitore del FVIII (linea grigia) ottenuti durante il trattamento con rFVIIa e immunosoppressori.

della medesima azienda ossia: HemosIL APTT-SP, HemosIL RecombiPlasTin 2G, HemosIL Thrombin Time, HemosIL dRVVT Screen / dRVVT Confirm, HemosIL Factor VIII/IX/XI/XII deficient plasma, HemosIL VWF: Ag e HemosIL VWF: RCo. La paziente è stata ricoverata nel reparto di Ematologia per 13 giorni, durante i quali è stata sottoposta a terapia con corticosteroidi ed agente bypassante NovoSeven, Fattore VII attivato ricombinante (rFVIIa) alla dose di 90 µg/Kg ogni 4 ore per i primi 4 giorni ed ogni 6 ore dal 5° giorno sino alle dimissioni avvenute 13 giorni dopo. Grazie alla terapia con rFVIIa si è ottenuto un miglioramento clinico, con scomparsa della sintomatologia emorragica ed un incremento dei valori di HGB (Figura 1). Durante il ricovero la paziente è stata monitorata registrando un incremento del fattore VIII basale sino al 28% accompagnato da un progressivo accorciamento dell'aPTT (Ratio di 1,18). La risposta del fattore VIII era assolutamente cortisone dipendente. Successivamente, il programma terapeutico ha comportato la riduzione del cortisone e l'introduzione di una terza linea di terapia con Rituximab (anticorpo anti CD20) per eradicare definitivamente l'inibitore. In regime di day hospital è stato praticato un ciclo con Rituximab. Attualmente il FVIII basale della signora è del 90% con un aPTT-Ratio pari a 1,03.

DISCUSSIONE

L'AHA è un raro disordine emorragico a eziologia autoimmune, causato da auto-anticorpi, rivolti contro il FVIII della coagulazione, determinanti la neutralizzazione della sua attività pro-coagulante. Il FVIII è una proteina avente peso molecolare di 265 kDa ed una sequenza amminoacidica suddivisa in domini A1-A2-B (catene pesanti) – A3-C1-C2 (catene leggere). I domini A2 ed A3 espongono i siti di legame per il fattore IX, mentre il dominio C2 lega il fattore di Von Willebrand. Gli auto-anticorpi inibitori del FVIII responsabili dell'AHA sono rivolti contro i domini A2, A3 o C2, a differenza degli anticorpi responsabili dell'emofilia congenita i quali hanno molti più siti bersaglio (2). Gli auto-anticorpi contro il FVIII sono immunoglobuline (Ig) di tipo G appartenenti alle classi IgG1-IgG2-IgG4. I linfociti DC4+ svolgono un ruolo

centrale nella regolazione della risposta immunitaria umorale al FVIII. Tale risposta dipende da una complessa interazione tra sottoinsieme di cellule DC4+, Th1 (i quali stimolano le cellule B a produrre anticorpi IgG1 e IgG2) e Th2 (che inducono le cellule B a produrre anticorpi IgG4). Una predominanza dell'anticorpo anti-FVIII guidato da Th2 è correlata ad una risposta anticorpale più intensa e titoli di inibitore più elevati, mentre la terapia immunosoppressiva della AHA risulta di maggiore successo nei pazienti con una predominanza dell'inibitore guidato da Th1 (2). Anche la mancanza di riconoscimento di alcuni epitopi CD4 immuno-dominanti sui domini del FVIII sembra essere correlata alla formazione dell'inibitore. Una combinazione di fattori genetici e ambientali potrebbe portare al fallimento della tolleranza immunitaria e causare lo sviluppo di autoanticorpi. Alcuni alleli di classe II dell'antigene leucocitario umano (HLA) e polimorfismi a singolo nucleotide dell'antigene citotossico dei linfociti T4 (CTLA-4) sono stati osservati con una frequenza maggiore nell'AHA (2). La cinetica di reazione dell'interazione tra il FVIII e l'anticorpo inattivante dell'emofilia acquisita (auto-anticorpi) differisce dal modello osservato nell'emofilia congenita, complicata dallo sviluppo dell'inibitore (alloanticorpi). La maggior parte degli alloanticorpi congeniti inattiva il FVIII in proporzione lineare rispetto alla loro concentrazione (Tipo I o cinetica di I ordine), quindi il FVIII è completamente inattivato se l'inibitore è presente in eccesso. La maggior parte degli auto-anticorpi acquisiti, invece, hanno una cinetica di attivazione non lineare (Tipo 2 o cinetica di II ordine). In questo caso la fase di inattivazione iniziale è molto rapida con una successiva fase più lenta. Di solito questi anticorpi non inattivano completamente il FVIII, anche alla massima concentrazione di plasma inibitore. C'è una scarsa correlazione, quindi, tra il livello di FVIII e la gravità del sanguinamento nell'AHA, al contrario di quanto si osserva nell'emofilia congenita. Tuttavia, nella maggior parte dei casi di AHA si osserva un quadro emorragico, spesso severo e potenzialmente fatale, soprattutto in caso di ritardo nella formulazione della diagnosi e nell'avvio del trattamento specifico (3). Oltre alla patogenesi, la forma congenita e acquisita di emofilia hanno caratteristiche epidemiologiche e fenotipiche differenti. L'AHA presenta un'incidenza maggiore nella popolazione anziana, con un'età media di insorgenza intorno ai 75 anni, eccezione fatta per i casi che si manifestano in donne in età fertile nel periodo peri-partum (4-5). Sono ben note le associazioni con neoplasie solide (prostata, rene, colon, polmone), ematopatie maligne (leucemia linfatica cronica e linfomi), disordini autoimmuni (artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, sclerosi multipla) e gravidanza anche se circa il 50% dei casi rimane idiopatico (6). Il soggetto affetto presenta spesso un'anamnesi personale ma soprattutto familiare negativa per disordini emorragici significativi. Infine, anche il quadro emorragico nel caso di AHA, seppur vario, è differente da quello osservato nell'emofilia congenita: la diatesi emorragica, spontanea o post-traumatica, è per lo più di tipo muco-cutaneo o muscolare, meno di tipo viscerale. Solo raramente si osserva un sanguinamento di tipo intra-articolare, caratteristico della carenza congenita di

FVIII. Di conseguenza, andrebbe sospettato un quadro di AHA di fronte ad un soggetto anziano o una donna nel peri-partum, con allungamento isolato di aPTT associato o meno ad una diatesi emorragica con le caratteristiche suddette. L'incidenza di AHA è pari a circa 1 caso ogni 1,5 milioni di abitanti, con prevalenza simile tra uomini e donne ed una mortalità stimata tra il 3% ed il 15% (7). Ciò sottolinea l'importanza di una diagnosi precoce ed un trattamento mirato per l'eliminazione degli auto-anticorpi. Nel nostro caso, l'inibitore del FVIII è stato quantificato utilizzando il metodo Bethesda-Nijmegen. Il metodo Bethesda è stato descritto per la prima volta nel 1975 da Kasper et al. (8); la sensibilità e la specificità di questo metodo furono migliorate dalla modifica di Nijmegen (1) (Figura 2). Il metodo Bethesda-Nijmegen si basa sulla misura dell'inattivazione del FVIII durante un tempo di incubazione prefissato e sulla quantificazione dell'attività del FVIII rimanente. Al termine dell'incubazione viene misurata l'attività del FVIII rimanente. Poiché il FVIII è una molecola termolabile, nella determinazione deve essere incluso un campione di riferimento (miscela 1:1 PNP-tampone imidazolo). Nel caso specifico la paziente, essendo stata ricoverata in uno stato di pre-anemia e avendo avuto tempestivamente la diagnosi di AHA, ha

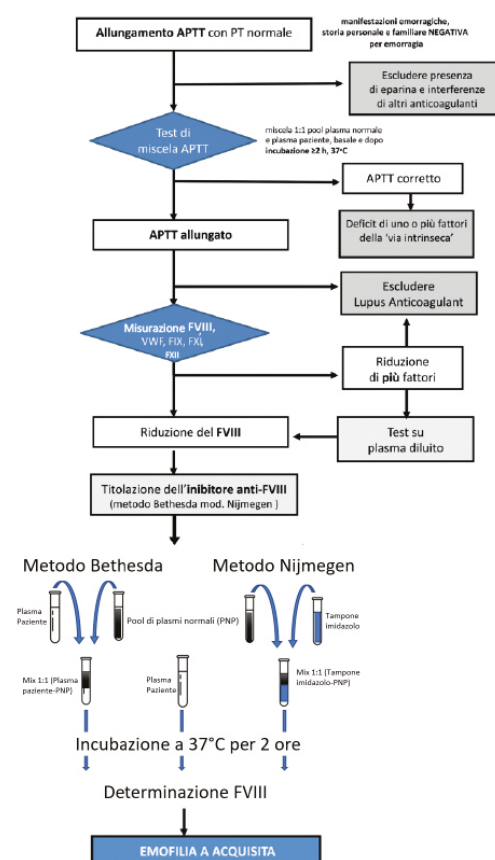


Figura 2

La figura rappresenta in maniera schematica l'algoritmo diagnostico applicato per la diagnosi di emofilia A. In particolare viene illustrato il metodo Bethesda-Nijmegen.

potuto lasciare la struttura in meno di due settimane riportando un significativo miglioramento delle proprie condizioni cliniche. Allo stato attuale la paziente ha terminato anche la terapia di terza linea per la completa eradicazione dell'inibitore riscontrando una risalita del FVIII dal 3,6% al 90%. In generale, il decorso della suddetta malattia è favorevole; infatti la scomparsa degli inibitori a 30 mesi è del 100%. Per questo motivo è fondamentale giungere alla diagnosi il prima possibile per istituire un adeguato trattamento evitando complicanze che possono essere fatali. La diagnosi può essere difficile, dal momento che il paziente non ha storia personale o familiare di disturbi emorragici, tuttavia l'AHA va sempre considerata, e opportunamente ricercata, in qualsiasi paziente che si presenti con nuova insorgenza di emorragie e prolungamento isolato dell'aPTT (9-10). In conclusione, ci sono da chiarire molti punti inerenti all'AHA per quanto riguarda le cause della patologia, ma risulta di fondamentale importanza la collaborazione tempestiva tra clinici e laboratoristi. In particolare, considerata la possibilità che tale patologia insorga durante o dopo la gravidanza, deve essere tenuta ben presente nel novero delle diverse sindromi emorragiche che possono manifestarsi in queste circostanze. Risulta necessario, infatti, che tali situazioni siano valutate e seguite da gruppi multidisciplinari, dove sia sempre presente l'esperto di emostasi, figura chiave nella valutazione diagnostica e nel trattamento dell'AHA.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BA. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:752-9.
2. Mulliez, Anna Vantilborgh, et al. "Acquired hemophilia: a case report and review of the literature." *Int J Lab Hematol*. 2014;36:398-407.
3. Franchini M, Castaman G, Coppola A, Santoro C, Zanon E, Di Minno G, et al. Acquired inhibitors of clotting factors: AICE recommendations for diagnosis and management. *Blood Transfus* 2015;13:498-513.
4. Knoebl P, Marco P, Baudo F, Collins P, Huth-Kühne A, Nemes L, et al. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *J Thromb Haemost* 2012;10:622-31.
5. Knoebl P, Marco P, Baudo F, Collins P, Huth-Kühne A, Nemes L, et al. EACH2 Registry Contributors. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *J Thromb Haemost* 2012;10:622-31.
6. Prencipe MA, D'Errico M, Di Giorgio G, Gatta G, Gesuete A, Nobile M, et al. Macroematuria post-partum: un insolito caso di emofilia acquisita del puerperio. *G Ital Nefrol* 2002;19:204-8.
7. Coppola A, Franchini M, Tripodi A, Santoro RC, Castaman G, Marino R, et al. Acquired haemophilia A: Italian Consensus Recommendations on diagnosis, general management and treatment of bleeding. *Blood Transfus* 2022;20:245-62.
8. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Letter: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975;34:869-72.
9. Coppola A, Favalaro EJ, Tufano A, Di Minno MN, Cerbone AM, Franchini M. Acquired inhibitors of coagulation factors: part I-Acquired Hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:433-46.
10. Coagulation Assay. Haemophilia A: Diagnosis and monitoring. https://www.coagulationassays.com/en_gb/home/diagnosis-monitoring/algorithm-ofhaemophilia-a.html