

Laboratorní diagnostika vonWillebrandovy choroby

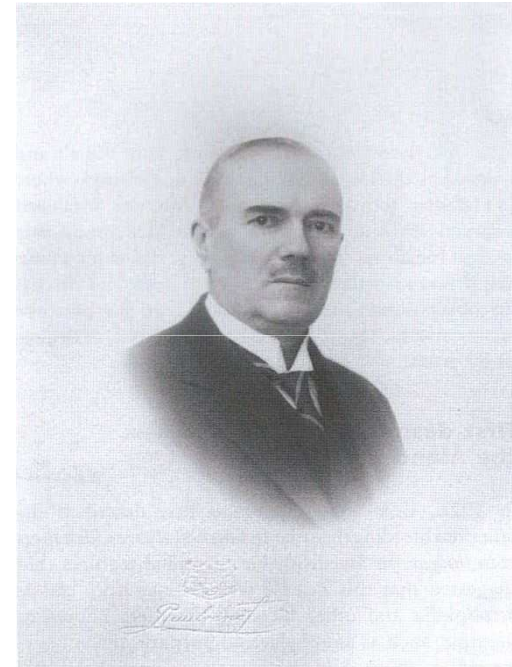
MUDr. Zdeňka Hajšmanová

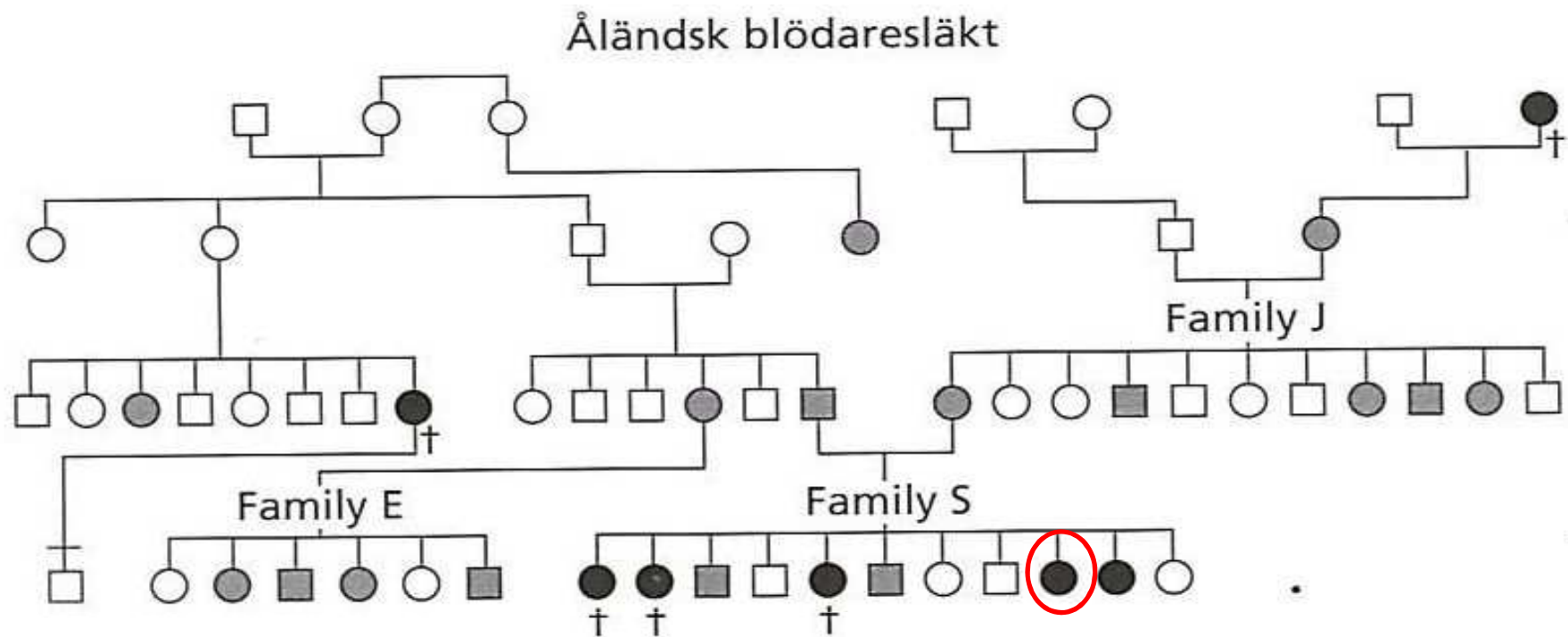
7.hematologický den ÚKBH

Plzeň, 19.9.2014

Historie

- Minot, Lee (USA) 1920
- Erik Adolf von Willebrand
 - * 1870
 - 1896 ukončil studium medicíny
 - 1899 obhajoba disertační práce
Změny koagulace po závažném krvácení
 - 1908 -1935 přednosta interní kliniky
Deaconess Institute, Helsinky
 - hereditární pseudohemofilie**
 - + 1949
- **Jürgens , 1930 – Willebrand-Jürgensova trombocytopathie**
- Blombäckovi (Stokholm) - 50. léta - antihemofilický faktor
- 70. léta izolován VWF





1926 publikován rodokmen rodiny žijící na ostrově Föglö, souostroví Åland, Baltské moře

5-letá dívka Hjördis S

oba rodiče (bratranec se sestřenicí) zatíženi krvácivou diatézou, 3 sestry +
7 z 11 dětí mělo krvácivé projevy

ve 3 letech krvácela až téměř do bezvědomí z poraněného horního rtu
opakovaně těžké epistaxe, krvácení po extrakcích zubů, krvácení do kyčle
+ ve 14 letech, vykrvácela během svého 4. menstruačního cyklu

23 osob z 66 členné rodiny - epistaxe, úrazy a poranění, modřiny, GIT, menses, porody

vonWillebrandův faktor (vWF)

- Velká multimerní adhezivní plazmatická glykoproteinová molekula syntetizovaná v
 - megakaryocytech
 - endotelových buňkách
- Snížená plazmatická c nebo porušená funkce vWF → von Willebrandova choroba

vonWillebrandova choroba (vWD)

Definice

- vrozená krvácivá choroba s poruchou **koncentrace nebo funkce vWF v plazmě**

BJH,2014: krvácivá choroba predominantně attributable redukovanou aktivitou vWF, s častou, ale ne vždy přítomnou poruchou genu vWF.

Funkce vWF

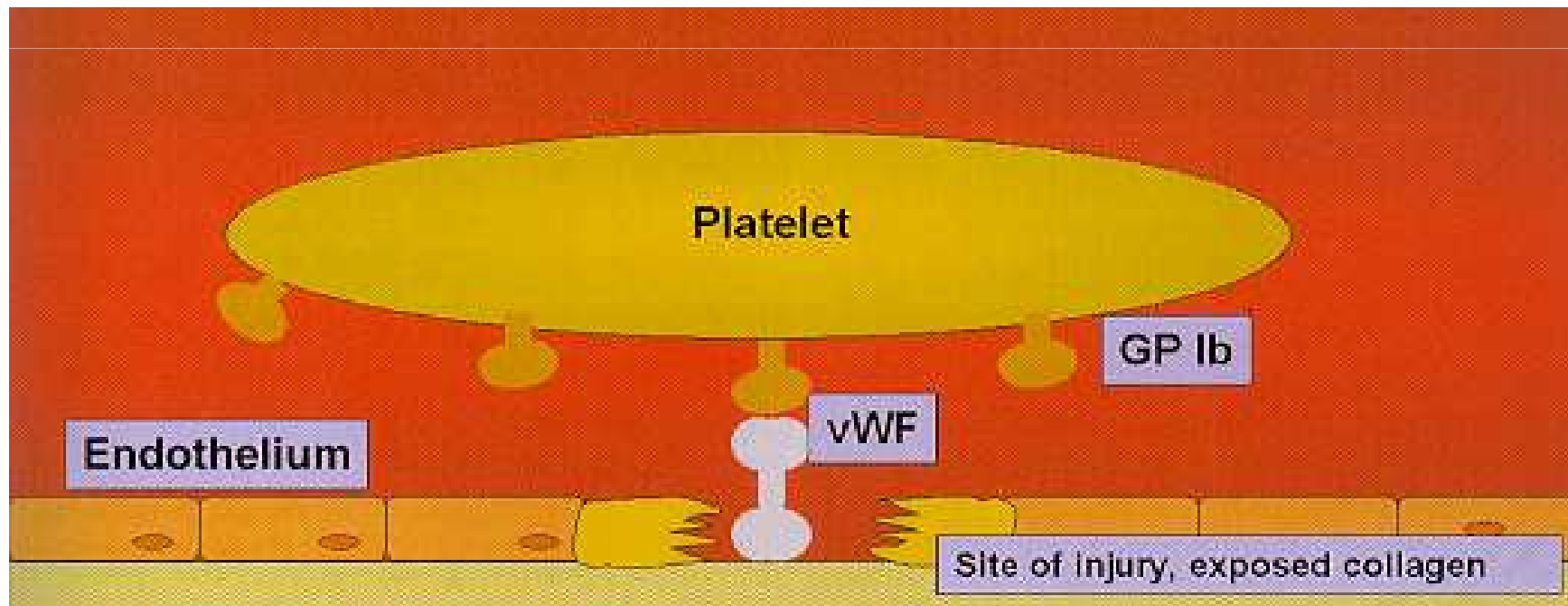
- **Primární hemostáza – adheze**
 - vazba na kolagen v místě poranění cévy
 - mediátor vazby GPIb – vWF- kolagen
 - podpora agregace destiček vazbou na GP IIb/IIIa při ↓ fbg (platelet-platelet interakce)
- **Plazmatická hemostáza**
 - nosič FVIII:C brání proteolytické degradaci FVIII a prodlužuje poločas FVIII:C na 12-15 h (2-3 h)

vWF v primární hemostáze

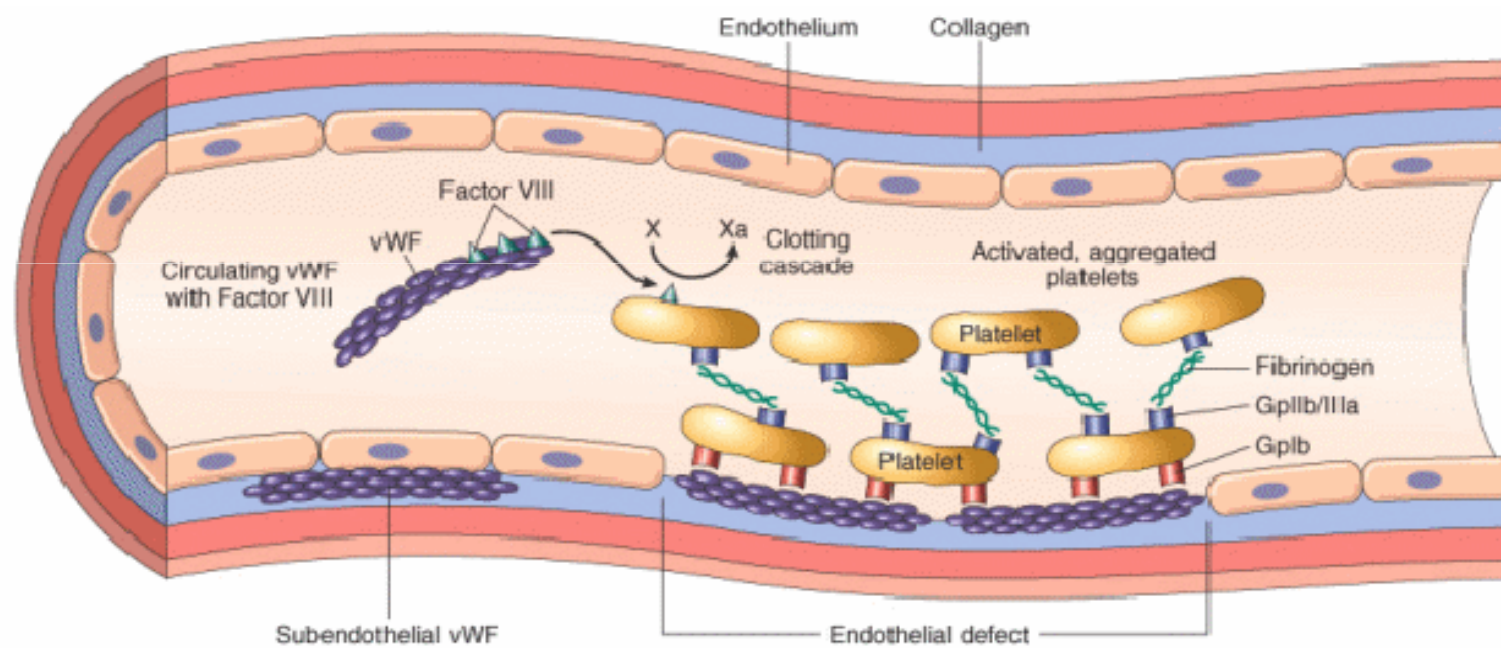
= tvorba primární destičkové zátky

Adhese

destičkový GPIb – HMW multimers vWF – kolagen cévní stěny



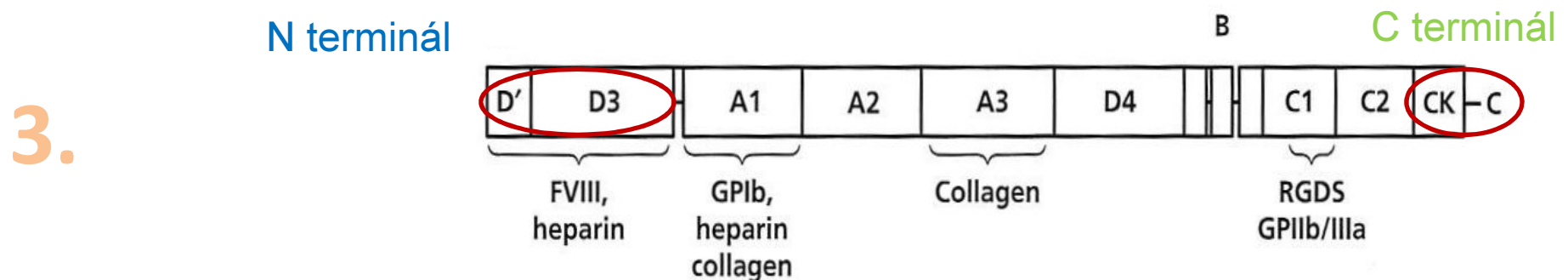
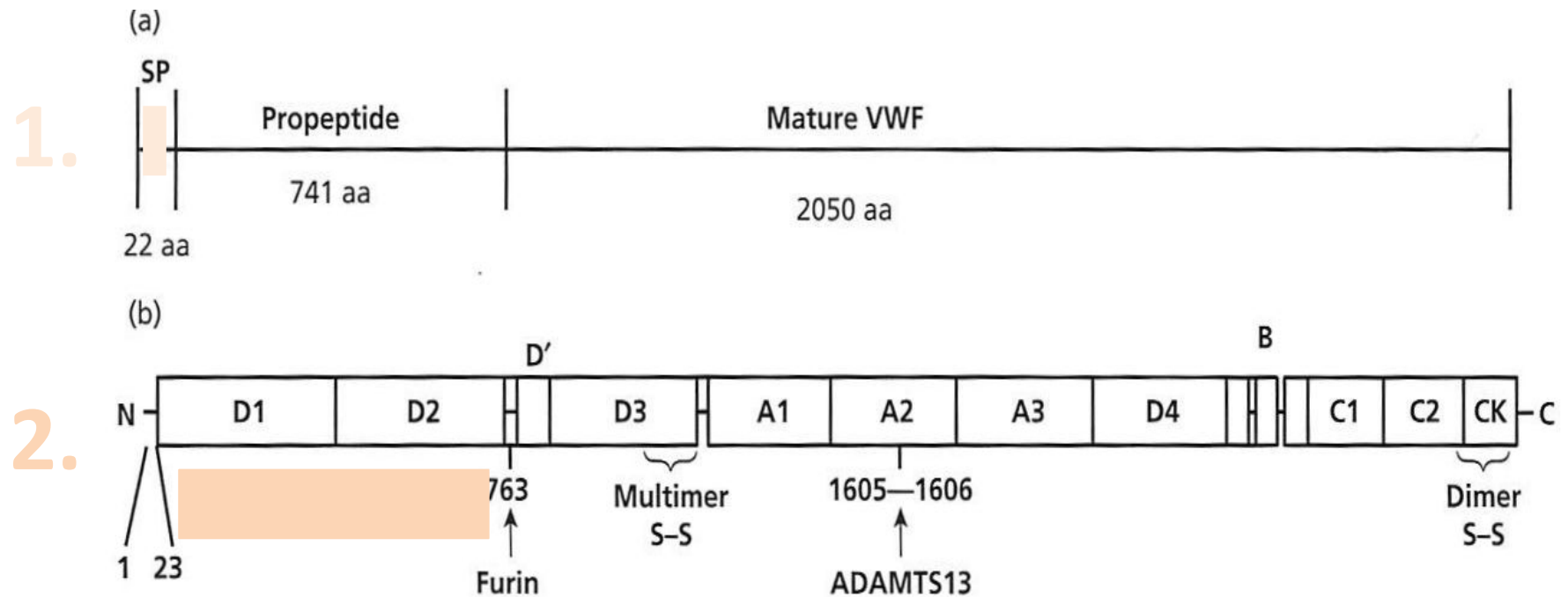
vWF v plazmě



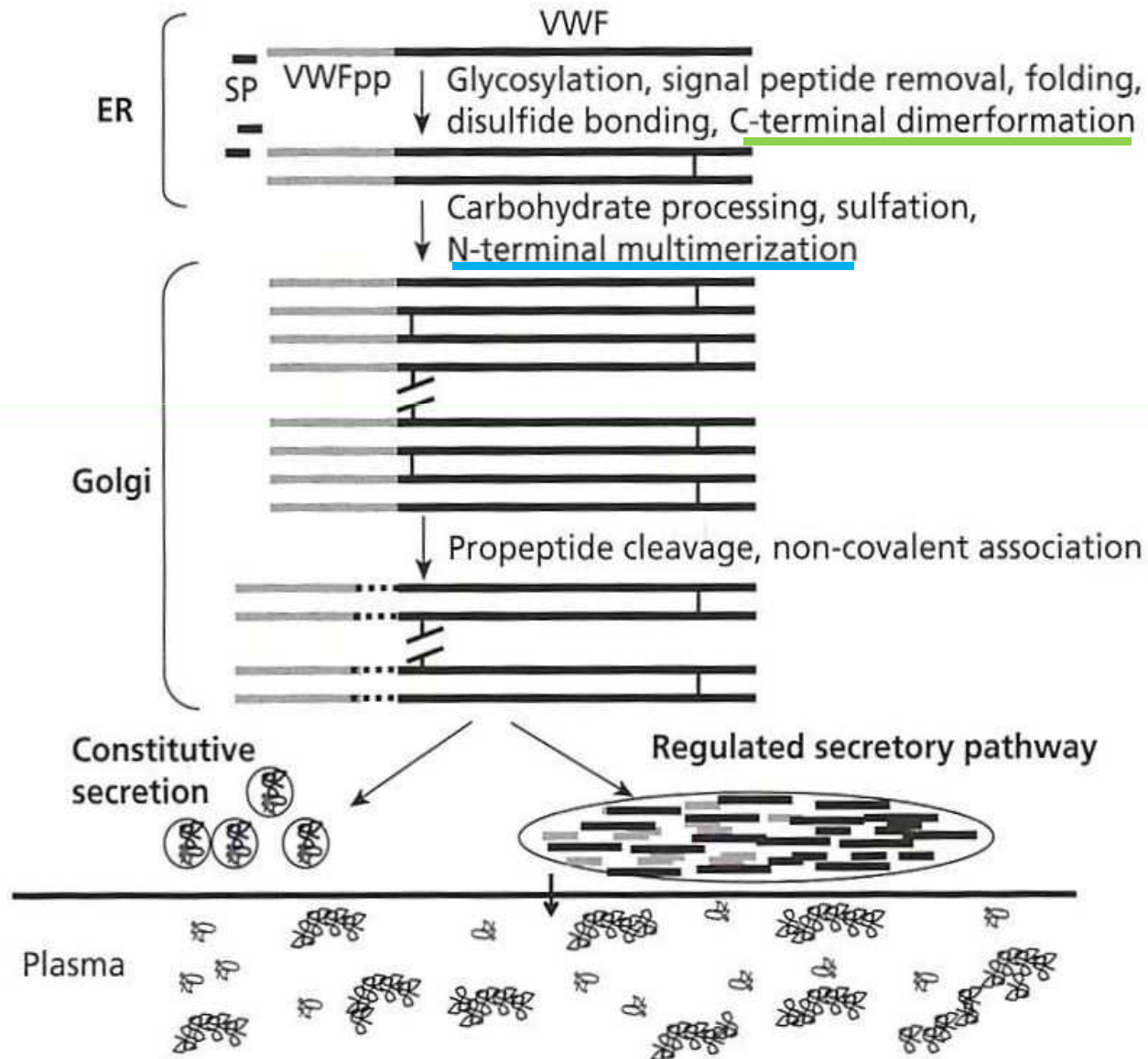
Molekulární biologie vWF

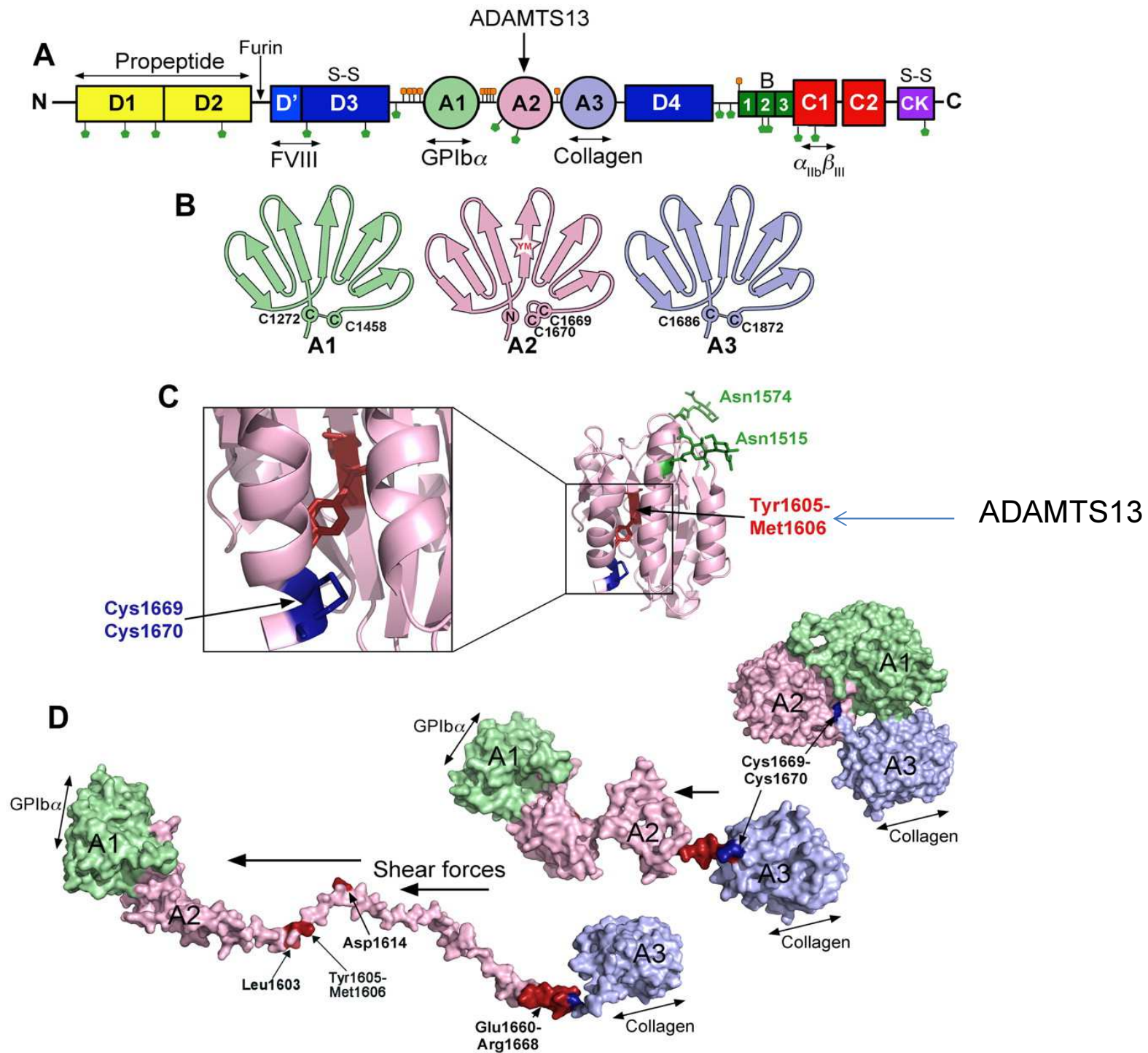
- 1985
- **Chromozom 12** (částečně i chromozom 22)
- **Protomer vWF je syntetizován jako**
pre - pro - vWF
SP (22AMK) - propeptid (741AMK) - vWF (2050 AMK)
- Syntéza v Mgc a v endotelových bb. probíhá stejným způsobem
- Zásoba α-granula Mgc a Weibel- Paladeho inkluze v endotelu
- Plazma

Struktúra vWF

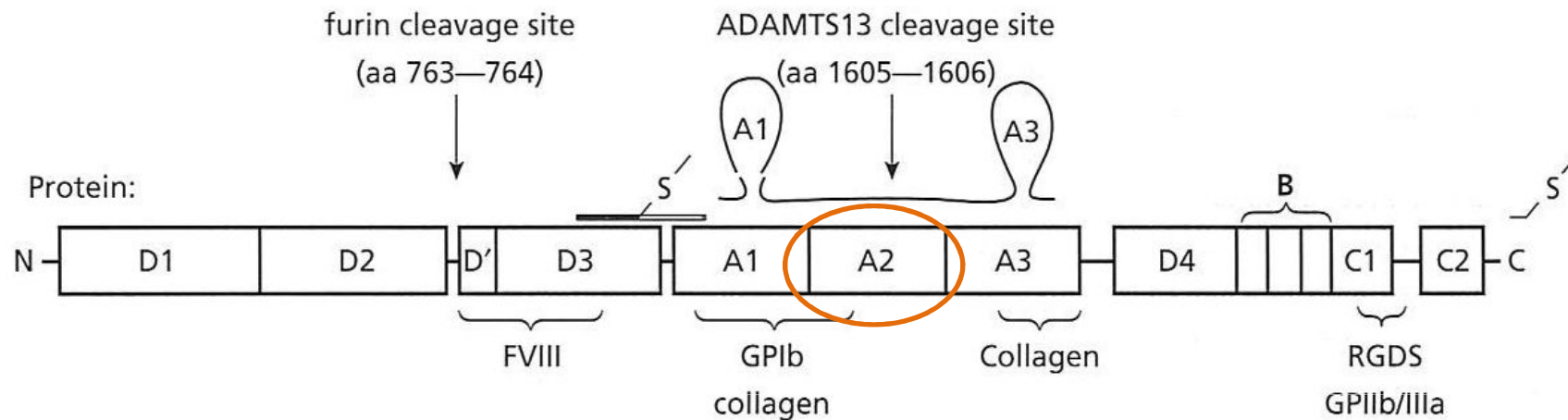


Syntéza vWF



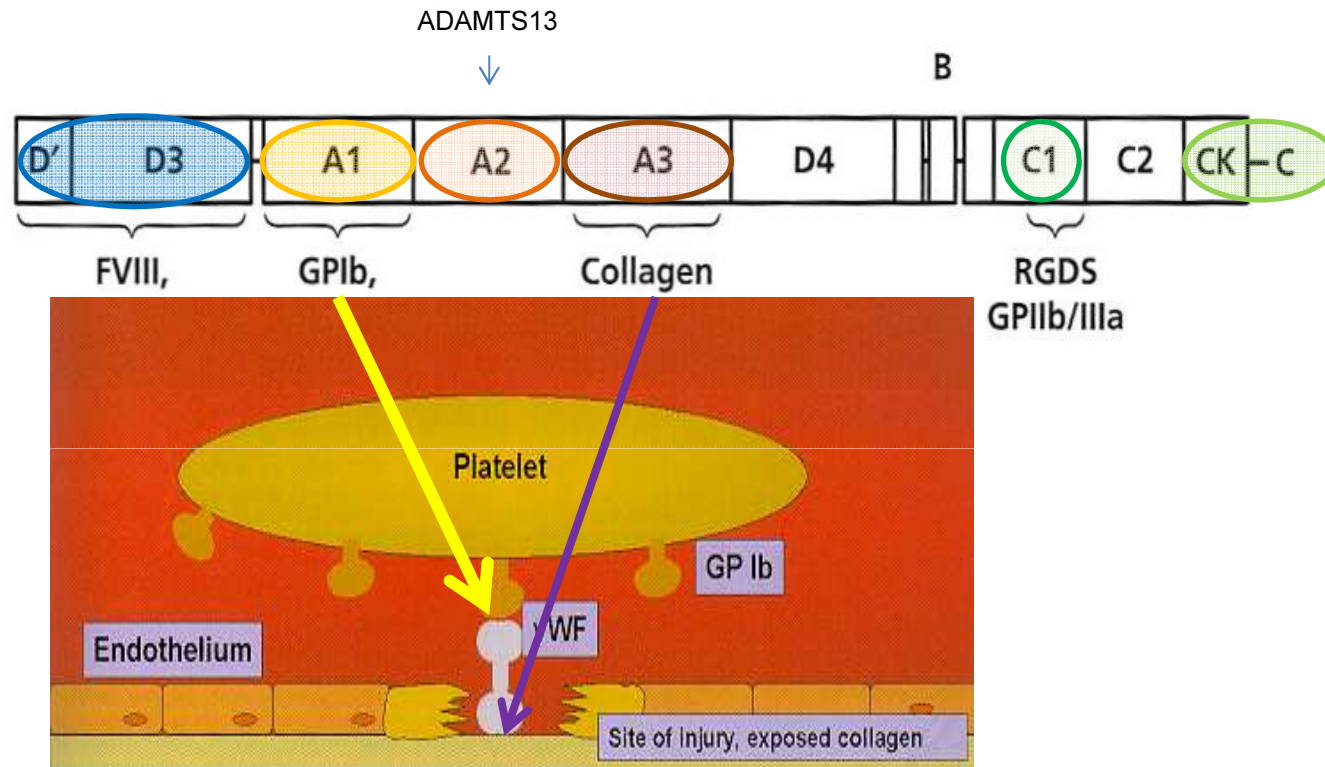


ADAMTS13



- vWF je uvolňován do plazmy jako vysoce trombogenní UL- VWF multimer
- metaloproteinázou ADAMTS13 je štěpen na menší a méně trombogenní multimery
- řízená proteolýza v doméně A2 (Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶)
- Deficit ADAMTS13 → TTP

Maturovaný vWF



Doména D'

- D3 – multimerizace v Golgi a vazba vWF/FVIII v plazmě

Doména A1

- GPIb, kolagen

A2

- proteolýza metaloproteinázou ADAMTS13

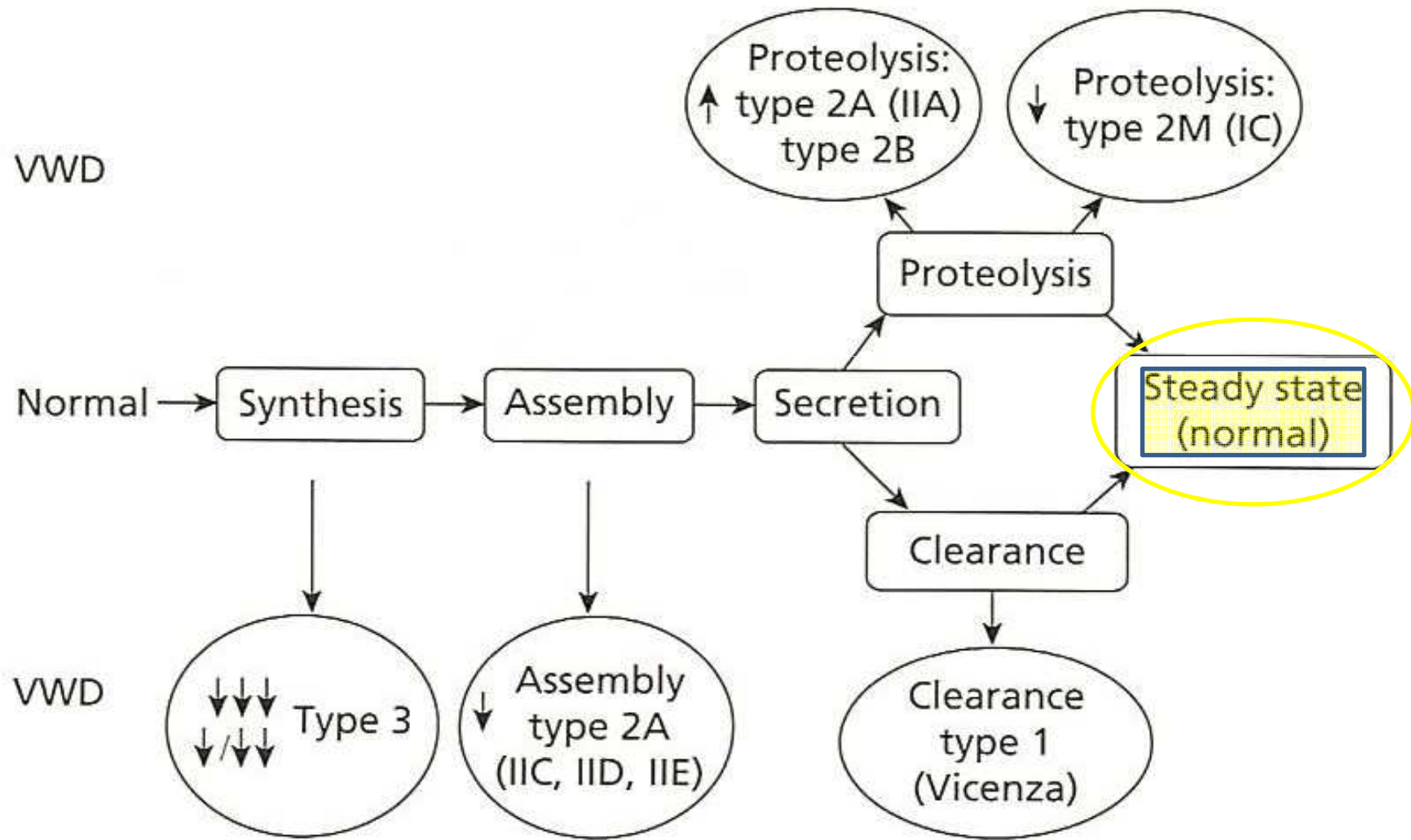
A3

- vazba na kolagen

Doména C1 (Arg, Gly, Asp, Ser) - vazba GP IIb/IIIa

Doména CK - dimerizace v ER

vWD



Epidemiologie

- Nejčastější dědičná krvácivá choroba s odhadovanou prevalencí 1 %
- Dle odhadu ISTH 1500 - 3000 os/milion populace
- **Symptomatické krvácivé projevy 100 os/ milion populace**

Klinický obraz

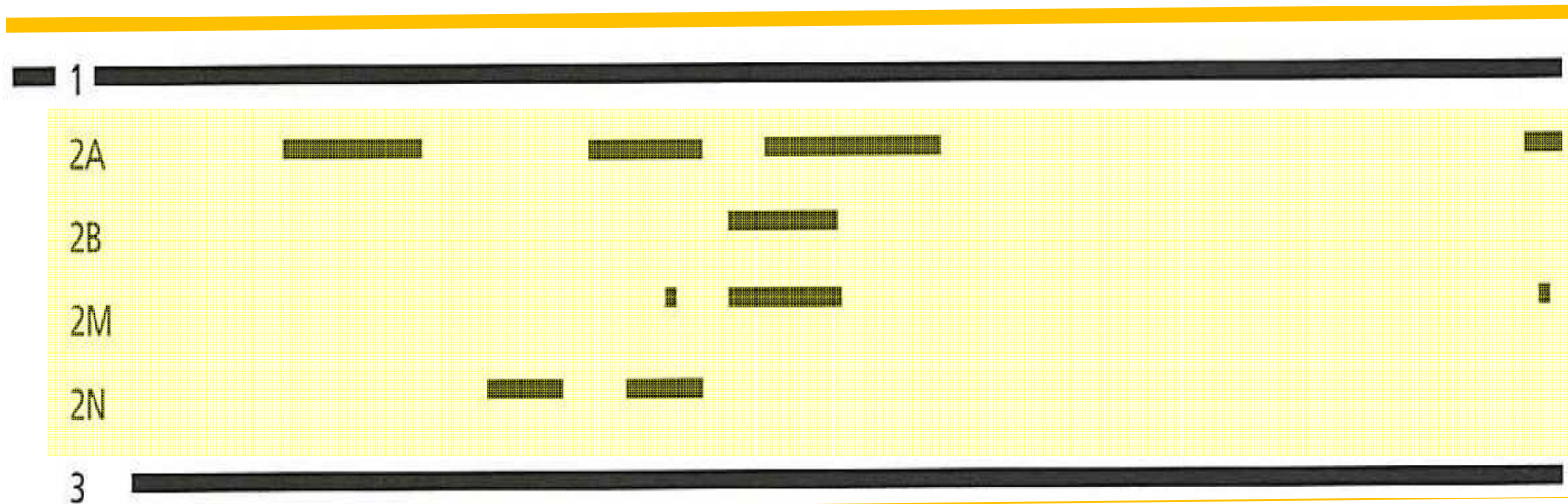
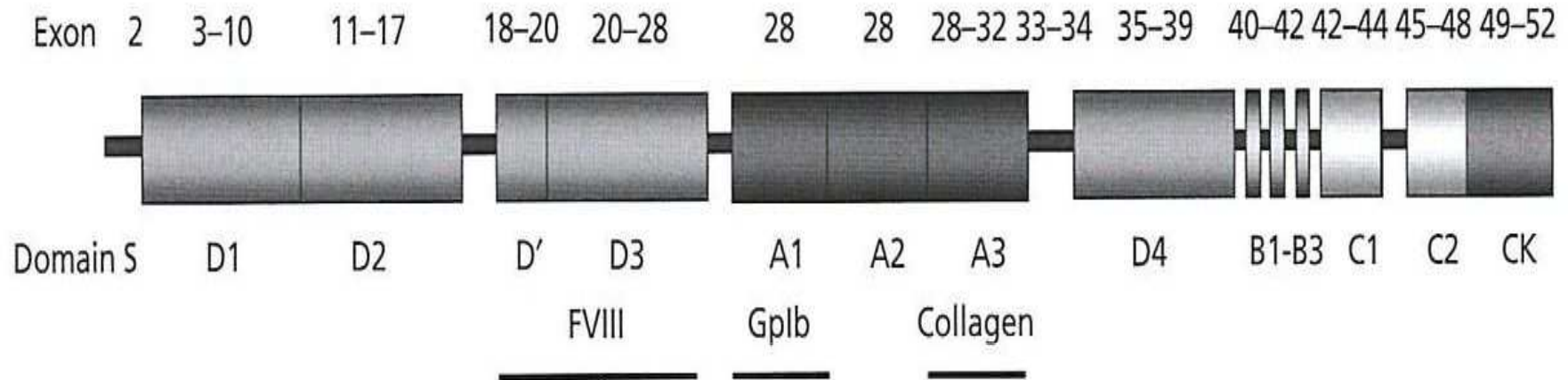
- slizniční krvácení (epistaxe, gingivorhagie, menorhagie, krvácení do GIT)
- podkožní hematomy
- časné a protražované poúrazové /perioperační krvácení
- krvácení do kloubů a měkkých tkání
vrozená či získaná hemofilie x typ 3 vWD, 2N vWD

Klasifikace vWD

Revize 2006

- Typ 1 **parciální deficit vWF**
- Typ 2 **kvalitativní defekt vWF**
 - 2A chybění HMW multimerů vWF
 - 2B ↑afinita vWF ke GPIb
 - 2M ↓ afinita vWF ke GPIb při dostatku
 HMW multimerů vWF
 - 2N ↓ afinity vWF k FVIII
- Typ 3 **úplný deficit vWF**

MOLECULAR DIAGNOSIS OF VWD: THE GENOTYPE



Diagnostika vWD

- Anamnestické údaje
- Klinický obraz
- Laboratorní testy

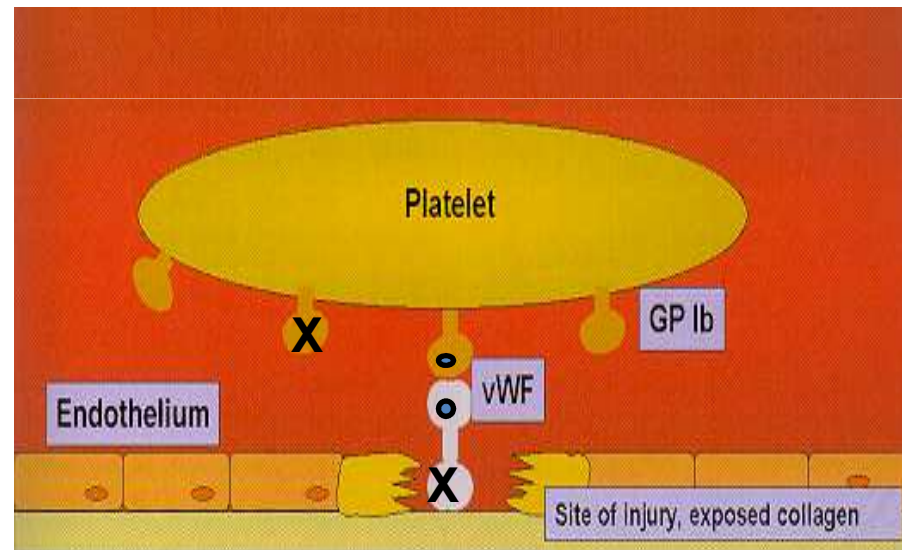
Diferenciální diagnostika

- Obtížná u typu 2vWD
- vWD vs.
 - Trombocytopenie
 - Trombocytopatie
 - vrozené
 - získané
 - Hemofilie A
 - Získaný vWS

Dif. dg. trombocytopatií

GPIb – HMW multimers vWF – kolagen cévní

- Bernard –Soulier sy (BSS)
 - chybí GPIb
- PT-vWD
 - ↑GPIb k vWF
- 2B vWD
 - ↑vWF k GPIb
- 2M vWD
 - rezistence vWF ke GPIb



Koncentrace vWF

- Zdravé osoby s KS 0 c vWF o 25 – 30 % ↓ (kratší poločas)
- ↑ s věkem (od 40 let, každou dekádu ↑ cca o 6 %)
- ↑ při stresu - protein akutní fáze
- ↑ v průběhu těhotenství, menstruačního cyklu
- ↑ při nádorovém stonání

Zdraví jako bleeders X bleeders jako zdraví

→ opakovaně vyšetřit

Laboratorní diagnostika

- **Screening**
 - KO (počet destiček)
 - BT/ PFA-100
 - aPTT
- **Základní testy pro dg vWD - typ 1, 2 a 3 vWD**
 - vWF:Ag
 - vWF:RCo
 - FVIII:C
 - » vWF:RCo/ vWF:Ag
 - » FVIII:C/ vWF:Ag

BJH IX/2014 vWF:Ag
vWF:RCo
FVIII:C
vWF:CB
vWF:CB/vWF:Ag
- **Specifické dg testy - subtypy 2A, 2B, 2M, 2N**
 - vWF:CB
 - RIPA
 - multimery
 - vWF:FVIIIIB
 - vWFpp

multimery?
vWF:FVIIIIB???

dg vWS

- *Genetické vyšetření*

Screeningové laboratorní testy

- KO
 - **Trombocytopenie** typická pro 2B vWD a PT- vWD
- APTT
 - **není dg test pro vWD zejména pro lehké formy**
 - Prodloužen při ↓↓ FVIII:C → 2N a těžké formy vWD
 - Při prodlouženém aPTT je nutno provést kompletní dif. dg (FVIII, IX, XII, HMWK, LA)
- Krvácivost (Simpla[®]/ PFA 100)

Krvácivost (BT)

- Globální test primární hemostázy
- Prodloužen u trombocytopenií
trombocytopatií
vWD
vaskulopatií
- **40% senzitivita pro záchyt vWD**
- Existují citlivější a méně traumatické in vitro metody nezávislé na provádějící osobě

PFA 100

P_{latelet} F_{unction} A_{nalyzer}

In vitro simulován proces adheze a agregace
ve vzorku nesrážlivé krve pacienta

Testovací modul

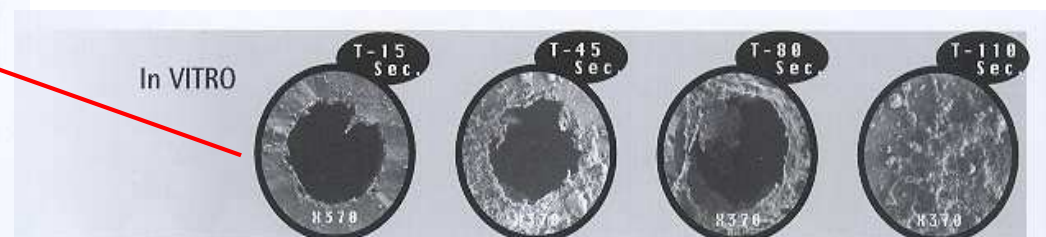
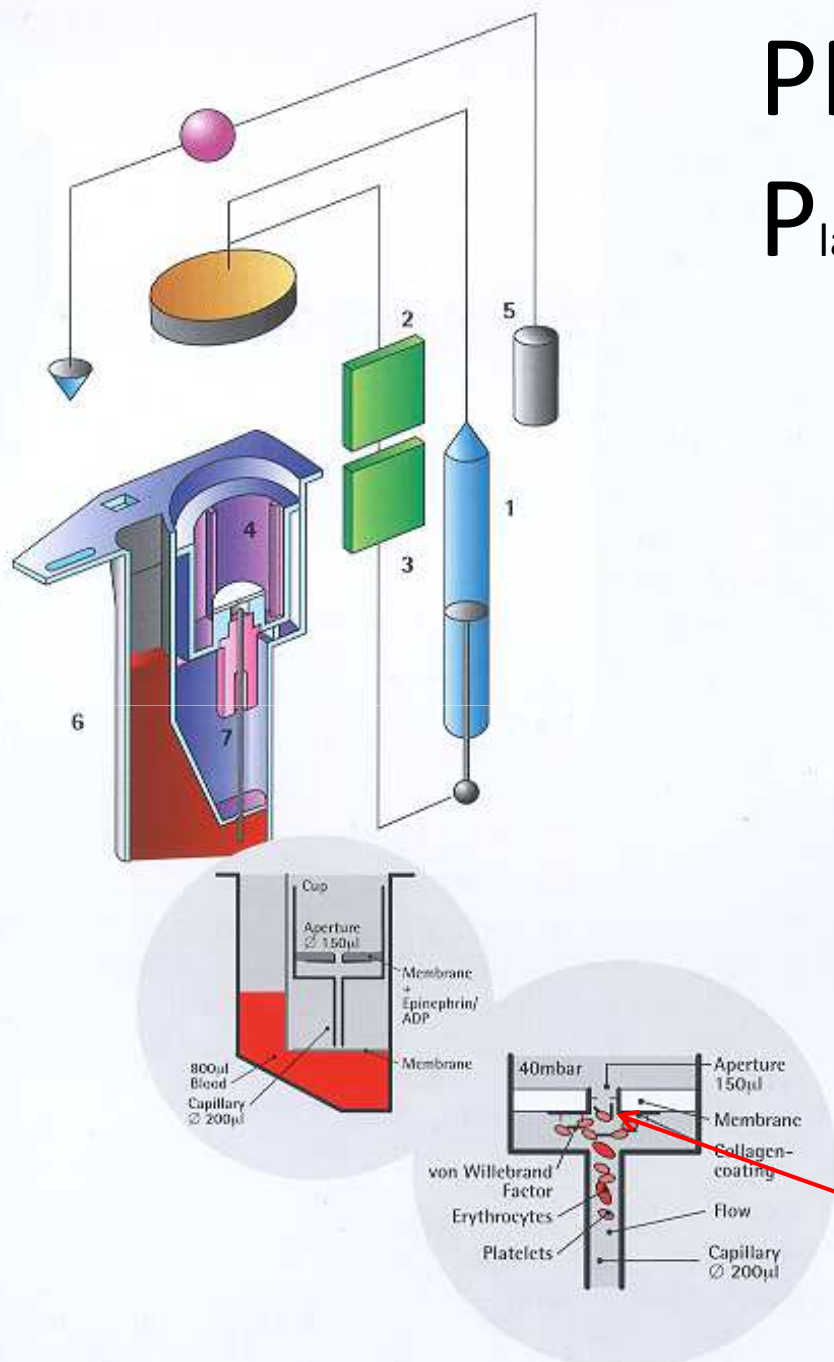
Col/ Epi

Col/ ADP

Closure time (CT)

Col/EPI 94 - 193 s

Col/ADP 71 - 118 s



PFA-100

- Testovací systém využívající princip high shear stress
- Citlivý na přítomnost, absenci či dysfunkci vWF v plazmě
- Detekce cca 80 % nemocných s vWD
- Senzitivita 90 %
- 100 % pro typ 2A, 2B, 2M, typ 3
 - u typu 2N je v normě
 - u typu 1 záleží na hladině vWF
- Stejně jako krvácivost se do výsledku promítají i další komponenty hemostázy (počet a fce destiček)
- Monitorace léčby desmopresinem

Základní dg laboratorní testy vWD

- vWF:Ag
 - vWF:RCo
 - FVIII:C
 - *vWF:CB*
-
- vWF:RCo/vWF:Ag
 - FVIII:C/vWF:Ag

vWF:Ag

- antigen = protein
- ELISA
- **zásadní pro dg vWD**
- **redukce a/nebo dysfunkce vWF**
- 80 % pacientů s vWD má ↓ vWF:Ag
- odlišit vWD od vWS, hemofilie
- **vždy doplnit funkčním vyšetření vWF**

vWF:RCo

- Ristocetin urychluje reakci mezi propranými destičkami a vWF
- Destičky + ristocetin 1mg/ml + standard/PP → rychlost agregace
- Čerstvé, fixované, lyofilizované, zmrazené
- Botrocetin jako náhrada ristocetinu

FVIII:C

- **FVIII:C ↓ u pacientů s vWD**
 - deficit vWF → ↓ vWF/FVIII → FVIII zkrácený poločas
 - u typu 2N porušena vazba vWF/FVIII
- Koagulační metoda, princip aPTT s použitím specifické deficientní plazmy, odečet z kalibrační křivky
- Chromogenní metoda není běžně používána
 - ELISA pro stanovení antigenu FVIII

Porovnávací testy (fce : Ag)

- **odlišení kvantitativní a kvalitativní poruchy**

- Typ 1 vWD

vWF:RCo a vWF:CB **konkordantní** vWF:RAg

> 0,6

- Typ 2 vWD

vWF:RCo a vWF:CB **diskordantní** vWF:Ag

< 0,6

- Diskriminační rozmezí = 0,6

$$vWF:RCo/vWF:Ag < 0,6$$

- Typ 2 vWD → dg. subtypů
 - vWF:CB (2A x 2M)
 - RIPA (2B x PT- vWD)
 - *multimery (2A, 2M)*
 - *vWF:FVIII B (2N)*

Collagen-binding capacity (vWF:CB)

- ELISA (podobné vWF:Ag)
- **fce HMW multimerů**
- **sensitivnější než metoda vWF:RCo, nelze zaměřovat, doplňuje funkční test**
- **rozlišení subtypů 2A a 2M vWD**
- úskalí se standardizací
- monoklonální Ab je zaměřena přímo na funkční doménu vWF, umožňují detekci HMW multimerů vWF

Ristocetin-induced platelets agglutination

- PRP (RIPA)
- Ristocetin usnadňuje vWF → GPIb
- Rozlišit subtyp 2B vWD a PT-vWD
- Proprané destičky + ristocetin 1mg/ml a PP/ NP
- *Vyšetření indikováno $vWF:RCo/vWF:Ag$
 $avWF:CB/vWF:Ag < 0,6$ a zároveň
trombocytopenie*
- *Reakce chybí*
 - u BSS (chybí GPIb)
 - typ 3 vWD (chybí vWF)
- PT- vWD - ↑↑ agregace destiček v patientské PRP už po přidání kryoprecipitátu/plazmy i **bez přítomnosti ristocetinu**

Dg subtypů vWD

vWF:CB

rozliší typ 2A x 2M

RIPA

potvrdí 2B

*Typ 1 - test **RIPA** není doporučován*

Typ 2A – vWF:Ag N/ ↓, vWF:RCo ↓, **vWF:CB ↓**

2B – vWF:Ag N/ ↓, vWF:RCo ↓, vWF:CB ↓, **RIPA**

2M – vWF:Ag N/ ↓, vWF:RCo ↓, **vWF:CB N**,

2N - FVIII:C/ vWF:Ag < 0,6

(hemofilie A - FVIII ↓, vWF:Ag N)

Dif. dg.VWD

Typ

1. vWF:RCo, vWF:CB /vWF:Ag > 0,6

2. vWF:RCo, vWF:CB /vWF:Ag < 0,6

2A vWF:CB ↓

2B – RIPA

2M – vWF:CB N

2N - FVIII:C/ vWF:Ag < 0,6

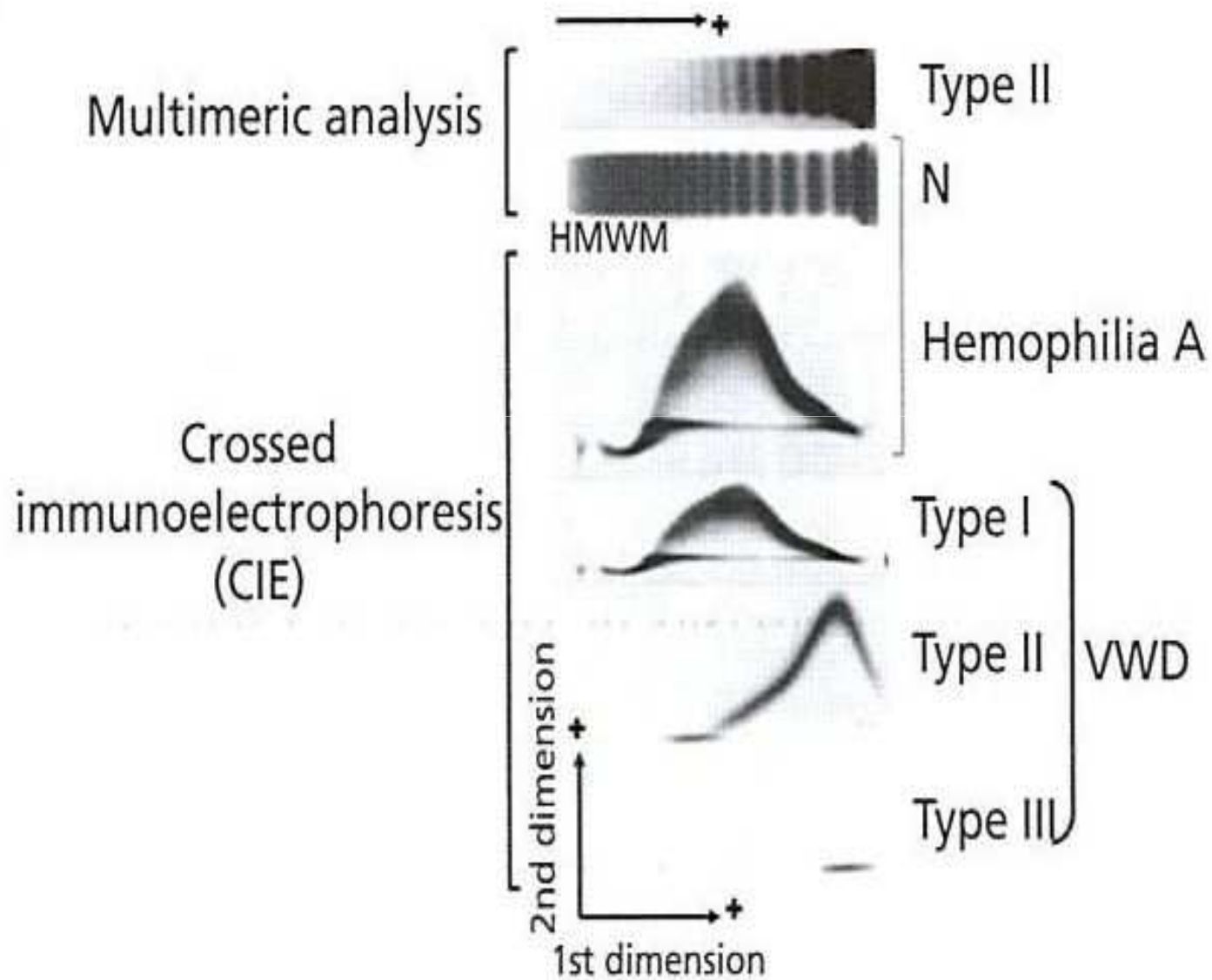
3. vWF:Ag = 0

vWF multimery

- účelem analýzy je
 - přímý průkaz multimerů (2A x 2M)
 - odlišit vrozenou vWD od získaného vWS
 - dg. TTP, HUS, sepse – struktura vWF podá cennou informaci
- zkřížená elektroforéza na agarózovém SDS gelu
- *lze nahradit vWF:CB/vWF:Ag*

SDS- sodium dodecylsulfát

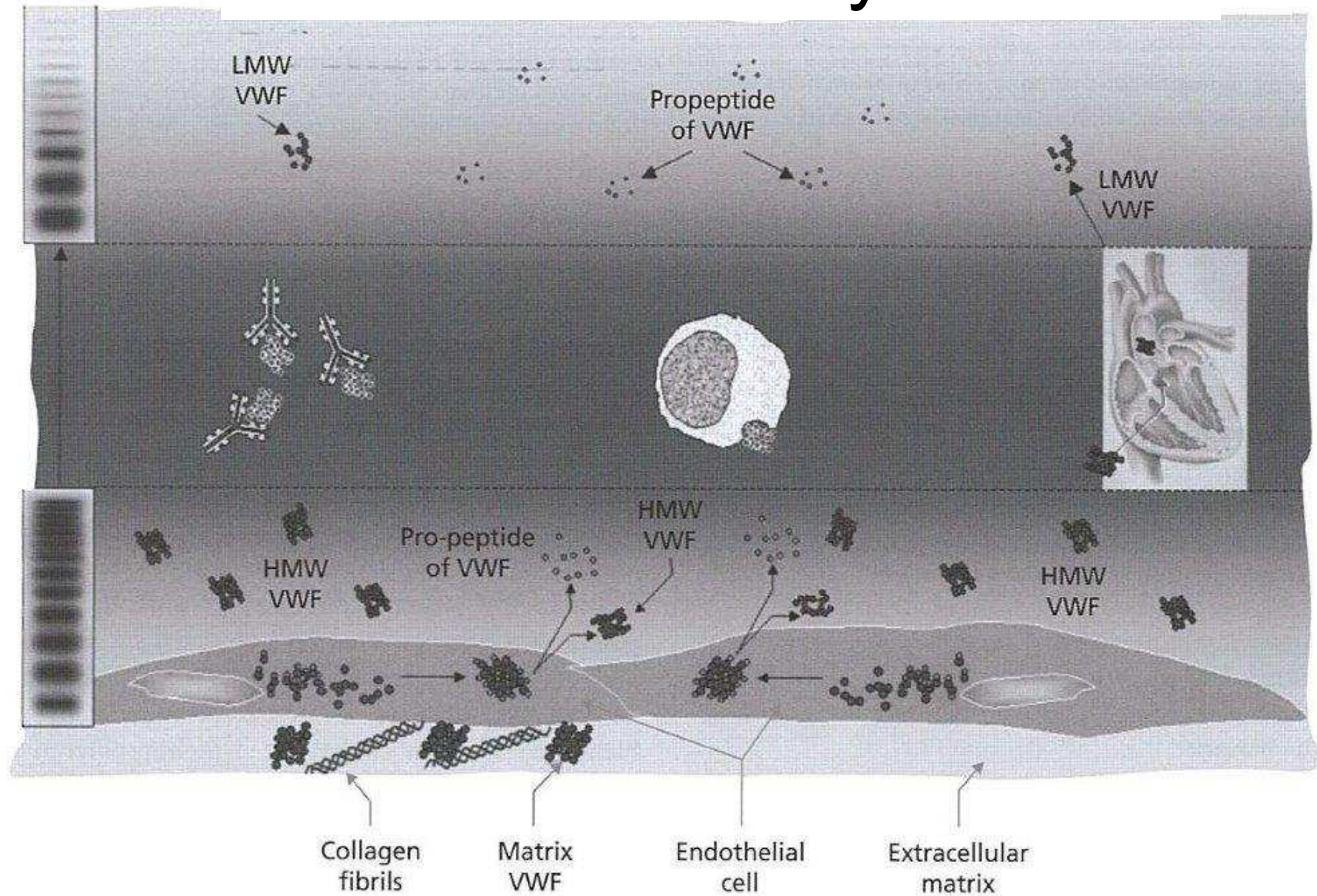
VWF electrophoresis



vWF:FVIII B

- **schopnost pacientova vWF vázat exogenní normální FVIII**
- 2NvWD - vazba vWF/ FVIII je dysfunkční →
poločas FVIII v plazmě je zkrácen a
 $\text{c FVIII} \downarrow$
- **ELISA, technicky náročný**
- ***preference genetického vyšetření***
- $\text{FVIII} / \text{vWF:Ag} < 0,6 = 2\text{N vWD}$
- stanovit u všech pacientů s projevy hemofilie
kde neseď typ dědičnosti (2N není vázána na pohlaví)

VonWillebrandův syndrom



vWF propeptid (vWF:AgII)

- do plazmy uvolňován zároveň s maturovaným vWF, ale eliminace vWFpp z plazmy nezávislá na vWF
- **při ↑eliminaci vWF poměr vWFpp/vWF:Ag ↑**
- **vrozená vWD x avWS**

Heydeho syndrom

- R.H., *1937, KS 0 Rh+
- vrožené angiodysplasie GIT
- těsná Ao stenosa → destrukce multimerů vWF
→ krvácení z teleangiectasií v GIT → Hb 41 g/l
→ opakovaně TU EBR
- náhrada Ao chlopně v VI/2014
- koncentrát vWF
- aktuální stav snad dobrý

Datum odběru	25.11.2013 11:03	po 21.7. 07:32	Stav	Vývoj	Normály	Jednotky
Pozn. k odběru						
Krevní obraz						
B-Le	8,40	4,10	●	-	4 - 10	10 ⁹ /l
B-Ery	3,63	2,85	●●●	<	3,8 - 5,2	10 ¹² /l
B-Hb	100	84	●●●	-	120 - 160	g/l
B-HTK	0,313	0,245	●●●●	<<	0,35 - 0,47	1
B-Obj ery.	86	86	●	-	82 - 98	fl
B-Hb ery	27,6	29,3	●	-	28 - 34	pg
B-Hb konc	320	342	●	-	320 - 360	g/l
B-Erytr.křivka	14,5	16,2	●	-	10 - 15,2	%
B-Trombo	375	123	●	<	150 - 400	10 ⁹ /l
Hemokoagulace						
Pt-Krvácivost	6:58				2 - 8	minuty
P-APTT	44,4					s
P-APTT - R	1,37		●●	<	0,8 - 1,2	1
P-Protrombin. čas	14,7					s
P-PT - R	1,12		●	-	0,8 - 1,2	1
P-INR	1,2					1
P-Trombin. čas	15,6		●		11 - 18	s
P-Trombin.čas - R	0,96		●		0,8 - 1,2	1
P-Fbg	4,33		●		1,8 - 4,5	g/l
Agregace destiček o						
P-Agr.d.rist.max	80		●		45 - 90	%
P-Agr.rist.max gr	49		●		50 - 110	%/min
P-Agr.rist.red ma	14					
P-Agr.ri.max.gr.i	13					%/min
Spec. koag.						
P-Aktin - čas	37,4					s
P-Aktin normál	27,6					s
P-Kor. APTT - čas	37,8					s
P-Kor. APTT - R	1,17		●		0,8 - 1,2	1
P-Faktor VIII	83		●		50 - 150	%
P-vWF aktivita Ia	31		●●		50 - 150	%
P-vWF latex Ag	52		●		50 - 150	%



M 8081

Ústav hematologie a krevní transfuze

Komplement laboratorní ÚHKT

Vedoucí KL ÚHKT: prof. Ing.J.E. Dyr, DrSc.

Zdravotnická laborator akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO 15189 pod č.8081

Laboratoř pro poruchy hemostázy

Vedoucí laboratoře: RNDr. Ingriď Hrachovinová

11 Naměstkova 7 126 20 Praha 2 - tel.:221977251,221977284,221977271, fax.:221977249

Datum odběru vzorku: 25.11.2013 11:03		Číslo vzorku: 14		Číslo v lab.: KOAG000000000000	
Datum příjmu vzorku: 07.01.2014-11:20		Lékař: MUDr. Hrdmanová/RNDr. Hrachovinová			
Metoda	Pacient	Jedn.	Normál	Poznámka	
FVIII:C	97,0	%	60,0-150,0		
vWFAntigen (ELISA, VIDAS)	66,0	%	50,0-160,0		
vWFRID8	15,0	%	55,0-170,0		
Multimery vWF	normální			2014/2	
Recept zrušen, platil pouze k této analýze					

Závěr:

Funkční deficit VWCH

Multimerní struktura jeví méně deficit vysokých multimerů oproti normálu, čitelných je ale až 17

multimerů. Tripletové struktura multimerů je v normě.

Množství propeptidu VWF je na horní hranici normy.

VWF: propeptid (ratio) = 2,6 (norma <3,0)

VWTag = 46 IU/dl (ELISA - kit na ppVWF)

ppVWF = 120 U/dl

Výsledky svědčí pro zvýšenou konzumaci vyšších multimerů, nelze ale bez anamnézy dřívějších krvácení, výsledků adt. odlišit získanou formu VWCH od vrozené, pravděpodobně by to byl typ 2M.

Dr. Ingriď Hrachovinová

Zdravotnická laboratorní ÚHKT, 11 Naměstkova 7, 126 20 Praha 2

Datum a čas vyhodnocení: 10.01.2014-11:27

Datum tisku: 10.01.2014-11:27

* akreditované metody dle: 105_SOP_08_06

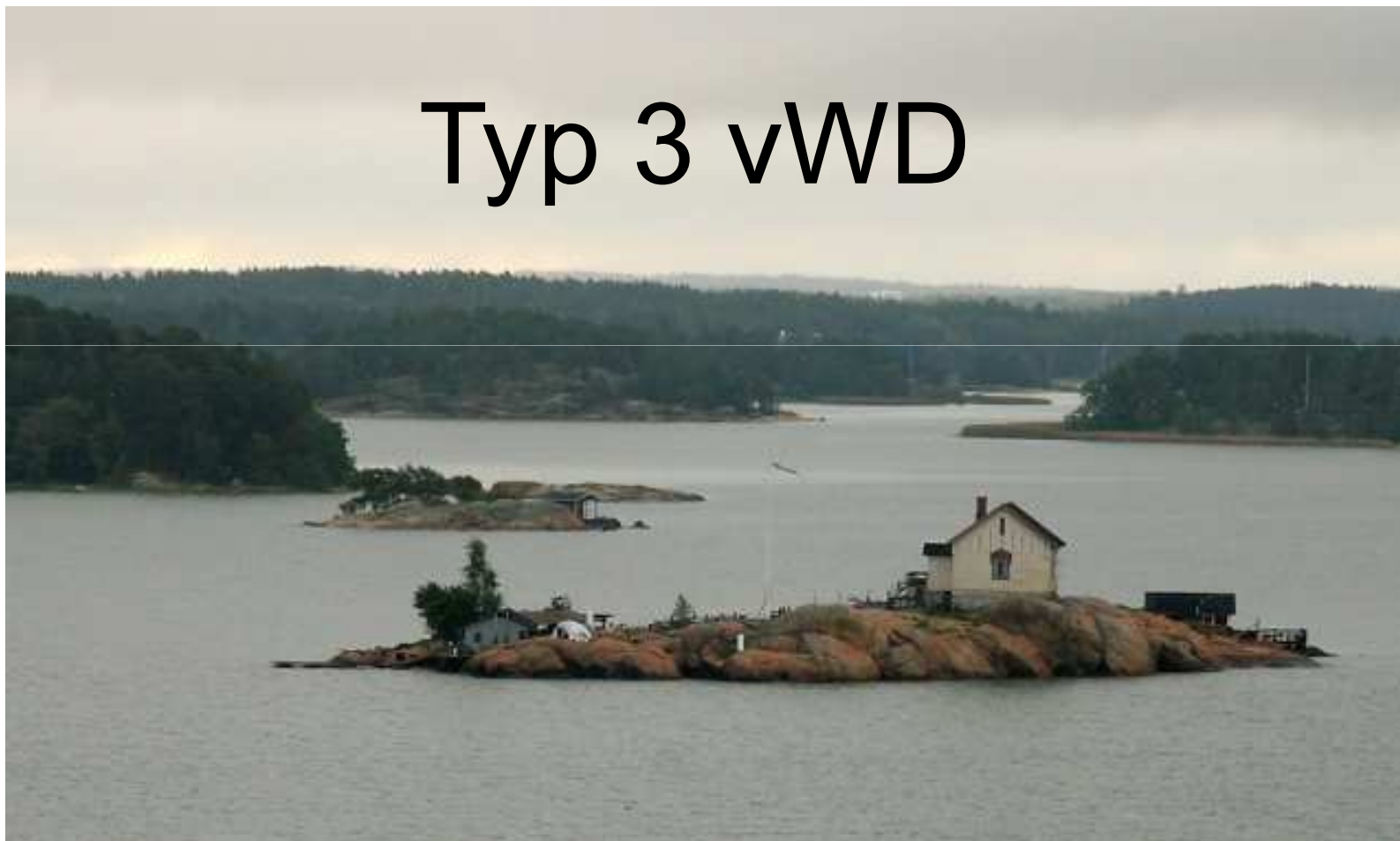
Kopie vyhodnocení jsou dostupné v laboratorní na požádání

Strana: 1/1

UMIS-STERN, © 1991-2014, rev. 28-08-11, G.A.H.

Jakým typem vWD trpěla Hjördis?

Typ 3 vWD



Děkuji za pozornost.