

CAT

Critically Appraised Topic

Titel: Is de GPIb bindingsassay evenwaardig aan de ristocetine cofactor activiteitstest?

Author: Melissa Depypere
Supervisor: Dr. Els Bailleul
Date: 12/03/2013

CLINICAL BOTTOM LINE

Uit onze validatie kunnen we besluiten dat de vWF:GPIb assay minstens evenwaardig is aan de vWF:RCO assay. Omwille van een hogere kostprijs op jaarbasis en het aanwezig zijn van een BCSXP Siemens analyzer dat over een rotorsysteem beschikt, wat noodzakelijk is voor een vWF:RCo bepaling, overweegt het OLVZ Aalst momenteel niet om naar de vWF:GPIb kit van Siemens over te schakelen.

De vWF:RCo test zou niet geschikt zijn voor bepaling van verworven von Willebrand ziekte (vWZ), indien de etiologie gebaseerd is op een destructie van von Willebrand factor (vWF), zoals wordt gezien bij patiënten met een left ventricular assist device (LVAD), aortastenose of septumdefect. Om dit te achterhalen hebben we zowel vWF:RCo als vWF:GPIb bepalingen gedaan bij deze patiëntenpopulatie. Een gepaarde t-test toont geen significant verschil. Onze patiëntenpopulatie is echter te beperkt om hier definitieve conclusies uit te trekken.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

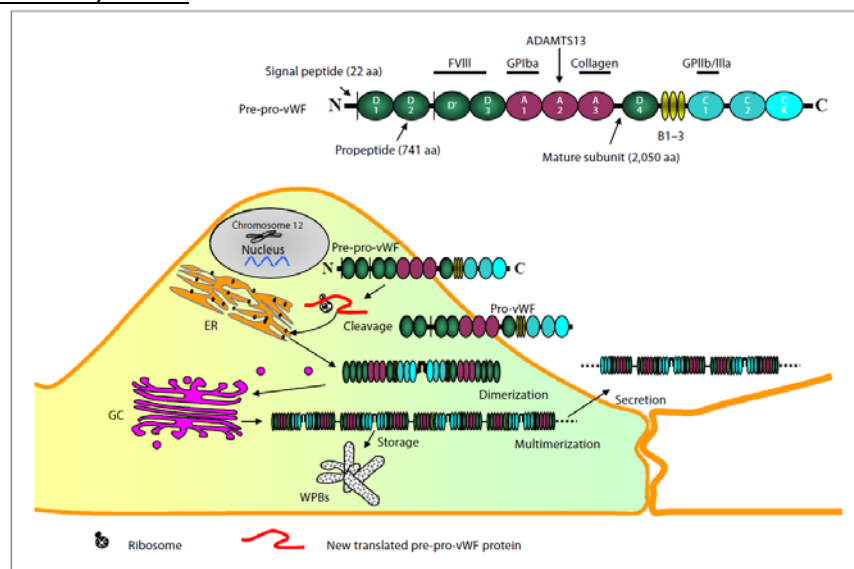
Functie vWF

De vWF heeft twee belangrijke biologische functies:

- 1) Het zorgt voor de hechting van bloedplaatjes aan de vaatwand
- 2) Het bindt FVIII waardoor dit eiwit wordt beschermd tegen afbraak

VWF wordt in de endotheelcellen en megakaryocyten gesynthetiseerd als een betrekkelijk groot precursor eiwit van ongeveer 300.000 Da. Het pre-pro-vWF bestaat uit een signaalpeptide, een propeptide en de mature subeenheid. Nadat het signaalpeptide verwijderd wordt, vormt de vWF een dimeer via disulfide bruggen in het endoplasmatisch reticulum en ondergaat het een verdere polymerisatie in het golgi apparaat. De mature vWF wordt vervolgens opgeslagen in de Weibel-Palade lichaampjes, waaruit het in geval van nood gesecreteerd kan worden.^{2,3,4,7} (figuur 1)

Figuur 1: Overzicht van de vWF synthese²



Wanneer vWF in de bloedbaan terecht komt bestaat het uit een aaneenschakeling van honderden monomeren. De grootte is daarenboven gerelateerd aan de functie van de factor. Bijgevolg is het zeer belangrijk dat er een goed evenwicht onderhouden wordt tussen de kleine en grote vormen van de vWF. Hoe groter de multimeren

Contact: Dr. E Bailleul

hoe eenvoudiger vWF kan binden aan collageen en plaatjes, omdat deze meer conformatieveranderingen kunnen ondergaan onder invloed van shear stress.^{2,4} Het protease ADAMTS13 speelt een cruciale rol in het reguleren van deze grootte en het vermijden van trombosevorming in de circulatie zelf. Het is een plasma metalloprotease dat constitutief aanwezig is in de circulatie en geproduceerd wordt door levercellen en endotheelcellen.^{2,3,4,7}

Onder invloed van shear stress ondergaat vWF in de circulatie een vormverandering van globulair naar langwerpig.⁴ In langwerpige conformatie is het A2 domein beschikbaar voor het ADAMTS13 om te knippen, met als gevolg het ontstaan van kleinere vormen.²

Wanneer er een deficiëntie zou zijn van ADAMTS13 en het vWF in zijn grootste vorm aanwezig blijft kan dit leiden tot een trombotische trombocytopenische purpura. Dit illustreert tegelijk het belang van dit protease.^{4,7} In contrast hiermee is het optreden van vWZ **type 2A** wanneer er een overproductie van ADAMTS13 aanwezig is.⁷ (cfr infra) Kortom dit protease is voornamelijk afhankelijk van de conformatie van vWF en zijn specifieke binding met deze factor. Zoals hierboven reeds aangehaald zijn grotere multimeren in staat om te binden aan plaatjes en collageen om op deze manier bloedplaatjesaggregatie te initiëren.² Wanneer er schade is aan de bloedvatwand heeft de vWF de mogelijkheid te binden aan collageen via zijn A3 domein. Hierdoor ondergaat de vWF een verdere conformatieverandering waardoor het A1 domein in staat is om bloedplaatjes te binden via zijn GPIb receptor.

Van Schooten et al heeft onderzoek gedaan naar hoe de vWF uit de circulatie wordt verwijderd en stelde vast dat dit hoofdzakelijk gebeurt door de lever. De milt en de nieren hebben ook een functie hierin, maar de hoeveelheid die ze verwijderen is veel kleiner. De macrofagen zelf staan in voor de afbraak.⁸

Von Willebrand ziekte

Von willebrand ziekte is een autosomaal overerfbare bloedingsstoornis met een defect in vWF, dat kan gepaard gaan met een FVIII deficiëntie en een verlengde bloedingstijd.³⁵ De ziekte heeft een prevalentie van 1%, waarvan slechts 0.002% tot 0.01% van de patiënten behandeling nodig hebben.³

Deze patiënten lijden frequent aan mucosale hemorragiën, zoals neusbloedingen, menorrhagie en bloedingen aan het tandvlees en de gastro-intestinale tractus. Verlengde bloedingstijd na trauma is eveneens kenmerkend voor de aandoening, typisch tijdens of na een ingreep.

Er zijn een aantal relevante omgevingsfactoren die een belangrijke invloed kunnen hebben op de vWF.

VWF is één van de vele acute fase eiwitten. Wanneer patiënten lijden aan een bacteriële of virale infectie kunnen we een tot drievoudige stijging van vWF vaststellen, dat 1-2 weken kan persisteren gedurende de infectie. Langetermijns verhoging van vWF kan gepaard gaan met hyperthyroïdie en chronische endotheelbeschadiging zoals bij diabetespatiënten. Transiënte verhoging zien we bij toegenomen fysieke activiteit en na epinefrine infuus. Alsook bij verhoogde oestrogeen levels zoals bij patiënten die orale contraceptiva nemen of hormoonvervangende therapie en gedurende zwangerschap, waarbij we plasmalevels kunnen zien van 300-400%. Ook de leeftijd kan een invloed hebben, waarbij het level met 1-2% per jaar kan stijgen.⁶

De 250 vWF gen mutaties verwerven ons het nodige inzicht in de kwalitatieve en kwantitatieve afwijkingen van de vWF. Hoewel de huidige klinische classificatie van vWZ niet gebaseerd is op genetische defecten, maar wel als doel heeft de behandelingsstrategieën te optimaliseren.³ (tabel 1).

Tabel 1: vWZ types en pathofysiologisch mechanisme³

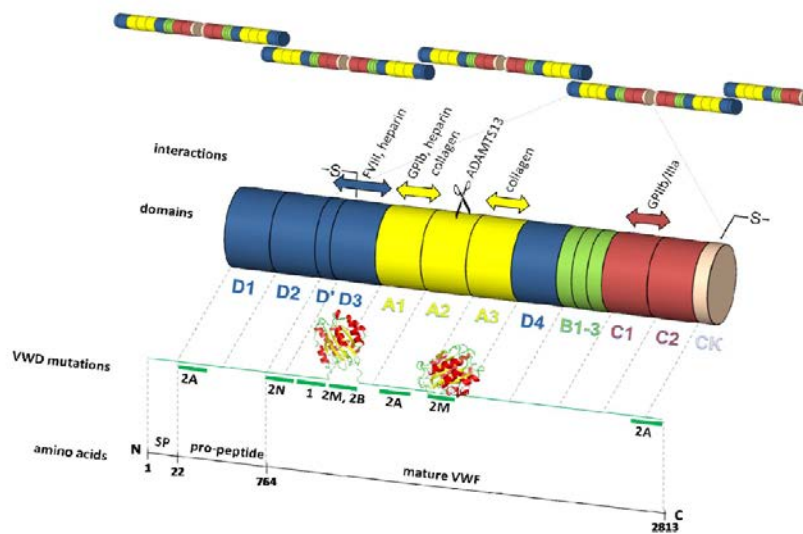
VWD type	Pathophysiologic mechanism
1	Partial quantitative deficiency of VWF and/or FVIII
2	Qualitative defects of VWF
A	↓ platelet-dependent VWF function, lack of HMWM
B	↑ platelet-dependent VWF function, lack of HMWM
M	↓ VWF function, normal multimers
N	↓ VWF binding to FVIII, normal multimers
3	Severe/complete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

Er zijn drie types van vWZ. **Type 1** is het meest voorkomende en tevens meest complexe type. Ongeveer 70-80% van vWZ behoort tot deze groep.³⁵ Het wordt gekarakteriseerd door milde tot ernstige kwantitatieve defecten van vWF, vaak geassocieerd met een daling van FVIII. Uit uitgebreide studies in Europa en Canada is gebleken dat er een aminozuursubstitutie in het D3 domein aan de

grondslag ligt. Dit leidt tot verminderd intracellulair transport van het dimeer pro-vWF en een snellere klaring van het proteïne uit de circulatie.^{1,3} Sommige patiënten kunnen gebaad zijn met desmopressine behandeling, dat de endotheelcellen aanzet tot een verhoogde uitstoot van vWF.³⁶

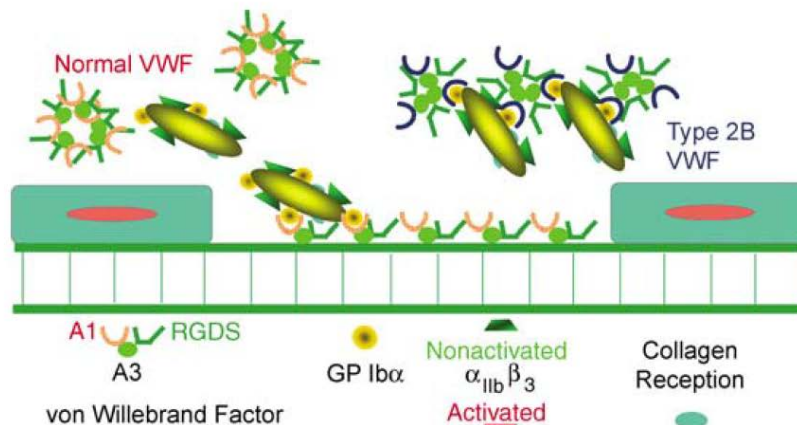
Type 2A is de meest voorkomende kwalitatieve variant en wordt gekarakteriseerd door een verminderde plaatjesadhesie onder invloed van vWF, dit als gevolg van een verminderde productie van grote vWF multimeren. Dit alles wordt veroorzaakt door een mutatie in het propeptide en/of een mutatie in het A2 domein waardoor de vWF veel gevoeliger wordt aan proteolyse door ADAMTS13.^{1,3} (cfr figuur 2)

Figuur 2: Schematische voorstelling van vWF³



Subtype 2B is eveneens een autosomaal dominante aandoening en gaat gepaard met een verhoogde en dikwijls spontane binding van vWF aan de glycoproteïne Ib (GP) receptor. (cfr [figuur 2,3](#)) Als gevolg hiervan ontstaan uiteraard trombocytenagglutinaties en trombocytopenie.³⁶ De afwijkende multimeren zijn zeer gevoelig voor ADAMTS13 en worden snel afgebroken, waardoor trombose wordt voorkomen en in het plasma de grote multimeren ontbreken.³⁶ Het moleculair defect situeert zich in het A1 domein van de vWF en is het resultaat van een gain of function mutatie. Samengevat komt het er op neer dat de normale vWF binding aan GPIb op de plaats van een wonde in het gedrang komt door de interactie in de circulatie zelf. Vandaar het paradox dat de gain of function mutatie leidt tot een loss of function fenotype.⁵

Figuur 3: Overzicht **type 2B**⁵



In tegenstelling tot **type 2B** gaat het bij **type 2M** om een autosomaal dominante 'loss of function' mutatie. Het merendeel van de geassocieerde mutaties bevindt zich in het A1 domein wat leidt tot een ongeschikte binding met de GPIb receptor, maar wat geen invloed heeft op de vorming van de multimeren. Het onderscheid tussen **type 2A** en **2M** kan voorlopig enkel met zekerheid gemaakt worden op basis van multimere gel elektroforese.^{1,3,6} ([figuur 2](#))

Subtype 2N, een autosomaal recessieve stoornis, ook wel pseudohemofilie genoemd, wordt gekarakteriseerd door een verminderde affiniteit van vWF voor FVIII. De mutatie situeert zich in het D' of D3 FVIII bindingsdomein.^{1,3,6} FVIII is licht verlaagd zoals bij een milde hemofilie A.³⁶ ([figuur 2](#))

Tot slot als laatste en meest pathologische type blijft er nog **type 3** over. Het gaat hier om een autosomaal recessief defect in de synthese van vWF wat leidt tot een ondetecteerbaar vWF proteïne en vanzelfsprekend ernstige bloedingssymptomen.^{1,3,6} Deze aandoening komt voor bij 1-5% van de patiënten.

Er bestaat ook een vorm van verworven vWZ, waarbij er eveneens defecten in de vWF zijn, maar onafhankelijk van overerving. Het kan door vier mechanismen veroorzaakt worden nl: adsorptie van vWF aan maligne cellen of aberrante expressie van GPIb op deze cellen, destructie van vWF door aortastenose, septumdefect, mitralisklepprolaps, LVAD of pulmonale hypertensie. LVAD's zijn toestellen die de pompfunctie van het linker

ventrikel kunnen overnemen. Ze worden in het abdomen geplaatst en met canules met het hart en de aorta verbonden. Deze toestellen worden gebruikt om de periode tot een harttransplantatie te overbruggen en kunnen enkel geplaatst worden indien de patiënt over een goed functionerend rechter ventrikel beschikt.³⁷ Een derde mechanisme kan veroorzaakt worden door de vorming van auto-antistoffen. Dit kan geassocieerd worden met lymfoproliferatieve ziekten, monoclonale gammopathie, auto-immuunziekte (lupus, reuma) en myeloproliferatieve aandoeningen

Als laatste bestaat er een verworven ziekte geassocieerd met hypothyroïdie, angiodysplasie, reuzenhemangiomen, teleangiectasieën of geneesmiddelengebruik. De aandoening bij hypothyroïdie kan verklaard worden door een verminderde synthese en secretie.³⁶

In deze CAT trachten we te achterhalen of de GPIb bindingsassay evenwaardig is aan de ristocetine cofactor activiteitstest en of de GPIb assay geschikt is om verworven vWZ bij patiënten met een LVAD te diagnosticeren.

QUESTION(S)

- 1) Vraag 1 Is de GPIb bindingsassay evenwaardig aan de ristocetine cofactor activiteitstest?
- 2) Vraag 2: Welke test is het meest geschikt om verworven vWZ bij patiënten met een LVAD te diagnosticeren?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: “ ”
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org/>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>, Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm>))
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; <http://diabetes.niddk.nih.gov/>), Westgard QC (<http://www.westgard.com>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clia/>)
- 5) UpToDate Online version 12.2 (2004)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)
 1. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME, Sadler JE, Weinstein M, Yawn BP. Von Willebrand disease: evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008;14:171-232
- 2) Systematic Reviews and Meta-analyses
- 3) Reviews
 2. Gyu-Ping L, Bing N, Xia Y, Yu-Zhang W. von Willebrand factor: More than a regulator of hemostasis and thrombosis. *Acta haematol* 2012;128:158-169
 3. De Meyer SF, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. Von Willebrand factor to the rescue. *Blood*. 2009;113: 5049-5057.
 4. Crawley JTB, De Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA. Unraveling the scissile bond: How ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011;118:3212-3221
 5. Ruggeri ZM. Type IIB von Willebrand disease: a paradox explains how von Willebrand factor works. *J Thrombosis and Haemostasis* 2003;2:2-6
 6. James PD, Lillicrap D. Von Willebrand disease: Clinical and laboratory lessons learned from the large von Willebrand disease studies. *Am. J. of Hematol.* 2012; 87:S4-S11
- 4) Original Articles
 7. Blombäck M, Eikenboom J, Lane. D, Denis C, Lillicrap D. Von Willebrand disease biology. *Haemophilia* 2012;18: 141-147

8. Van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, Oortwijn BD, van den Berg M, Denis CV, Lenting PJ. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* 2008; 112:1704-1712
9. Adcock DM, Bethel M, Valcou A. Diagnosing von Willebrand disease: a large reference laboratory's perspective. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2006;32:472-9
10. Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S, Schlammadinger A, Mazurier C, Deckmyn H. A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thromb Haemosst*. 2000 Jan; 83(1):107-113
11. Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Schlammadinger A, et al. Plasma glycolalbin as a source of GPIIb/IIIa in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thromb Haemost*. 2005;93(1):165-171.
12. Frederici AB, Canciani MT, Forza I, et al. A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Iba for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Haematologica*. 2004;89(1):77-85
13. Zhao Y, Gu Y, Ji S, Yang J, Yu Z, Ruan C. Development of an ELISA method for testing vWF ristocetin cofactor activity with improved sensitivity and reliability in the diagnosis of von Willebrand disease. *Eur J Haematol*. 2012;88(5):439-445.
14. Hillarp A, Stadler M, Haderer C, Weinberger J, Kessler CM, Romisch J. Improved performance characteristics of the von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay using a novel automated assay protocol. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2216-2223.
15. Strandberg K, Lethagen S, Andersson K, Carlson M, Hillarp A. Evaluation of a rapid automated assay for analysis of von Willebrand ristocetin cofactor activity. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2006; 12:61-7
16. Favaloro EJ, Mohammed S, McDonald J. Validation of improved performance characteristics for the automated von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay. *J. Thromb Haemost*. 2010;8(12):2842-2844
17. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, et al. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost*. 2009;7(11):1832-1839
18. Lattuada
19. Pinol M, Sales M, Costa M, Tosetto A, Canciani MT, Frederici AB. Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. *Haematologica*. 2007;92(5):712-713.
20. Favaloro EJ. Laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32(5):456-471
21. Borhany M, Shamsi T, Moiz B, Hasan K, Hashmi KZ, Ayyub M, Ali N, Zafar T, Amanat N. Guidelines on the laboratory diagnostics of congenital bleeding disorders in Pakistan. *J Pak Med Assoc*. 2012;62: 477-486
22. Kitchen S, Jennings I, Woods TA, Kitchen DP, Walker ID, Preston FE. Laboratory test for measurement of von Willebrand factor show poor agreement among different centers: results from the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2006; 32:492-8
23. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the subcommittee on von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2006;4: 2103-14.
24. Keeney S, Collins P, Cumming A, Goodeve A, Pasi J. Diagnosis and management of von Willebrand disease in the United Kingdom. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:488-494
25. Trossaert M, Ternisien C, Lefrancois A, Llopis L, Goudemand J, Sigaud M, Fouassier M, Caron C. Evaluation of an automated von Willebrand factor activity assay in von Willebrand disease. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2011;17: E25-9
26. Lasne D, Dey C, Dauzenberg MD, Cherqaoui Z, Monge F, Aouba A, Trochet MF, GEloen D, Landais P, Rothschild C. Screening for von Willebrand disease: contribution of an automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2012;18:e158-63
27. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 2012;1-5
28. Crow S, Chen D, Milano C, Thomas W, Joyce L, Piacentino V III, Sharma R, Wu J, Arepally G, Bowles D, Rogers J, Villamizar -Ortiz N. Acquired von Willebrand syndrome in continuous-flow ventricular assist device recipients. *Ann Thorac Surg* 2010;90: 1236-9.
29. Uriel N, Pak SW, Jorde PU, Jude B, Susen S, Vincentelli A, Ennezat PV, Cappelman S, Naka Y, Mancini D. Acquired von Willebrand Syndrome after Continuous flow mechanical device support contributes to a high prevalence of bleeding during long term support and at the time of transplantation. *JACC* 2010, 56:1207-13

30. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Trummer G, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Zieger B. Acquired von Willebrand Syndrome is an early-onset problem in ventricular assist device patients. *Eur J of Cardio-Thoracic Surgery* 2011; 40: 1328-1333
 31. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, Borhmann K, Oortwijn B, Lenting P, Eisert R, Ganzer A, Budde U. Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study. *J Thromb Haemost* 2008;6: 569-76
 32. Neugebauer BM, Goy C, Budek I, Seitz R. Comparison of two von Willebrand factor collagen-binding assays with different binding affinities for low, medium, and high multimers of von Willebrand factor. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:139-48
 33. Chen D, Tange JI, Meyers BJ, Pruthi RK, Nichols WL, Heit JA. Validation of an automated latex particle-enhanced immunoturbidimetric von Willebrand factor activity assay. *Journal of thrombosis and haemostasis: J Thromb Haemost.* 2011;9:1993-2002
 34. Bowyer EA, Sheperd F, Kitchen S, Makris M. A rapid automated vWF ristocetin cofactor activity assay improves reliability in the diagnosis of Von Willebrand disease. *Thrombosis research* 2011;127:341-344
- 5) Reference Works, Handbooks and Databases
35. Lethagen S. Hemostasis and bleeding disorders. A pocket companion
 36. De Wolf JTM, Eindhoven GB. Transfusiegeneskunde, een praktische handleiding
 37. Prof dr. J van der Meer, Prof. dr. C.D.A. Stehouwer. Interne geneeskunde. Bohn Stafleu van loghum
 38. ECAT The clotting times, special Issue. Von Willebrand disease clinical and laboratory aspects.
 39. Handboek hematologie. Dr. B. Löwenberg, Dr. G.J. Ossenkoppele, Dr. T. de Witte, Dr. M.A. Boogaerts. De tijdstroom
 40. Bijsluiter INNOVANCE Siemens kit
 41. Bijsluiter BC von Willebrand reagens Siemens
 42. Innovance vWF Ac assay, Siemens. Setting a new standard in automated determination of vWF activity.
- 6) Posters, "grey literature", presentations
43. Siemens presentatie: vergelijking vWF:RCo test met vWF:Lx test

Deel 1: Hoe testen voor vWZ?

Een goede initiële hemostase evaluatie houdt de bepaling in van compleet, bloedplaatjes, aPTT, PT en fibrinogeen. Deze testen zijn geen bewijs voor een mogelijke vWZ, maar kunnen wel suggestief zijn voor een factordeficiëntie of trombocytopenie. VWF:Ag (kwantitatieve test), vWF:RCo (kwalitatieve test) en FVIII zijn de initiële testen specifiek voor het opsporen van een probleem met de vWF. (cfr [attachment 1](#)) Het lijkt eenvoudig, maar in realiteit zijn er veel verschillende assays beschikbaar met elk hun eigen voor- en nadelen. De keuze van de meest ideale test is bijgevolg niet zo voor de hand liggend. Wanneer 1 of meer van deze testen afwijkend zijn kunnen er meer gespecialiseerde testen uitgevoerd worden waaronder een multimeer distributie, een collageen binding assay, een low dose RIPA test en berekening van de vWF:RCo/Ag ratio. Sommige laboratoria voeren ook een plaatjesfunctie analyse uit. De NHLBI (National Heart, Lung and blood institute) is geen voorstander van deze test omwille van tegenstrijdigheden wat betreft de sensitiviteit en specificiteit voor vWZ. Deze test wordt om deze reden ook niet verder besproken in de tekst. [Attachment 2](#) geeft een overzicht van de resultaten van de verschillende testen voor alle types van vWZ.¹

1.1. Kwantitatieve testen

1.1.1. vWF: Ag

De vWF:Ag assay is een immunoassay die de concentratie van vWF in plasma bepaalt en aldus een kwantitatief defect kan vaststellen. Frequent gebruikte methodes zijn de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)(referentiemethode) of de geautomatiseerde immuunturbidimetrische methode. Het voordeel van de geautomatiseerde methode is de korte turnaround time in tegenstelling tot ELISA die uitgevoerd moet worden in batch en vrij arbeidsintensief is. Sommige immuunturbidimetrische methodes kunnen echter wel een overschatting van de vWF levels geven, wanneer in het staal reumafactor aanwezig is.⁹ Belangrijk is dat de bloedgroep een invloed kan hebben op de vWF:Ag test. Patiënten met bloedgroep O hebben concentraties van ongeveer 25 procent lager in vergelijking met personen die een andere bloedgroep hebben.^{1,9,38}

1.2. Kwalitatieve testen

1.2.1. vWF:RCo assay

De vWF:RCo assay is een functionele assay die eventuele defecten in de interactie met normale plaatjes kan opsporen en zo de mogelijkheid heeft om een onderscheid te maken tussen kwalitatieve en kwantitatieve defecten. Ristocetine is een antibioticum dat niet meer wordt gebruikt omwille van het creëren van trombocytopenie door het induceren van conformatieverandering van vWF waardoor trombocytenuitstapting ontstaat. Deze bijwerking heeft men nuttig besteed voor het ontwikkelen van een laboratoriumtest om vWZ op te sporen. Vermits er in vitro geen shear stress aanwezig is voor de structurele veranderingen in de vWF en de uiteindelijke binding met bloedplaatjes, zijn we aangewezen op een surrogaat om dit te bekomen. De verschillende testmethodes om aggregatie op te sporen onder invloed van ristocetine worden hieronder besproken.^{1,9,38}

a) vWF:RCo op basis van aggregatie

De functie van vWF kan gemeten worden met de vWF:RCof activiteitstest, een test die gebruik maakt van gefixeerde bloedplaatjes van gezonde personen. Deze plaatjes reageren niet meer op secundaire agonisten (ADP, thromboxaan A2) waardoor eventuele andere plaatjesafwijkingen uitgesloten worden. Er ontstaat troebel door aggregatie. De hoeveelheid vWF:RCof in het plasma kan worden bepaald door op een vaste tijd de toename in lichtdoorlaatbaarheid te meten en deze waarde af te lezen op een ijklijn gemaakt met verdunningen van normaal plasma. Platelet-poor plasma wordt als referentie beschouwd en heeft een vooropgestelde lichttransmissie van 100%. De maximale amplitude is een maat voor aggregatie.³⁹ Deze methode wordt beschouwd als de gouden standaard, doch deze test kan frequent leiden tot foutieve diagnose. Mogelijke oorzaken zijn de biologische variatie van het donor plaatjesreagens, suboptimale kwaliteitscontrole en standaardisatie van ristocetine en tot slot een incorrecte curve. Bovendien wordt de test onbetrouwbaar bij zeer lage vWF concentraties (wanneer vWF:Ag < 20-30IU/dL is de CV > 30%) en is de kalibratie nog eens vrij arbeidsintensief^{13,14,15,16,38} Vandaar dat er uitvoerig werd gezocht naar een andere methode om deze limiterende test te vervangen. Volgende testen werden voorgesteld:

- 1) vWF collageen bindings assay op basis van ELISA (vWF:CB)
- 2) Een geautomatiseerde ristocetine cofactor activiteitsassay gebruik makend van gelyofiliseerd normaal donorplasma en optische coagulatie analyse.
- 3) Een vWF activiteitstest op basis van latex partikels gesensitiseerd met monoclonale antistoffen
- 4) vWF:RCo assay op basis van ELISA
- 5) vWF:RCo assay op basis van flowcytometrie

Hieronder worden enkel de assays op basis van ristocetine besproken, de twee andere testen komen verder nog aan bod.

b) vWF:RCo op basis van ELISA

De laatste jaren is er heel wat research gebeurd naar de ontwikkeling van een goede ELISA test. Vanhoorelbeke publiceerde in 2000 een studie waarbij ze een ELISA test op punt stelt met het oog op een betere reproduceerbare test dan de reeds bestaande gouden standaard. De ELISA plaat wordt gecoat met anti-GPIb antilichamen, waaraan recombinant GPIb alpha zal binden. Vervolgens wordt het patiëntenstaal in de aanwezigheid van een bepaalde concentratie ristocetine toegevoegd. Voor deze ELISA maakte ze gebruik van mAB 2D4 en een ristocetine concentratie van 760 µg/ml. Deze test heeft een aantal voordelen op de aggregatie test namelijk opvallend lagere CV's van < 14%, afwezigheid van donor plaatjes, een colorimetrische meting, wat eenvoudiger is voor de interpretatie, een sensitiviteit die hoger is met een lower limit of detection (LOD) van 0.05 IU/dL en tot slot een beperkte hoeveelheid patiëntenplasma.¹⁰ De sensitiviteit zou echter nog verbeterd kunnen worden, wanneer er een lage vWF:Ag concentratie aanwezig is, met als doel een meer betrouwbare ratio te bekomen bij lage waarden.¹³

In 2005 deed ze onderzoek naar het vervangen van het rGPIb fragment door glyocalicin, een proteolytisch fragment van GPIb, dat in normaal plasma een concentratie heeft van 1-3 µg/ml. De plasmalevels zijn een weerspiegeling van de turnover van bloedplaatjes. 42 monoclonale antilichamen werden uitgetest en geëvalueerd op het al dan niet binden van deze glyocalicin. Enkel de 24B3 antilichamen waren in staat dit te binden op zo'n manier dat ristocetine de binding van vWF nog kon induceren. De test heeft een CV <11% en heeft dezelfde voordelen op de gouden standaard dan de test uit 2000. Hoewel rGPIb theoretisch een meer reproduceerbare en constante bron van GPIb is dan plasma glyocalicin, heeft deze test toch een betere reproduceerbaarheid.¹¹

Frederici ontwikkelde een ELISA ook op basis van een rGPIbalphaverschillend aan dat van Vanhoorelbeke), maar met LJ-P3 als monoclonaal antilichaam. Opnieuw is de CV en LOD lager dan de bestaande gouden standaard.¹²

Zhao et al heeft in 2012 een studie gepubliceerd waarin ze een nieuwe ELISA uittesten, die gecoat is met SZ-151 ipv de reeds besproken ELISA van Vanhoorelbeke, gecoat met 2D4 monoclonale antilichamen. De resultaten zijn veelbelovend en tonen een nog lagere interassay (8%), intra-assay variatie (12%) en een LOD van 0.008 IU/dl). Wederom hebben we hier het probleem van een arbeids-en tijdsroevende procedure. Bovendien is nog geen enkele kit commercieel beschikbaar.¹³

Tabel 2 geeft een overzicht.

Tabel 2: Overzicht studies vWF:ELISA op basis van RCo

Platform	Jaar studie	Coat: mAB	Hoeveelheid ristocetine	LOD (IU/dL)	CV(%)	
ELISA	2000	2D4	760 µg/ml	0.05	4-13%	Niet commercieel beschikbaar
ELISA	2005	24B3	1 mg/ml	0.05	5-10%	Niet commercieel beschikbaar
ELISA	2004	LJ-P3	0.8 mg/ml	0.1	9-10%	Niet commercieel beschikbaar
ELISA	2012	SZ-151	760 µg/ml	0.008	8-12	Niet commercieel beschikbaar

c) vWF: RCo op basis van gelyofiliseerde plaatjes

Deze geautomatiseerde agglutinatietest maakt gebruik van gelyofiliseerde plaatjes en heeft men de lichaamseigen plaatjes niet nodig. Ristocetine zorgt er vervolgens voor dat de vWF zal agglutineren met deze plaatjes wat leidt tot een daling in turbiditeit. Deze verandering in optische densiteit wordt gedetecteerd door het toestel. Omwille van de aanwezigheid van de plaatjes moet het reagens in beweging gehouden worden en moet men beschikken over een toestel waarop een rotorsysteem voorzien is.⁴³

De kleine hoeveelheid (minder plasma, meer plaatjes), het eenvoudig gebruik, de kortere turnaround time en de prijs zijn allen voordelen ten opzichte van de gouden standaard.^{14,15} De gebruikte ristocetine concentratie van de verschillende assays kan wel variëren per firma en per lot. De ristocetine mag een bepaalde concentratie niet overschrijden vermits dit precipitatie van plasmaproteïnen kan geven. Een ideale range bevindt zich tussen de 1-2 mg/mL, hogere concentraties zijn niet meer geschikt.^{14,16}

De beperking is echter dat deze assays niet ontwikkeld zijn voor detectie van lage hoeveelheden vWF, wat vooral belangrijk is in de diagnostiek van type 3. De BC vW reagens kit van Siemens die het labo van het OLVZ in Aalst gebruikt, heeft een lower limit of detection van 10-20 IU/dL. Een ander nadeel is de beperkte stabiliteit van de gelyofiliseerde plaatjes.^{14,42}

d) vWF: Rco op basis van flowcytometrie

De detectie van ristocetine geïnduceerde plaatjesagglutinatatie is ook mogelijk met flowcytometrie.

Chen et al beschreef in 2007 een methode waarin hij een mengsel van groen en rood fluorochroom gelabelde plaatjes incubeerde met patiënten plasma in de aanwezigheid van ristocetine. Door de expertise en het ter beschikking zijn van een flowcytometer, dat in een hemostase labo vaak niet aanwezig is, wordt er op deze test niet verder ingegaan.³⁸

e) Nadelen ristocetine test

Zoals hierboven werd aangehaald heeft de test een hoge intra/interlaboratoire variatie. CV's van 20% of meer zijn geen uitzondering. Vandaar dat men in de loop der jaren getracht heeft om een meer reproduceerbare test te ontwikkelen, waar men ook in geslaagd is. Attachment 3 is een overzicht van de CV's van de verschillende testen van de kwaliteitscontrole ECAT voor type 1 vWZ van 2012. Daarin valt op dat de turbidimetrische testen, die gebruik maken van latexpartikels (cfr infra) de beste CV's bekomen. Wat eveneens opvalt is dat de aggregatietesten nog slechts door 25 labo's gebruikt worden en een gemiddelde CV hebben van 17.7%.

Een andere belangrijke limitatie werd opgemerkt door Flood et al, die een case report beschrijft van een patiëntje van Afrikaanse origine met een gedaalde vWF:RCo, maar afwezigheid van bloedingssymptomen. Het gaat hier om een variatie in de P1467S sequentie waardoor de vWF beperkt is in zijn mogelijkheid om ristocetine te binden. Er werd reeds vroeger notie gemaakt van raciale verschillen in de vWF assay onder meer door Buchannan et al., die beschrijft dat het negroïde ras een gedaald ristocetine geïnduceerde plaatsjesaggregatie heeft in vergelijking met het Kaukasische ras.¹⁷

Een ander niet onmiskenbaar nadeel is dat de vWF:RCo assay ongevoelig zou zijn voor verworven vWF abnormaliteiten bij patiënten met een LVAD, septumdefect of andere oorzaak die leidt tot destructie van de HMWM (high molecular weight multimers). Deze diagnostiek is van groot belang bij patiënten met een LVAD en patiënten met een verworven vWF syndroom secundair aan ernstige aortaklepstenose of een andere cardiovasculaire aandoening, waarbij er subtiel verlies kan zijn van de HMWM door shear stress in de pomp en de leiding die de pomp met het hart verbindt.^{30,33} De lage sensitiviteit bij lage waarden van vWF is eveneens een minpunt van deze test, hoewel dit met de ontwikkeling van nieuwe generatie assays verbeterd is.

Ondanks zijn gebreken is het echter tot op heden nog steeds de frequentst gebruikte laboratoriumtest om beperkingen in de functie van vWF op te sporen.^{1,13,36}

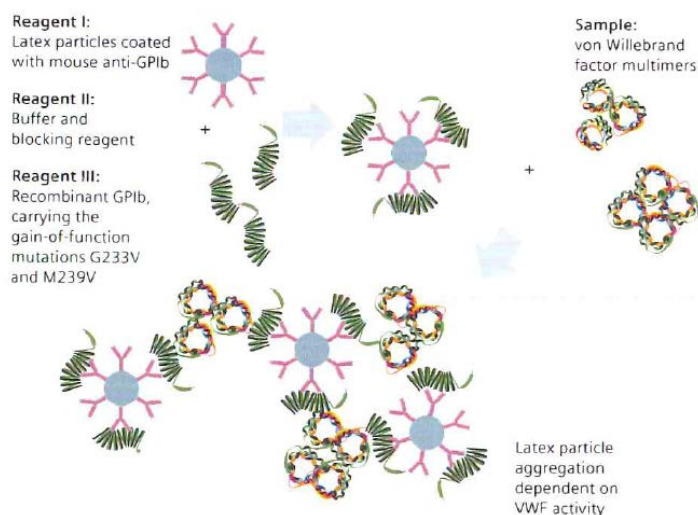
1.2.2. GPIb bindingsassay op basis van latexpartikels

Recent werd er een nieuwe assay voorgesteld als een goed alternatief voor de vWF:RCo test. Het is ook een test die geen gebruik maakt van de lichaamseigen bloedplaatjes, maar van een recombinant GPIb, waarin een gain of function mutatie aanwezig is, waardoor de vWF geen conformatieverandering moet ondergaan om te kunnen binden aan deze GPIb. Latexpartikels gecoat met GPIb antistoffen binden dit recombinant GPIb, waarna tot slot het patiëntenplasma wordt toegevoegd, dat het vWF bevat en in globulaire vorm kan binden aan dit complex. Figuur 4 illustreert deze interactie.

Deze test heeft een uitstekende CV (<10%), een verbeterde lower limit of detection (voor Innovance 2.2 IU/dL, 12.5 IU/dL voor IL) en een brede lineaire range.¹⁹ Bovendien heeft het een langere stabiliteit en is het niet zo onderhevig aan lotvariatie. Al deze factoren dragen bij tot een verbeterde identificatie van type 1 vs type 2M. De verschillende

studies omtrent deze assay komen in deel 2 aan bod.^{38,42,43}

figuur 4: Principe van de GPIb bindingsassay



1.2.3. vWF binding aan collageen op basis van ELISA

Deze assay wordt door zeer weinig laboratoria gebruikt, omwille van het niet commercieel beschikbaar zijn en het enkel als ELISA kan gebruikt worden, wat zoals eerder aangehaald, enkel in batch kan uitgevoerd worden in het kader van de hoge kosten en het arbeidsintensief werk. Deze test meet de binding van vWF aan collageen, via zijn A3 domein. Zoals de ristocetine assay is ook deze test voor zijn binding afhankelijk van de grootte van de multimeren. Het heeft echter enkele voordelen op de vWF:RCo assay, zoals een lagere interassay en interlaboratorium variatie, een uitstekende lower limit of detection van 0.1 U/dL en een goede lineariteit. Adcock et al beschrijft bovendien een significant specifiek resultaat met een vWF:CB/Ag ratio voor de identificatie van stalen met een type 2 multimeer patroon in vergelijking met de vWF:RCo/Ag ratio. (cfr infra)

Doch deze assay heeft niet enkel voordelen. Variatie in de collageen componenten en occasioneel voorkomen van vals negatieve resultaten voor **type 2M** vWZ kunnen voorkomen.^{1,9,10,38}

Tabel 3 geeft een vergelijking van de verschillende activiteitstesten.

Tabel 3: Overzicht alternatieve testen

Methode	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

1.3. RIPA testen (low dose)

De RIPA test of de ristocetine geïnduceerde plaatjesaggregatie is een test die de mogelijkheid onderzoekt van vWF om te binden aan de lichaamseigen plaatjes in de aanwezigheid van ristocetine. De ristocetine gevoeligheid bij een RIPA test is afhankelijk van het level en de functie van vWF. Patiënten zonder vWZ vertonen plaatjesaggregatie vanaf een concentratie van 1,0 mg/ml ristocetine en hoger, maar niet bij een concentratie lager dan 0,6 mg/ml. Het level van plaatjesaggregatie bij patiënten met **type 1** vWZ hangt dan weer af van het plasmalevel van vWF. Patiënten met een ernstige **type 1** vWZ zullen geen aggregatie tonen bij een concentratie < 1,0 mg/ml. Patiënten met een **type 2A** vertonen een gelijkaardig patroon. Plaatjesaggregatie bij een concentratie < 0,6 mg/ml treedt enkel op bij **type 2B** en mutaties in de vWF receptor op de bloedplaatjes. Het testprincipe verloopt gelijkaardig aan dat van de gouden standaard, met dat verschil dat men gebruik maakt van de lichaamseigenplaatjes om de eventuele defecten van de bloedplaatjesreceptoren, zoals Bernard Soulier, te kunnen opsporen.^{1,16}

1.4. FVIII testen

Wanneer de aPTT verlengd is kan dit worden veroorzaakt door een FVIII deficientie. Om deze op te sporen wordt het te onderzoeken plasma gemengd met plasma dat deficiënt is aan FVIII. De overige stollingsfactoren zijn voldoende aanwezig, waardoor een verlenging van aPTT enkel verklaard kan worden door een deficiëntie van FVIII (of eventueel inhibitor), op voorwaarde dat de patiënt geen heparine heeft gekregen, de PT normaal is en men lupus anticoagulans kan uitsluiten.³⁹

1.5. vWF:RCo/Ag

Omwille van de heterogeniteit van vWZ is het moeilijk om aan de hand van deze drie testen een definitieve conclusie te trekken over het type vWF. Een hulpmiddel hierbij is de bepaling van de ratio vWF:RCo/Ag. Wanneer de ratio < 0.7 kan dit passen bij een **type 2** vWZ. Bij **type 2A**, **2M** is de ratio gewoonlijk verlaagd, bij **type 2B** kan dit verlaagd zijn, maar mogelijks ook normaal.^{1,13,19,21} Fredericic et al hanteert zelfs een ratio < 0.3 voor **type 2A**.²² Een ratio van >0.7 is typisch voor **type 1** vWZ en **type 2N**.¹⁹ Door de lage sensitiviteit van de vWF:RCo test bij lage waarden van vWF (<15-20IU/dL) kan deze ratio een onbetrouwbaar criterium zijn in de diagnose van **type 2**.^{1,23}

1.6. DDAVP infusie respons

Desmopressine is een synthetisch derivaat van het antidiuretisch hormoon vasopressine. Het stimuleert de vrijzetting van vWF uit de endotheelcellen, door middel van cyclisch AMP. Ook FVIII ondervindt invloed van desmopressine met een snelle verhoging na toediening. Het mechanisme hiervan is echter nog niet duidelijk.

DDAVP is nuttig gebleken in de behandeling van **type 1**. Het kan gegeven worden voor **type 2A** en **2M**, doch de respons is onvoorspelbaar. Wanneer er geen effect is wordt er overgeschakeld op een therapie met vWF en FVIII. Het resultaat van DDAVP op **type 2N** is vaak teleurstellend omwille van de onstabiele FVIII. Voor **type 2B** is DDAVP zelfs een contra-indicatie, omwille van het verergeren van trombocytopenie.⁹ In de behandeling van **type 3** is DDAVP logischerwijze niet nuttig. Tot op heden is er nog steeds geen consensus over de therapie bij dit type.²⁵ Patiënten met verworven von Willebrand factor ondervinden vaak slechts een kortdurend effect.¹ (raadt men wel aan bij mensen met verworven vWZ die operatie moeten ondergaan) Het effect van DDAVP is erg variabel, maar bij eenzelfde persoon wel constant.³⁶

1.7. Multimeer analyse

Multimeer analyse is een arbeidsintensief en dure procedure dat enkel in een aantal gespecialiseerde labo's wordt uitgevoerd. Er zijn geen commerciële kits beschikbaar, bijgevolg zijn de laboratoria zelf aangewezen in het bereiden van reagens en elektroforese gel. Multimeer analyse is gebaseerd op scheiding van de vWF in zijn multimeren (door middel van een natrium dodecyl sulfaat agarose gel) Het kleinste multimeer is een dimeer met een molecuulgewicht van ongeveer 540 kDa. Het grootste multimeer daarentegen heeft een molecuulgewicht van 10000 kDa.³⁸ Visualisatie van deze multimeren wordt bereikt door labeling van de vWF in de gel met gelabelde antistoffen tegen vWF of door middel van Western blot. Slecht samengesteld reagens of een slechte assay techniek kan een grote invloed hebben op het migratie patroon en leiden tot verkeerde interpretatie.^{9,38}

Deel 2: VWF: RCo assay versus vWF GPIIb/IIIa bindingsassay

2.1. Literatuur:

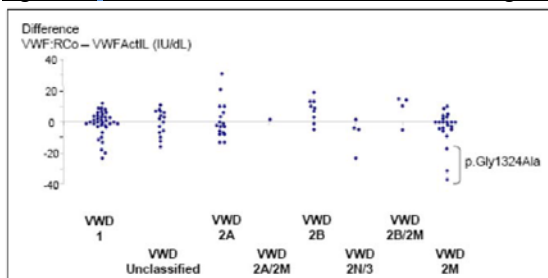
2.1.1. Vergelijking vWF: RCo assay versus vWF GPIIb/IIIa bindingsassay

We deden een literatuurstudie om een idee te krijgen over de prestatie van deze nieuwe GPIIb/IIIa bindingsassay en daarbij een vergelijking te maken met de reeds veel in gebruik zijnde vWF:RCo activiteitstest op basis van gelyofiliseerde plaatjes. Beide testen maken geen gebruik van de lichaamseigen bloedplaatjes. De latextest gebruikt recombinant GPIIb/IIIa, de ristocetine test daarentegen gebruikt gelyofiliseerde plaatjes. Er zijn momenteel slechts twee GPIIb/IIIa bindingsassays op de markt, de Siemens Innovance vWF Ac en de IL latex vWF activiteitstest. In deze CAT vergeleken we de Siemens Innovance test met het BC reagens von Willebrand factor.

Trossaert et al heeft een studie gedaan waarin hij de vWF:RCo activiteitstest van Siemens, die ook gebruikt wordt in het OLZV in Aalst, vergeleek met de IL vWF activiteitstest. Hij heeft aangetoond dat er een goede correlatie is tussen beide testen. Ze kunnen echter niet gebruikt worden als een screenings assay vermits ze beide ongeveer 25% van de vWF afwijkingen niet detecteren en men maw een sensitiviteit heeft van 75%, dit bij een cutoff van 50 IU/dL.

Trossaert merkt in zijn artikel wel op dat er een belangrijke discordantie is bij diagnose van vWZ **type 2M**.²⁵ (Figuur 5)

Figuur 5: Verschil vWF:RCo en vWF GPIIb/IIIa bindingsassay²⁵



Bij onderzoek naar 3 familieleden met deze aandoening, blijkt dat er 1 patiënt met de nieuwe test normale waarden heeft. Bij diagnose werden deze patiënten wel gediagnosticeerd door middel van de vWF:RCo assay. Het zou hier eventueel kunnen gaan om een fenotype waarbij er een gedaalde vWF:RCo is, zonder dat er een vWF dysfunctie aanwezig is, zoals reeds beschreven door Flood et al (cfr supra). Verdere research is nodig om dit te kunnen bevestigen.

Lasne et al heeft ook onderzoek gedaan naar de nieuwe methode van IL en testte 160 patiënten met mogelijks vWZ op basis van klinisch onderzoek, symptomen en familiaal vermoeden of follow-up patiënten met gediagnosticeerde vWZ. Geen enkele vWZ zou gemist zijn met deze assay. Er is echter 1 patiënt die volgens de nieuwe assay vWZ zou hebben, maar volgens de vWF:RCo assay van Siemens geen vWZ heeft. Er zijn op moment

van publicatie nog geen bijkomende testen gebeurd op dit staal. De bland Altman plot toont een goede correlatie met 10 patiënten die buiten het betrouwbaarheidsinterval liggen. Alle 10 behoren ze tot de groep van de normalen. Bij een cutoff van 43,8 % heeft de nieuwe test een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 97,3%. De ratio's vWF:RCo/Ag en vWF:GPIIb/Ag zijn vergelijkbaar, zodat deze met de nieuwe test ook een hulpmiddel kunnen zijn in de discriminatie van de verschillende types. Hoewel deze resultaten, omwille van een te beperkte studiegroep, bevestigd moeten worden in grotere studies.²⁶

Lawrie et al heeft recent een studie gepubliceerd waarin hij onderzoek doet naar de INNOVANCE vWF Activiteitstest van Siemens, dezelfde kit die ook wij gebruikt hebben voor onze validatie. Vooreerst bevestigt hij wat Lasne et al heeft aangetoond wat betreft de ratio. Deze is bruikbaar en toont correlatie met de vWF: RCo/Ag ratio, hoewel er 1 patiënt was die met Innovance test een ratio > 0.7 had en met de BC test een ratio < 0.7. De reden hiervoor blijft onduidelijk. De lower limit of detection is 3 IU/dL voor de nieuwe test en 5 IU/dL voor de oude test. Lawrie et al heeft ook gekeken naar de invloed van de HIL index op de resultaten en merkte geen significant verschil in resultaat op.²⁷

2.2.2. LVAD patiënten

Een belangrijk nadeel aan de vWF:RCo activiteitstest is dat deze assay geen verworven von Willebrand ziekte zou kunnen detecteren bij patiënten met een LVAD (cfr supra). Crow et al heeft in 2010 een studie gedaan, waarbij 37 LVAD patiënten met een heartmate II (HM II) type werden nagekeken op verworven von Willebrand ziekte. Hij verzamelde stalen voor het plaatsen van het assist device en erna. Alle 37 patiënten toonden een significant verlies van de hoge multimeren aangetoond door middel van gel elektroforese. Doch, slechts 10 van de 37 patiënten hadden daadwerkelijk bloedingssymptomen met een gemiddelde duur tot bloeding van 22 dagen na het plaatsen van het device. Bloedingssymptomen definieert hij als alle bloedingen waar interventie voor noodzakelijk is. Dit kan gaan van een cauterisatie voor epistaxis en endoscopie voor melena tot het geven van transfusies. Wat ook opviel is dat degene die bloedingssymptomen vertoonden opmerkelijk hogere waarden hadden van vWF antigen en ristocetine voor het plaatsen van de LVAD. De hogere vWF:Ag resultaten zouden echter wel verklaard kunnen worden doordat deze patiënten een grotere inflammatoire respons hadden dan degene met lagere waarden. Kortom, er is geen duidelijke verband tussen het plaatsen van de LVAD en bloedingssymptomen, vermits 27 patiënten geen bloedingen hadden ondanks verlies van de hogere multimeren. Angiodysplasie kan hiervoor geen verklaring zijn, aangezien men dit eerder verwacht op oudere leeftijd en men toch geen verschil ziet in leeftijdscategorie. Ook een slecht gecontroleerde INR kan het optreden van bloeding niet verklaren. Zoals reeds werd aangehaald hebben patiënten met bloedgroep O een lager percentage vWF. Crow durft echter niets concluderen wegens een te beperkte studiegroep.²⁸

Uriel et al bekamt gelijkaardig resultaten. Hij deed ook onderzoek naar de prevalentie van bloedingen bij 79 patiënten met LVAD type HM II. Bij 31 patiënten werd er multimeer analyse uitgevoerd, dat een verlies van de grotere multimeren vertoont bij alle 31 stalen. Maar slechts 18 van de 31 patiënten vertoonden daadwerkelijk bloedingen. Hij stelde ook vast dat er meer ernstige bloedingen (waar transfusie voor nodig is) voorkwamen bij patiënten ouder dan 66 jaar, die een twee keer zo hoog risico hebben op het krijgen van bloedingen. Dit wordt dan weer niet bevestigd door Crow et al. De gemiddelde tijd tot het optreden van bloedingssymptomen is 56 dagen in zijn studie, wat meer dan dubbel zo lang is dan bij Crow et al.^{28,29} Heilmann heeft echter aangetoond dat alle LVAD patiënten in zijn studie (6 met een BVAD (biventriculair assist device), 11 met een HMII) op dag 3 na plaatsing van het device, verlies hadden van de hoge multimeren. 6/6 patiënten met BVAD deden bloedingen en slechts 3/11 patiënten met een HM II. Dit verschil kan echter verklaard worden doordat de patiënten met een BVAD een ernstigere vorm van hartfalen hadden, een verminderde leverfunctie en meer uitgebreide operatie hadden ondergaan met een hoger verbruik van stollingsfactoren. Hij maakt in zijn studie nog enkele interessante bemerkingen wat betreft de vWF:RCo/Ag ratio en vWF:CB/Ag ratio. Hij vond pathologische vWF:RCo/Ag ($\leq 0,65$) ratio's in 18 van 55 cumulatieve testen bij stalen die een bewezen verlies hadden van de hoge multimeren, de ratio van vWF:CB/Ag was echter bij alle stalen pathologisch ($\leq 0,7$). Een verklaring zou kunnen zijn dat hij voor collageen bindingsELISA collageen type 1 gebruikte wat een hogere affiniteit zou hebben voor de hogere multimeren en minder voor de medium en lage multimeren in vergelijking met collageen type 3 en daarom geschikter is voor de detectie van verworven vWZ.³² Hij benadrukt wel dat deze resultaten met de nodige voorzichtigheid moeten geïnterpreteerd worden mits vWF een acuut fase eiwit is en verhoogd is bij LVAD patiënten.³⁰

De International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) definieert verworven von willebrand factor aan de hand van de volgende criteria: a) voorgeschiedenis van bloedingen zonder evidentie voor congenitaal probleem, b) lage waarden voor vWF:RCo of vWF:CB en c) vWF:RCo/Ag of vWF:CB/Ag ratios < 0,7 in geval van (rand)normale waarden voor vWF:RCo of vWF:CB. Er is echter weinig geweten over de diagnostische sensitiviteit van vWF:Rco, vWF:CB en hun ratio's in de diagnose van verworven von willebrand factor. Tiede et al heeft hier in 2008 onderzoek naar gedaan. De voorwaarde voor inclusie in de studie was een verlies van de hoge multimeren. 35 patiënten werden geïnccludeerd, waarvan 16 een cardiovasculaire aandoening hadden en allen minstens één bloedingsepisode hadden. 3 van de 16 hadden een assist device. De diagnostische gevoeligheid van FVIII:C, vWF:Ag, vWF:RCo en vWF:CB was 0% bij patiënten met een cardiovasculaire oorzaak en 64% bij patiënten met een monoclonale gammopathie (wat veroorzaakt wordt door auto-antistoffen). De sensitiviteit van de ratio's

voor vWF:RCo/Ag en vWF:CB/Ag ratio waren respectievelijk 26% en 46% voor beide groepen. De hoogste sensitiviteit bekomt men als de ratio vWF:CB/Ag met een cutoff van 0,8 (ipv de gebruikelijke 0,7) gecombineerd werd met vWF:Ag (< 50IU/dL) en vWF:RCo/Ag ratio(< 0,7%). De 16 patiënten met een cardiovasculaire aandoening hadden een vWF:Ag > 90 IU/DL. Geen van de patiënten had een gedaald vWF:RCo of vWF:CB waarbij de ratio's vWF:RCo/Ag en vWF:CB/Ag een sensitiviteit hadden van 19% resp. 44%. (sensitiviteit wordt uitgedrukt als proportie van de patiënten die het hebben) Tiede concludeerde dat deze testen of hun combinatie niet voldoende sensitief waren voor verworven vWZ en dat een multimeer analyse steeds een onderdeel moet zijn van de diagnostiek.³¹

Chen merkt op dat de vWF:RCo test geen geschikte assay is voor verworven vWZ en testte daarom de vWF GPIb assay van IL om te achterhalen of de precisie en accuraatheid van deze test beter is in de diagnose van (verworven)vWZ. De assay heeft een intrarun, interrunc CV < 10%, zelfs bij lage vWF, een lineaire correlatie van 0.93 met een uitstekende methodevergelijking (gouden standaard) zonder significante bias. Bovendien is de latextest sensitiever en specifiek voor het onderscheiden van **type 1** vs **type 2M**.

In zijn studiepopulatie waren er 24 patiënten met verworven vWZ op basis van verlies van de hoge multimeren, waarvan 10 een LVAD hadden. De waarden voor de verschillende testen staan vermeld in **tabel 4**. 15 van 24 patiënten hebben een vWF:GPIb/Ag ratio < 0,7, in tegenstelling tot 5 patiënten bij de vWF:RCo/Ag ratio.³³

Tabel 4: vergelijking vWF:RCo vs vWF:GPIb bindingsassay³³

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 (n = 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 (n = 100)																					
Type 1 (n = 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 (n = 35)																					
2A/B (n = 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 (n = 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 (n = 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 (n = 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 (n = 492)		408	84			392	100			391	101			444	37			437	55	410	82

Hij toonde aan dat bij een cut off van 0.7 de vWF:GPIb/Ag ratio gevoeliger was dan de vWF:RCo/Ag ratio. Een ROC analyse bevestigde zelfs een sensitiviteit van 90%, dit bij een cut-off van 0.8.

Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat de vWF:GPIb niet enkel de sterkte van de binding meet maar ook de efficiëntie van de latex agglutinatie, dat gefaciliteerd wordt door multivalente antilichamen bindingsplaatsen op het HMWM. Chen stelt dus een ratio van 0.8 voor om de gevoeligheid voor verworven von Willebrand ziekte te verhogen. De volgende flowchart wordt voorgesteld. Als de vWF:Ag of vWF:GPIb test < 55IU/dL of de vWF:GPIb/vWF:Ag ratio < 0,8 is, worden er bijkomende testen gedaan met een vWF:RCo test en een vWF multimeer analyse. Als men dit algoritme zou toepassen dan zouden alle **type 1, 2** en 20/24 patiënten in de verworven groep geïdentificeerd worden.³³

2.2. Methode

2.2.1. Implementatievalidatie INNOVANCE vWF activiteitstest

We zijn gestart met de implementatievalidatie van de INNOVANCE vWF kit op de CS2100. Dit houdt in de bepaling van de herhaalbaarheid (within run precisie), de reproduceerbaarheid (between run precisie) en de juistheid (accuraatheid of bias). Er werd ook een methodevergelijking gedaan met de BC vWF reagens kit op de BCSXP. Voor de herhaalbaarheid na te gaan hebben we een pool gemaakt van stalen met een normale waarde voor vWF en deze 20 keer in 1 run door het toestel laten bepalen. Voor de reproduceerbaarheid hebben we gebruik gemaakt van control N en control P van de firma Siemens. Deze controles werden elk 4x per dag bepaald gedurende 5 dagen. De juistheid hebben we afgeleid uit de reproduceerbaarheid. De bias werd berekend uit elke eerste bepaling van de dag van control N en control P. Voor de methodevergelijking verzamelden we 14 stalen uit de routine, 9 met normale waarden en 5 met afwijkende waarden (onder de cut-off van 40%).

2.2.1. LVAD patiënten

In totaal zijn er vijf patiënten in behandeling met een LVAD HM II. Maandelijks worden er citraatstalen afgenomen voor vWF bepaling. De gegevens van deze vijf patiënten staan vermeld in **tabel 5**. De bloedgroep wordt ook vermeld, om na te gaan of er een verband is met voorkomen van bloedingsstoornissen, verworven vWZ en bloedgroep O.

Tabel 5: Overzicht LVAD patiënten OLVZ Aalst

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

2.3. Resultaten

2.3.1. resultaten validatie

De resultaten van de validatie zien er veelbelovend uit. We bekomen een within-run CV van 1.85% (cfr [tabel 7](#)), waarbij de firma een CV vooropstelt van 3.5%. Voor de between run zijn de resultaten ook uitstekend met een CV van 2.48% voor control N en een CV van 4.08% voor control P ([tabel 6](#)). De firma bekomt hier een CV van 4.1% resp 4.6%. Kortom kunnen we besluiten dat de precisie uitstekend is. De bias geeft een waarde van 2.41% en 2.78% voor respectievelijk control N en control P. De totale fout is 6,4% resp 8,68%. Ricos stelt een waarde voorop van 4,7% voor de bias en 8,8% voor de totale fout. Deze zijn opgesteld voor een normale populatie, maar vermits we geen andere waarden hebben als evaluatiecriteria gebruiken we deze ook voor de control P groep. We voldoen aan alle vooropgestelde eisen.

Voor de methodevergelijking hebben we 14 stalen vergeleken. De stalen met een waarde > 150 op de BCSXP worden voor de bland altman plot en de regressie vergelijking niet in rekening gebracht. De overige 9 stalen tonen een goede correlatie met een coëfficiënt van 0,995. De Bland-Altman plot waarbij het verschil tussen twee methoden wordt uitgezet tegen de gemiddelde waarde, toont een bias van 2,52. We zien 1 outlier, dat tot de normale populatie behoort en klinisch geen noemenswaardig belang heeft. ([Tabel 8](#) en [figuur 6](#))

Tabel 6: Between run precisie

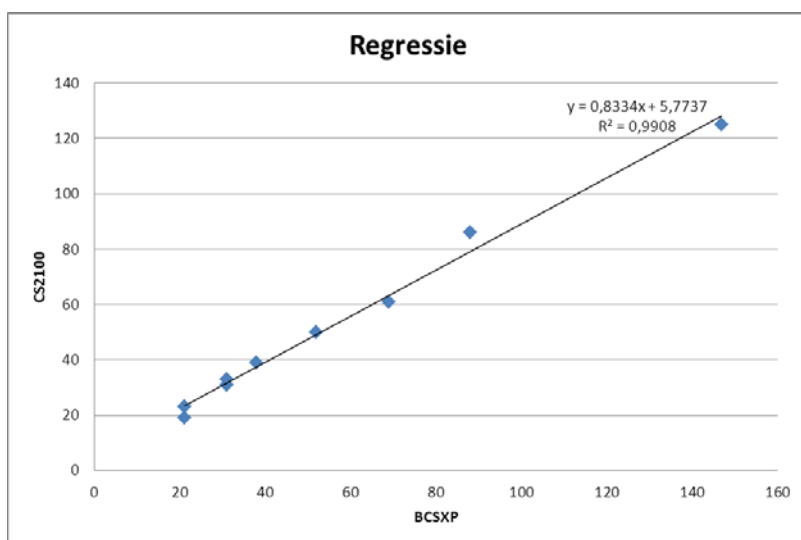
Between run	Control N		Control P	
3/10/2012	92,40	86,90	23,10	23,00
3/10/2012	89,70	89,40	23,40	24,20
5/10/2012	92,90	89,10	21,90	24,70
5/10/2012	93,10	92,90	23,80	23,80
8/10/2012	89,90	95,60	25,00	22,40
8/10/2012	90,50	87,60	23,30	23,00
9/10/2012	91,30	88,70	25,60	23,10
9/10/2012	89,60	91,30	23,10	24,20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

Tabel 7: Within run precisie

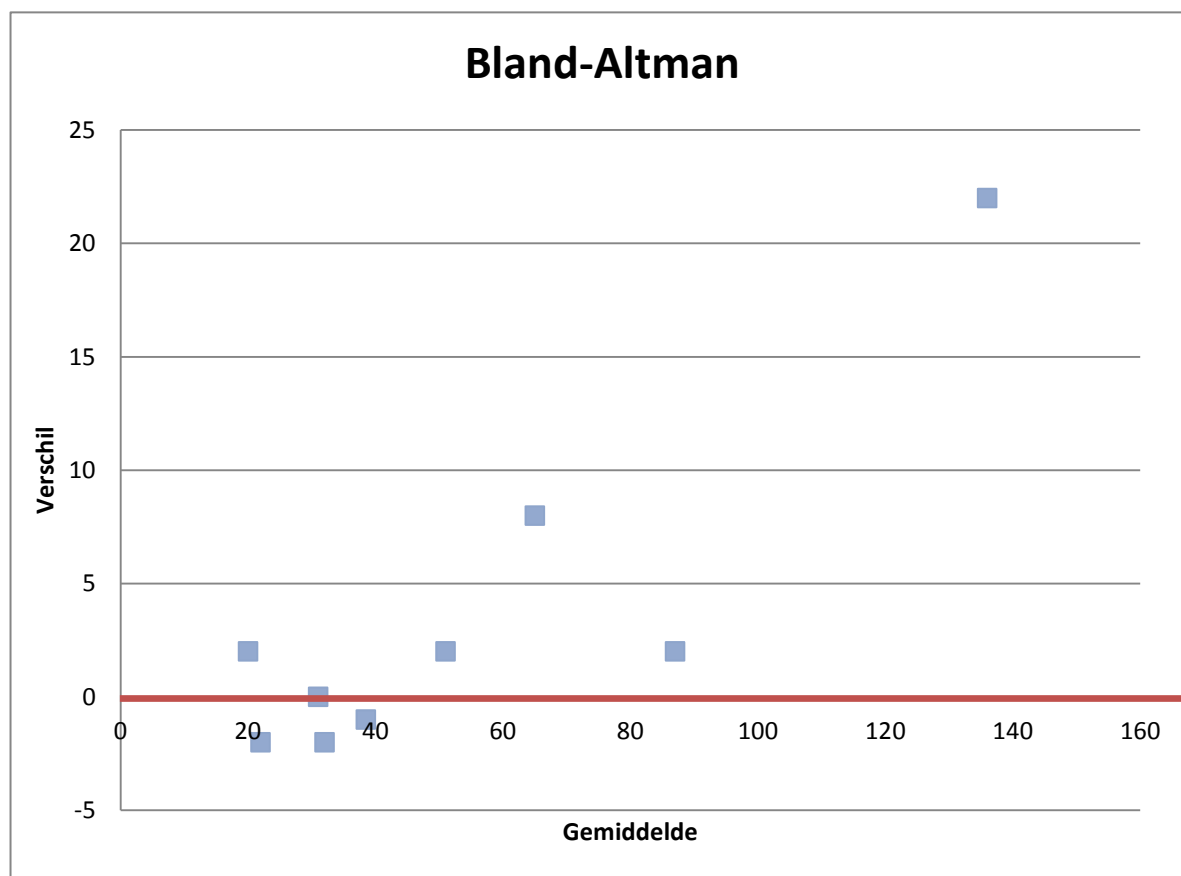
Within run	76.4	75.5	75.1	75.5	74.9	74.5	73.1	74.7	74.8	74.4
precisie	74.7	75.4	78.5	75.9	75.1	75.1	77.6	75.8	78.2	77.8

Tabel 8 : Methodevergelijking: Regressie

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



Figuur 6 : Methodevergelijking: Bland-Altman plot



2.3.2. Resultaten LVAD studie

De vraag die zich stelt is of we aan de hand van de vWF:RCo test kunnen voldoen aan de diagnose van verworven von Willebrand factor bij patiënten met een LVAD. In veel studies hebben de patiënten een normaal vWF:RCo resultaat ondanks het verlies van de hoge multimeren. Is de GPIb bindingsassay sensitiever voor deze diagnose? De resultaten van de multimeer analyse kunnen we nog niet includeren, maar het is wel al interessant om te kijken of er een significant verschil is tussen de beide ratio's.

De resultaten van de LVAD patiënten staan weergegeven in onderstaande [tabel 9](#).

Tabel 9: Cumulatieve resultaten LVAD patiënten

Patiënt	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

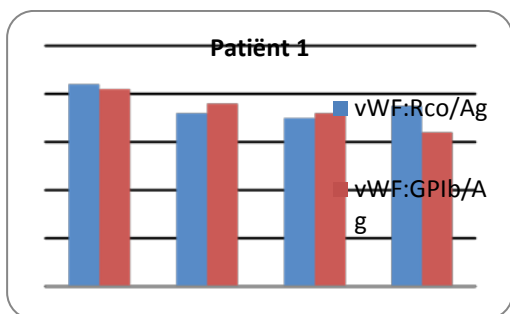
Tabel 10: Resultaten normalen

	FVIII	vWF:Ag	vWF:RCo	vWF:GPIb	vWF:RCo/vWF:Ag	vWF:GPIb/vWF:Ag
4560339	>150	165	143	150	0,86	0,90
4560024	86	85	67	78	0,79	0,92
4568981	85	66	49	52	0,74	0,79
4574101	76	58	45	41	0,77	0,71
4590420	93	72	71	66	0,99	0,92
4590426	132	93	72	78	0,77	0,84

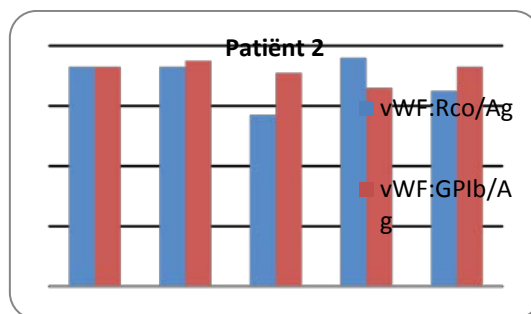
We maken gebruik van een fisher exact om significantie op te sporen. Wanneer we de resultaten volgens ratio bekijken bij de groep van patiënten die bloeden en de groep zonder bloedingen, vinden we een p-waarde van 1 voor de vWF:RCo test en een p-waarde van 0,15 voor de vWF:GPIb test. Als we opnieuw een fisher exact doen, maar dan met een groep normalen (cfr [tabel 10](#)) dan bekomen we voor vWF:RCo en vWF:GPIb beide een p waarde van 0,058. Onze gegevens zijn allen niet significant. Een gepaarde t-test geeft eveneens een niet-significante waarde van 0,086. De studiepopulatie is echter veel te klein om definitieve conclusies te kunnen trekken. Als we het gemiddelde bepalen in de LVAD populatie bekomen we voor de vWF:RCo test een waarde van 0.66 en voor de vWF:GPIb een waarde van 0.69. In de normale populatie liggen deze waarden hoger met resp 0.82 en 0.85 voor vWF:RCo en vWF:GPIb. In beide populaties liggen de waarden voor de vWF:GPIb test iets hoger.

[Figuur 7,8,9,10](#) en [11](#) geven de resultaten in de tijd voor resp. patiënt 1,2,3,4 en 5. We zien bij geen enkele patiënt een lineaire daling van de ratio. Voor patiënt 5 hebben we ook waarden van vWF:RCo van 1 dag voor het plaatsen van de LVAD. Voor de plaatsing had hij nog een normale ratio van 0.83 en 0.81 voor resp. vWF:RCo/Ag en vWF:GPIb/Ag. Een maand na plaatsing is het gedaald naar 0.50 resp 0.67. Drie maanden na plaatsing is dit opnieuw licht gestegen met een waarde van 0.61 resp 0.71.

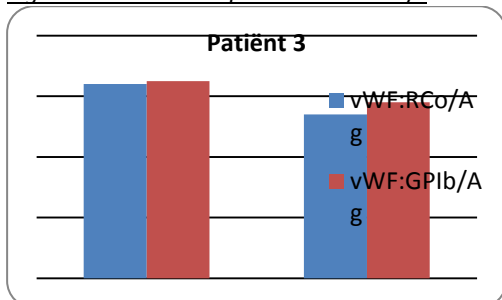
Figuur 7: Resultaten patiënt 1 in de tijd



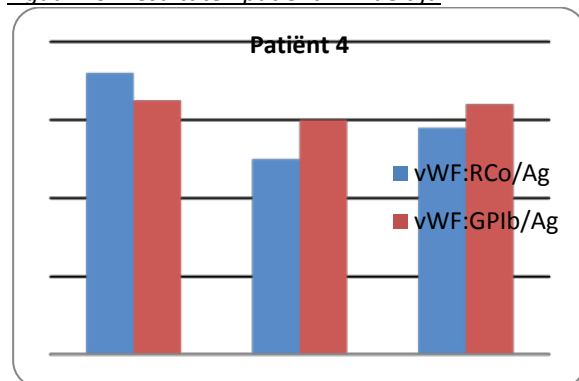
Figuur 8: Resultaten patiënt 2 in de tijd



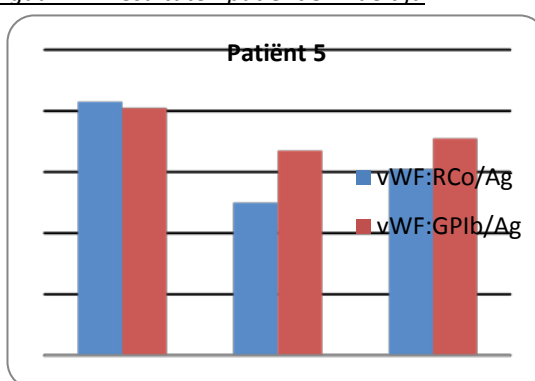
Figuur 9: Resultaten patiënt 3 in de tijd



Figuur 10: Resultaten patiënt 4 in de tijd



Figuur 11: Resultaten patiënt 5 in de tijd



2.4. Kostprijs

De von Willebrand factor testen worden 1x/14 dagen uitgevoerd. Stalen worden in tussentijd in aliquotjes ingevroren in de -80 diepvries en 1x/14 dagen uitgehaald voor een bepaling op de BCSXP. Het BC von Willebrand reagens van Siemens heeft een kostprijs van 278.49 euro per doosje. Een doosje BC reagens bevat 5 reagenspotjes van 4 ml. Per test heeft het toestel 150µL reagens nodig. Het gemiddeld aantal testen werd bepaald op basis van het aantal aanvragen van de laatste twee jaar en geeft een gemiddelde waarde van 4 per testdag. De test heeft een stabiliteit van 2 dagen op 2°-8°C, met andere woorden elke testdag wordt er 1 potje gebruikt. Zelfs kalibratie in rekening gebracht overschrijden we nooit deze hoeveelheid. Vermits we deze test slechts om de veertien dagen uitvoeren en dus 26 dagen per jaar uitvoeren met telkens verbruik van 1 reagenspotje verbruiken we dus 6 doosjes, wat een totaal maakt van 1670,94 euro op jaarbasis. Met 1 doosje kunnen er in totaal 133 testen worden uitgevoerd.

De kostprijs van de innovance vWFac test is 698.63 euro. Deze kit bestaat uit drie verschillende reagentia, waarvan het toestel van reagens I, II, III respectievelijk 40µL, 70µL en 13µL nodig heeft. Deze test heeft een stabiliteit van 4 weken voor reagens I en II en 12 weken voor reagens III. Als we opnieuw rekening houden met het gemiddeld aantal aanvragen van 4, dan kunnen we 1 reagenspotje gebruiken voor 3 opeenvolgende testdagen. Reagens III blijft drie keer zo lang stabiel, wat gelijk is aan het verbruik van de drie reagenspotjes van I en II. Als we weer rekening houden met een kalibratie van 4x/jaar met 14 bepalingen gaat dit nooit de hoeveelheid van het reagens overschrijden. Op jaarbasis komt dit op een verbruik van drie doosjes wat een totaal maakt van 2095.89 euro. Met 1 doosje kunnen er 120 testen worden uitgevoerd.

Tabel 11 geeft een overzicht.

Tabel 11 : overzicht kostprijs op jaarbasis.

	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	1 flesje/ 14 dagen	1 flesje/drie testweken
Kostprijs op jaarbasis	6 doosjes = 1670.94 euro	3 doosjes= 2095.89 euro

2.5. Besluit aan de hand van vraagstelling CAT

Vraag 1

Is de turbidimetrische vWF activiteitstest evenwaardig aan de ristocetine cofactor activiteitstest?

Uit onze validatie kunnen we besluiten dat de nieuwe test minstens evenwaardig is aan de vWF:RCo assay. Het is belangrijk om rekening te houden met kosten/baten. Omwille van hogere kostprijs en het beperkt aantal testen dat er in het OLVZ Aalst wordt uitgevoerd lijkt het ons momenteel nog niet nuttig om de nieuwe test te vervangen door de bestaande test. Bovendien beschikken we over een BCSXP toestel waarop een rotorsysteem voorzien is, wat noodzakelijk is om een vWF:RCo test te kunnen uitvoeren. Eén van de redenen waarom Siemens de nieuwe kit op de markt heeft gebracht is zodat men geen toestel meer nodig zou hebben waarop een rotorsysteem moet voorzien zijn.

Vraag 2

Welke test is het meest geschikt om patiënten met een verworven vWZ bij patiënten met een LVAD op te sporen?

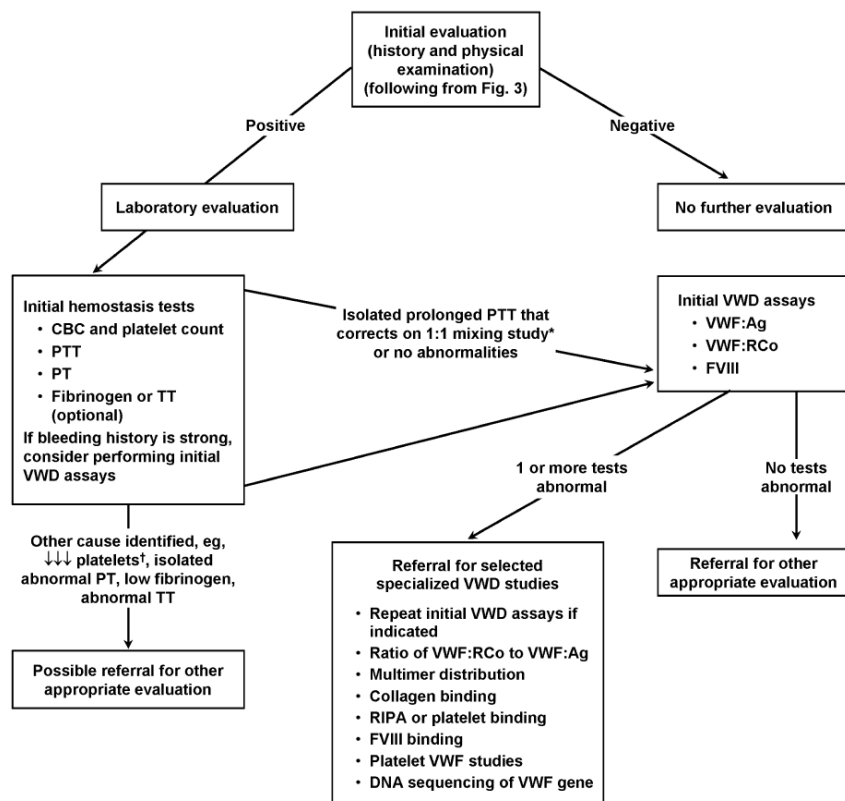
Onze studie is te beperkt om uitsluitsel te kunnen geven over deze vraag. De literatuur leert ons weinig over het optreden van bloedingen bij LVAD patiënten. De oorzaak is niet duidelijk en heeft misschien zelfs niets te maken met het voorkomen van verworven vWZ. Heeft het bovendien wel zin om deze testen uit te voeren, wanneer men weet dat elke LVAD patiënt op dag 3 na plaatsing verlies heeft van de hoge multimeren? Verder onderzoek en meer uitgebreide studiepopulaties zijn nodig om deze vraag te kunnen beantwoorden.

To do/ACTIONS

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

ATTACHMENTS

Attachment 1



Attachment 2

		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:FVIIIIB	N	N	N	N	N	↓↓↓	Absent

Attachment 3

	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	10.8	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

