



Is de GPIb bindingsassay evenwaardig aan de ristocetine cofactor activiteitstest?

Melissa Depypere

12/03/2012

Promotor: Dr. Els Bailleul
OLVZ Aalst

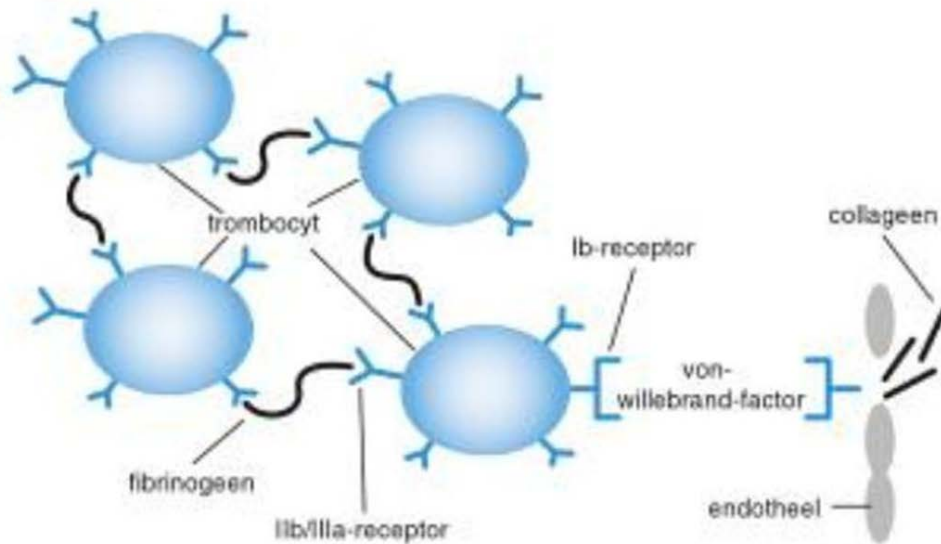


Overzicht

- Functie von Willebrand Factor (vWF)
- Von Willebrand ziekte (vWZ)
- Vragen CAT
- DEEL 1: Hoe testen voor vWZ?
- DEEL 2: Validatie en studie LVAD
- Antwoorden vragen CAT
- To Do



Functie vWF



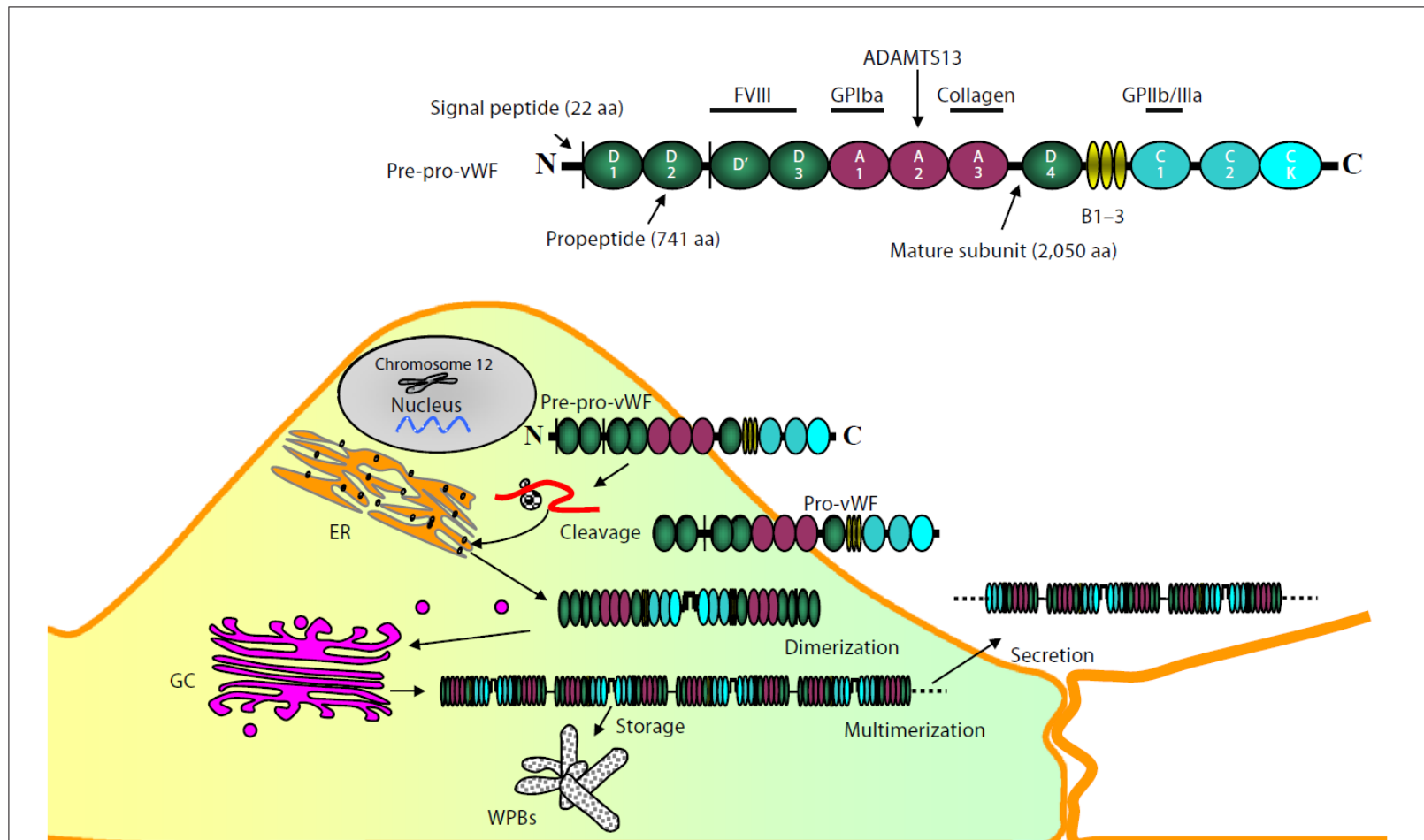
- Functie 1

Het zorgt voor de hechting van de bloedplaatjes aan de vaatwand

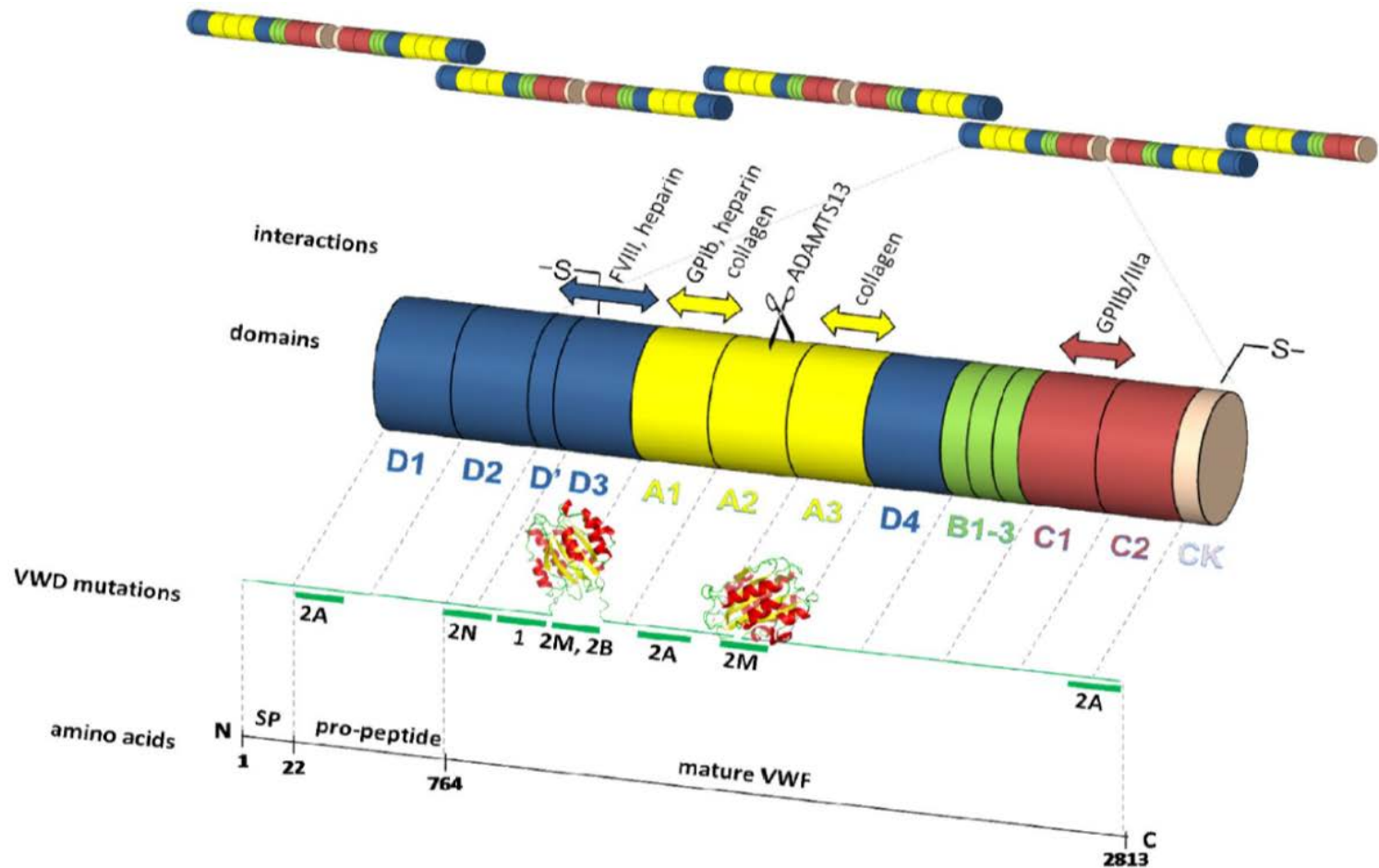
- Functie 2

Het bindt FVIII waardoor dit eiwit wordt beschermd tegen afbraak

Functie vWF



Functie vWF



Von Willebrand ziekte

- Autosomaal overerfbaar
- Prevalentie: 1%
- Therapie: 0,002% - 0,01%
- Symptomen:

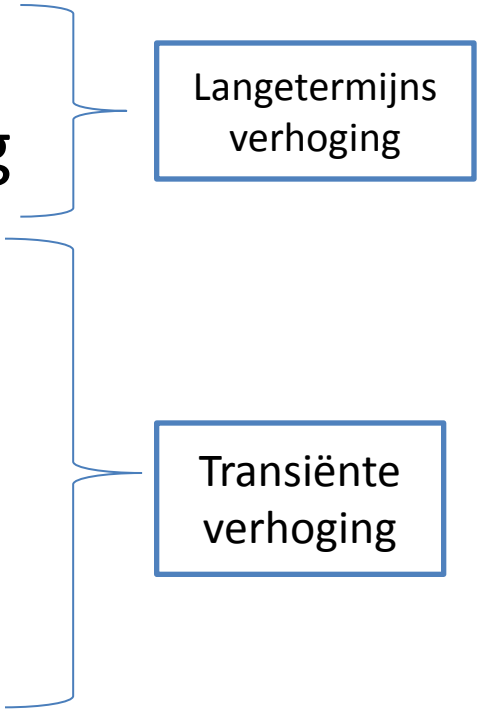


o mucosale hemorragiën (neusbloedingen, menorrhagie, bloedingen tandvlees, GI tractus)

o verlengde bloedingstijd na trauma, typisch tijdens/na ingreep

Verworven omgevingsfactoren

- o Bacteriële/virale infectie (x3)
- o Hyperthyroïdie
- o Chronische endotheelbeschadiging
- o Fysieke activiteit
- o Epinefrine infuus
- o Orale contraceptiva
- o Hormoonvervangende therapie
- o Zwangerschap (300-400%)
- o Leeftijd: stijging 1-2% per jaar



Langetermijs
verhoging

Transiënte
verhoging

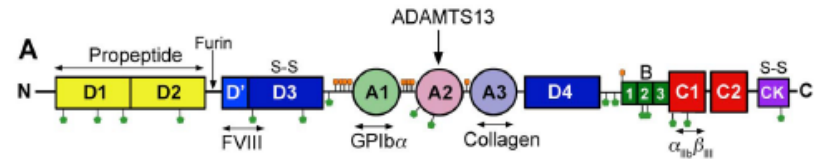
Von Willebrand ziekte

Table 1. Phenotypic classification of VWD

VWD type	Pathophysiologic mechanism
1	Partial quantitative deficiency of VWF and/or FVIII
2	Qualitative defects of VWF
A	↓ platelet-dependent VWF function, lack of HMWM
B	↑ platelet-dependent VWF function, lack of HMWM
M	↓ VWF function, normal multimers
N	↓ VWF binding to FVIII, normal multimers
3	Severe/complete deficiency of VWF and moderately severe decrease of FVIII

Von Willebrand ziekte Type 1

- 70-80% van vWZ
- Milde-ernstige kwantitatieve defecten
- Frequent $\searrow$ FVIII
- Aminozuursubstitutie in D3 domein



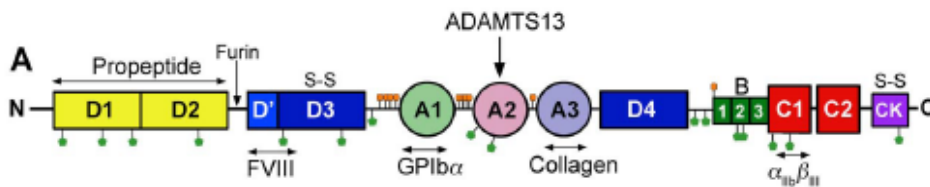
Verminderd
intracellulair
transport van
het dimeer pro-
vWF

Snellere klaring
van het proteïne
uit de circulatie

- R:/ Desmopressine (verhoogde uitstoot)

Von Willebrand Ziekte Type 2A

- Meest voorkomende kwalitatieve variant
- Verminderde productie van grote vWF multimeren
- Mutatie in het propeptide en/of A2 domein waardoor het veel gevoeliger wordt aan proteolyse door ADAMTS13



Von Willebrand Ziekte

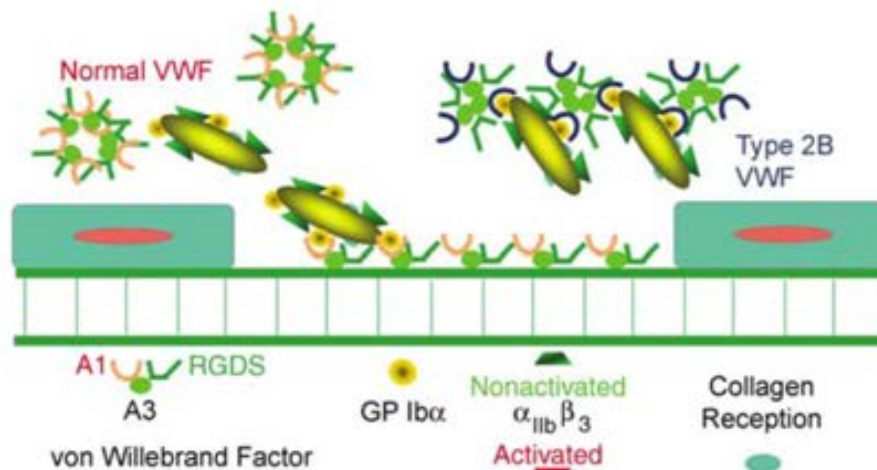
Type 2B

- Autosomaal dominant
- Verhoogde/spontane binding aan de GPIb receptor → trombocytenagglutinatie en trombocytopenie
- MAAR multimeer **zeer gevoelig aan ADAMTS13**
grote multimeren ontbreken, geen trombose
- Moleculair defect: **A1 domein**

Gain of
function



Loss of
function



Von Willebrand Ziekte

Type 2M

- Autosomaal dominant
- Verminderde affiniteit voor GPIb receptor
- Mutatie: A1 domein: loss of function
- Geen invloed op de vorming van de multimeren

Type 2N

- Autosomaal recessief (alias pseudohemofilie)
- Verminderde affiniteit voor FVIII
- Mutatie in het D' of D3 FVIII bindingsdomein
- FVIII is licht verlaagd: milde hemofilie A

Type 3

- Autosomaal recessief
- < 5%
- Ernstige bloedingssymptomen, zeer laag tot ondetecteerbaar vWF

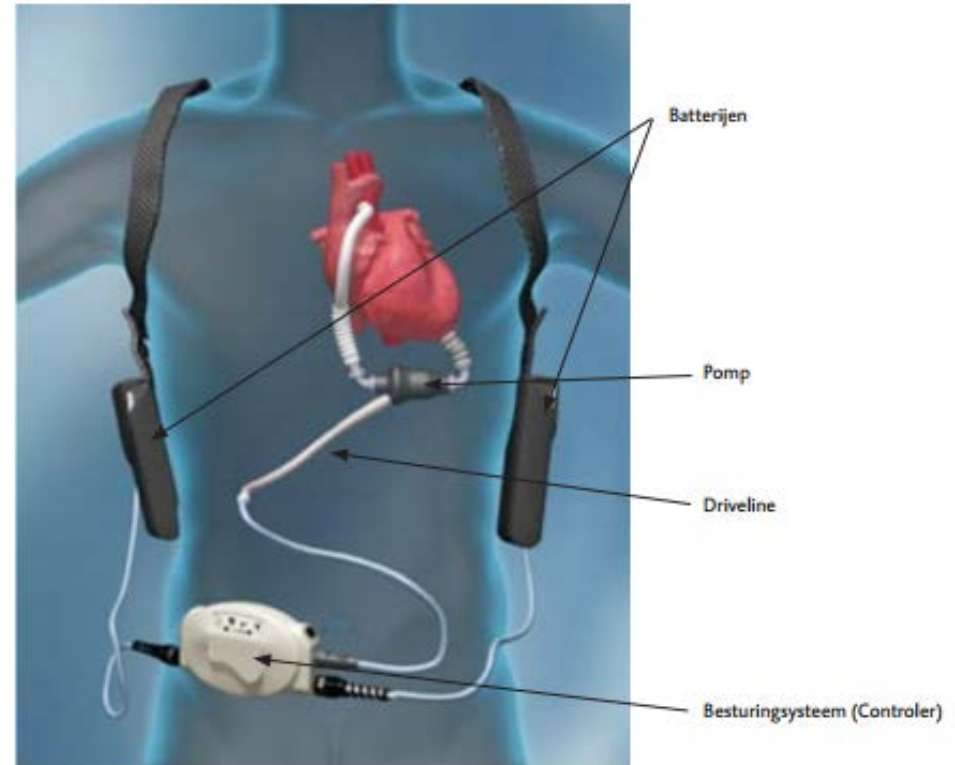


Verworven von Willebrand ziekte

- Onafhankelijk van overerving
- vier mechanismen:
 1. Auto antistoffen
 2. Adsorptie van vWF aan maligne cellen of aberrante expressie van GPIb
 3. Destructie van vWF: LVAD, aortastenose, septumdefect, mitralisklepprolaps, pulmonale hypertensie
 4. Hypothyreoïdie, angiodysplasie, reuzenhemangioom, teleangiectasieën, geneesmiddelengebruik

vWZ: LVAD

- Neemt pompfunctie linker ventrikel over
- Overbrugging naar harttransplantatie
- Pomp intern met canules naar hart en aorta



Vragen CAT

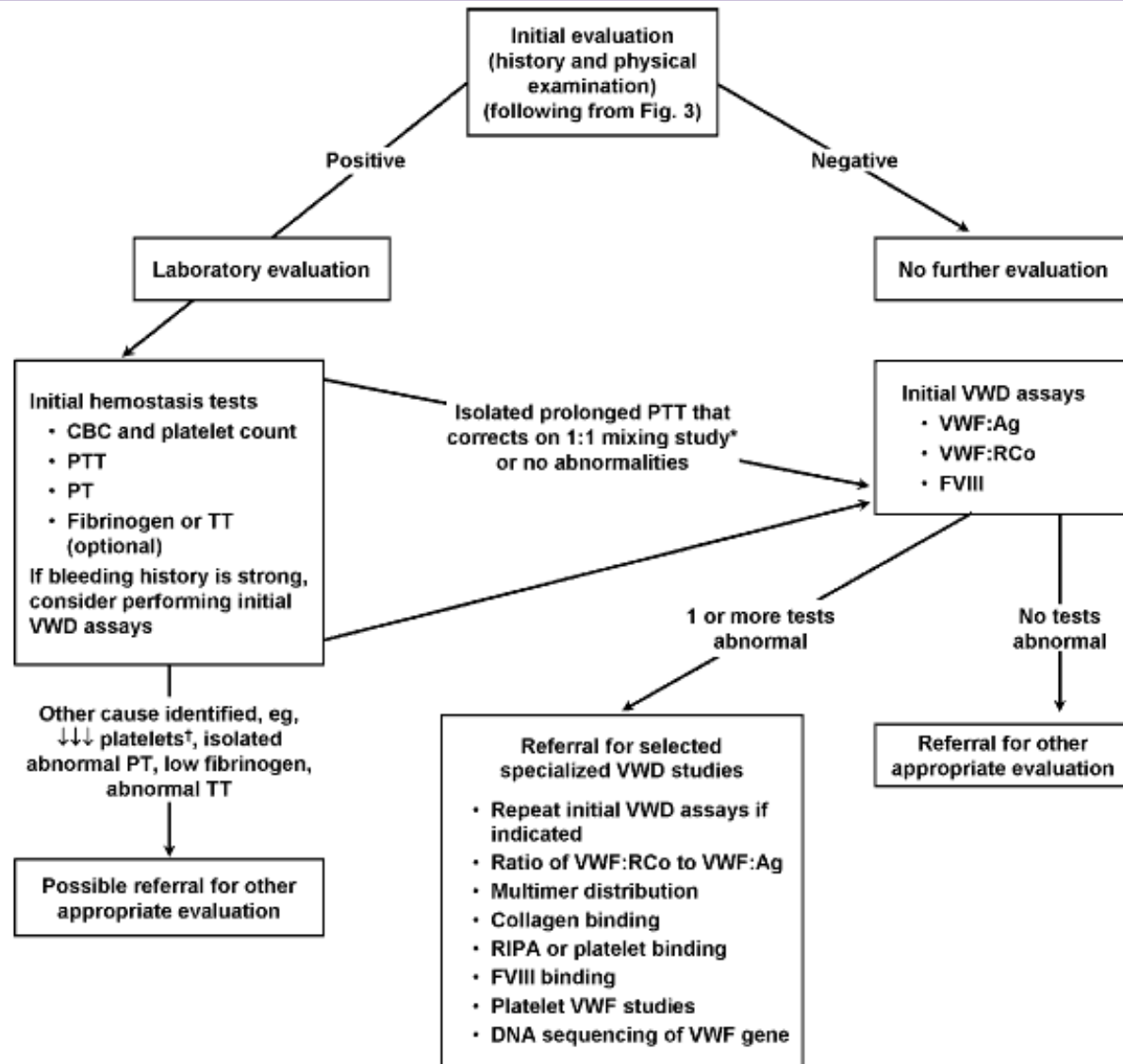


Is de GPIIb bindingsassay evenwaardig aan de ristocetine cofactor activiteitstest?



Welke test is het meest geschikt om verworven von Willebrand ziekte bij patiënten met een LVAD te diagnosticeren?

Deel 1: Hoe testen voor vWZ?



DEEL 1: Kwantitatieve testen

- vWF:Ag test
 - o ELISA (referentie)
 - o Immuunturbidimetrisch



Bloedgroep O: 25 % minder vWF!
reumafactor: overschatting

DEEL 1: kwalitatieve testen

vWF:RCo assay

- Functionele assay: defecten in interactie met normale plaatjes opsporen.
- Ristocetine=AB in onbruik door trombocytopenie



"Nurse, get on the internet, go to SURGERY.COM, scroll down and click on the 'Are you totally lost?' icon."

DEEL 1: kwalitatieve testen vWF:RCof op basis van aggregatie

- = **GOUDEN STANDAARD**

- Gefixeerde plaatjes+staal+ristocetine=aggregatie → troebel

voordeel: geen invloed van secundaire agonisten

- Lichttransmissie meten : amplitude curve = maat voor aggregatie
- PPP = referentie met lichttransmissie van 100%
- Gouden standaard, MAAR toch veel nadelen:



DEEL 1: kwalitatieve testen

Nadelen vWF:RCof testen

Zoeken naar
betere
methode

Nadelen van deze test



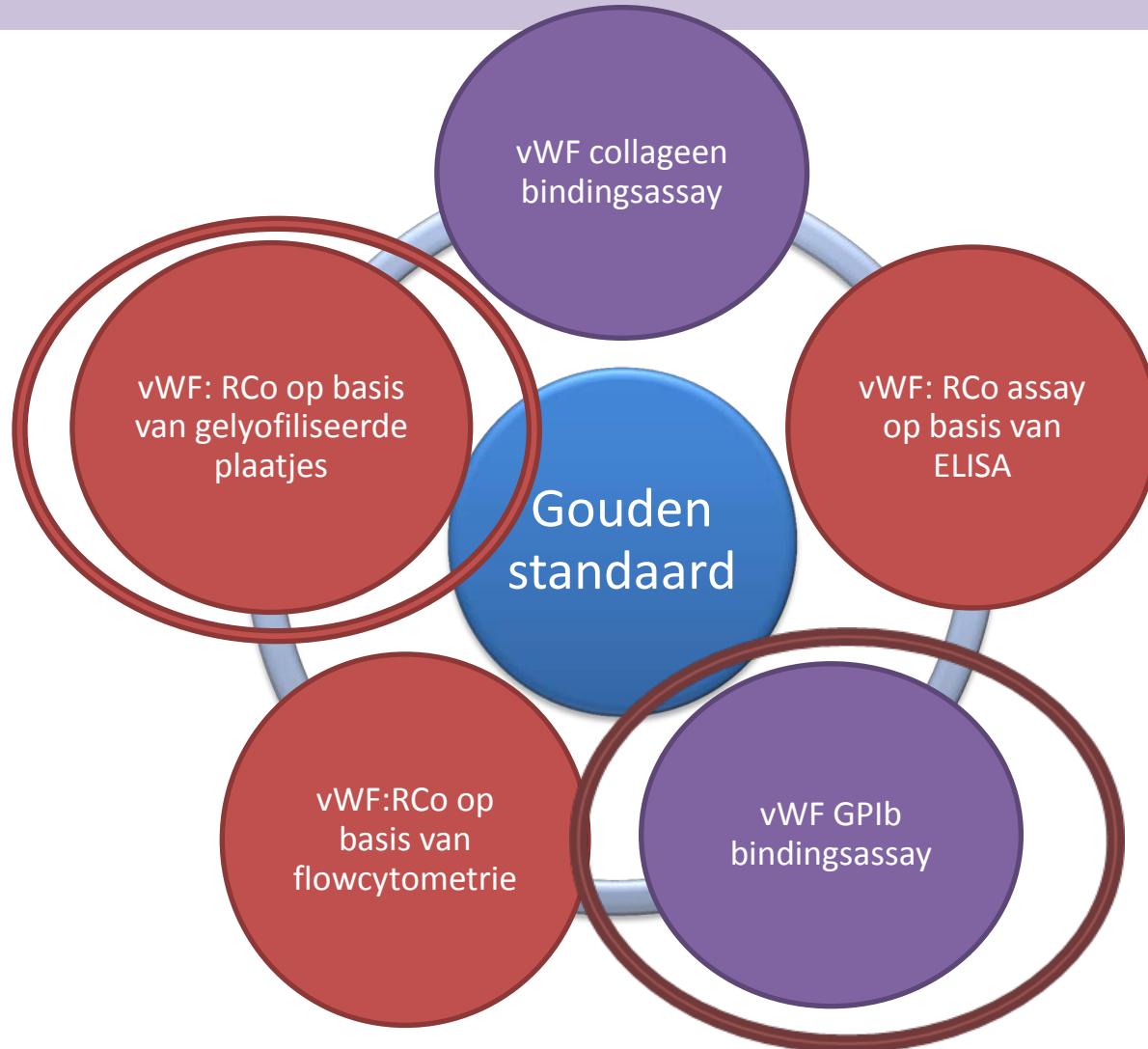
- Incorrecte curve
- Onbetrouwbaar bij lage waarde vWF (algemeen)
- Hoge CV's (20-30%)
- Niet geschikt voor verworven vWZ bij destructie vWF (algemeen)
- Lot tot lot variatie (algemeen)
- arbeidsintensief

Nadelen van ristocetine

- Variatie in P1467S sequentie
- Kan precipiteren aan andere proteïnen → overschatting

DEEL 1: kwalitatieve testen

Alternatieve testen



DEEL 1: kwalitatieve testen

Alternatieve testen

Test-naam	Test-mechanisme	CV(%)	LLQ IU/ml	Automatisch vs manueel	Commercieel verkrijgbaar	limitaties
vWF: RCo met gelyofiliseerde plaatjes	Plaatjesaggregatie door gebruik te maken van gelyofiliseerde plaatjes	<10	0.03	automatisch	Ja	Duur en occasioneel tekort van reagens plaatjes
vWF:CB	Binding van VWF aan collageen dmv ELISA	15-20	0.03	manueel	Ja	Collageen afhankelijk, kan type 2M missen
VWF: GPIb bindingsassay	Specifieke latex immunoassay door gebruik te maken van monoclonale AL tegen vWF A1 domein	<10	0.03	automatisch	Ja	Maakt geen gebruik van plaatjes
vWF:FC	vWF ristocetine geïnduceerde plaatjes interactie gemeten door flowcytometrie	10-15	<0.01	manueel	Nee	Complex, flowcytometer nodig
vWF: Rco ELISA	vWF ristocetine geïnduceerde plaatjesagglutinat	4-13%	0,008-0,1	manueel	Nee	arbeidsintensief

DEEL 1: kwalitatieve testen overzicht

	n	target value	CV (%)	range	your result	z-score
Total Group	202	43	14.0	23 - 215	36	-1.13
Agglutination	119	43	14.3	23 - 215	36	-1.08
Biodata vWF assay	4	35		23 - 50		
Homemade	8	45		32 - 53		
Siemens vWF Reagent	107	43	13.5	28 - 215	36	-1.16
Aggregation	25	42	17.7	30 - 67		
Biogenics VWF: RiCoF	1	37				
Chronolog vWF assay	8	37		30 - 52		
Helena Laboratories vWF:RiCoF assay	9	39		30 - 50		
Homemade	5	44		42 - 67		
Other	1	44				
Renam VWF:RiCoF	1	49				
CLIA	1	40				
I.L. AcuStar VWF:Rco	1	40				
ELISA	11	47	18.4	30 - 57		
ABP vWF assay	4	47		44 - 49		
American Diagnostica VWF:RiCoF Elisa™	2	33		30 - 36		
Axis-Shield vWF activity assay	1	42				
DG-EIA VWF Activity	4	54		53 - 57		
Turbidimetric	46	43	12.8	36 - 64		
I.L. Latex vWF activity	24	44	11.0	37 - 64		
Other	1	50				
Siemens Innovance vWF Ac	21	42	10.2	36 - 49		

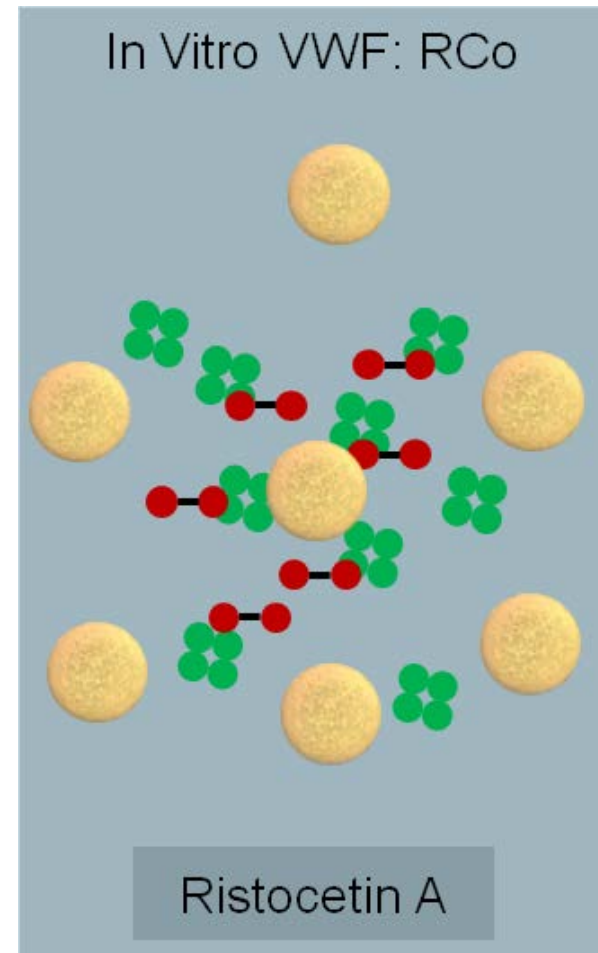
Count

DEEL 1: Kwalitatieve testen

vWF:RCo assay op basis van gelyofiliseerde plaatjes

- Geautomatiseerd
- Agglutinatie test (afname in troebel detecteren)
- Gelyofiliseerde plaatjes

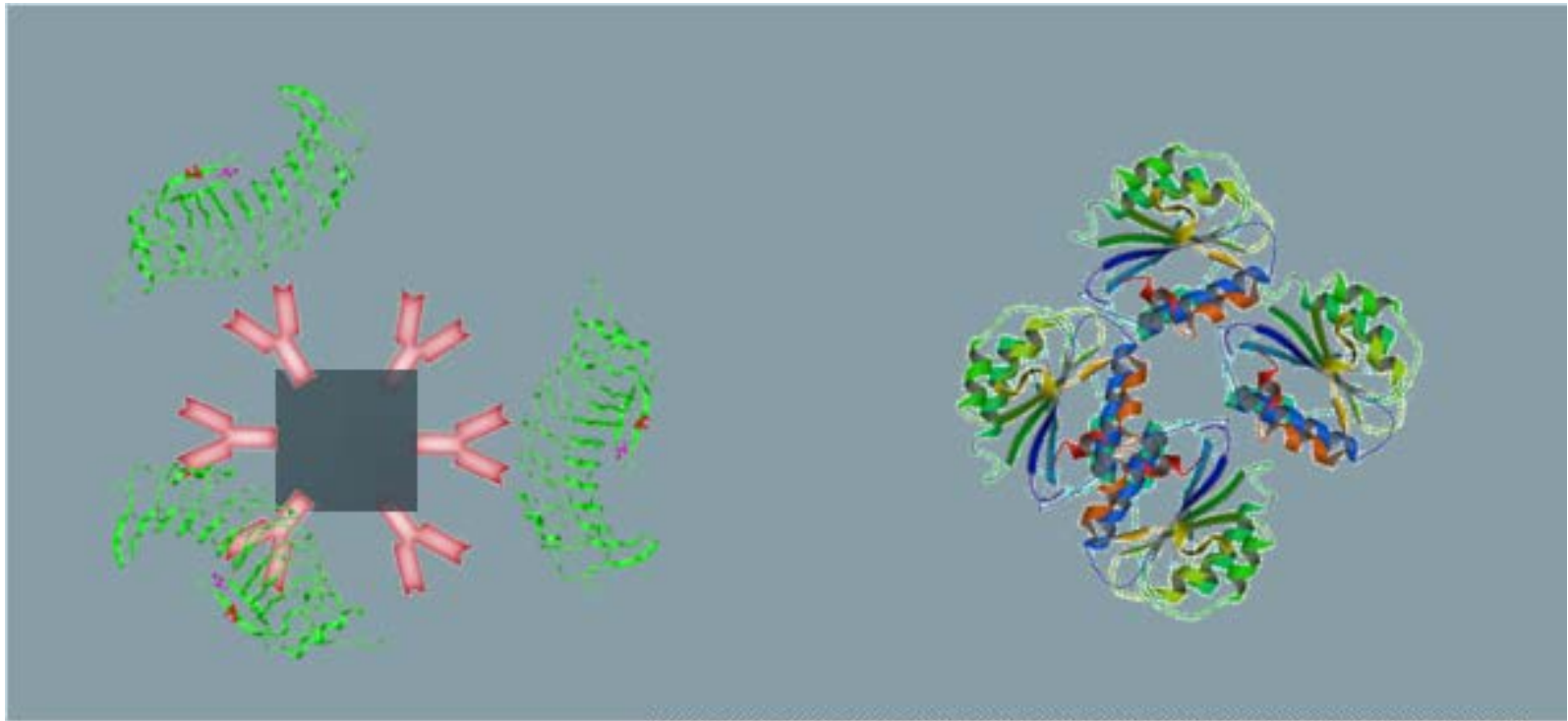
Contra: - lage sensitiviteit
bij lage vWF
- korte stabiliteit
- 'lot to lot' variabel
- rotorsysteem nodig



DEEL 1: Kwalitatieve testen

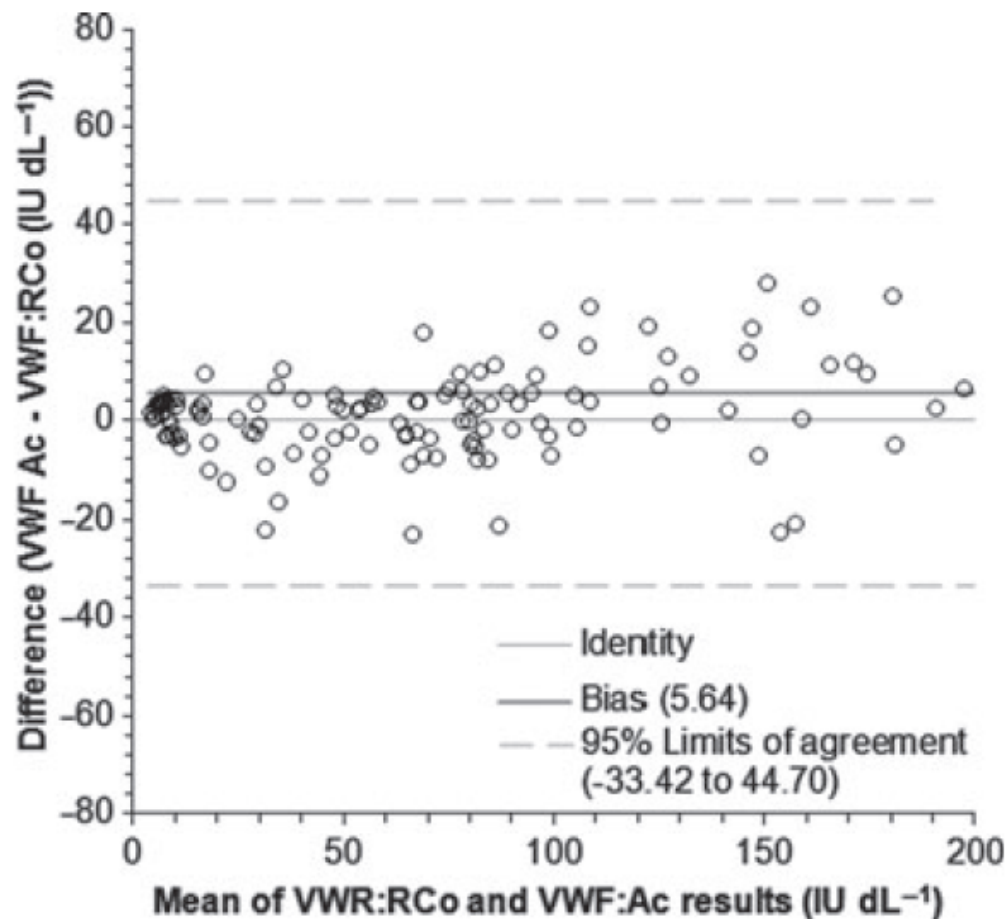
GPIb bindingsassay

- Geautomatiseerd
- Turbidimetrische test (toename in troebel detecteren)
- rGPIb + (antiGPIb + latexpartikels)



DEEL 1: kwalitatieve testen

GPIIb bindingsassay vs vWF: Rco

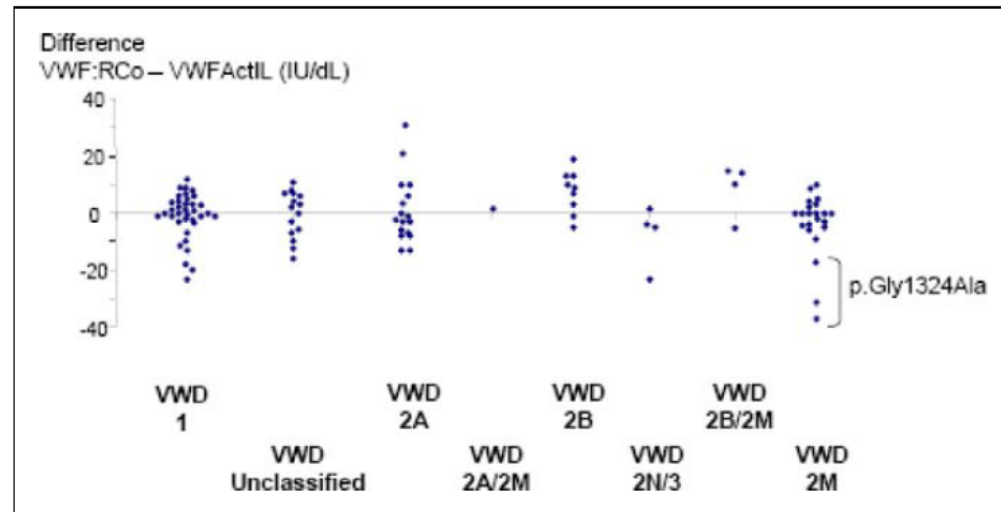


DEEL 1: kwalitatieve testen

GPIb bindingsassay vs vWF: Rco

Trossaert

- Siemens RCo vs IL GPIb
- Goede correlatie($r=0,89$)
- Sensitiviteit 75% indien als screeningstest gebruikt wordt (cutoff 50%)
- Discordantie type 2M

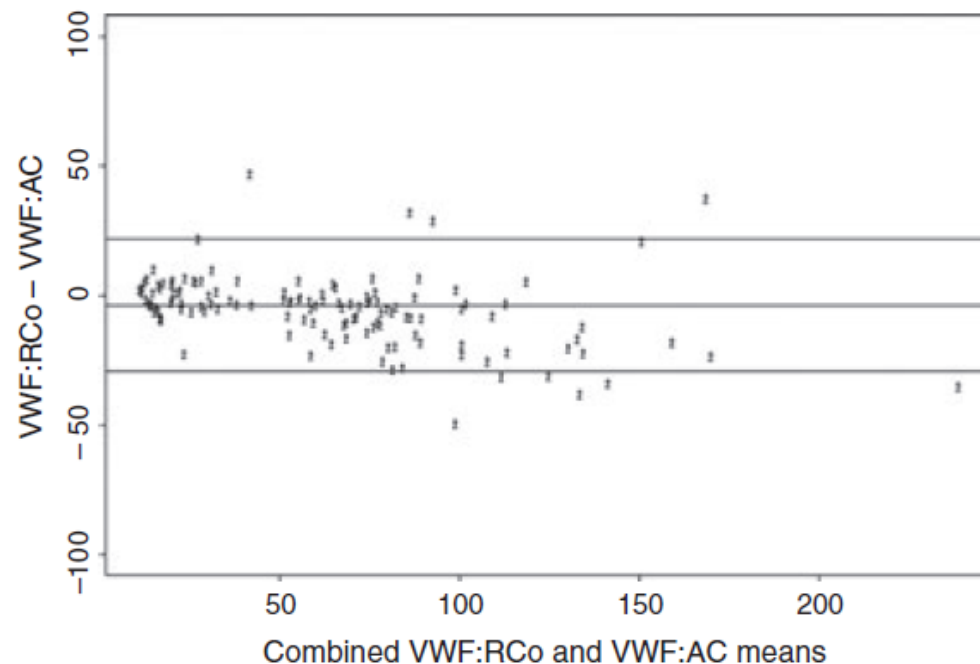


DEEL 1: kwalitatieve testen

GPIb bindingsassay vs vWF:RCo

Lasne et al

- Siemens RCo vs IL GPIb
- 1/160 patiënten pos met GPIb, negatief met RCo
- Goede correlatie
- 10 pt buiten CI (gn vWZ)
- Cutoff van 43,8%
sensitiviteit van 100% en
specificiteit van 97,7%



DEEL 1: kwalitatieve testen

GPIb bindingsassay vs vWF: Rco

	BC von Willebrand Reagens Siemens	Siemens Innovance vWF Ac
Kostprijs totaal	278.49 euro	698.63 euro
Volume reagens	5*4 mL	Reagens I: 3*2.0 mL Reagens II: 3*3.5 mL Reagens III: 1*2.5mL
Volumeverbruik	150µL/ test	Reagens I: 40µL Reagens II: 70µL Reagens III: 13µL
Kalibratie	10*150µL 4 keer per jaar	14*70µL 4 keer per jaar
Gemiddeld aantal testen per 14 dagen	4	4
Stabiliteit 2°-8°C	2 dagen	Reagens I: 4 weken Reagens II: 4 weken Reagens III: 12 weken
Verbruik	1flesje/ 14 dagen	1 flesje/drie testweken
Kostprijs op jaarbasis	6 doosjes = 1670.94 euro	3 doosjes= 2095.89 euro

DEEL 1: Overige testen

RIPA (Lowdose)

Lichaamseigen plaatjes

Type 2B → plaatjesaggregatie bij dosis $< 0,6$ mg/mL

FVIII testen

Verlengde aPTT

Mengen met FVIII deficiënt plasma

vWF:RCo/Ag

$> 0,7$: type 1, 2N, 2B

$< 0,7$: type 2A, 2M, 2B, verworven vWZ

DDAVP infusierespons

Synthetisch derivaat van vasopressine

Stimuleert de vrijzetting van vWF uit endotheelcellen

Nuttig voor type 1, kan helpen bij type 2A en 2M

Type 2B: contraindicatie

Multimeer analyse

Scheiding van vWF in zijn multimeren dmv electroforese

Geen commerciële kits beschikbaar

Overzicht testen

		VWD Variants					
	Normal	1	2A	2B	2M	2N	3
Screening Tests							
Platelet Count	N	N	N	N or ↓	N	N	N
FVIII:C	N	N or ↓	N or ↓	N or ↓	N	↓↓	↓↓↓
VWF:Ag	N	↓ or ↓↓	N or ↓/↓↓	N or ↓/↓↓	N or ↓/↓↓	N or ↓	Absent
VWF:RCo	N	↓ or ↓↓	↓/↓↓	N or ↓/↓↓	N or ↓/↓↓	N or ↓	Absent
VWF:RCo/VWF:Ag	> 0.5–0.7	> 0.5–0.7	< 0.5–0.7	< 0.5–0.7	< 0.5–0.7	> 0.5–0.7	NA
VWF:CB/VWF:Ag	> 0.5–0.7	> 0.5–0.7	< 0.5–0.7	< 0.5–0.7	< 0.5–0.7*	> 0.5–0.7	NA
Supplemental Tests							
VWF Multimer Analysis Patterns	Normal multimer distribution	Normal multimer distribution	Decreased HMWM Abnormal satellite bands	Decreased HMWM Abnormal satellite bands	HMWM present (ultralarge &/or smeary multimers in some variants)	Normal multimer distribution	Absent
RIPA (low dose ristocetin)	N	N	N	↑	N	N	N
VWF:FVIII B	N	N	N	N	N	↓↓↓	Absent

DEEL 2: Vergelijking Innovance en BC reagens

- Precisie ☐
- Juistheid ☐
- Totale fout ☐
- Methodevergelijking ☐

DEEL 2: Precisie

Op CS2100

Between run	Control N		Control P	
3/10/2012	92,40	86,90	23,10	23,00
3/10/2012	89,70	89,40	23,40	24,20
5/10/2012	92,90	89,10	21,90	24,70
5/10/2012	93,10	92,90	23,80	23,80
8/10/2012	89,90	95,60	25,00	22,40
8/10/2012	90,50	87,60	23,30	23,00
9/10/2012	91,30	88,70	25,60	23,10
9/10/2012	89,60	91,30	23,10	24,20
16/10/2012	88,60	94,00	24,60	23,20
16/10/2012	89,20	91,30	24,20	25,30
Totaal CV		2,48		4,08

	Firma	Validatie
CV between run N	4,1%	2,48%
CV between run P	4,6%	4,08%
CV within run	3,5%	1,85%

Within precisie	run	76.4	75.5	75.1	75.5	74.9	74.5	73.1	74.7	74.8	74.4
		74.7	75.4	78.5	75.9	75.1	75.1	77.6	75.8	78.2	77.8

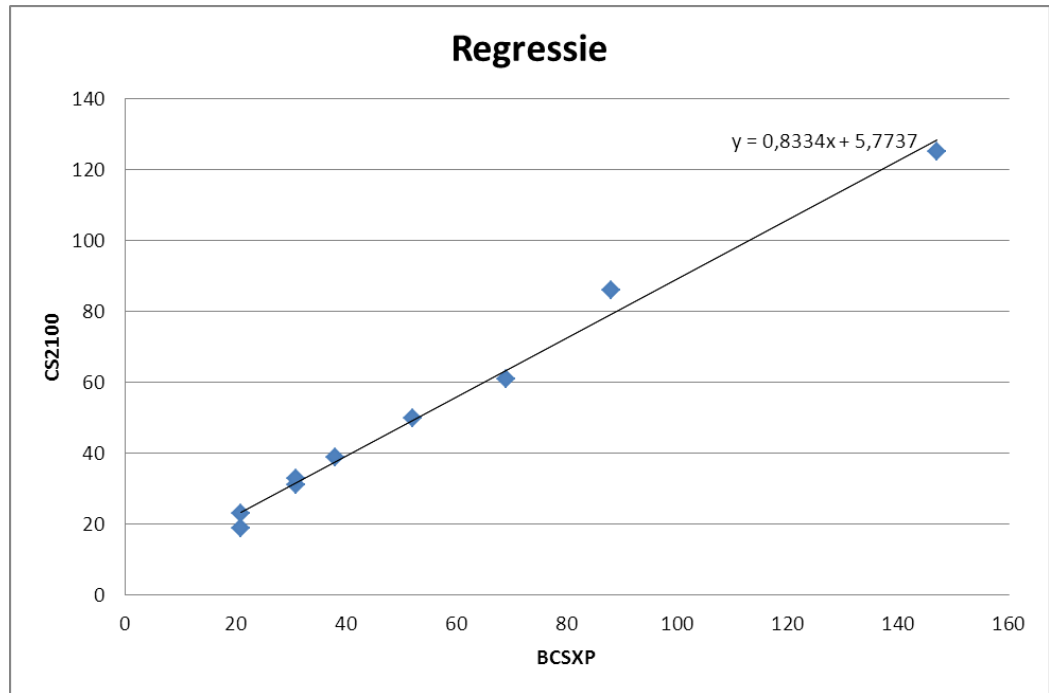
DEEL 2: Juistheid, totale fout

	RICOS	Validatie
Bias Control N	4,7 %	2,41 %
Bias Control P	4,7%	2,87 %
Totale fout N	8,8 %	6,40 %
Totale fout P	8,8%	8,68 %

DEEL 2:

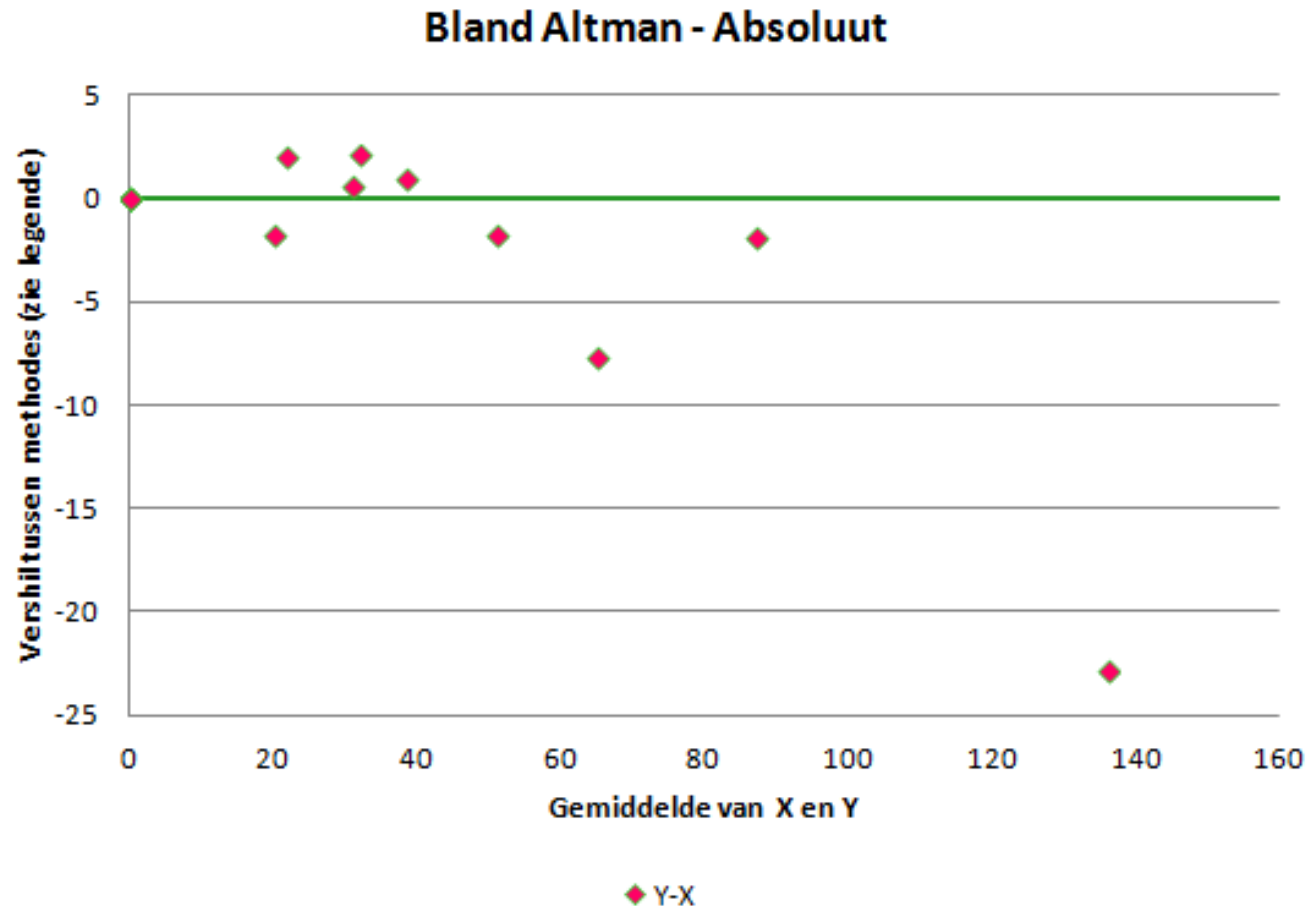
Methodevergelijking

Staalnummer	BCSXP (ristocetine)	CS2100 (INNOVANCE)
4436012	>150	181
4438825	21	19
4439078	147	125
4439260	88	86
4436594	52	50
4440109	21	23
4453570	38	39
4454826	31	31
4457821	31	33
4451737	>150	147
4456225	69	61
4456454	>150	147
4456743	>150	152
4458983	>150	437



correlatiecoëfficiënt van 0,995

DEEL 2: Methodevergelijking



Bias:
2,5%

DEEL 2: Conclusie vergelijking

- Precisie
- Juistheid
- Totale fout
- Methodevergelijking



DEEL 2: Studie LVAD

- Definitie verworven von Willebrand Ziekte volgens ISTH.
 - a) Voorgeschiedenis van bloedingen zonder evidentie voor congenitaal probleem*
 - b) Lage waarden voor vWF:RCo of vWF:CB*
 - c) vWF:RCo/Ag of vWF:CB/Ag ratio $< 0,7$ in geval van (rand)normale waarden voor b)*

MAAR zijn deze testen wel sensitief genoeg in de diagnose van verworven vWZ?

DEEL 2: Studie LVAD

Literatuur

Crow et al

- HM II
- 37/37 verlies hoge multimeren
- 10/37 bloedingssymptomen
- Gemiddelde duur tot bloeding: 22 dagen
- Geen verklaring voor bloeding (angiodysplasie, INR, bloedgroep O)

Uriel et al

- HM II
- 31/31 verlies hoge multimeren
- 18/31 bloedingssymptomen
- Gemiddelde duur tot bloeding: 56 dagen
- > 66 jaar, 2x zo groot risico op bloeding

DEEL 2: Studie LVAD Literatuur

Heilmann et al

- Verlies HMWM dag 3 na operatie (6/6 BVAD en 11/11 HMII)
- 6/6 BVAD deden bloedingen vs 3/11 HM II
- meer bloedverlies tijdens ingreep, verminderde leverfunctie
- 18/55 cumulatieve testen vWF:RCo/vWF:Ag ratio $< 0,65$
- vWF:CB/vWF:Ag $< 0,7$ bij 55/55

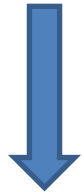


DEEL 2: Studie LVAD

Literatuur

Tiede et al

Onvoldoende
sensitief



Multimeer
analyse steeds
onderdeel
diagnostiek

	Sensitivity (%)			
	CV	GP	Other	Total (95% CI)
Single tests				
(1) FVIII:C < 50 IU dL ⁻¹	0	64	0	20 (7–33)
(2) VWF:Ag < 50 IU dL ⁻¹	0	64	0	20 (7–33)
(3) VWF:RCo < 50 IU dL ⁻¹	0	64	13	23 (9–37)
(4) VWF:CB < 50 IU dL ⁻¹	0	64	13	23 (9–37)
Ratios				
(5) VWF:RCo/Ag ratio < 0.7	19	36	25	26 (11–40)
(6) VWF:CB/Ag ratio < 0.7	44	55	38	46 (29–62)
(7) VWF:CB/Ag ratio < 0.8	75	82	88	80 (67–93)
(8) VWF propeptide/Ag ratio > 0.25	0	55	0	22 (6–38)
Combinations of tests				
(9) 2 or 5 or 6	50	82	50	60 (44–76)
(10) 2 or 5 or 7	75	100	88	86 (74–97)
(11) 3 or 4 or 5 or 6	50	82	63	63 (47–79)

DEEL 2: studie LVAD

Literatuur

Chen et al

Case group	VWF:Ag, IU dL ⁻¹			VWF:RCo, IU dL ⁻¹			VWF:Lx, U dL ⁻¹			VWF:RCo/VWF:Ag ratio			VWF:Lx/VWF:Ag ratio				
	Mean (SD)	≥ 55	< 55	Mean (SD)	≥ 55	< 55	Mean (SD)	≥ 55	< 55	Mean (SD)	≥ 0.7	< 0.7	Mean (SD)	≥ 0.7	< 0.7	≥ 0.8	< 0.8
Normal (<i>n</i> = 368)	121 (75)	368	0	119 (72)	357	11	114 (67)	357	11	0.99 (0.13)	365	3	0.96 (0.11)	365	3	345	23
VWD (<i>n</i> = 100)																	
Type 1 (<i>n</i> = 57)	43 (8.0)	0	57	43 (11)	11	46	45 (11)	9	48	0.98 (0.15)	56	1	1.04 (0.14)	57	0	55	2
Type 2 (<i>n</i> = 35)																	
2A/B (<i>n</i> = 31)	53 (21)	13	18	32 (12)*	2	29	29 (14)	1	30	0.56 (0.13)*	4*	24*	0.54 (0.17)	3	28	3	28
2M (<i>n</i> = 4)	75 (28)	3	1	45 (25)	2	2	47 (24)	2	2	0.56 (0.16)	0	4	0.60 (0.16)	0	4	0	4
Severe VWD 1 vs. 2M (<i>n</i> = 8)	21 (5.6)	0	8	< 12.5	0	8	13 (4.9)	0	8	NA	NA	NA	0.68 (0.33)	3	5	3	5
AVWA (<i>n</i> = 24)	152 (75)	24	0	119 (57)	20	4	100 (45)	22	2	0.80 (0.19)	19	5	0.67 (0.12)	9	15	4	20
Total (<i>n</i> = 492)		408	84		392	100		391	101		444	37		437	55	410	82



Chen et al, J of Thromb Haemost,
2011;9:1993-2002

DEEL 2: Studie LVAD

Besluit literatuur

- LVAD → Verlies van de HMWM → verworven vWZ.
- Optreden bloedingen → ???
- Resultaten voorzichtig interpreteren, mits vWF een acuut fase eiwit is en verhoogd kan zijn bij LVAD patiënten.
- Welke ratio voldoet best aan de definitie? Is er discordantie?

DEEL 2: studie LVAD

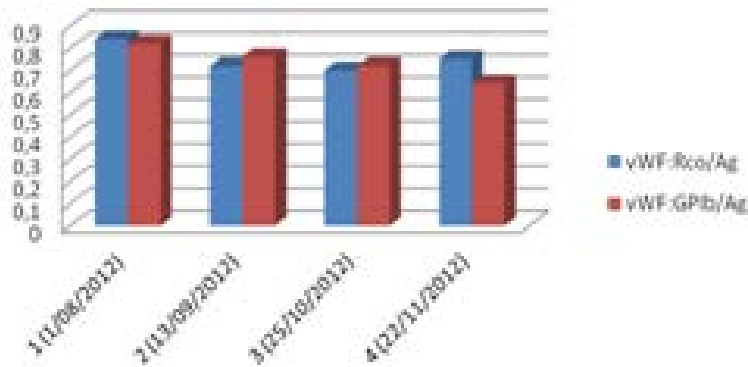
Demografie	Patiënt 1	Patiënt 2	Patiënt 3 (overleden)	Patiënt 4	Patiënt 5
Leeftijd	47 jaar	40 jaar	59 jaar	54 jaar	34 jaar
Sex					
Man			x	X	X
Vrouw	x	X			
Oorzaak hartfalen					
Ischemie	x			X	
Idiopathisch					
Familiaal		X	x		x
Kleplijden					
Bloedgroep					
A		X		X	
AB					
B	x				
O			x		X
Plaatsen LVAD (HM II)	17/05/11	07/02/12	25/04/12	18/06/12	28/11/12
bloedingssymptomen	10/01/12: hematoom in klein bekken	Geen bloedingen	04/05/12: tamponade 15/05/12: epistaxis	13/07/12: epistaxis	Geen bloedingen

Patient	Staalnummer	FVIII (60-150)	vWF:AG (52-200%)	vWF:RCo (40-200)	vWF: GPIb	vWF:RCo/vWF Ag (0,7)	vWF: GPIb/WFAG (0,7)
1	4366410	>150	184	154	151	0.84	0.82
2	4368258	120.8	85	62	62	0.73	0.73
3	4368304	137	165	107	107	0.64	0.65
4	4368463	>150	182	131	118	0.72	0.65
3	4393906	>150	235	129	136	0.54	0.58
2	4395944	>150	100	73	75	0.73	0.75
4	4396313	>150	182	92	109	0.50	0.60
2	4456225	135	91	69	60	0.76	0.66
4	4456454	>150	251	146	160	0.58	0.64
1	4456743	>150	210	146	152	0.70	0.72
2	4425346	150	110	63	78	0.57	0.71
1	4486045	>150	229	150	128	0.75	0.64
2	4485584	155	80	52	58	0.65	0.73
5	4490712	>150	175	146	142	0.83	0.81
1	4411217	>150	236	170	180	0.72	0.76
5	4525235	>150	121.8	61	82	0.50	0.67
5	4581002	147	136	83	97	0.61	0.71

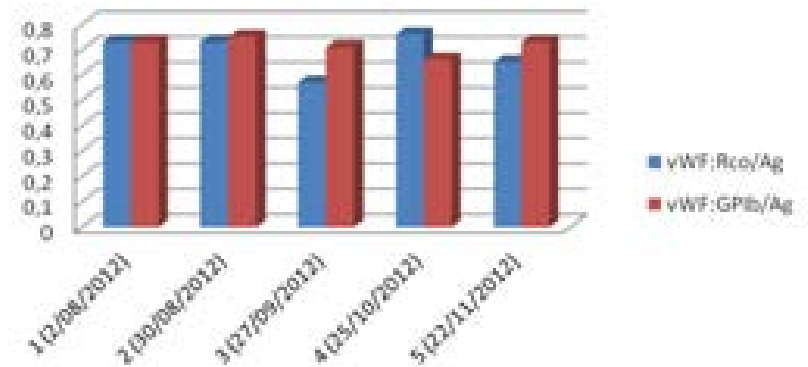
DEEL 2: Studie LVAD

Resultaten in de tijd

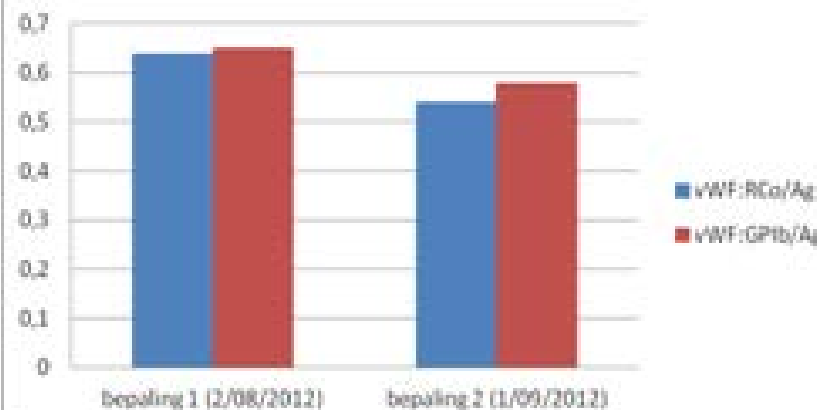
Patiënt 1



Patiënt 2



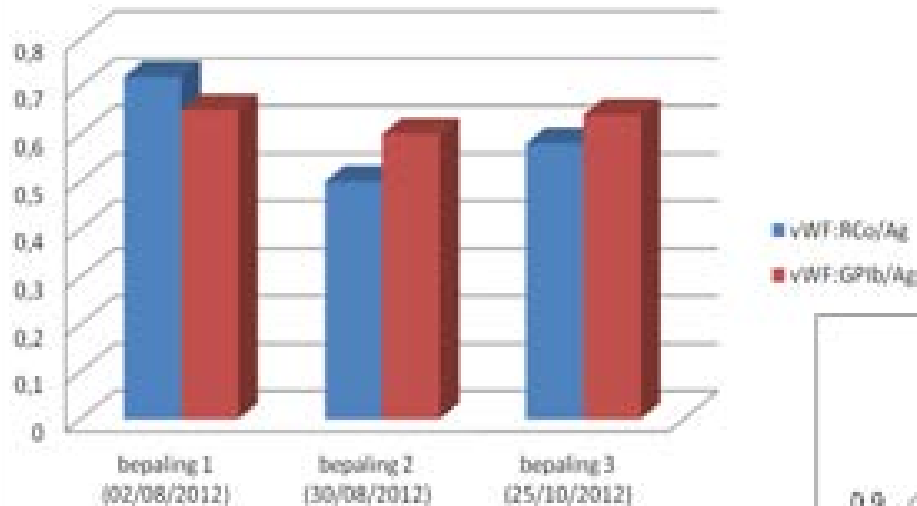
Patiënt 3



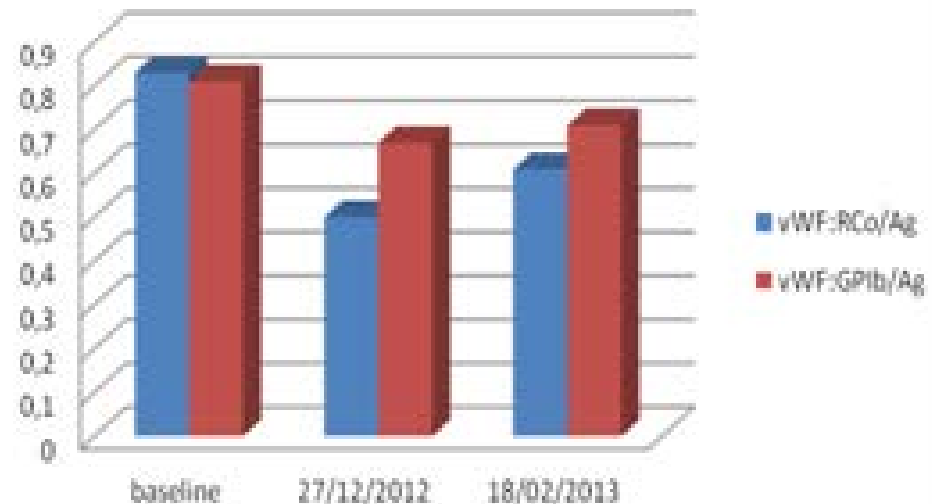
DEEL 2: Studie LVAD

Resultaten in de tijd

Patiënt 4



Patiënt 5





DEEL 2: Studie LVAD

Statistiek

	vWF:RCo/vWF:Ag	vWF:RCo/vWF:Ag
bloeding	5	4
geen bloeding	4	4

P=1

	vWF:AC/vWF:Ag	vWF:AC/vWF:Ag
bloeding	6	3
geen bloeding	2	6

P=0,15

	vWF:RCo/Ag<0,7	vWF:RCo/Ag>0,7
normaal	0	6
LVAD	8	9

P=0,058

	vWF:Lx/Ag<0,7	vWF:Lx/Ag<0,7
normaal	0	6
LVAD	8	9

P=0,058

T-test: P= 0,086

Mean LVAD vWF:Rco: 0,66

Mean normalen vWF:RCo: 0,82

Mean LVAD vWF:GPIb: 0,69

Mean normalen vWF:GPIb: 0,85

Antwoorden

- Is de GPIb bindingsassay evenwaardig aan de ristocetine cofactor activiteitstest?
 - Evenwaardig
 - Kosten, baten?
 - Beschikken over toestel met rotorsysteem
- Welke test is het meest geschikt om verworven von Willebrand ziekte bij patiënten met een LVAD te diagnosticeren?
 - Studiepopulatie te klein voor een juiste conclusie
 - Is het nuttig dit te controleren bij LVAD patiënten???

Wat is de oorzaak van bloeding?



To Do

- Resultaten multimeer electroforese includeren.
- Nakijken of er een verband is tussen het optreden van bloedingen en het opdrijven van pompfrequentie.

THANKS
FOR
LISTENING