

Le proteine monoclonali possono causare alterazioni negli esami di coagulazione

Maria Chiara Gagliardi¹, Luigi Capone², Giuseppe Ciampa³, Antonio Ciampa¹

¹Centro Emostasi, Ospedale S.G. Moscati, Avellino

²Laboratorio di Patologia, Ospedale S. G. Moscati, Avellino

³Dipartimento di Ingegneria Chimica, Università "Federico II" di Napoli

ABSTRACT

Emostatic abnormalities in a patient treated with direct oral anticoagulants

Prothrombin Time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) are the most frequently performed coagulation test. The PT is used for assessment of clotting disorders (deficiency of factors II, V, VII and/or X) and monitoring of patients taking oral anticoagulant therapy (OAT) with vitamin K antagonist (VKAs). In patients taking VKAs, unmeasurable PT test result are frequently due to over-anticoagulation caused by excessive drug intake. The aPTT test, on the other hand, is altered in case of factorial deficiency (factors VII, IX, XI, and/or XII), presence of inhibitors (specific or non-specific) or in case of heparin contamination. Although it is widely known that monoclonal proteins are altering factors in many laboratory tests, their impact on coagulation tests can differ from patient to patient. In this work, a case of interference by monoclonal proteins on the aPTT test is described.

Parole chiave: aPTT, gammopatie monoclonali, interferenze analitiche

CASO CLINICO

Nel settembre del 2023 un uomo di 62 anni, con sospetta malattia linfoproliferativa, in previsione di una gastroscopia per confermare la localizzazione gastrica della patologia ematologica, ha eseguito gli esami di coagulazione di primo livello come previsto dai protocolli di pre-ospedalizzazione. Il tempo di protrombina (PT) risultava allungato e il tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) indeterminabile, per cui il paziente veniva ricoverato nel reparto di Ematologia dell'AORN S. Moscati con richiesta di consulenza presso il Centro Emostasi. Gli esami del profilo emo-coagulativo di base hanno mostrato una serie di importanti alterazioni: la ratio del PT era di 5,03 (i.r. 0,80- 1,15) e ratio dell'aPTT (i.r. 0,85- 1,20) era indeterminabile. Temendo una contaminazione eparinica, si eseguiva un tempo di trombina (TT), il quale risultava nella norma (ratio 1,05; i.r. 0,80-1,20). Si è proceduto quindi, all'esecuzione dell'aPTT su miscela costituita da pool di plasmi normali (PNP) - plasma del paziente in rapporto 1:1, ottenendo una ratio pari a 6,04. Questi risultati, come pure quelli relativi alle ricerche

successive sono riportati in Tabella 1. La determinazione del *Lupus Anticoagulant* (LAC), eseguita con dRVVT (tempo di veleno di vipera Russel diluito), risultava positiva. La determinazione degli anticorpi antifosfolipidi (aPL) è risultata positiva per gli anticorpi anticardiolipina IgM (6126 U7m/L; v.r.<20). Viceversa, gli anticorpi anti- β 2-glicoproteina-I ($\alpha\beta$ 2GPI) IgG ed IgM risultavano essere entrambi negativi. I fattori determinati (II, V, VII, IX, IX e XI) sono risultati normali. Una rivalutazione attenta della situazione del paziente ha incluso la verifica di altri esami biochimici. In particolare, l'elettroforesi delle proteine evidenziava la presenza di una componente monoclonale (CM) migrante in zona γ -globulinica. In seguito, all'immunofissazione sierica era stato possibile tipizzare la CM in IgM-kappa (17,8 g/L). Si è ipotizzato quindi che la componente proteica anomala fosse in grado di interferire con gli esami coagulativi. Nel tentativo di verificare questa ipotesi veniva pianificato il seguente esperimento: l'isolamento della CM IgM-kappa mediante elettroforesi su gel di poliaccrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (gel SDS-PAGE 4-20%) e successivamente la purificazione con colonne HiTrap IgM Purification HP.

Corrispondenza a: Maria Chiara Gagliardi, Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale e di Alta Specialità San Giuseppe Moscati - Centro Emostasi, Via Madre Teresa di Calcutta, 18 Atripalda AV email: lunachiara224@gmail.com

Ricevuto: 22.01.2024

Revisionato: 10.02.2024

Accettato: 07.03.2024

Publicato online: 18.03.2024

DOI: 10.19186/BC_2024.017

Tabella 1

Esami eseguiti	valori ottenuti	Intervallo di riferimento
aPTT-Ratio	non determinabile	0,85-1,20
aPTT-Mixing-Ratio	6,04	0,85-1,20
dRVVT-Screen-Ratio	1,69	<1,20
dRVVT-Confirm-Ratio	0,99	
LAC Ratio-Normalizzata	1,7	<1,20
aCL-IgG (U/mL)	2,7	<20
aCL-IgM (U/mL)	6126	<20
a β 2GPI-IgG (U/mL)	2,8	<20
a β 2GPI-IgM (U/mL)	10,3	<20
Fattore II (%)	90	79-131
Fattore V (%)	100	62-139
Fattore VII (%)	89	50-120
Fattore X (%)	97	77-131
Fattore VIII (%)	105	50-120
Fattore IX (%)	86	65-150
Fattore XI (%)	98	65-150

PT, tempo di protrombina; aPTT, tempo di tromboplastina parziale attivato; aPTT-Mixing, aPTT eseguito su miscela 1:1 (PNP-plasma del paziente); LAC, Lupus Anticoagulant; aCL, anticorpi anticardiolipine; a β 2GPI, anticorpi anti β 2glicoproteine I.

Tabella 2

Esami di coagulazione eseguiti su pool di plasma di soggetti adulti sani, con normali tempi coagulativi, diluiti con concentrazioni progressivamente elevate della componente IgM-kappa isolata e purificata o con 50 μ L di soluzione tampone.

	PNP di soggetti sani adulti	PNP + 5 μ L IgMk (1,5 μ g)	PNP + 25 μ L IgMk (7,5 μ g)	PNP + 50 μ L IgMk (17 μ g)	PNP + 50 μ L TAMPONE
PT secondi	11,2	12,6	17,4	51,1	11,1
PT Ratio	0,97	1,14	1,58	4,64	0,97
aPTT secondi	28,5	37,8	75,2	157,2	28,3
aPTT Ratio	0,97	1,32	2,64	5,52	0,99
Proteina C (%)	109	116	103	97	109
Proteina S (%)	98	91	82	89	99

PNP, pool di plasmi normali; PT, tempo di protrombina; aPTT, tempo di tromboplastina parziale attivato.

La CM, così ottenuta, veniva aggiunta in concentrazioni progressivamente crescenti ad un pool di plasmi normali (PNP); su queste diverse concentrazioni venivano eseguiti il PT e l'aPTT. I risultati hanno dimostrato un allungamento di entrambi gli esami, fenomeno che non si osservava, invece, con l'aggiunta al PNP di una soluzione tampone (Tabella 2). Infine, questi tempi di coagulazione venivano verificati con trombelastografia ottenendo risultati nella norma. Ciò ha permesso di costatare come la CM fosse funzionalmente in grado di interferire con il sistema di rilevazione dei tempi di coagulazione.

Gli esami di coagulazione sono stati eseguiti sull'analizzatore ACL TOP 500 (Werfen, Bedford, MA, USA), utilizzando i reagenti della medesima azienda (RecombiPlasTin e aPTT-SP). Per la valutazione del LAC è stato utilizzato il reagente dRVVT (Werfen, Bedford, MA, USA). La rilevazione degli aCL e a β 2GPI sono stati eseguiti sull'analizzatore ACL AcuStar (Werfen, Bedford, MA, USA). L'elettroforesi delle proteine sieriche è stata eseguita con Capillarys (Sebia, Evry Cedex, Francia), mentre l'immunofissazione è stata eseguita su Hydrasys (Sebia, Evry Cedex, Francia). Per la purificazione della CM sono state utilizzate le colonne HiTrap IgM Purification HP Sigma-Aldrich (Merck Spa, Milano, Italia).

DISCUSSIONE

Il PT e l'aPTT sono esami comunemente utilizzati per la valutazione della coagulazione plasmatica. Il PT è utilizzato anche come esame di monitoraggio per i pazienti in terapia anticoagulante orale (TAO) con antagonisti della vitamina K (AVK) (1). In questi ultimi pazienti, PT indeterminabili possono essere riscontrati a causa di un eccesso di anticoagulazione dovuto ad un'assunzione eccessiva del farmaco (2). Alterazioni del PT, in pazienti non sottoposti a terapia anticoagulante (con AVK o anticoagulanti orali ad azione diretta - DOA), possono essere indice di disturbi della coagulazione quali carenze fattoriali (fattori II, V, VII X). L'aPTT, invece, risulta alterato in caso di carenza fattoriale (fattore VIII, IX, XI, XII), presenza di inibitori (specifici o aspecifici) o

in caso di contaminazione eparinica. In generale, emolisi, lipemia, iperbilirubinemia ed ematocrito anormale possono agire da interferenti endogeni per entrambi gli esami. Molto raramente, le CM sono in grado di causare interferenza negli esami di coagulazione a causa dell'aumentata viscosità del campione e/o precipitazione delle stesse e/o reazioni delle proteine monoclonali con i reagenti (3). I farmaci, invece, sono la causa più comune di interferenza di tipo esogeno (4). In generale, i risultati alterati a causa di interferenze, che siano endogene, esogene o dovute alla scorretta esecuzione del prelievo, sono potenzialmente pericolosi (5). I valori ottenuti in presenza di interferenti possono essere fuorvianti per il clinico e possono esporre il paziente ad un rischio elevato di esito sfavorevole, specialmente in un contesto di emergenza. Sebbene sia ampiamente risaputo come le CM siano responsabili di alterazioni di molti esami di laboratorio, l'impatto delle stesse sugli esami della coagulazione può differire da paziente a paziente (6). In questo lavoro viene descritto un caso di interferenza da CM su esami della coagulazione ed in particolare sull'aPTT. La macroglobulinemia di Waldenström (WM) è un linfoma raro (2% dei linfomi non Hodgkin), che può originare da una gammopatia monoclonale di significato non determinato (MGUS). Sono diagnostici l'infiltrato midollare da parte dei linfociti neoplastici superiore al 10% e la presenza della CM IgM nel sangue (6). In assenza di fattori di rischio per la progressione in mieloma multiplo o in altri disordini linfoproliferativi, l'usuale gestione clinica prevede la ripetizione dell'elettroforesi sierica delle proteine a sei mesi e successivamente ogni due anni, senza necessità di ricorrere alla biopsia del midollo osseo (7). Le manifestazioni cliniche delle gammopatie monoclonali sono eterogenee ed includono la produzione di immunoglobuline monoclonali, una riduzione della secrezione di immunoglobuline non clonali da parte delle cellule plasmatiche, alterazioni dell'ematopoiesi con anemia, difetti dell'emostasi, lesioni del midollo osseo, ipercalcemia e disfunzioni renali (8). Al contrario del mieloma multiplo, nelle MGUS le manifestazioni sistemiche sono rare ed estremamente varie, così come le alterazioni degli esami coagulativi (10-11). Disordini emorragici possono essere il risultato dell'alterazione di vari meccanismi, tra cui carenze fattoriali dovute all'assorbimento amiloideale, CM con attività inibitoria sui fattori della coagulazione, alterata polimerizzazione del monomero di fibrina o fibrinolisi sistemica (10). Risultati anomali degli esami di screening della coagulazione sono comuni nei pazienti con neoplasie plasmacellulari (11). Tuttavia, questi non sono quasi mai associati a sanguinamento clinicamente rilevante, in quanto l'alterazione degli esami è dovuta a fattori interferenti tipici della patologia (6). Nel paziente qui descritto, l'aPTT era indeterminabile ed il PT oltre soglia, ma le percentuali di attività dei fattori misurate sul medesimo campione erano del tutto fisiologiche. Questo suggeriva che l'indeterminabilità dell'aPTT non dipendesse da basse percentuali di attività fattoriali, ma da qualche altra causa interferente. Esaminando attentamente la storia clinica del paziente si ipotizzava che la CM (IgM Kappa), potesse interferire sia con gli esami della coagulazione

che con la rilevazione degli anticorpi aCL/IgM. Per dimostrare tale ipotesi la CM è stata isolata riuscendo a riprodurre l'allungamento dei tempi di coagulazione attraverso l'aggiunta della stessa ad un PNP ottenuto da soggetti adulti sani. L'ipotesi degli autori è che la CM sia in grado di legarsi in maniera specifica ai fosfolipidi, "disturbando" la rilevazione dei tempi di coagulazione *in vitro*. Clinicamente, ovvero *in vivo*, il paziente non era affetto da alcuna alterazione del sistema emostatico, come ha dimostrato la totale assenza di sintomatologia riferibile a disordini emorragici o trombotici e la normalità del tracciato tromboelastografico. La CM IgM kappa è stata, però, in grado di interferire *in vitro* mimando una coagulopatia. Il paziente, infine, è stato regolarmente sottoposto alla gastroscopia prevista, senza alcuna complicanza né di tipo emorragico né di tipo trombotico. Il paziente è stato rivisto dopo 12 settimane per rivalutare la positività per LAC e aCL/IGM: il dRVVT è risultato negativo (ratio - Screen 1,15) e l'aCL/IgM notevolmente ridotta (58,4 U/mL). Il miglioramento dei dati di laboratorio si è avuto grazie al fatto che il paziente stava eseguendo una terapia di mantenimento con Rituximab (anticorpo monoclonale anti CD120), evidenziando come la CM avesse in precedenza interferito non solo sugli esami del PT e dell'aPTT ma anche sul LAC e aCL/IgM. Un messaggio che deve emergere da questo caso è che la valutazione di laboratorio della potenziale presenza di CM in circolazione dovrebbe essere considerata come approfondimento diagnostico in un paziente che non assume alcuna terapia anticoagulante ma con inspiegabili e inattesi risultati degli esami di coagulazione. Bisognerebbe, quindi, misurare la concentrazione delle proteine totali e delle immunoglobuline (G, A, M) ed eseguire l'elettroforesi e l'immunofissazione delle proteine, ove possibile. In conclusione, la corretta interpretazione dei risultati di laboratorio e la costante comunicazione con i clinici ha facilitato l'inquadramento di questo caso clinico.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Lippi G, Pasalic L, Favaloro EJ. Detection of mild inherited disorders of blood coagulation: current options and personal recommendations. *Expert Rev Hematol* 2015;8:527-42.
2. Zareh M, Davis A, Henderson S. Reversal of warfarin-induced hemorrhage in the emergency department. *West J Emerg Med* 2011;12:386-92.
3. King RI, Florkowski CM. How paraproteins can affect laboratory assays; spurious results and biological effects. *Pathology* 2010;42:397-401.
4. Dimeski G. Interference testing. *Clin Biochem* 2008;29:S43-8.
5. Nanda SK, Sarangi R, Ray L, Kumar A, Padhi S. Factitious biochemical reports which are caused due to paraproteinaemia in multiple myeloma - a case report. *J Clin Diag Res* 2013;7:350-2.
6. Huang H, Li H, Li D. Effect of serum monoclonal protein concentration on haemostasis in patients with multiple myeloma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; 26:555-9.

7. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar S V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
8. Huang H, Li H, Li D. Effect of serum monoclonal protein concentration on haemostasis in patients with multiple myeloma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;26:556-9.
9. Crowley MP, Quinn S, Coleman E. Differing coagulation profiles of patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *J Thromb Thrombolysis* 2015;39:245-9.
10. Wu X yao, Yin Y feng, Teng J lin, et al. IgMk paraprotein from gammopathy patient can bind to cardiolipin and interfere with coagulation assay: A case report. *BMC Immunol* 2017;18:1-4.
11. Thiagarajan P, Shapiro SS, De Marco L. Monoclonal immunoglobulin M λ coagulation inhibitor with phospholipid specificity. Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980;66:397-405.