

Vergleich der halbautomatisierten Von Willebrand Faktor-Multimeranalyse mittels HYDRAGEL 5/11 mit der herkömmlichen, ressourcenintensiven Handmethode



Rosanna Rubin, BMA 18-21 A

Bildungsgang biomedizinische Analytik HF

Inselspital, ZLM Hämostase

1. Zusammenfassung

Um die von Willebrand Erkrankung (VWD) zu diagnostizieren muss eine exakte Untersuchung des von Willebrand Faktors (VWF) vorgenommen werden, wozu unter anderem die Gelelektrophorese dazu gehört (In-House von Willebrand Multimeranalyse IHVWM). Diese Analyse ist technisch anspruchsvoll, variiert qualitativ stark von Gel-zu-Gel, ist zeitintensiv und benötigt speziell ausgebildete Fachkräfte. Seit kurzem wird eine halbautomatisierte von Willebrand Multimeranalyse (H5/11VWM) angeboten, die schnelle und hochwertige Resultate mit Fertigmateriale verspricht. Das Inselspital als Referenzlabor der VWF-Diagnostik möchte diese neue Analyse evaluieren, um ein Ersatz der IHVWM zu erwägen. Dazu ist ein Kollektiv von 87 Proben erstellt worden aus gesunden und erkrankten Personen mit vorgängiger IHVWM. Diese sind darauf mit der H5/11VWM getestet und blind typisiert worden. Insgesamt hat die H5/11VWM eine 74-prozentige Übereinstimmung mit der IHVWM gezeigt, wobei die meisten Fehldiagnosen in den Typen 2A (IIA)/ 2B, 2M und AVWS zu finden sind. Dies kann teils mit der fehlenden Darstellung der Tripletstrukturen begründet werden, teils mit dem heterogenen Erscheinungsbild innerhalb eines Typs, mit dem Alter der Proben und einem zwischenzeitlichen Wechsel der Klassifizierung.

2. Einleitung

Die Von Willebrand Erkrankung (engl. Von Willebrand Disease, VWD) ist Folge eines Mangels oder einer Dysfunktion des Von Willebrand Faktors (VWF). Strukturell ist der VWF ein multimeres Glykoprotein mit Bindungsstellen für Thrombozyten (Glykoprotein Ib α /IX), Kollagen (Typ I, III, IV und VI) und den Faktor VIII (FVIII). Wird der frisch gebildete VWF in die Zirkulation entlassen, wird er durch Scherkräfte oder die zinkhaltige Metalloprotease ADAMTS-13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin-1-like domains, member 13) in kleinere Multimere gespalten [1]. Dabei entstehen charakteristische Multimergrößen, welche in der Gelelektrophorese als verschiedene, voneinander getrennte Banden dargestellt werden können (Abbildung 1).

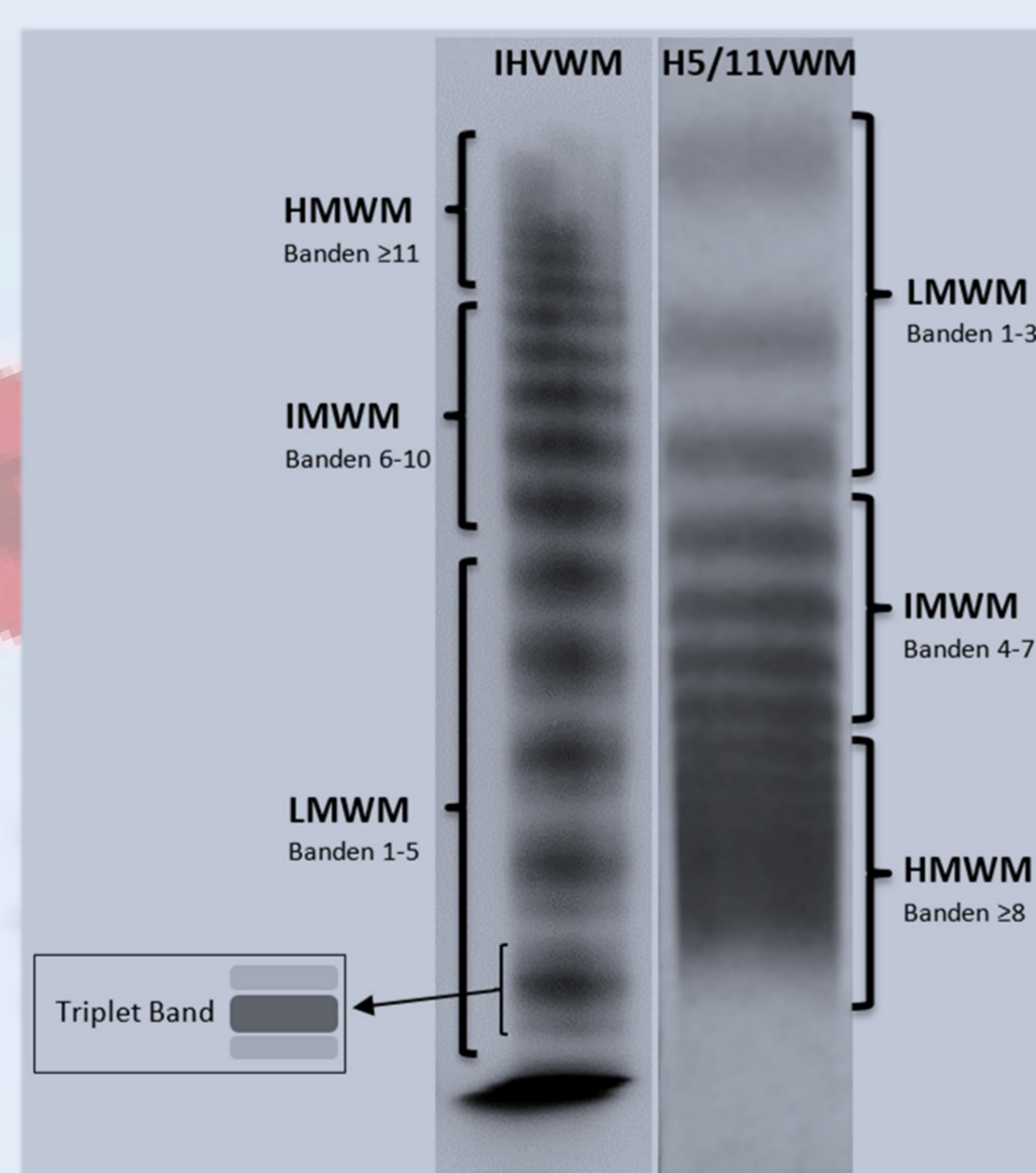


Abb. 1 Bandenstrukturen des VWF in der IHVWM und H5/11VWM (Rubin, 2021)

3. Ziele und Fragestellungen

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Evaluation der halbautomatisierten VWF-Multimeranalyse mittels HYDRAGEL 5/11 im klinischen Alltag.

Fragestellung:

Korrelieren die Ergebnisse der semiquantitativen Methode mit der In-House Methode bezüglich der diagnostischen Genauigkeit?

Dabei werden folgende Kriterien verwendet:

Bandenfärbung und -verteilung, Laborparameter (VWF:Ac, VWF:Ag, Ratio Ac/Ak), Densitometrie (Werte, Kurvenform/-breite, Wellentiefe)

4. Material, Methodik, Vorgehen

Bei diesen Analysen handelt es sich um Gelelektrophoresen, wobei das Patientenplasma als Vorbereitung mit einem Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) haltigen Puffer verdünnt wird. Es wird Plasma aus Natriumcitrat-Röhrchen verwendet, welches vorgängig bei -20°C bis -80°C gelagert worden ist. Als Kontrolle läuft pro Gel eine Lane Standard Human Plasma (SHP) von Siemens (LOT 503287, exp. 24.06.2022) oder ein Normalplasma mit. Das Kollektiv von Patientinnen und Patienten dieser Arbeit ist aufgrund der Diagnosestellung der vorangegangenen IHVWM ausgewählt worden, dabei sind gesunde wie auch an VWD erkrankte Personen eingeschlossen.

5. Ergebnisse/ Resultate

In der unten stehenden Abbildung (Abb. 2) wird eine repräsentative Patientenprobe gezeigt, um ein Beispiel für die gewonnenen Resultate zu präsentieren. Vom Kollektiv sind 74 % korrelierend zur IHVWM diagnostiziert worden. Am meisten Differenzen gibt es bei Typen 2A (IIA) / 2B, 2M und AVWS.

Bandenfärbung: normal

Bandenverteilung: HMWM & IMWM vermindert

Densitometrie: HMWM fehlend, IMWM vermindert

Laborparameter:

VWF:Ac 35 %
VWF:Ag 55 %
VWF:Ac/Ak Ratio 0.65

Diagnose:

VWD Typ 2A (IIA), DD: 2B

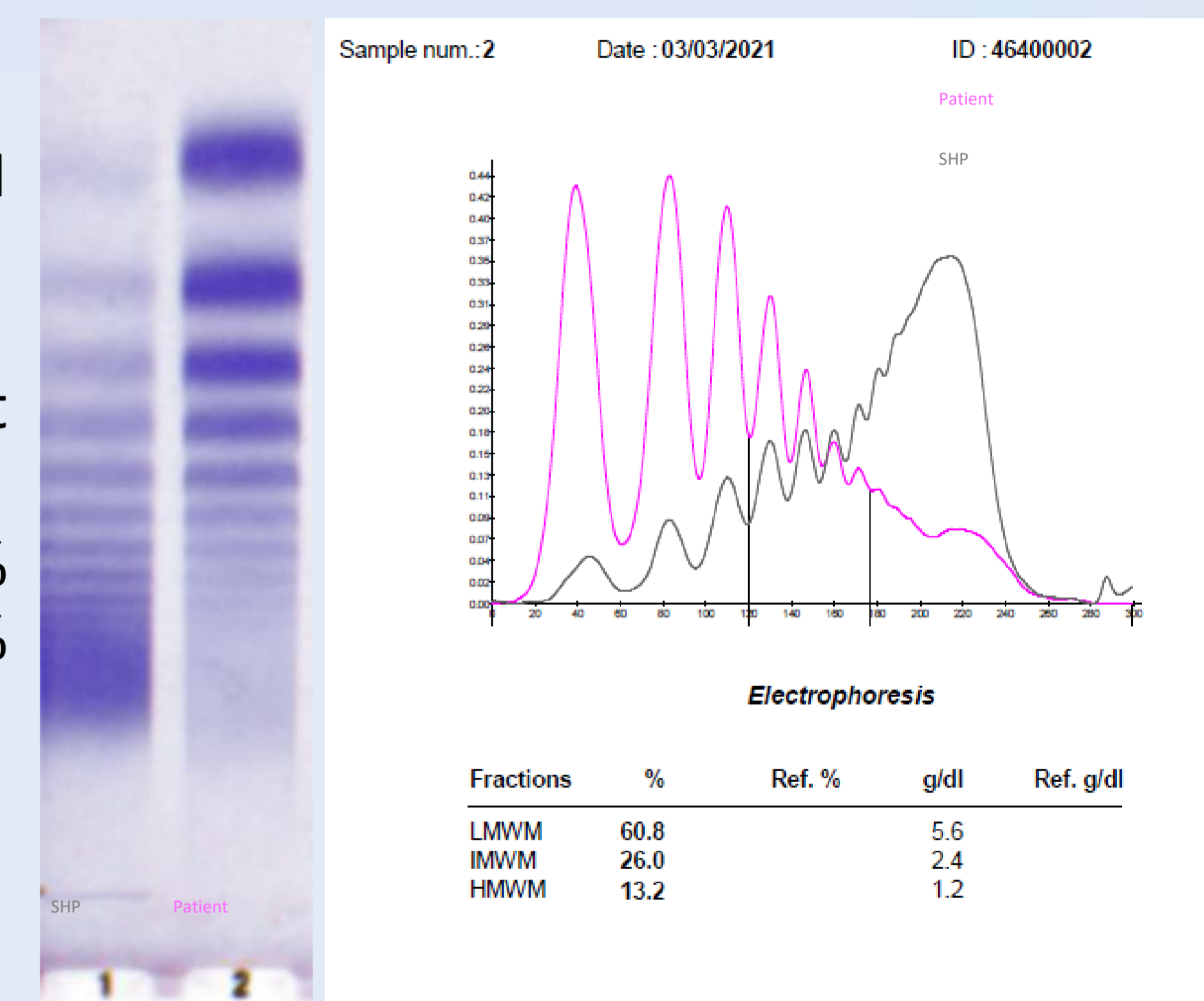


Abb. 2 Beispiel Evaluation Gel und Densitometrie einer H5VWM

6. Diskussion

74 % Übereinstimmung spricht für eine starke Vereinfachung der Bandenmusterinterpretation dank Zusatzinformationen durch die Densitometrie. Im Vergleich zu einer Referenzstudie [2] ist dieses Ergebnis zwar prozentual tiefer, es sind jedoch noch die Subtypen des VWD Typ 2A mit einbezogen worden, was diesen Unterschied erklären kann. Weiter kann das Alter der Proben einen Einfluss auf die Größenverteilung der Multimere ausüben durch Verminderung der HMWM.

Abschliessend gesagt ist die H5/11VWM eine schnelle und qualitativ hochwertige Gelelektrophorese, jedoch erreicht sie die Ansprüche eines Referenzlabors nicht und kann die IHVWM nicht ersetzen.

Quellenverzeichnis

- [1] Heijdra, J. M., Cnossen, M. H., & Leebeek, F. W. G. (2017). Current and Emerging Options for the Management of Inherited von Willebrand Disease. *Drugs*, 77(14), 1531-1547. doi: 10.1007/s40265-017-0793-2
- [2] Bowyer, A. E., Goodfellow, K. J., Seidel, H., Westhofen, P., Stufano, F., Goodeve, A., . . . Makris, M. (2018). Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydrigel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. *Res Pract Thromb Haemost*, 2(4), 790-799. doi: 10.1002/rth2.12141
- Rubin, R. (2021). Bandenstrukturen des VWF in der IHVWM und H5/11VWM. Bern: Eigene Abbildung
- Rubin, R. (2021). Beispiel Evaluation Gel und Densitometrie einer H5VWM. Bern: Eigene Abbildung
- Wasserzeichen: Vanderlinden, W., Lipfert, J. (2016). von Willebrand Factor (vWF). Abgerufen von https://www.biophysik.physik.uni-uenchen.de/research/cell_biophysics/vwf/index.html