

Il laboratorio nella diagnosi differenziale

Le microangiopatie trombotiche: dalla diagnosi alle nuove terapie

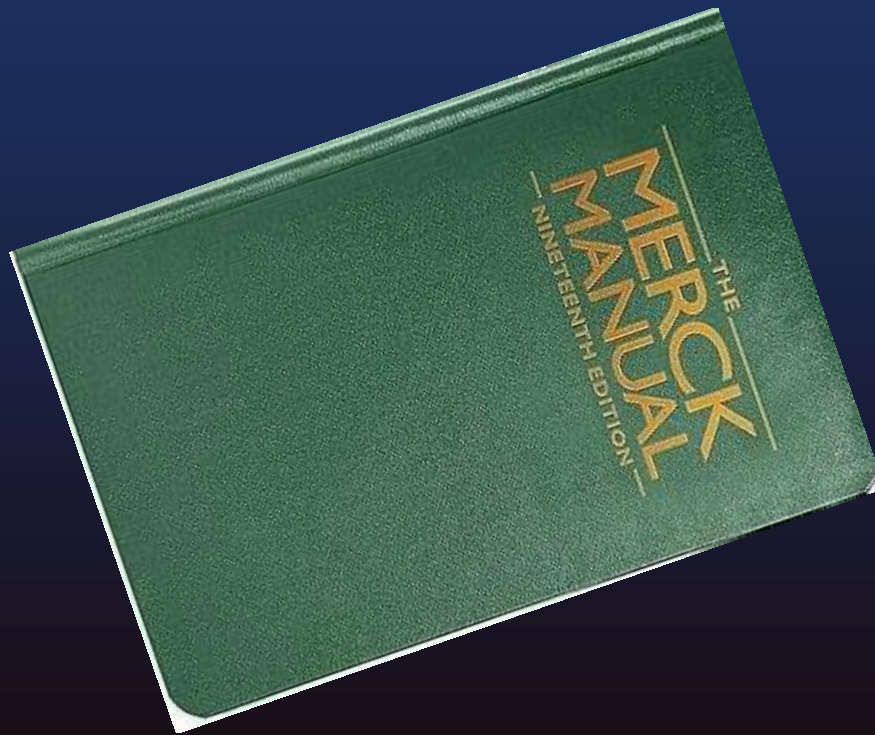
Raimondo De Cristofaro

Servizio Malattie Emorragiche e Trombotiche
Fondazione Policlinico universitario “A. Gemelli”
Polo di Oncologia - Ematologia
Istituto di Medicina Interna e Geriatria
Università Cattolica S. Cuore - Roma



Definizione di microangiopatia trombotica

- “Condizione patologica caratterizzata da anemia emolitica, trombocitopenia, trombosi del microcircolo con manifestazioni cliniche multidistrettuali”



Classificazione delle microangiopatie trombotiche

- MT primarie - SEUa, STEC-SEU e TTP
 - La malattia è definita dalla presenza di MT
- MT secondarie
 - Condizioni/eventi associati a MT come complicanza
 - Ipertensione maligna
 - Criopirinopatie (CAPS)
 - MT post trapianto renale
 - Lupus Eritematoso Sistemico
 - MT indotta da farmaci
 - Crisi renale da sclerodermia
 - Preeclampsia
 - DIC
 - Eclampsia
 - MT da trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT)
 - Sindrome HELLP
 - MT maligna

Poiché molte malattie concomitanti con MT, STEC -SEU, SEUa e TTP manifestano contemporaneamente i loro segni e sintomi, spesso la loro diagnosi può essere ritardata o inesatta

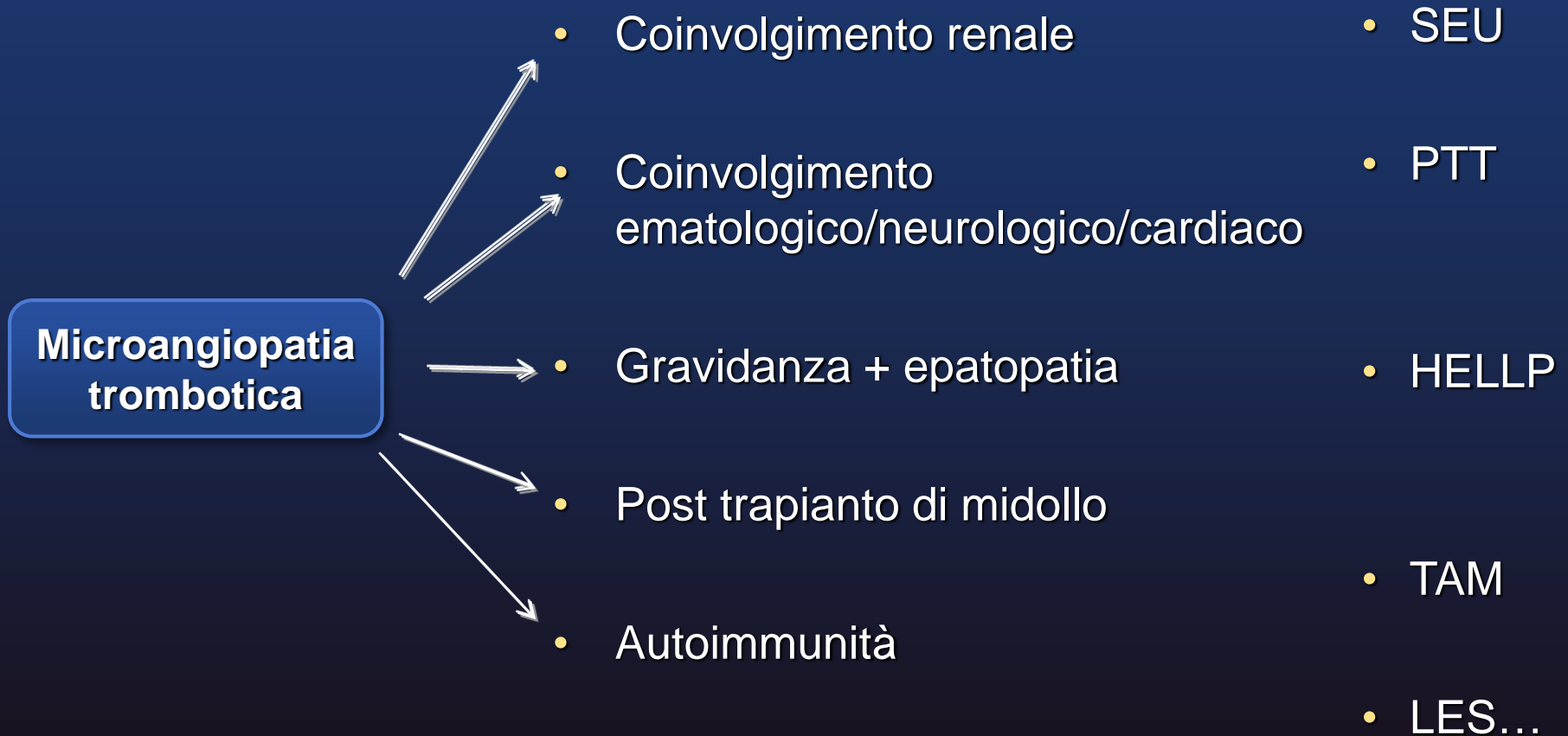
Dilemma clinico

- 1. Incertezza diagnostica di una malattia che può essere rapidamente fatale**
- 2. Disponibilità di un trattamento efficace che presenta dei rischi**

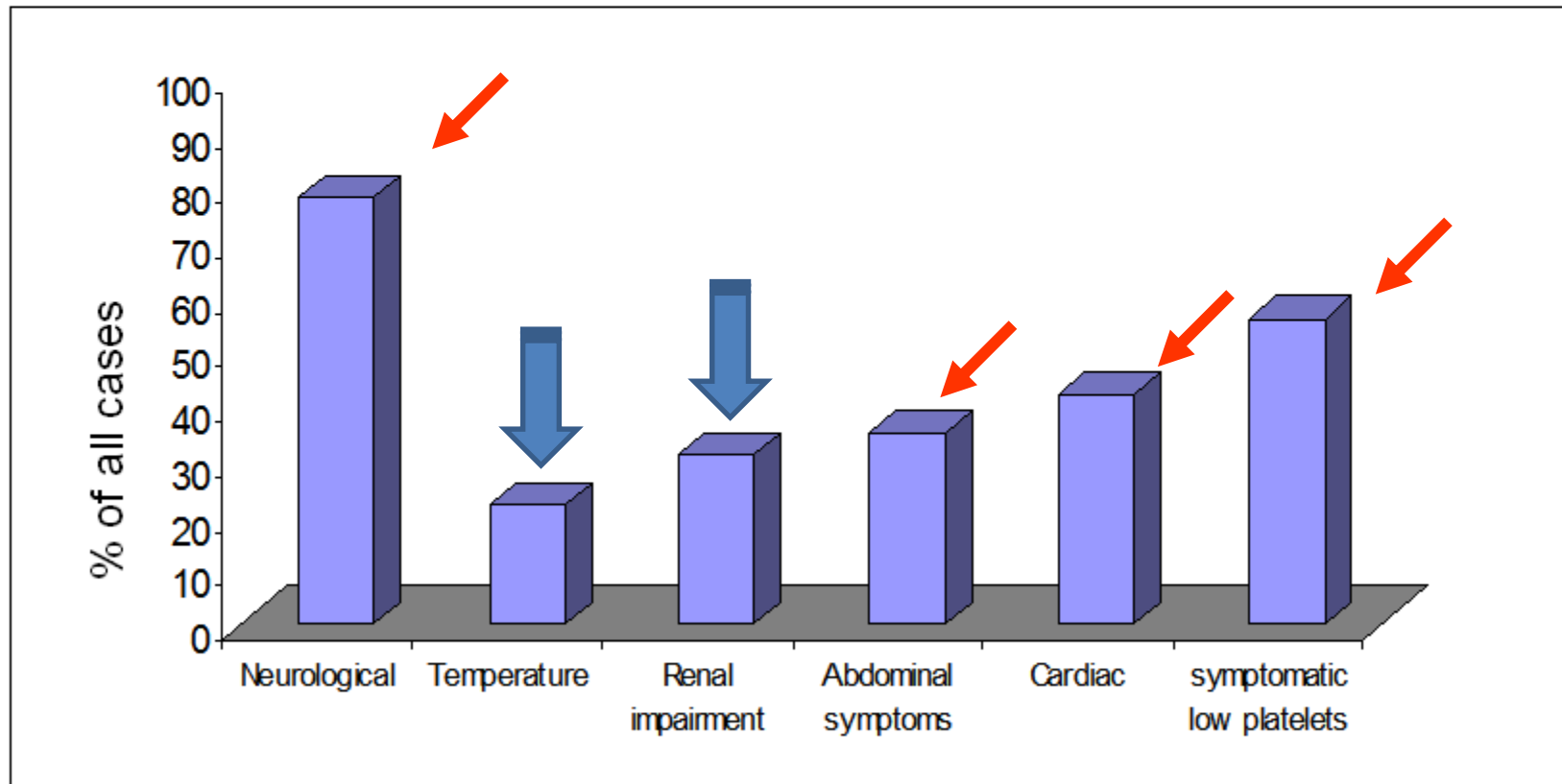
- Come di distinguere le due più importanti e potenzialmente fatali forme di MAT, la PPT e le SEU per fornire ai pazienti la più appropriata terapia?
- **Il test di laboratorio unico per effettuare una diagnostica differenziale della MAT al momento non sembra esistere.**
- Inoltre, molti di questi test **non sono immediatamente disponibili nei laboratori non specializzati.**
- Tuttavia, vedremo come una diagnosi di TTP può essere inizialmente ottenuta con ragionevole precisione **utilizzando molto semplici misure di laboratorio che sono ubiquitariamente a disposizione**

Dall'organo alla malattia

■ Diagnosi differenziale clinica delle microangiopatie trombotiche



Presenting clinical features of acute TTP episodes-SE England TTP Registry



ROSE's TTP score

	Hb	Plt	Neuro	Rene *
0	>12 g/dl	> 100.000/ul	No	CrS normale
1	>9<12g/dl	>20<100.000/ul	§Segni minori	CrS>1<2.5mg/dl
2	<9g/dl	<20.000/ul	#Segni maggiori	CrS>2.5mg/dl

§ Parestesie, cefalea

Deficit focali, cambio comportamentale, stupore, coma

Score \geq 5 istituzione immediata del PEX

Score < 5 plasma infusione 15ml/kg e si pianifica il programma con PEX

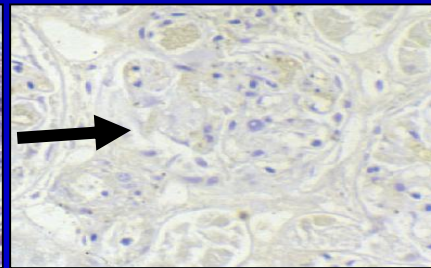
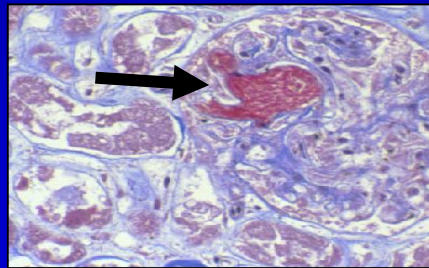
- Il rapporto uACR (v.n.< 30 mg/g o <3.4 mg/mmol) sarebbe preferibile in termini di sensibilità alla determinazione della sola creatinina plasmatica?

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

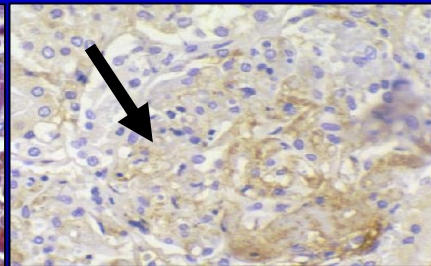
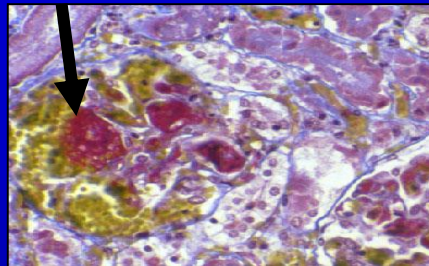
Platelets and
fibrin staining

VWF

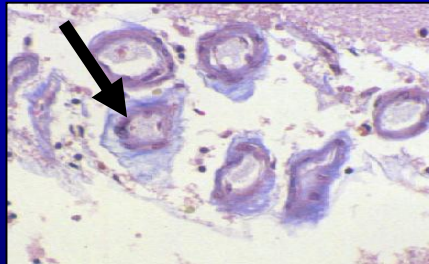
DIC



HUS

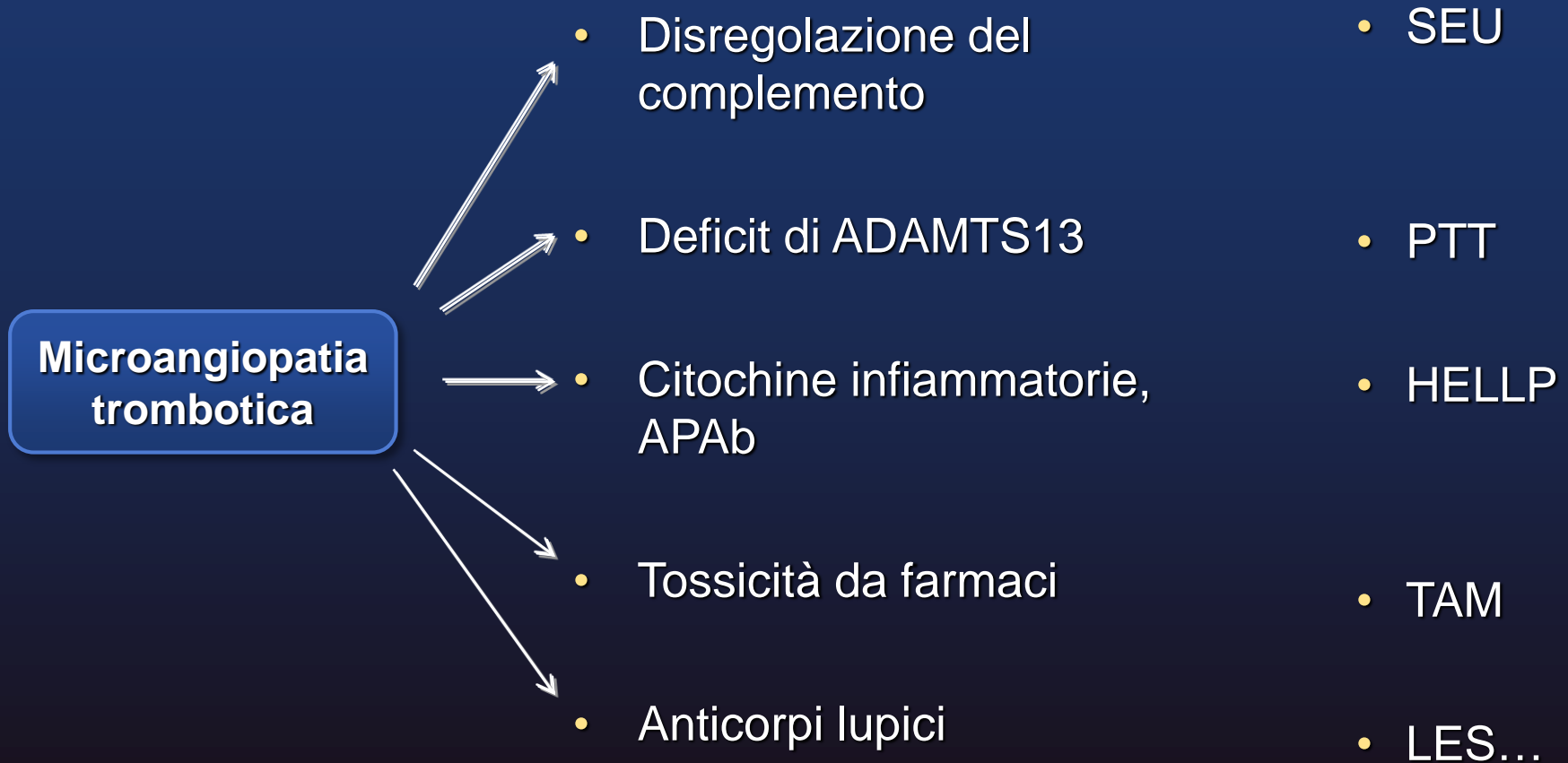


TTP



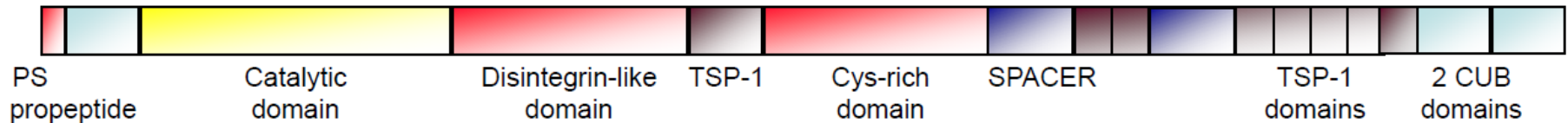
Dai meccanismi alla malattia

■ Diagnosi fisiopatologica delle microangiopatie trombotiche



ADAMTS13

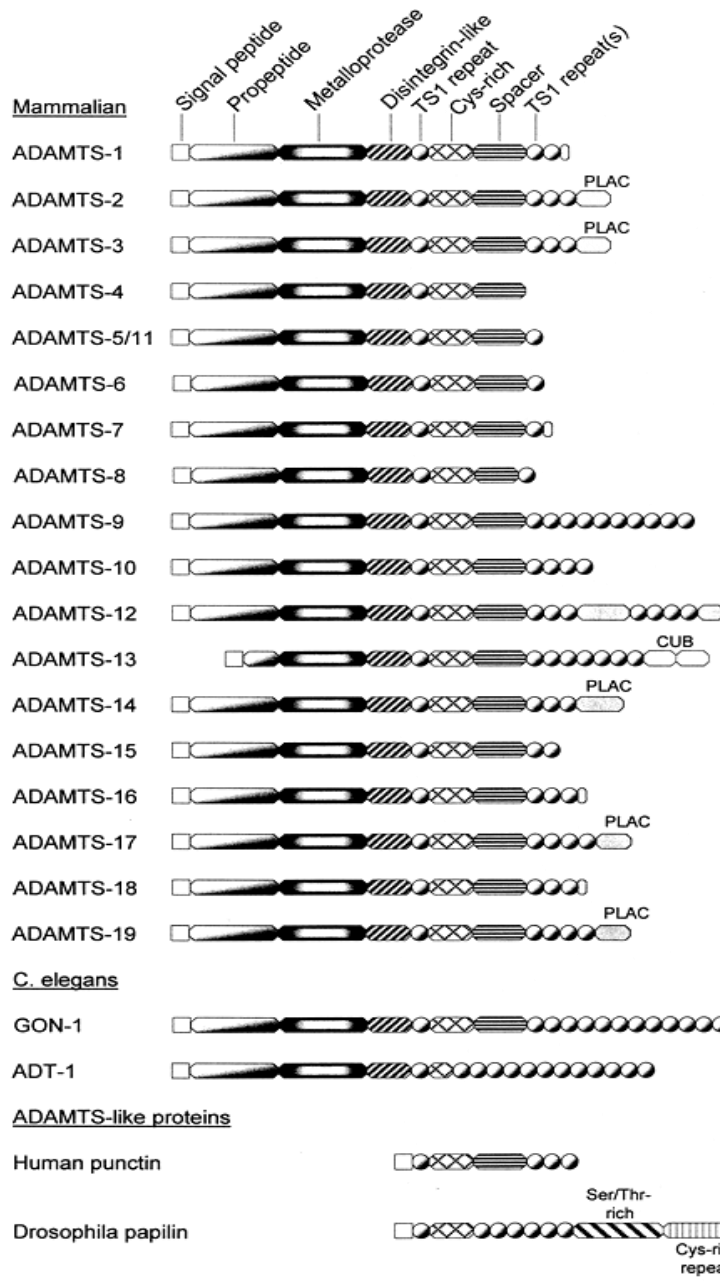
- Metalloproteinase, ADAMTS family
- Monochain glycoprotein of 190 kDa (1427 aa)



- Gene: chromosome 9q34
- Synthesis: liver
- Plasma concentration = 1 $\mu\text{g/mL}$; half-life = 3 days

↓
Mutations
(hereditary TTP forms)

↓
Autoantibodies
(acquired TTP forms)



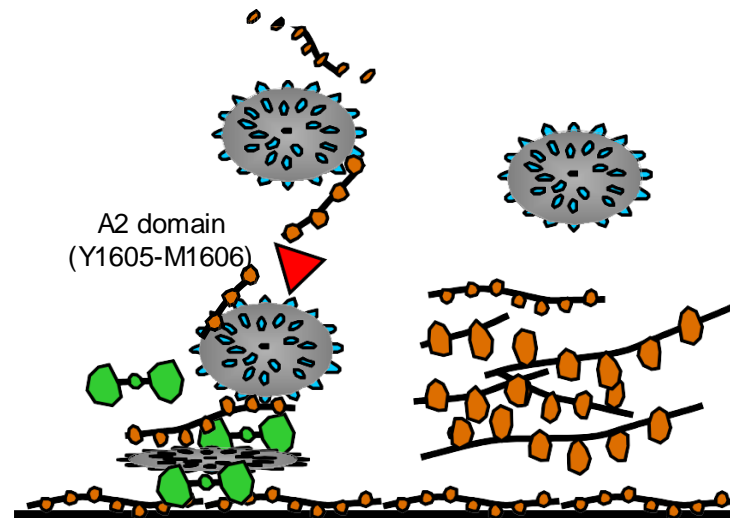
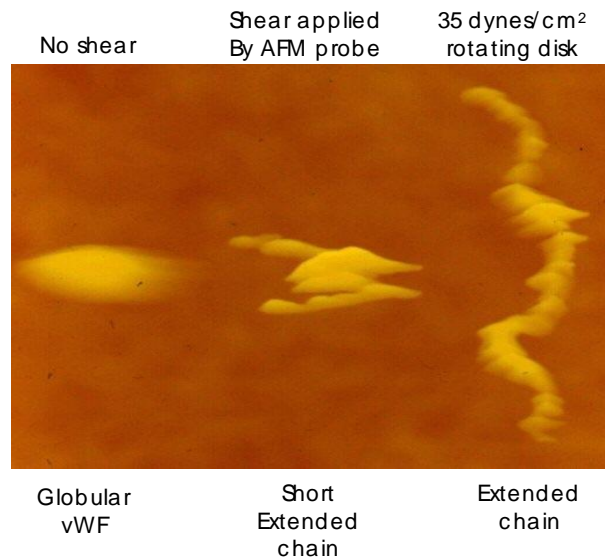
The ADAMTS FAMILY

← **ADAMTS-13**

ADAMTS-13

A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin-1 repeats

- It limits platelet-rich thrombus formation in the small arteries by cleaving unusually large (UL) VWF multimers under high shear stress
- ADAMTS13 cleaves the VWF subunit at the Tyr1605–Met1606 peptide bond in the A2 domain (Furlan M, et al. Blood 1996; Tsai HM. Blood 1996; Zheng XL, et al. JBC 2001; Levy GG, et al. Nature 2001; Fujikawa K, et al. Blood 2001)



Natural Modulators of VWF/ADAMTS-13 interaction

Positive

- Shear forces
- Platelet GpIb
- P-selectin

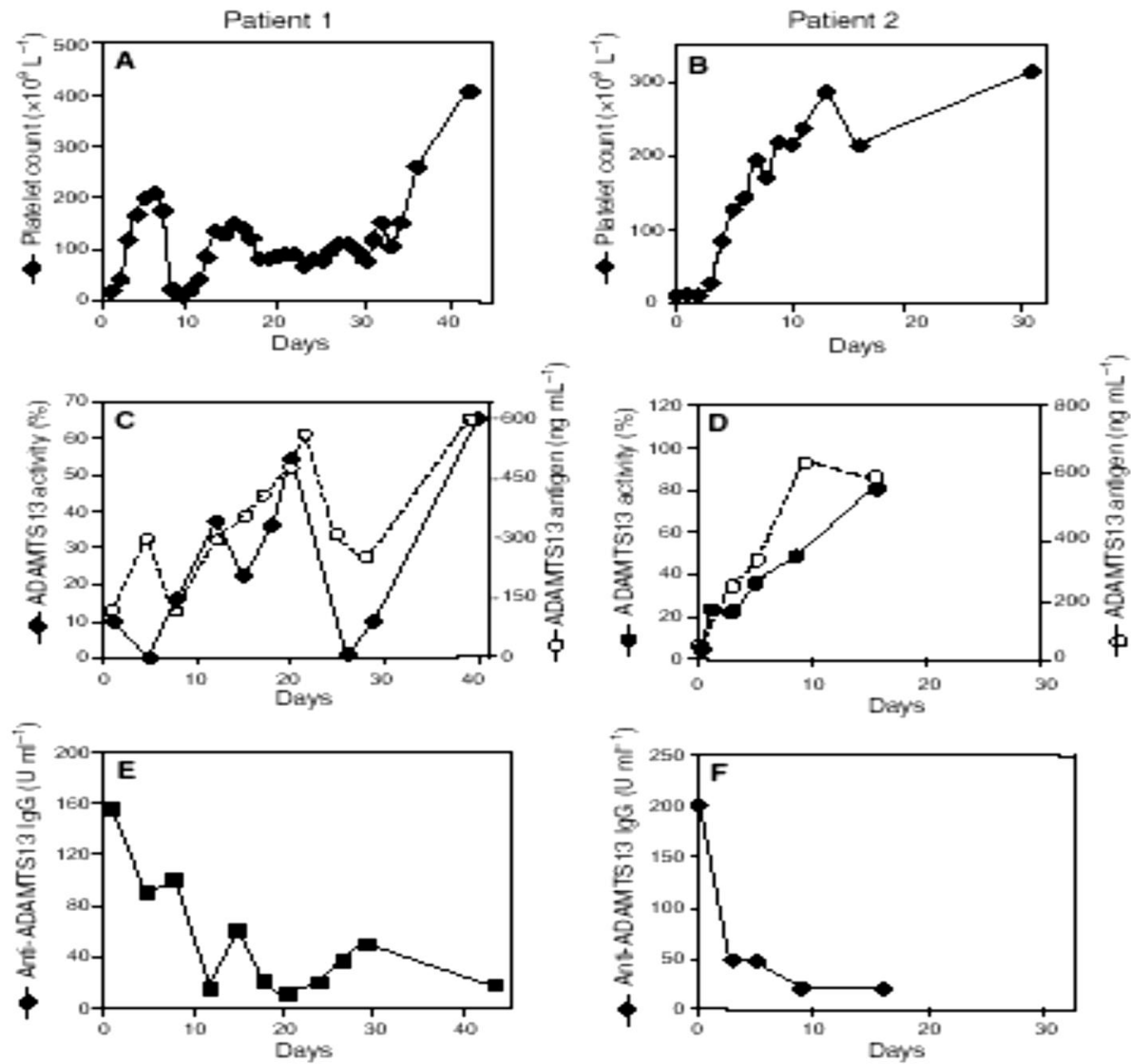


Negative

- Anti-ADAMTS-13 Ab
- Anions (chloride)

ADAMTS13 deficiency and TMAs

- **UNDETECTABLE ADAMTS13 activity plasma levels (severe deficiency)**
 - typically associated to thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP),
 - can also be found in other non-TTP thrombotic microangiopathies (TMAs), even though to a less extent
- **DETECTABLE ADAMTS13 activity plasma levels (normal or mild-to-moderate reduction)** do NOT help in the differential diagnosis



Shelat et al. (2006) JTH 4:1707

Come orientarsi in laboratorio?

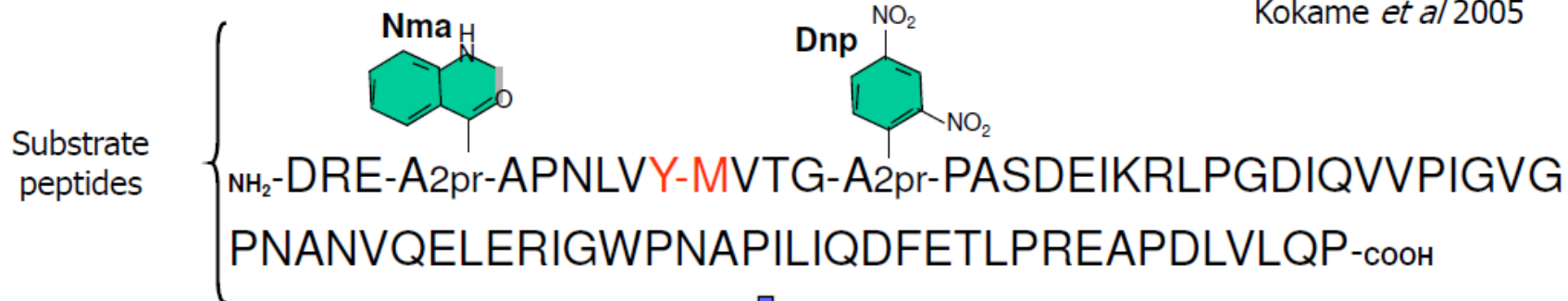
La diagnosi della PTT

Which assays for ADAMTS13 testing?

- Assays of ADAMTS13 activity
- Assays of ADAMTS13 antigen
- Assays of anti-ADAMTS13 autoantibodies (neutralizing and non-neutralizing protease activity)

FRETS-VWF73 assay

Kokame *et al* 2005



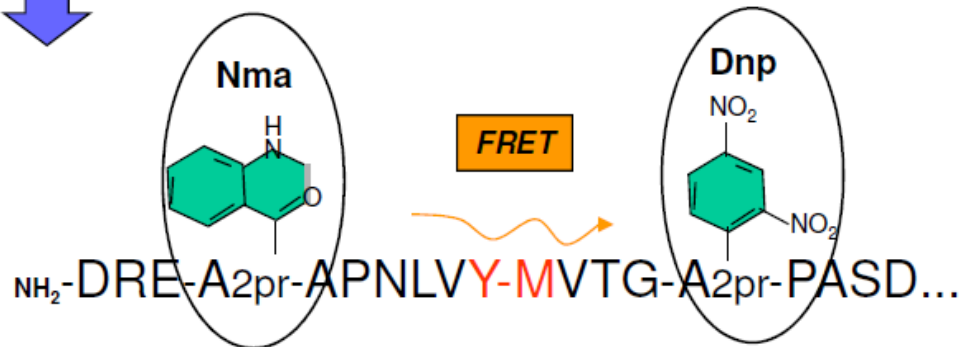
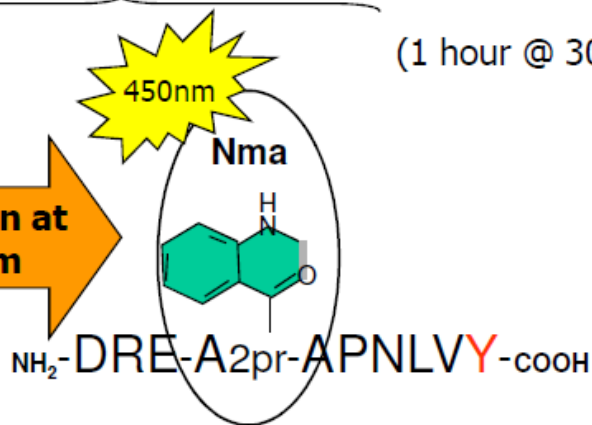
SAMPLE

(1/15 in assay buffer)

Cleaved peptides

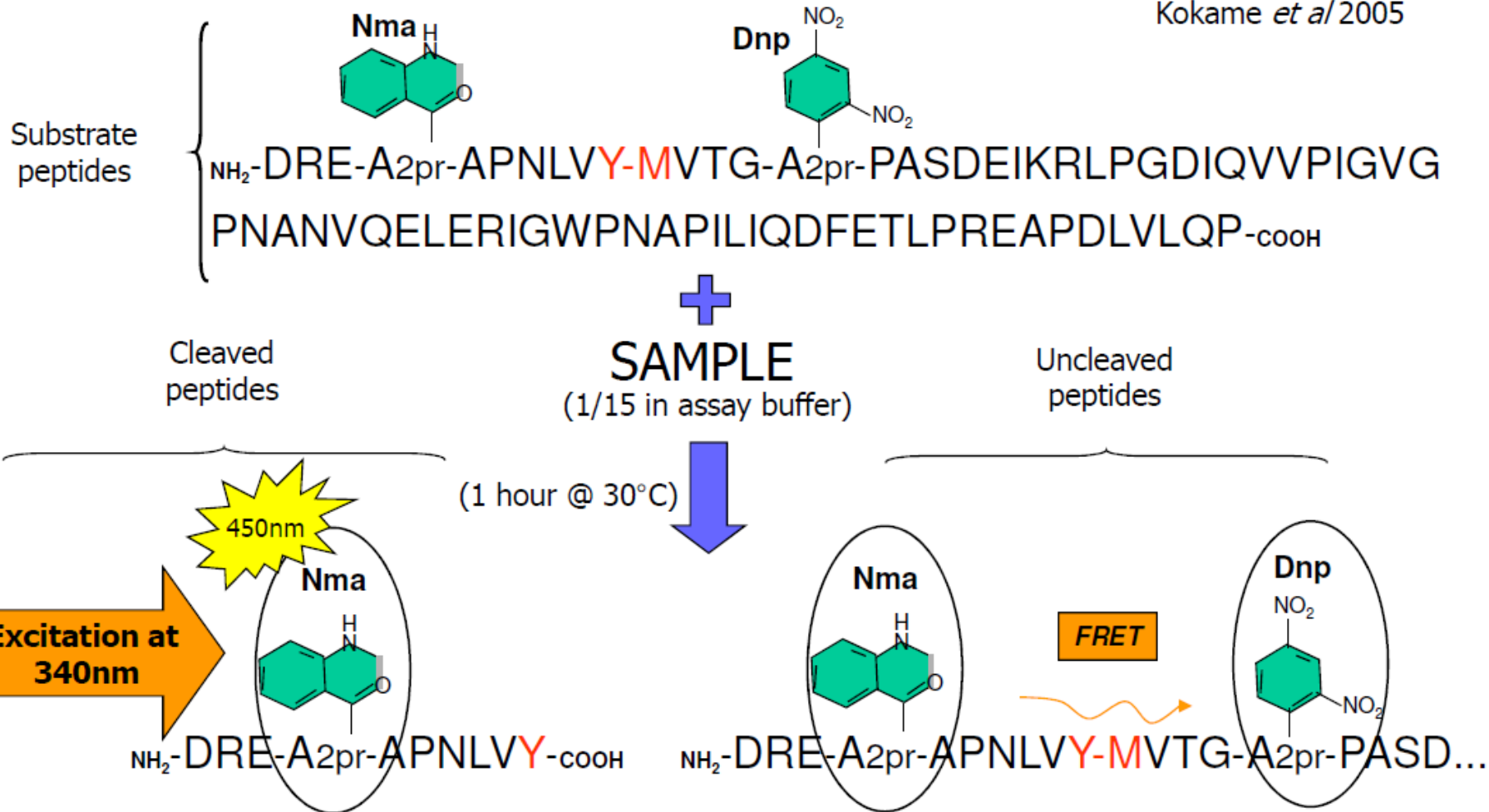
Uncleaved peptides

(1 hour @ 30°C)



FRETS-VWF73 assay

Kokame *et al* 2005



The increasing of fluorescence emission over time is directly proportional to ADAMTS13 activity in plasma

Come orientarsi in laboratorio?

La diagnosi della PTT

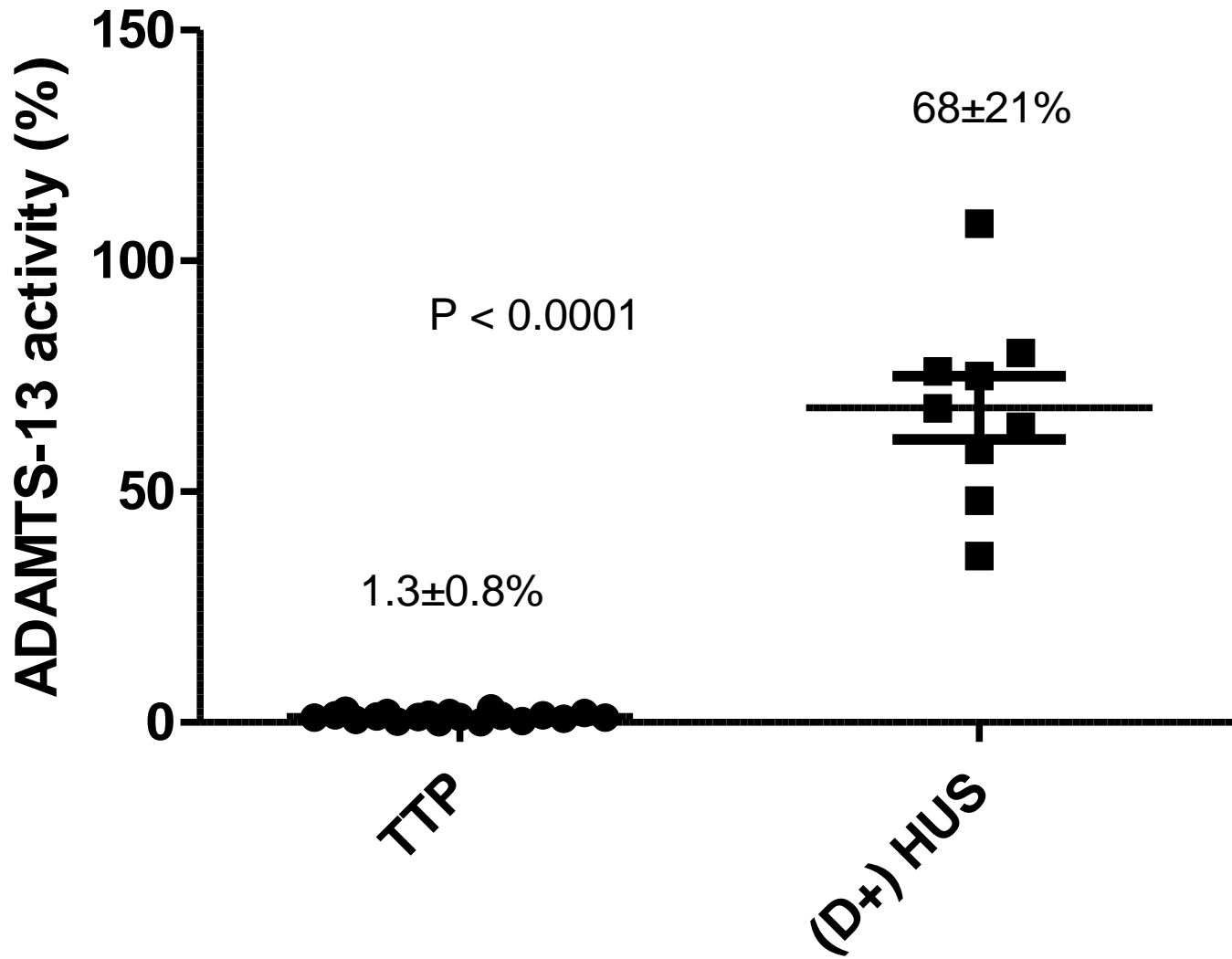
- Casi tipici PTT congenite o acquisite sono caratterizzati da *grave carenza* di ADAMTS13 nel plasma [1-2].
- La maggior parte dei metodi funzionali di laboratorio per la misurazione nel plasma dell'ADAMTS-13 non sono abbastanza sensibili per misurare con precisione *livelli plasmatici <10% (5%).*
- *Quindi una carenza grave è di solito definita da livelli inferiori <10%.*
Il valore predittivo positivo di questo dato è molto alto, perché solo in rarissimi casi di sepsi, neoplasia e CID I livelli plasmatici di coagulazione intravascolare possono essere così bassi.

Come orientarsi in laboratorio?

La diagnosi della PTT

- Al contrario la SEU (sia atipica che STEC) è caratterizzata da livelli plasmatici misurabili di ADAMTS-13 [1-2].

- 1) G.G. Levy, et al. *Nature* 413 (2001) 488–494.
- 2) L.A. Lotta, et al. *Blood* 120 (2012) 440–448.



Come orientarsi in laboratorio?

La diagnosi della PTT

- Anche se **l'analisi del DNA e la ricerca di anticorpi anti-ADAMTS-13** sono passi non essenziali nella diagnosi iniziale di TTP, questi test sono necessari come secondi filtri perché **differenziano la PTT ereditaria dalla forma di PTT su base autoimmune [1]**

1) M. Rieger, et al. *Blood* 106 (2005) 1262–1267.

DIAGNOSIS-TTP

ADAMTS13 level and anti-ADAMTS13 Abs titer ?

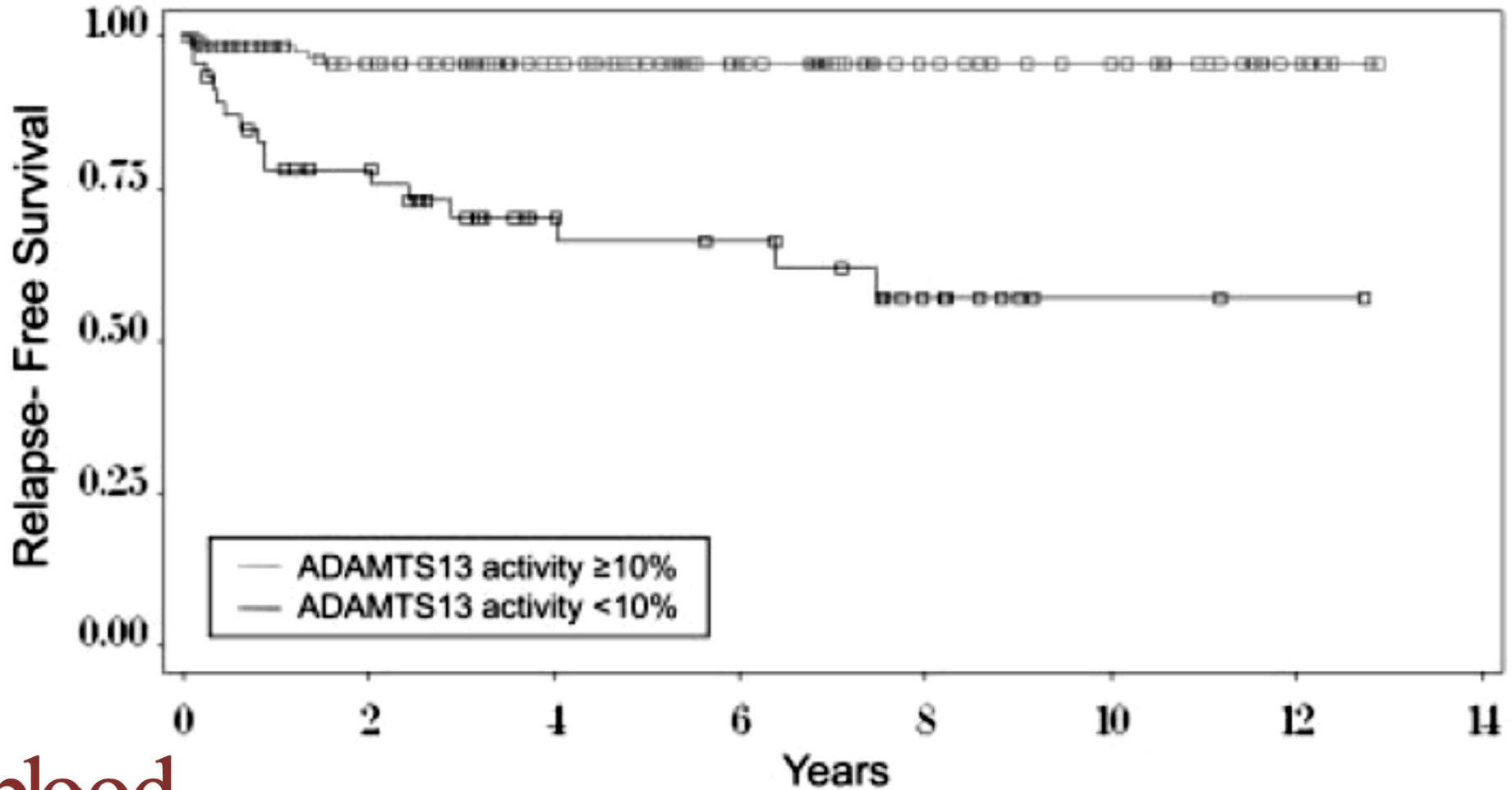


TTP diagnosis when ADAMTS13 < 5%



Useful as exclusion criterion and for prognosis

Relapse-free survival in TTP patients



blood

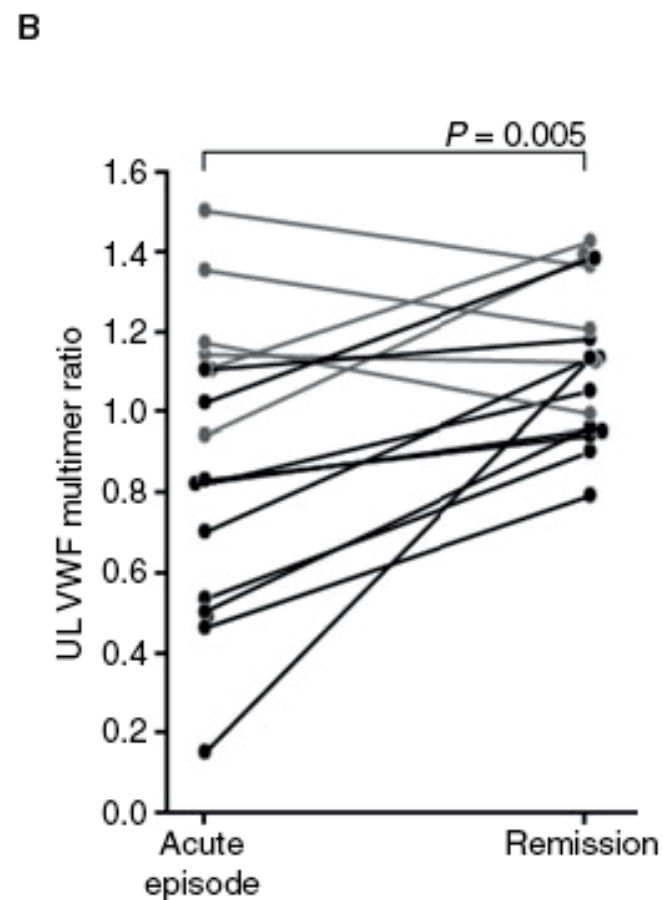
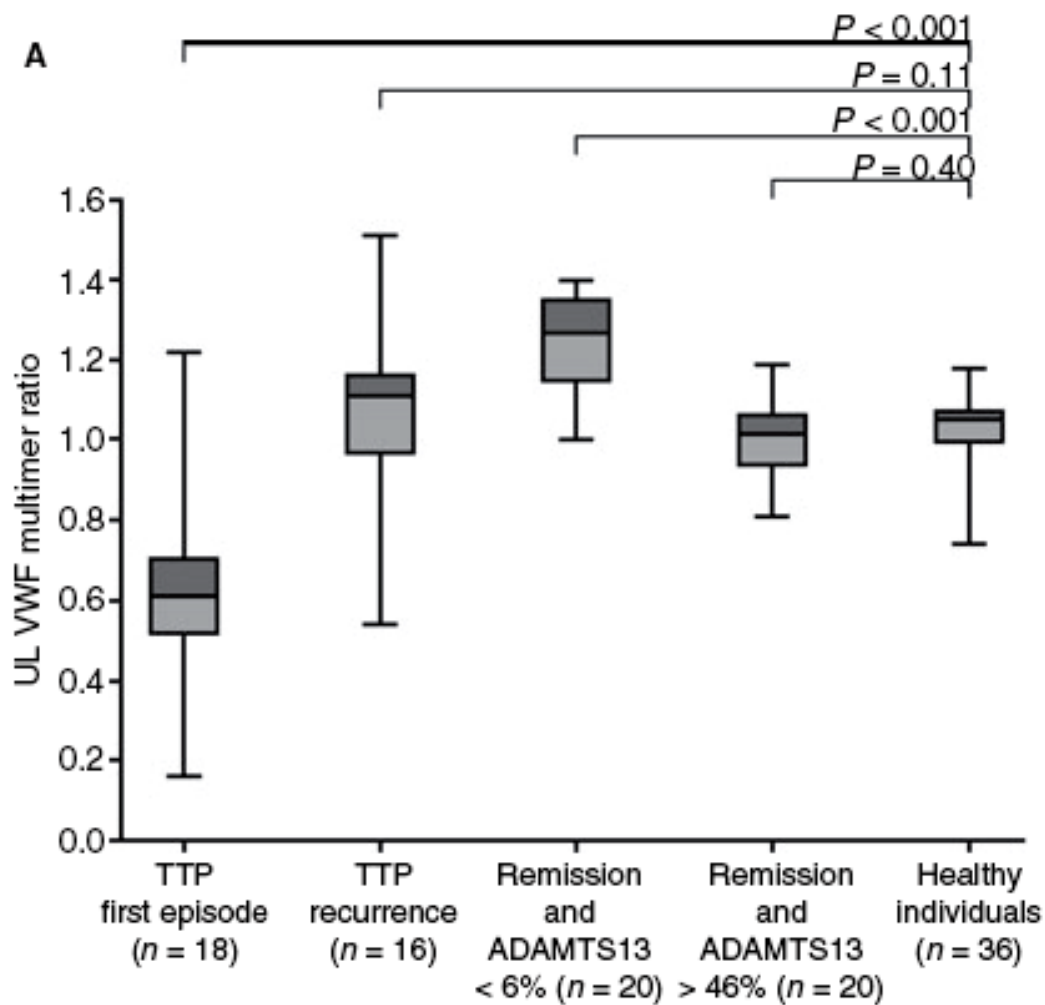
2010 115: 1500-1511
Prepublished online December 23, 2009;
doi:10.1182/blood-2009-09-243790

Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura

Johanna A. Kremer Hovinga, Sara K. Vesely, Deirdra R. Terrell, Bernhard Lämmle and James N. George

CLINICAL APPLICATIONS OF ADAMTS-13 ASSAY

Stage	ADAMTS-13 Deficiency (<5%)	Implication
Presentation	Yes	TTP
	No	Other TMA forms?
Remission	Yes	Risk of relapse



Come orientarsi in laboratorio?

La diagnosi della PTT

- L'eccezione a questo quadro diagnostico relativamente semplice è rappresentata da casi di PTT secondaria ad altre malattie come
 - a) cancro metastatico
 - b) trapianto di midollo osseo allogenico
 - c) sepsi e infezione da HIV [1,2] diagnosticate come MAT per la presenza di piastrinopenia da consumo, anemia microangiopatica e danno d'organo a causa di una trombosi microvascolare.

1) M. Rieger, et al. *Blood* 106 (2005) 1262–1267.

2) J.N. George, C.M. Nester. *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 654–666.

Algoritmi diagnostici per la diagnosi differenziale di PTT basati su dati semplici di laboratorio

Sono stati fatti svariati tentativi per sviluppare un punteggio in base a semplici test di laboratorio in grado di prevedere carenza grave di ADAMTS-13 (e quindi una diagnosi *bona fide* di PTT), **prima ancora che il laboratorio metta a disposizione risultati sui livelli plasmatici della proteasi.**

Algoritmi diagnostici per la diagnosi differenziale di PTT basati su dati semplici di laboratorio

Results of Laboratory Testing in 214 Patients with Thrombotic Microangiopathy According to ADAMTS13 Activity.

	Deficiency group (n = 160)	Detectable group (n = 54)	P Value
Hemoglobin level, g/dL	8.1 (2.2)	8.7 (2.1)	.06
Reticulocyte count, $\times 10^9/L$	185 (118)	106 (80.1)	<.0001
LDH level, U/L	6.0 (4.6)	5.8 (3.5)	.70
Platelet count, $\times 10^9/L$	17.4 (14.2)	66.6 (49.3)	<.0001
Creatinine level, $\mu\text{mol/L}$ mg/dL	114 (68.4)	454 (326)	<.0001
	1.29 (0.77)	5.13 (3.68)	
Estimated GFR, mL/min	80.6 (33.3)	35.0 (59.2)	<.0001
ANA	85 (53%) ¹	13 (24%) ²	<.001
Anti-dsDNA antibodies	9 (7%) ³	0 (0%) ⁴	.21
Anticardiolipin antibodies	14 (11%) ³	9 (20%) ⁵	.11

Data are presented as mean (standard deviation) or number (percent).

¹21 patients had anti-extractable nuclear antigen antibodies, including anti-SSA antibodies in 12 cases, anti-SSA antibodies associated with anti-SSB antibodies in 5 cases, and anti-U1-snRNP antibodies in 4 cases.

²1 patient had anti-SSA antibodies.

The analysis was performed on 127³, 35⁴ and 45⁵ patients.

Abbreviations: ANA, antinuclear antibodies; Anti-dsDNA, anti-double-stranded DNA; GFR, glomerular filtration rate.

doi:10.1371/journal.pone.0010208.t002

Table 4. Association Between Patient Characteristics and ADAMTS13 Deficiency Using Multivariate Analysis.

Patient Characteristics	Adjusted Odds Ratio	95% CI	<i>P</i> Value
Creatinine level ≤ 200 $\mu\text{mol/L}$ (2.26 mg/dL)	23.4	8.8–62.5	<.001
Platelet count $\leq 30 \times 10^9/\text{L}$	9.1	3.4–24.2	<.001
Positive ANA	2.8	1.0–8.0	<.05

Abbreviations: ANA, antinuclear antibodies; CI, confidence interval by bootstrap resampling technique.

doi:10.1371/journal.pone.0010208.t004

Coppo P, et al. (2010) Predictive Features of Severe Acquired ADAMTS13 Deficiency in Idiopathic Thrombotic Microangiopathies: The French TMA Reference Center Experience. PLoS ONE 5(4): e10208. doi:10.1371/journal.pone.0010208
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=info:doi/10.1371/journal.pone.0010208>

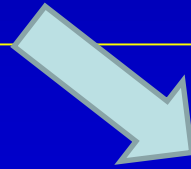
Algoritmi diagnostici per la diagnosi differenziale di PTT basati su dati semplici di laboratorio

Nello studio di Coppo & coll. la previsione di carenza di ADAMTS-13 grave aveva un valore positivo del 85% quando almeno uno dei suddetti criteri era presente, un valore predittivo valore che è salito al 98%, quando tutti i criteri erano presenti contemporaneamente

CLINICAL FORMS OF TMA

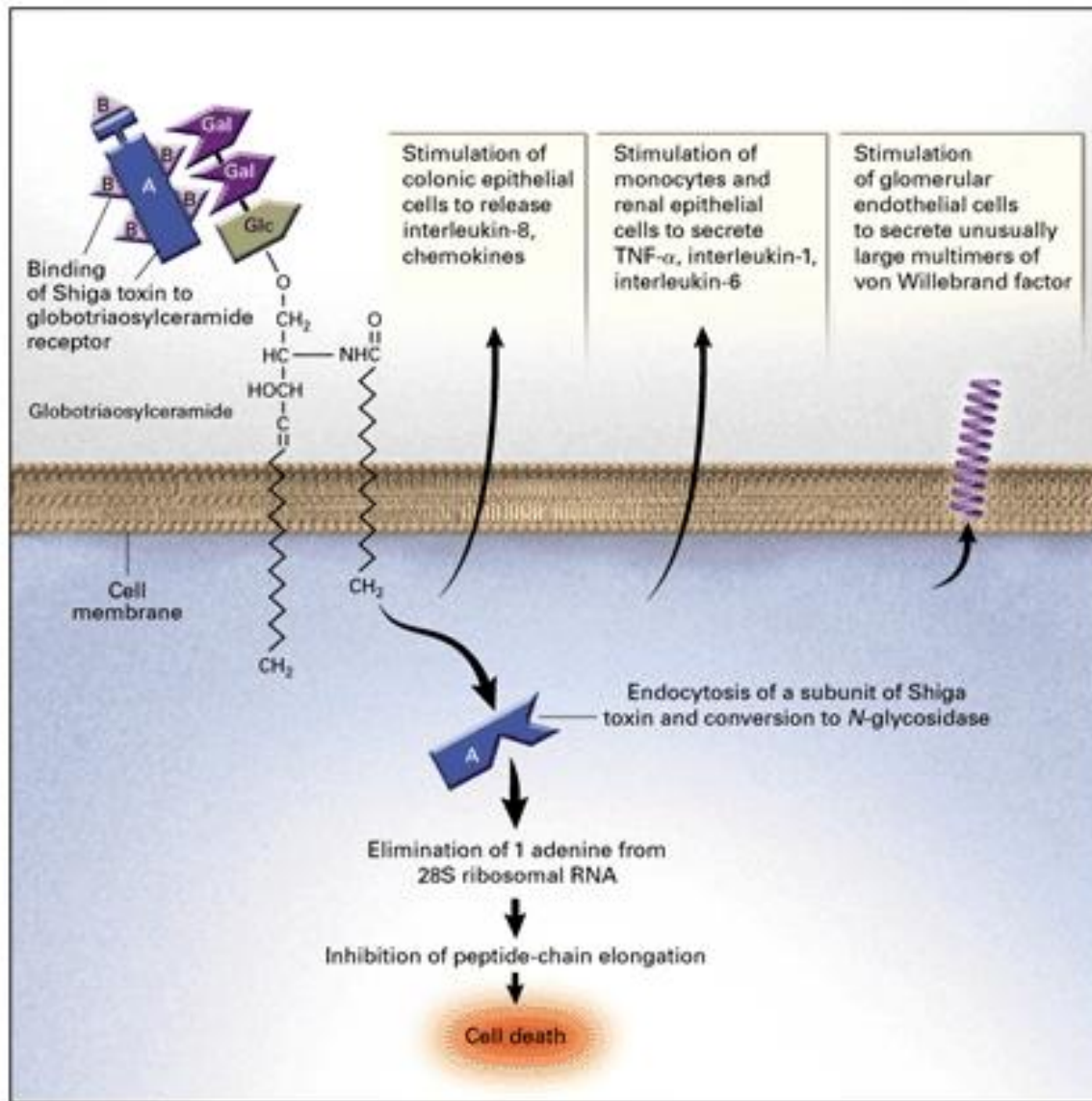
TTP

- Acute sporadic (non-familial)
- Chronic recurrent (often familial)



HUS

- Diarrhea-related: verotoxin, shigella toxin
- Atypical (non-familial or familial)



DD della SEU

La scoperta che nella maggior parte dei casi di SEU vi è un'anormale attivazione della via alternativa del complemento ha portato alla proposta di usare il termine di **SEU da complemento**, anche se ci sono casi dovuti a mutazioni genetiche diverse da disregolazione del complemento, come mutazioni del Diacil-glicerolo-3-kinasi ϵ (DGKE) [1] e altri in cui l'eziologia non è stata ancora identificata [2].

[1] M. Lemaire, et al. *Nat. Genet.* 45 (2013) 531–536.

[2] C. Loirat, et al. *Orphanet. J. Rare Dis.* 6 (2011) 60

DD della SEU

Il test genetico è in grado di rilevare in circa un terzo fino alla metà dei pazienti con SEU mutazioni eterozigoti nei geni che codificano proteine coinvolte nell'attivazione del complemento (guadagno-di-funzione) o la sua regolazione (perdita della funzione) [1]

[1] M. Noris, G. Remuzzi, Atypical hemolytic–uremic syndrome, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 1676–1687

Complement and Atypical HUS

About 50%-60% of aHUS cases are associated with a mutation in a complement-related gene

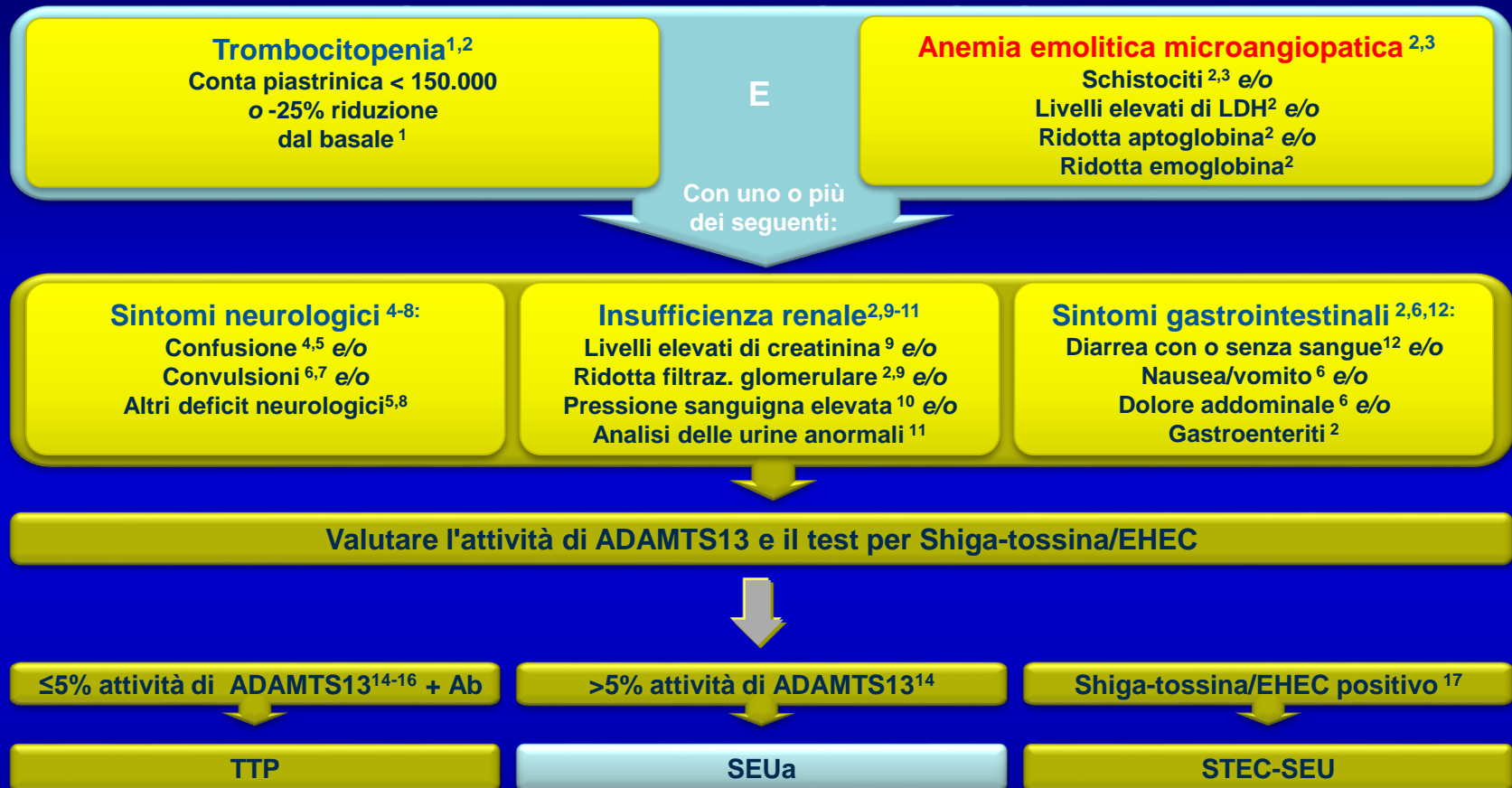
Protein	Gene	Source	Location	% of aHUS
Factor H	<i>CFH</i>	Liver	circulates	~ 15-30%
Factor I	<i>CFI</i>	Liver	circulates	~ 5-10%
Membrane Cofactor Protein	<i>MCP</i>	Widespread	Membrane bound	~ 10-15%
Factor B	<i>CFB</i>	Liver, ?	circulates	<5%
C3	<i>C3</i>	Liver, ?	circulates	~ 5-10%
Anti-FH-Ab	<i>CFHR1/CFHR3</i>	Lymphocyte	circulates	~ 10%
Unknown				~ 40-50%

Jozsi et al. Blood 2008, Frémeaux-Bacchi V et al. Blood 2008, Goicoechea de Jorge 2007, Caprioli, et al Blood 2006, Kavanagh Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007

SEU atipica e test di laboratorio per disregolazione del complemento

- ❖ La valutazione di marcatori semplici di attivazione del complemento, come **bassi livelli di C3 e fattore H con C4 normale sono di valore limitato,** perché solo un terzo dei pazienti affetti da SEU atipica confermato da test su DNA concorda con questa semplice strategia di laboratorio.
- ❖ **Prospettive di utilizzo del saggio immunoenzimatico per la misurazione del C5b-9 nella diagnostica di HUS atipica,** sebbene il saggio presenti problemi preanalitici
- ❖ Casi di SEU atipica causata dalla formazione acquisita **di autoanticorpi che si legano o inattivano il fattore H** sono estremamente rari, così che la ricerca iniziale di questi autoanticorpi non è necessario

Diagnosi differenziale delle microangiopatie thrombotiche:



1. Dati su file. Alexion Pharmaceuticals, Inc.; 2012.
2. Caprioli J et al. *Blood*. 2006;108:1267-1279.
3. Noris M et al. *N Engl J Med*. 2009;361:1676-1687.
4. Ohanian M et al. *Clin Pharmacol*. 2011;3:5-12.
5. Noris M et al. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:1177-1183.
6. Dragon-Durey MA et al. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:2180-2187.
7. Neuhaus TJ et al. *Arch Dis Child*. 1997;76:518-521.
8. Davin JC et al. *Am J Kid Dis*. 2010;55:708-711.

9. Sellier-Leclerc AL et al. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:2392-2400.
10. Sallée M et al. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:2028-2032.
11. Al-Akash SI et al. *Pediatr Nephrol*. 2011;26:613-619.
12. Noris M et al. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:1844-1859.
13. Zuber J et al. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(11):643-657.
14. Bianchi V et al. *Blood*. 2002;100:710-713.
15. Tsai HM. *Int J Hematol*. 2010;91:1-19.
16. Barbot J et al. *Br J Haematol*. 2001;113(3):649-651.
17. Bitzan M et al. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36:594-610.

Ringraziamenti

Dr. Stefano Lancellotti
Dr.ssa Monica Sacco
Prof. Maurizio Pompili



Istituto di Medicina Interna e Geriatria
Catholic University School of
Medicine of Rome

Prof. Flora Peyvandi
Dr. Roberta Palla
Luca Lotta



Fondazione Bianchi Bonomi
IRCCS Ospedale Maggiore
Dpt. Internal Medicine
University of Milan

Grazie per l'attenzione