

Teresa IWANIEC
Jacek MUSIAŁ

II Katedra Chorób Wewnętrznych
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kraków
Kierownik:
Prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

Słowa kluczowe:

- choroba von Willebranda
- hemofilia
- testy przesiewowe
- testy specjalistyczne

Key words:

- von Willebrand disease
- hemophilia
- screening test
- specific tests

Diagnostyka laboratoryjna choroby von Willebranda i hemofilii

Diagnostyka laboratoryjna wrodzonych i nabytych skaz krwotocznych poprzedzona jest zawsze badaniem klinicznym pacjenta. Zarówno we wrodzonych jak i w nabytych postaciach choroby obowiązują podobne schematy postępowania. Diagnostykę rozpoczyna się od badań podstawowych (skriningowych), którą rozszerza się następnie o badania specjalistyczne. Hemofilia to skaza osoczkowa, w której oprócz charakterystycznych objawów klinicznych także badania podstawowe wyraźnie wskazują na tę jednostkę chorobową. Znacznie trudniejsza do diagnostyki jest choroba von Willebranda. Jest to jedna z najczęściej występujących skaz krwotocznych, a mimo to rzadko rozpoznawana. Przyczyną jest fakt, że testy podstawowe zwykle są prawidłowe. Hemofilia i vWD mogą mieć także charakter nabyty. W przypadku hemofilii przyczyną są autoprzeciwciała, które upośledzają funkcję czynnika VIII. Natomiast w nabytej vWD mogą być obecne przeciwciała skierowane przeciwko różnym domenom czynnika vWF. W obu przypadkach potwierdzeniem rozpoznania postaci nabytej jest stwierdzenie obecności tychże przeciwciał.

Laboratory diagnostics of von Willebrand disease and hemophilia

Laboratory diagnostics of congenital and acquired bleeding disorders is always preceded by clinical evaluation of the patient. Diagnostic algorithms in congenital and acquired forms of the disease are similar. The diagnostic process starts with basic evaluation (screening tests), followed by specialist tests. Hemophilia is a bleeding disorder caused by deficiency of a plasma clotting factor. The diagnosis can be suspected on the basis of typical clinical picture and basic laboratory measurements. In contrary, the diagnostics of von Willebrand disease is much more complicated. Being one of the commonest bleeding disorders, this condition is still underdiagnosed due to the fact that results of the screening tests most commonly remain within the normal range. Hemophilia and von Willebrand disease can also be acquired. Acquired hemophilia is caused by circulating factor VIII autoantibodies; whereas the antibodies present in acquired von Willebrand disease are directed against different domains of vWF. Detection of these antibodies confirms the diagnosis.

Diagnostykę laboratoryjną wrodzonych i nabytych skaz krwotocznych zawsze poprzedza badanie kliniczne pacjenta. Obraz kliniczny, a więc wiek, w którym pojawiły się pierwsze krwawienia, występowanie podobnych epizodów u innych członków rodziny oraz rodzaj krwawień podpowiada dalsze postępowanie diagnostyczne. Bez względu na to, czy podejrzewamy chorobę wrodzoną czy nabytą, schemat postępowania diagnostycznego jest podobny.

Diagnostyka obejmuje testy przesiewowe, wykonywane praktycznie w każdym laboratorium przyszpitalnym, oraz testy specjalistyczne, wykonywane w wyspecjalizowanych laboratoriach. Testy przesiewowe (tzw. skriningowe) to: morfologia krwi (z liczbą płytek krwi), czas protrombinowy (PT), czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT), czas trombinowy (TT), poziom fibrynogenu oraz czas krwawienia (BT). Należy pamiętać, że prawidłowe wyniki testów przesiewowych nie wykluczają patologii w

obrębie układu krzepnięcia, np. choroby von Willebranda (vWD).

Czas krwawienia, czyli czas upływający od doświadczonego zranienia skóry do chwili ustania wypływu krwi, to metoda bardzo mało czuła i swoista oraz mało powtarzalna. Dlatego próbuje się ją zastąpić urządzeniem do automatycznego pomiaru czynności płytek krwi: PFA-100 (*platelet function analyzer*). Badanie to, przedstawiane w literaturze jako przesiewowe, w Polsce ze względu na koszt trudno traktować jako rutynowe. Aparat mierzy tzw. „czas zamknięcia/okluzji” (*closure time*) otworu w membranie przez tworzący się czop płytkowy. PFA-100 ocenia hemostazę płytkową, w tym funkcję płytek zależną od czynnika von Willebranda (vWF).

Testy specjalistyczne to m. in.: aktywność poszczególnych czynników krzepnięcia, stężenie i aktywność vWF, analiza jego multimetrów, badanie agregacji płytek krwi i ocena ich morfologii.

Diagnostyka choroby von Willebranda

Choroba von Willebranda (vWD) jest jedną z najczęściej występujących skaz krwotocznych. Jest to skaza o charakterze mieszanym, płytkowo-osoczkowym i dlatego jej rozpoznanie nie jest proste. Trudności diagnostyczne wynikają również z tego, że wyniki badań podstawowych są w większości przypadków vWD prawidłowe. Należy także pamiętać o fizjologicznej zmienności poziomu czynnika von Willebranda (vWF), który rośnie np. wraz z wiekiem i różni się w zależności od grupy krwi (u osób z grupą krwi „0” jest niższy o około 25-30% w porównaniu z grupą krwi A

Adres do korespondencji:

Teresa Iwaniec
II Katedra Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
31-066 Kraków, ul. Skawińska 8
Tel.: 012-430-52-66, w. 209
e-mail: teresaiwaniec@poczta.fm

i B). Poziom vWF ulega zwiększeniu między innymi po wysiłku fizycznym, w stanie stresu, w chorobach zapalnych i nowotworowych. Dlatego też podejrzewając łagodną postać vWD badania laboratoryjne nierzadko trzeba wykonywać dwukrotnie lub nawet trzykrotnie (w odpowiednich odstępach czasu).

Badania podstawowe (przesiewowe) wykonywane przy podejrzeniu vWD obejmują: czas krwawienia (praktycznie już nie wykonywany), PFA-100, PT, aPTT oraz liczbę płytek krwi. Badanie czasu okluzji przy pomocy aparatu PFA-100 wydaje się dosyć czułym parametrem (przedłużony czas okluzji występuje u około 86% procent chorych z vWD), ale mało swoistym (wydłużony jest także m. in. w trombastenii *Glanzmann*, w małopłytkowości oraz podczas stosowania aspiryny). Prawidłowy czas okluzji nie wyklucza więc vWD. Czas aPTT jest najczęściej prawidłowy, choć może być przedłużony w przypadku, gdy obniżona jest aktywność czynnika VIII. Czas protrombinowy (PT) jest zawsze prawidłowy. Liczba płytek krwi może być obniżona jedynie w niezwykle rzadkim podtypie 2B (w pozostałych przypadkach jest prawidłowa).

Kolejny etap diagnostyki ma na celu określenie typu oraz podtypu vWD (badania specjalistyczne, tabela I). Aby rozróżnić typ vWD (1, 2 lub 3) oznacza się: poziom czynnika vWF (vWF:Ag), aktywność kofaktora rystocetyny (vWF:RCof), test wiązania vWF do kolagenu (vWF:CB) oraz aktywność czynnika VIII (FVIII:C). Na określenie podtypu typu 2 (2A, 2B, 2N, 2M) pozwala: analiza multimerów czynnika vWF, test RIPA oraz test wiązania vWF z czynnikiem VIII.

Aktywność czynnika VIII jest najczęściej prawidłowa, za wyjątkiem typu 2N gdzie ulega obniżeniu, i typu 3, gdzie wynosi poniżej 10% (jest to tzw. typ ciężki choroby, który odznacza się prawie całkowitym brakiem vWF). Poziom czynnika vWF w typie 1 choroby jest obniżony, w typie drugim obniżony lub prawidłowy, natomiast w typie 3 niższy niż 10%. Aktywność kofaktora rystocetyny i test wiązania vWF do kolagenu pozwalają na ocenę funkcji czynnika vWF. Rystocetyna to niskocząsteczkowy glikopeptyd, który wiąże się z vWF i glikoproteiną Ib, powodując aglutynację płytek krwi. Aktywność kofaktora rystocetyny (vWF:RCof) jest obniżona w typach: 1, 2A, 2B, 2M oraz 2N (w którym może być też prawidłowa). W typie 3 vWF:RCof wynosi mniej niż 10%. Typy 1 i 2 vWD najprościej można rozróżnić opierając się na stosunku vWF:RCof do vWF:Ag. Jeżeli jest on wyższy niż 0,7, rozpoznajemy typ 1 choroby (charakteryzujący się proporcjonalnym zmniejszeniem aktywności i stężenia vWF). Wynik niższy niż 0,7 wskazuje na zaburzenia czynnościowe cząsteczki vWF (typ 2).

Test wiązania vWF do kolagenu polega na pomiarze adhezji osoczonego vWF do mikrocząstki opłaszczonej kolagenem. Jest przydatny przy różnicowaniu typu 1 i 2 oraz podtypów 2A i 2B, w których brakuje multimerów o dużej masie cząsteczkowej. Test RIPA polega na pomiarze agregacji płytek krwi pod wpływem dwóch stężeń rystocetyny (1,5 oraz 0,5 mg/ml). U osób zdrowych prawidłową agregację obserwuje przy stężeniu 1,5 mg/ml, podczas gdy przy stężeniu 0,5 mg/ml agregacja nie zachodzi. U osób z chorobą *von Willebranda* agregacja płytek przy wyższym stężeniu rystocetyny może być osłabiona lub prawidłowa. Natomiast w typie 2B, w którym powinowactwo vWF do glikoproteiny Ib jest zwiększone, obecna jest agregacja przy stężeniu 0,5 mg/ml. Metoda ta pozwala także na rozróżnienie pomiędzy typem 2B vWD a rzekomą (płytkową) chorobą vWD, w której zwiększenie powinowactwa vWF do płytek wynika z defektu receptora płytkowego, a nie samego czynnika vWF. W modyfikacji tej metody wykonuje się agregację płytek krwi pod wpływem rystocetyny w stężeniu 0,5 mg/ml w dwóch mieszaninach: I – osocze pacjenta i świeże płytki zdrowe, II – płytki pacjenta i osocze zdrowe (z prawidłowym poziomem czynnika vWF). W typie 2B vWD obecna jest agregacja w I mieszaninie, brak w II. Natomiast w płytkowej postaci choroby jest na odwrót.

Test wiązania czynnika vWF z czynnikiem VIII pozwala na ocenę ilości czynnika VIII związanego z vWF. Pozwala odróżnić podtyp 2N vWD, w którym występuje defekt wiązania czynnika VIII przez vWF, od łagodnej hemofilii A, w której to wiązanie jest prawidłowe. Analiza multimerów polega na rozdzieleniu w żelu agarozowym multimerów vWF o różnej wielkości (multimetry o dużej masie cząsteczkowej wędrują w żelu wolniej niż multimetry małe i pośrednie). Jest to badanie szczególnie przydatne w rozpoznawaniu typu 2 choroby (2A i 2B), w którym wzór multimerów jest zaburzony.

Tabela I

TYP vWD	Charakterystyka	Badania diagnostyczne
TYP 1 (60-80% pacjentów)	Defekt ilościowy – prawidłowa budowa cząsteczki vWF	↓ R:Cof, ↓ vWFAg R:Cof / vWFAg > 0,7 FVIII:C (poziom zmienny)
TYP 2 (10-30% pacjentów)	Defekt jakościowy – zaburzony wzór multimerów vWF	Analiza multimerów R:Cof / vWFAg < 0,7 (poza 2N) Typ mutacji
Podtyp 2A	Brak dużych i pośrednich multimerów	
Podtyp 2B	↓ powinowactwo do GP Ib, brak dużych multimerów Różnicowanie z rzekomą vWD	RIPA; Liczba płytek (czasem małopłytkowość)
Podtyp 2M	↓ powinowactwo do płytek, obecne wszystkie multimetry	
Podtyp 2N	Defekt wiązania FVIII Różnicowanie z łagodną HA!	Test wiązania FVIII:vWF
TYP 3 (1-5% pacjentów)	Postać ciężka – prawie całkowity brak vWF	vWFAg < 10%

Nabyta choroba von Willebranda

Diagnostyka nabytej postaci vWD przebiega analogicznie do postaci wrodzonej (obowiązuje dokładnie taki sam schemat postępowania). Rozróżnienie pomiędzy postacią wrodzoną i nabytą jest bardzo istotne ze względu na konieczność wdrożenia odpowiedniego leczenia. Nabyta vWD jest najczęściej związana z obecnością przeciwciał przeciw różnym domenom czynnika vWF, stąd też stwierdzenie ich obecności we krwi chorego jest testem potwierdzającym nabyty charakter choroby. Wykorzystuje się w tym celu tzw. test neutralizacji, w którym oznacza się vWF:Ag i vWF:RCof w osoczu badanym i mieszaninie osocza badanego z osoczem zdrowym po 12-godzinnej inkubacji w 4°C. Na podstawie różnicy między wartościami uzyskanymi a „oczekiwanymi” (takimi, jak przy braku inhibitora) można wnioskować o obecności lub braku przeciwciał. Ze względu na fakt, iż jest to metoda czasochłonna, próbuje się ją zastąpić metodami immunoenzymatycznymi (ELISA).

Diagnostyka hemofilii

Hemofilie to wrodzone, osocze skazy krwotoczne, których przyczyną są niedobory czynników krzepnięcia: czynnika VIII (hemofilia A), czynnika IX (hemofilia B) lub czynnika XI (hemofilia C). Najczęstsza z nich jest hemofilia A.

Badania wykonywane przy diagnozowaniu hemofilii A to:

- liczba płytek krwi (prawidłowa);
- czas krwawienia i / lub czas okluzji PFA-100 (prawidłowe)
- PT / INR (prawidłowy);
- aPTT – przedłużony!;
- aktywność FVIII – obniżona; zakres uzyskiwanych wartości zależy od typu hemofilii (typ ciężki < 1%, typ umiarkowany 1-5%, typ łagodny 5-40%);
- stężenie czynnika VIII – obniżone;

Obniżenie aktywności czynnika VIII obserwuje się także w części przypadków vWD, dlatego pomimo istotnych różnic w obrazie klinicznym tych dwóch chorób należy przeprowadzić diagnostykę różnicową (oznaczyć vWF:Ag, vWF:RCof oraz wiązanie czynnika vWF do FVIII). Bazując wyłącznie na oznaczeniu aktywności FVIII można błędnie rozpoznać np. umiarkowaną postać hemofilii A u pacjenta z typem 3 vWD. Podobnie stwierdzając obniżenie aktywności czynnika IX w osoczu pacjenta, należy wykluczyć niedobór pozostałych czynników kompleksu protrombiny (czynnika II, VII oraz X).

W przypadku podejrzenia obecności inhibitora u pacjenta z hemofilią A (rzadziej B) należy wykonać test korekcji w celu róż-

nicowania pomiędzy „prostym” niedoborem czynnika krzepnięcia a obecnością krążącego antykoagulantu, czyli inhibitora FVIII lub FIX. Potwierdzeniem obecności antykoagulantu jest przedłużenie aPTT mieszaniny równych objętości osocza badanego i osocza prawidłowego po 1 h inkubacji w 37°C. Jeśli test korekcji jest dodatni, oznacza się miano inhibitora czynnika VIII (lub IX) w teście Bethesda (w modyfikacji *Nijmegen*). Jedna jednostka Bethesda (1 j.B./ml) to taka ilość inhibitora obecna w osoczu pacjenta, która po 2 h inkubacji w 37°C inaktywuje 50% czynnika VIII w osoczu zdrowym.

Oznaczając aPTT oraz aktywność czynników VIII i IX należy pamiętać, że wyniki uzyskiwane w poszczególnych laboratoriach mogą się różnić. Związane jest to z faktem, że oznaczenia wykonuje się z użyciem różnych zestawów odczynnikowych (różniących się składem i pochodzeniem poszczególnych składników) oraz na różnych analizatorach koagulometrycznych. Istotne jest, aby odczynniki stosowane do oznaczania aPTT i aktywności czynnika VIII były na tyle czułe, aby można było wykryć wszystkie typy hemofilii (od postaci ciężkiej po łagodną).

Hemofilia nabyta

U pacjentów z hemofilią nabytą charakterystyczne jest izolowane przedłużenie aPTT (2-3-krotne) przy prawidłowych wartościach PT, TT, poziomu fibrynogenu, czasu krwawienia oraz płytek krwi. Aktywność czynnika VIII jest znacznie obniżona i wynosi 0-15%. Izolowane przedłużenie aPTT występuje także w przypadku niedoborów czynników krzepnięcia drogi wewnątrzpochodnej (czynniki: VIII, IX, XI, XII) oraz w obecności antykoagulantu toczniowego (LA). Należy przy tym zwrócić uwagę na fakt, że obecność LA predysponuje do zakrzepicy, a nie do krwawień, natomiast niedobór czynnika XII jest anomalią bezobjawową, która nie wiąże się ze zwiększeniem tendencji do krwawień i nie wyma-

ga leczenia. W celu potwierdzenia obecności antykoagulantu (inhibitora czynnika VIII / IX lub LA) wykonuje się test korekcji. Jeśli jest on dodatni (obecny jest antykoagulant), należy wykluczyć obecność LA oraz oznaczyć miano inhibitora czynnika VIII w teście Bethesda. Stwierdzenie obecności inhibitora FVIII oraz typowy obraz kliniczny (skaza nabyta, prawidłowy aPTT w przeszłości) potwierdza rozpoznania nabytej hemofilii. Przy pomocy miana inhibitora monitoruje się także leczenie, którego celem jest wyeliminowanie krążących we krwi przeciwciał, zaburzających prawidłowe działanie czynnika VIII.

Piśmiennictwo

1. Barrowcliffe TW, Cattaneo M, Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, Toh CH, Hemker HC, Beduin S, Ingerslev J, Sorensen B. New approaches for measuring coagulation. *Haemophilia* 2006; 12: 76-81.
2. Szanto T, Schlamadinger A, Salles I, Pareyn I, Vauterin S, Harsfalvi J, Vanden-Bulcke AM, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. Type 2B von Willebrand disease in seven individuals from three different families: Phenotypic and genotypic characterization. *Thromb haemost* 2007; 98: 251-254.
3. Lillicrap D, Nair S.C., Srivastava A, Rodeghiero F, Pabingers I, Federici AB. Laboratory issues in bleeding disorders. *Haemophilia* 2006; 12: 68-75.
4. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's disease. *NEJM* 2004; 351: 683-694.
5. Kumar S, Pruthi RK, Nichols WL. Acquired von Willebrand disease. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 181-187.
6. Siaka C, Rugeri L, Caron C, Goudemand J. A new ELISA assay for diagnosis of acquired von Willebrand Syndrome. *Haemophilia* 2003; 9: 303-308.
7. Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK. *Textbook of Hemophilia*. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
8. Bolton-Maggs P, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet*. 2003; 361: 1801-1809.
9. Greek D. The management of acquired haemophilia. *Haemophilia* 2006; 12: 32-36.
10. Buczman A, Windyga J. Hemofilia nabyta. *Pol Arch Med Wew* 2007; 117: 227-233.