

Raccomandazioni per la diagnosi di laboratorio della malattia di von Willebrand

Benedetto Morelli¹, Francesca Stufano² per il Gruppo di Studio SIBioC Emostasi

¹Synlab Castenedolo, Castenedolo, Brescia

²Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

ABSTRACT

Recommendations for the laboratory diagnosis of von Willebrand disease. Von Willebrand disease (VWD) is the most common inherited bleeding disorder. Clinically, VWD induces mucosal bleeding caused by a decreased quantity or quality of von Willebrand factor (VWF). Diagnosis of VWD requires careful consideration of patient specific factors, bleeding symptoms, and laboratory results. There is no single diagnostic test for VWD; laboratory diagnosis requires a number of assays of VWF amount and function, and factor VIII activity, with no single straightforward diagnostic test available up to know to either confirm or exclude the diagnosis. The currently available laboratory testing for VWD is imperfect, but if accompanied by an attentive and careful interpretation provides significant clinical utility by categorizing affected patients by type of VWD. As the diagnosis of VWD variants has implications for treatment, laboratory testing is therefore critical for optimising patient care. Newer assays of VWF function are becoming available and will be of great help in establishing the laboratory diagnosis of VWD.

INTRODUZIONE

La malattia di von Willebrand (VWD) è una malattia emorragica ereditaria causata da un difetto genetico che determina un'anomalia quantitativa, strutturale o funzionale, del fattore di von Willebrand (VWF). La malattia fu descritta per la prima volta nel 1926 da Erik von Willebrand, che ne riconobbe le differenze dall'emofilia e per questo venne definita inizialmente come "pseudoemofilia ereditaria" (1).

Il fattore plasmatico responsabile della malattia è stato identificato molti anni fa e fu chiamato VWF in onore del medico scopritore. Il VWF è una glicoproteina multimerica, ad elevato peso molecolare coinvolta nell'emostasi primaria, nell'ambito della quale svolge un ruolo fondamentale per l'adesione e l'aggregazione piastrinica tramite il legame con i recettori delle glicoproteine GPIIb e GPIIb-IIIa in condizioni di elevato *shear stress* (2).

Il VWF agisce inoltre come proteina *carrier* del fattore VIII della coagulazione (FVIII), proteggendolo dalla degradazione proteolitica e da una rapida clearance (3).

La VWD è la più comune malattia emorragica ereditaria ed ha una modalità di trasmissione autosomica dominante nella maggior parte dei casi. La malattia è caratterizzata principalmente da sanguinamento a livello

delle mucose e dopo interventi chirurgici e traumi. La diagnosi della malattia si basa su una storia personale e familiare di eventi emorragici e sul riscontro di ridotti livelli di VWF.

EPIDEMIOLOGIA

Sulla base degli studi più recenti, la prevalenza della VWD è compresa tra lo 0,6 e l'1,3% (4,5). Sebbene il modello di ereditarietà autosomica dominante suggerisca una uguale distribuzione di pazienti di sesso maschile e pazienti di sesso femminile, la malattia è diagnosticata più frequentemente nelle donne a causa dei problemi emorragici specifici delle donne. Non tutte le persone con bassi livelli di VWF hanno sintomi emorragici clinicamente rilevanti. Sulla base delle segnalazioni dei centri specialistici, la prevalenza stimata della VWD è di circa 1 caso ogni 10 000 persone (5). La prevalenza è fortemente dipendente dal valore soglia diagnostico utilizzato per il VWF (6). L'intervallo di riferimento è generalmente compreso tra 50 e 150 UI/dL. In diverse linee guida, la diagnosi è basata su un valore limite per il VWF di 30 UI/dL, mentre i suggerimenti per l'inizio di terapie mirate per la VWD specificano un valore limite di 40 UI/dL (4, 6-8).

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, Synlab Castenedolo, via Beato L. Pavoni 18, 25014, Castenedolo, Brescia, Tel 3407912302, E-mail benemorelli47@gmail.com

Ricevuto: 29.04.2019

Revisionato: 10.05.2019

Accettato: 22.06.2019

Pubblicato on-line: 15.10.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.057

STRUTTURA DEL FATTORE DI VON WILLEBRAND

Il VWF è una lunga catena polipeptidica con peso molecolare di circa 270 kDa; questa proteina multimerica plasmatica è presente nel plasma e nelle piastrine, ed è prodotta dall'endotelio e dai megacariociti. Ogni monomero di VWF è composto da domini ripetuti identici designati come A, B, C, D ed E (9,10). La disposizione dei domini appare come una proteina mosaico (11); le caratteristiche funzionali di ciascun dominio sono illustrate nella figura 1. La dimensione multimerica del VWF è importante per la sua funzione (12).

Il VWF circola nel sangue sotto forma di una serie di multimeri di dimensioni comprese tra circa 500 e 20 000 kDa; quelli di dimensioni maggiori sono i più efficaci dal punto di vista emostatico (13).

La biosintesi del VWF è completata attraverso un complesso processo che comprende diverse modifiche post-traduzionali; la molecola di partenza è un polipeptide di 350 kDa contenente 2 050 residui aminoacidici, un peptide segnale lungo 22 aminoacidi, e un pro-peptide di 741 residui di aminoacidi.

Il propeptide si dimerizza rapidamente all'interno del reticolo endoplasmatico per formazione di un legame disolfuro (14,15). Il precursore subisce la multimerizzazione dopo l'elaborazione nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi della cellula endoteliale e viene scisso in due componenti: una è la proteina matura, mentre l'altra è un pro-peptide (VWFpp) di 97 kDa (16).

La proteina matura media l'interazione tra piastrine e componenti del subendotelio nei siti di danno vascolare,

e il risultato di queste interazioni è la protezione del FVIII dalla degradazione proteolitica. Il VWF è inizialmente sintetizzato come pre-pro-polipeptide. Il pro-polipeptide può essere tagliato e anche secreto. Il pro-polipeptide libero è identificato come von Willebrand antigene II, una glicoproteina plasmatica di funzione sconosciuta (17).

Il VWF plasmatico consiste in una serie eterogenea di multimeri che sono composti da subunità glicoproteiche apparentemente *single-type*, collegate tra loro da legami disolfuro (18,19).

Il VWF è secreto come multimero di grandi dimensioni che viene poi scisso a livello del dominio A2 dalla metalloproteasi *A Disintegrin And with a Thrombospondin type 1 motif, member 13* (ADAMTS-13) formando multimeri più piccoli. Il VWF scisso è attivato da forze idrodinamiche nel sanguinamento arteriolare per promuovere l'emostasi, mentre il VWF non scisso è attivato ad un più basso livello fisiologico di *shear stress* e causa la trombosi (20).

DIAGNOSI

La corrente classificazione della VWD si basa sulla carenza parziale o completa del VWF (VWD di tipo 1 e di tipo 3) o sulla presenza di forme disfunzionali del VWF (VWD di tipo 2). La frequenza dei tre tipi è rispettivamente compresa tra il 70 e l'80% (tipo 1), è di circa il 20% nel tipo 2 ed è <5% nel tipo 3. La VWD di tipo 2 è ulteriormente suddivisa in quattro varianti (2A, 2B, 2M e 2N) in base al diverso fenotipo (2); la variante di tipo 3 è trasmessa in forma autosomica recessiva con una prevalenza di circa 1/1 000 000 nella popolazione

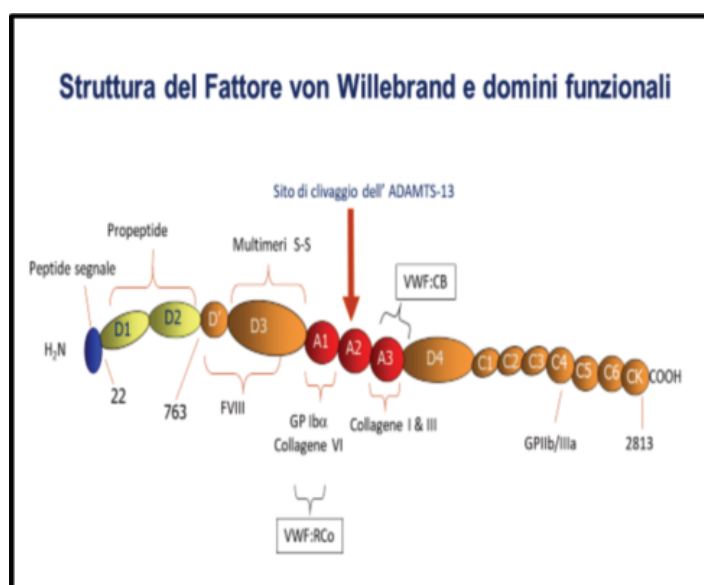


Figura 1

Struttura del Fattore von Willebrand. Modificato da Zhou YF et al. Sequence and structure relationship within von Willebrand factor. Blood 2012;120:449-58. ADAMTS-13, A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13; A1, A2, A3, Domini A; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, Domini C; D1, D2, D3, D4, Domini D; VWF:CB, attività di legame con il collagene; VWF:RCO, cofattore ristocetinico

generale, ma la sua frequenza è significativamente più alta nelle aree con un alto tasso di consanguineità (21). Come per le altre malattie emorragiche, anche l'approccio al paziente con sospetto di VWD è basato su una storia personale o familiare di sanguinamento, o entrambi, in combinazione con l'utilizzo di esami di laboratorio che mostrano anomalie nella determinazione quantitativa o funzionale del VWF, del FVIII o di entrambi. La valutazione del fenotipo emorragico inizia comunque con la raccolta anamnestica dettagliata di tutti i sintomi emorragici nel paziente e nei familiari. L'utilizzo di uno schema di punteggio (*score*) per definire la gravità dei sintomi emorragici nella VWD è andato sempre più diffondendosi negli anni recenti: sistemi di punteggio numerico, basati su questionari strutturati, di solito riferiti come strumenti di valutazione del sanguinamento, sono stati sviluppati e approvati anche dall'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH). Lo *score* denominato *ISTH-Bleeding Assessment Tool* (BAT) è utile in diversi contesti clinici e può essere impiegato per valutare sia la VWD che alcune disfunzioni piastriniche in pazienti con sospetto di malattia emorragica con coinvolgimento

dell'emostasi primaria (21-24).

Questi strumenti hanno però un uso diagnostico limitato perché dipendono fortemente dall'età del paziente e dal numero di precedenti eventi emorragici. L'utilizzo di questi *score* è dunque particolarmente problematico nel caso di pazienti giovani che non hanno ancora subito un intervento chirurgico o un intervento di estrazione dentale.

DIAGNOSI DI LABORATORIO

Il VWF è una glicoproteina multimerica e multifunzionale con diversi domini contenenti diversi siti di legame correlati a diverse attività funzionali, come mostrato in figura 1. Pertanto, a differenza della diagnostica di altre carenze fattoriali, è necessario più di un esame per valutare tutte le funzioni del VWF, e spesso, la diagnosi della VWD risulta complessa. Sono disponibili diversi esami biochimici per analizzare le funzioni di questa complessa glicoproteina, l'esecuzione dei quali deve avvenire seguendo criteri di approccio diversificati (esami di screening, esami di primo e di secondo livello) (figura 2).

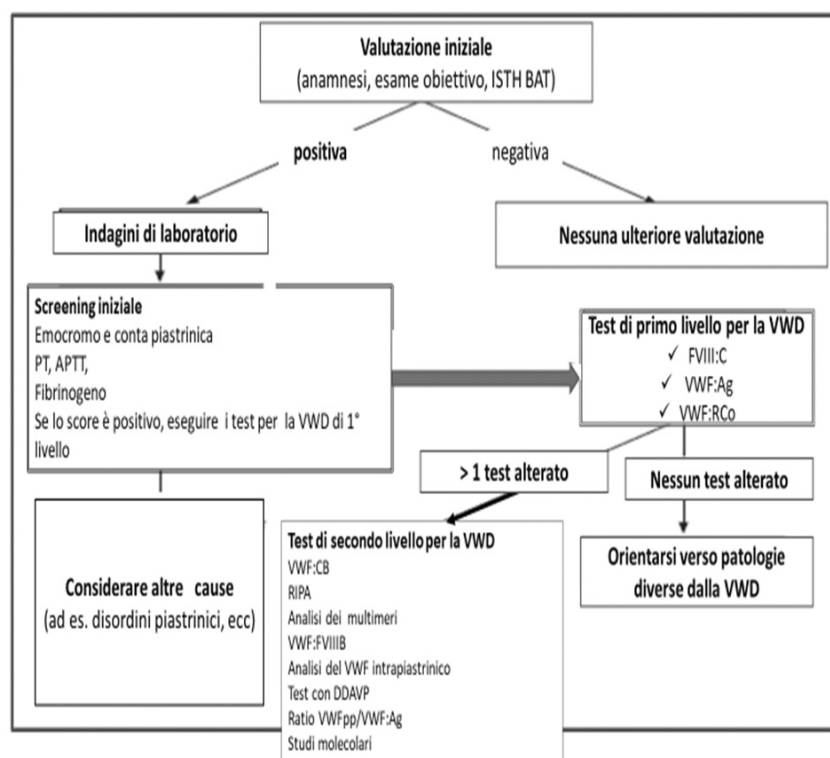


Figura 2

Approccio al paziente con sospetto di malattia emorragica. Modificata da Stufano F et al. *Diagnosis of von Willebrand Disease – Phenotypic characterization. Treatment of hemophilia*. <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1691.pdf>.

ISTH BAT, *International Society of Thrombosis and Hemostasis Bleeding Assessment Tool*; PT, tempo di protrombina; APTT, tempo di tromboplastina parziale attivato; VWD, malattia di von Willebrand; FVIII:C, attività del fattore VIII; VWF:Ag, antigene di von Willebrand; VWF:RCo, cofattore ristocetinico; VWF:CB, attività del legame con il collagene; RIPA, Ristocetin Induced Platelet Aggregation; VWF-FVIII B, test per il legame con il fattore VIII; DDAVP, 1-deamino-8-D-arginine vasopressin; VWFpp, propeptide del fattore di von Willebrand.

Esami di screening

La valutazione iniziale del laboratorio di emostasi deve includere l'emocromo completo, il tempo di protrombina (PT), il tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT), il Platelet Function Analyzer-100® (PFA) e la determinazione del fibrinogeno. Questi esami non possono escludere o confermare la presenza della VWD, ma possono suggerire se un deficit di un fattore della coagulazione possa essere la causa potenziale dei sintomi di sanguinamento di un paziente (2).

Anche il conteggio piastrinico è importante perché una trombocitopenia può essere associata alla VWD di tipo 2B. Inoltre nella VWD, la carenza di FVIII può essere secondaria alla mancanza o alla disfunzione del VWF, sua proteina di trasporto. Pertanto, nella VWD, i risultati dell'APTT sono prolungati solo se il livello del FVIII è sufficientemente ridotto (cioè nella VWD di tipo 3 o di tipo 2N).

In alcuni laboratori, vengono eseguiti anche il tempo di sanguinamento (Bleeding Time-BT) e la valutazione della funzionalità piastrinica con PFA-100® (o PFA-200®). Tuttavia, i risultati del tempo di sanguinamento presentano alta variabilità operatore-dipendente e scarsa sensibilità (25). Alcuni studi hanno dimostrato che i risultati ottenuti con questo esame sono anormali nella maggior parte dei pazienti con VWD; tuttavia, il PFA-100® manca di sensibilità e specificità per cui può essere utilizzato solo come esame di screening (26, 27).

Esami di primo livello

Gli esami di primo livello misurano il livello di attività del FVIII (FVIII), la concentrazione antigenica (VWF:Ag) e l'attività funzionale del VWF dipendente dalle piastrine (attività del legame VWF-GPIIb/IIIa), solitamente misurata come attività di cofattore ristocetinico (VWF:RCO). I risultati di questi esami possono essere espressi in unità internazionali per decilitro (IU/dL) o per millilitro (IU/mL) (4).

FVIII:C

La determinazione dell'attività procoagulante del FVIII può essere effettuata con un metodo coagulativo o con un metodo cromogenico. Il metodo più comunemente utilizzato è il metodo coagulativo che misura la capacità del FVIII del paziente di accorciare il tempo di coagulazione di un plasma carente di FVIII (28).

VWF:Ag

Il VWF:Ag misura la concentrazione immunologica della glicoproteina VWF nel plasma del paziente. L'esame può essere eseguito con saggi immunoenzimatici ELISA o con esami immunoturbidimetrici al lattice automatizzati su coagulometri (LIA, Latex ImmunoAssay).

VWF-GPIIb/IIIa

La capacità del VWF nel legarsi alle piastrine tramite la GPIIb/IIIa viene comunemente valutata come VWF:RCO, che misura la capacità del VWF plasmatico di agglutinare piastrine in presenza di ristocetina (29). Negli ultimi dieci anni sono stati introdotti nuovi esami per valutare l'attività del legame tra GPIIb/IIIa piastrinica e VWF con lo scopo di superare le limitazioni dell'esame VWF:RCO (30). Perciò, il comitato scientifico e di standardizzazione dell'ISTH (SSC) ha approvato una nuova nomenclatura che facilita la distinzione di tali esami che differiscono nei loro dettagli funzionali (31). Questa nomenclatura classifica tali esami come segue:

VWF:RCO. Per la valutazione del cofattore ristocetinico, vengono utilizzate piastrine intatte in diverse forme (native, fissate in formalina o liofilizzate ricostituite) e ristocetina. Questi esami sono suddivisi in esami di prima generazione (manuali), di seconda generazione (semi-automatici), di terza generazione (completamente automatizzati), di quarta generazione (modificati, completamente automatizzati), e metodi di citometria a flusso. Questi esami presentano alcune limitazioni, come un alto coefficiente di variazione (CV, che in alcuni casi può superare il 30% quando i valori sono <15 IU/dL), ampia variabilità da lotto a lotto di ristocetina o nel reagente piastrinico (preparato localmente o utilizzando liofilati commerciali) e l'intrinseca instabilità del sistema di analisi (32,33). Anche gli esami di prima e seconda generazione sono dispendiosi in termini di tempo e scarsamente standardizzati.

VWF:GPIIb/IIIaR. Il Ristocetin-triggered GPIIb binding assay utilizza ristocetina e un frammento GPIIb/IIIa catturato da un anticorpo monoclonale (mAb), rivestito su una piastra ELISA o su particelle di lattice o magnetiche. Sono disponibili diversi anticorpi per catturare il frammento GPIIb/IIIa, che può essere derivato da proteine plasmatiche o ricombinanti (34, 35). Esiste una buona correlazione tra VWF:RCO e VWF:GPIIb/IIIaR; tuttavia, quest'ultimo dimostra una precisione migliorata, un CV migliore e un limite inferiore di rilevamento (31).

VWF:GPIIb/IIIaM. Il Gain-of-function mutant GPIIb binding assay utilizza frammenti GPIIb/IIIa "gain-of-function" (rGPIIb/IIIaM), che si legano spontaneamente al VWF senza ristocetina. È possibile utilizzare diverse mutazioni "gain-of-function" della rGPIIb/IIIaM (36). Questi saggi immunologici utilizzano rGPIIb/IIIaM catturato da una piastra ELISA o da una particella al lattice, rivestita con un mAb. Questi esami sono ben correlati con il golden standard VWF:RCO; e i più recenti hanno una precisione, un CV e una sensibilità migliori (30, 37, 38).

VWF:Ab

Costituisce l'esame immunoturbidimetrico automatizzato al lattice. In questo saggio, un mAb è diretto contro un epitopo nel dominio VWF A1 coinvolto nel legame con GPIIb/IIIa. I vantaggi di questo esame includono la sua applicabilità a diverse piattaforme e,

quindi, la sua fattibilità per i laboratori di base. Poiché questo saggio misura VWF legandosi a un mAb e non alla GPIIb α , non è chiaro se questo anticorpo sia in grado di simulare accuratamente il legame in vivo di GPIIb α con il VWF (39). Pertanto, non può essere considerato un vero esame di attività né raccomandato in sostituzione del VWF:RCo.

Esami di secondo livello

Questi esami sono necessari per la definizione e la classificazione delle varianti della VWD. Devono essere utilizzati quando vengono riscontrati bassi livelli di VWF e/o quando esiste una significativa discrepanza tra la concentrazione del VWF e l'attività funzionale piastrino-dipendente (ad esempio se VWF:RCo/VWF:Ag <0,6). Livelli diminuiti di FVIII associati a valori normali o quasi normali di VWF, che portano ad un rapporto FVIII:C/VWF:Ag <1 (40), possono essere correlati al VWD di tipo 2N o all'emofilia A lieve.

VWF:CB

L'interazione del VWF con il collagene è cruciale in condizioni di alto *shear stress* per l'inizio della formazione del tappo piastrinico nel sito della lesione vascolare. Il sito primario del legame con il collagene fibrillare è il dominio A3 del VWF (41-43). Il von Willebrand factor collagen binding assay misura la capacità del VWF di legarsi al collagene. Come per il VWF:RCo, i risultati del VWF:CB dipendono dalla dimensione dei multimeri del VWF, il che significa che i multimeri più grandi si legano al collagene con maggiore affinità rispetto alle forme più piccole. La sensibilità e la capacità del saggio VWF:CB nel discriminare i sottotipi di VWD dipende dalla fonte e dal tipo di collagene utilizzato (44). L'esame VWF:CB può essere utilizzato come surrogato dell'analisi multimerica del VWF, ogni volta che quest'ultimo esame non è disponibile, allo scopo di valutare l'assenza di multimeri ad alto peso molecolare (HMWM). Anche se alcuni studi suggeriscono che l'esame VWF:CB può migliorare la differenziazione tra la VWD di tipo 2M da quella di tipo 2A, nella pratica clinica e di laboratorio, l'esame VWF:CB non fa parte degli esami di routine per la diagnosi della VWD (45, 46). I difetti di legame al collagene sono anche descritti nel VWD di tipo 2M (VWF:CB/VWF:Ag <0,6) a causa di mutazioni nel dominio A3 (47, 48). Attualmente sono disponibili in commercio diversi kit ELISA per valutare questa funzione del VWF.

RIPA

Pochi metodi biochimici sono disponibili per distinguere la VWD di tipo 2B dagli altri tipi di VWD (ad esempio dal tipo 2A o 1) (49-52). Tra questi, l'agglutinazione piastrinica indotta da ristocetina (RIPA) è la più utilizzata (8). La RIPA, eseguita utilizzando plasma del paziente ricco di piastrine (PRP), valuta l'affinità del VWF per il recettore piastrinico GPIIb α ,

utilizzando diverse concentrazioni di ristocetina. Pertanto, per questa analisi è obbligatoria la disponibilità di un campione di sangue fresco. Concentrazioni basse di ristocetina (<0,7 mg/mL) non causano l'agglutinazione delle piastrine nel PRP dei soggetti normali, mentre la stessa quantità di ristocetina è in grado di causare l'agglutinazione piastrinica nel PRP di pazienti con VWD di tipo 2B. Al contrario, a concentrazioni più elevate di ristocetina (tra 0,7 e 1,2 mg/mL) in grado di indurre l'agglutinazione piastrinica in soggetti normali, l'esame RIPA risulta compromesso nei pazienti di tipo 3, 2A e 2M (53). Le mutazioni *gain-of-function* del recettore piastrinico GPIIb α causano la VWD di tipo piastrinico (PT-VWD), nota anche come pseudo-VWD. L'esame RIPA non è in grado di distinguere la VWD di tipo 2B da PT-VWD; tuttavia, una diagnosi differenziale può essere fatta mediante un esame di miscela delle piastrine (53) o tramite l'analisi molecolare del VWF e del gene GPIIb α .

Analisi multimerica del VWF

Il pattern multimerico del VWF nel plasma è importante per la sua attività funzionale. Gli HMWM rappresentano la forma più attiva dal punto di vista emostatico del VWF. Queste molecole si legano al collagene e alle piastrine con affinità significativamente maggiore rispetto ai multimeri a basso peso molecolare. A causa delle loro dimensioni, gli HMWM sono anche più efficaci nel mediare l'adesione e l'aggregazione piastrinica, in particolare in condizioni di elevato *shear stress* (54).

L'analisi della struttura multimerica del VWF è complessa e richiede tempo, ma è utile nella diagnosi della VWD. L'analisi a bassa risoluzione (gel a bassa concentrazione di agarosio) può rilevare la perdita di HMWM, consentendo la distinzione dei pazienti con VWD di tipo 1 dai pazienti di tipo 2 e la distinzione tra il tipo 2A (perdita di HMWM e MWM) e il tipo 2M (normale pattern multimerico). L'utilizzo di gel a risoluzione intermedia consente di rivelare la struttura multimerica interna, mostrando la struttura a tripletta di ogni singolo oligomero. Nei soggetti normali, il modello a triplette consiste in una banda centrale e due sottobande esterne (55); in alcuni pazienti con VWD si possono osservare alterazioni della struttura della tripletta. Recentemente è stato introdotto sul mercato un metodo semi-automatico per l'analisi multimerica del VWF a bassa risoluzione.

VWF:FVIII B.

Il VWF-FVIII binding assay valuta la capacità del VWF di legare il FVIII. Questo esame è fondamentale per la diagnosi differenziale tra VWD di tipo 2N ed emofilia A lieve, poiché entrambe le condizioni sono associate ad una moderata riduzione dei livelli plasmatici di FVIII e livelli normali di VWF:Ag e VWF:RCo (FVIII:C/VWF:Ag <1) (40). L'esame VWF:FVIII B misura la capacità del plasma VWF di legare un FVIII esogeno usando un saggio immunologico in fase solida (56).

Nella diagnosi differenziale, i risultati ottenuti con questo esame possono essere:

- una normale capacità del VWF di legare il FVIII, con conseguente diagnosi di emofilia A lieve;
- una capacità marcatamente ridotta di VWF di legare FVIII, con conseguente diagnosi di VWD di tipo 2N;
- una capacità moderatamente ridotta del VWF di legare il FVIII. Questo risultato è tipico dei portatori asintomatici di difetti di tipo 2N che di solito presentano livelli normali di FVIII (FVIII:C/VWF: Ag >1), ed è anche stato osservato in alcuni pazienti con varianti di tipo 2A/IIe.

Analisi del VWF intrapiastrinico

Oltre che all'interno dei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali, il VWF è anche immagazzinato all'interno degli α granuli delle piastrine. A differenza del VWF plasmatico, questo pool di VWF piastrinico è particolarmente ricco di multimeri emostaticamente attivi (Ultra Large - VWF) (57).

Il VWF intrapiastrinico può essere valutato utilizzando gli stessi esami adottati per il VWF plasmatico (VWF:Ag, VWF:RCO, VWF:CB e analisi multimerica). Tuttavia, per interpretare correttamente i risultati, è necessario stabilire prima un intervallo di riferimento, ottenuto da una piccola popolazione di individui sani. Come per il RIPA, le piastrine devono essere isolate da un campione di sangue fresco. Pochi metodi sono disponibili per l'estrazione del VWF dalle piastrine e nessuno di questi è stato standardizzato.

Mannucci et al. (58) descrivono tre diversi sottogruppi di pazienti basati sui livelli di VWF delle piastrine:

- platelet low, con valori ridotti di VWF:Ag e VWF:RCO piastrinico;
- platelet normal, con valori normali di VWF:Ag e VWF:RCO piastrinico;
- platelet discordant, con concentrazioni normali di VWF:Ag piastrinico, ma con una riduzione sproporzionata di VWF:RCO.

Queste sottocategorie sono state descritte per predire la risposta del VWF plasmatico del paziente alla somministrazione di desmopressina [1-desamino-8-D-arginina vasopressina (DDAVP)], e quindi potrebbero essere clinicamente utili.

Esame di infusione con vasopressina

La DDAVP è un derivato sintetico dell'ormone antidiuretico vasopressina che stimola il rilascio di VWF dai corpi di cellule endoteliali di Weibel-Palade (59, 60). La DDAVP è stata usata per trattare le forme lievi di VWD e il suo meccanismo di azione farmacologica e le indicazioni sono state ampiamente esaminate (3, 59-61). L'esame DDAVP può essere utilizzato per valutare la reattività del paziente prima della somministrazione di DDAVP per la prevenzione o il trattamento del sanguinamento. Per testare la risposta del paziente, viene somministrata per via sottocutanea o endovenosa una dose terapeutica di DDAVP (0,3 μ g/kg di peso corporeo) e i tre parametri FVIII:C, VWF:Ag e VWF:RCO vengono misurati al tempo 0 e a 1, 2 e 4 ore dopo

l'infusione. La valutazione a 4 ore dopo l'infusione è necessaria per identificare i pazienti con maggiore clearance di VWF che sono possibili candidati per trattamenti alternativi (62).

VWFpp/VWF:Ag

Un aumento del rapporto tra il propeptide del VWFpp e VWF (VWFpp/VWF: Ag), che è un marcatore di una elevata clearance del VWF, è stato riscontrato in pazienti con VWD e in pazienti con coagulazione intravascolare disseminata (63-65). Sono disponibili in commercio diversi kit ELISA per la misurazione della concentrazione plasmatica di VWFpp. Tuttavia, il metodo è relativamente nuovo e non ancora diffusamente utilizzato nella diagnosi di VWD. La valutazione del rapporto VWFpp/VWF:Ag è una buona alternativa all'esame DDAVP per studiare la velocità della clearance del VWF (66).

VARIABILITÀ EXTRA-ANALITICA

Variabilità biologica

I gruppi sanguigni ABO hanno un effetto significativo sulle concentrazioni plasmatiche del VWF e del FVIII (67). I soggetti con gruppo sanguigno di tipo O presentano concentrazioni di VWF inferiori del 25% circa rispetto agli individui con gruppi sanguigni non-O, come conseguenza della maggiore clearance del VWF correlata alla presenza di antigeni O sulle molecole del VWF rispetto alle molecole VWF che presentano antigeni non-O (68). Entrambi i livelli di VWF e FVIII aumentano con l'età. Negli adulti il VWF aumenta all'incirca dall'1% al 2% all'anno (69).

Variabilità pre-analitica

La fase pre-analitica comprende varie procedure, dalla preparazione del paziente alla raccolta, gestione, trasporto e conservazione dei campioni. La fase pre-analitica è considerata la parte più vulnerabile dell'intero processo degli esami di laboratorio e le problematiche pre-analitiche rappresentano circa il 70% degli errori di laboratorio. Prima di eseguire esami di laboratorio per la malattia di Willebrand è importante considerare la storia clinica del paziente per rilevare eventuali situazioni patologiche note per influenzare i livelli di VWF (ad esempio, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni, neoplasie, malattie linfoproliferative o mieloproliferative e ipotiroidismo).

La gravidanza e i contraccettivi orali devono essere considerati in quanto associati a elevati livelli dei fattori procoagulanti, incluso il VWF. È importante evitare lo stress (ad esempio, ansia o pianto, nel caso di bambini spaventati) prima del prelievo di sangue poiché aumenta le proteine di fase acuta (ad esempio, VWF e FVIII) (70). L'esercizio fisico non è raccomandato fino a 2 ore prima del prelievo e i soggetti devono riposare almeno 5 minuti prima del prelievo. Altri fattori esterni, come l'infiammazione e la chirurgia, aumentano i livelli

plasmatici di VWF (70).

Di conseguenza, è spesso necessaria la ripetizione degli esami in soggetti sospettati di VWD e bassi livelli di VWF devono essere confermati su almeno due prelievi di sangue in occasioni separate.

Relativamente alla raccolta, manipolazione e trasporto di campioni, il College of American Pathologists (CAP), così come il Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), raccomandano la raccolta del sangue nella soluzione di citrato tamponato al 3,2%. Dopo la raccolta, è importante miscelare tempestivamente il sangue per inversione per assicurare la distribuzione dell'anticoagulante, mentre l'agitazione eccessiva deve essere evitata poiché induce emolisi e/o attivazione di piastrine e fattori. Campioni emolizzati, itterici e lipemici possono compromettere i risultati degli esami. Prima dell'esecuzione, i campioni devono essere valutati per la presenza di coaguli, emolisi, ittero e lipemia (32, 33). Tuttavia, la maggior parte degli strumenti di coagulazione dispone oggi di sistemi di rilevamento delle interferenze ottiche a più lunghezze d'onda per rilevare la presenza di campioni non idonei.

La temperatura e il trasporto sono variabili chiave nella gestione dei campioni. Il trasporto di sangue intero in condizioni refrigerate non è raccomandato. I campioni devono essere trasportati a temperatura ambiente (15-25 °C) nel più breve tempo possibile (70,71).

Il trasporto a basse temperature (tra 2 e 8°C) prima della centrifugazione può causare diminuzioni spurie nel VWF e nel FVIII (70). Dopo il prelievo, il sangue intero deve essere processato rapidamente (idealmente entro 1 ora) per ottenere il plasma. Le analisi per il VWF devono essere eseguite su plasma povero di piastrine (32); per assicurare la rimozione delle piastrine, la centrifugazione dovrebbe preferibilmente essere condotta a ~ 1500 g per 15 minuti a temperatura ambiente allo scopo di ottenere una conta piastrinica $<10 \times 10^9/L$. Dopo la centrifugazione, se gli esami possono essere completati entro 2 ore, le provette devono rimanere tappate e mantenute a temperatura ambiente. Se non è possibile, i campioni devono essere congelati, preferibilmente a -70°C e analizzati entro 18 mesi (71). L'utilizzo di congelatori a temperature più alte (ad esempio -20°C) non consente tempi di conservazione prolungati.

I campioni congelati possono deteriorarsi durante il trasporto; si consiglia una consegna rapida e le aliquote devono essere consegnate con ghiaccio secco. Per evitare la formazione di crioprecipitato, i campioni di plasma congelati devono essere scongelati per almeno 5 minuti a 37°C in un bagno d'acqua prima dell'esecuzione degli esami; i campioni devono poi essere mescolati delicatamente.

CLASSIFICAZIONE

Come precedentemente affermato, l'attuale classificazione della VWD si basa su difetti quantitativi parziali o completi (VWD tipo 1 e 3) o qualitativi (VWD tipo 2) del VWF (tabella 1).

VWD tipo 1

La VWD di tipo 1 è caratterizzata da una carenza quantitativa parziale di VWF. Le manifestazioni emorragiche nei pazienti con VWD di tipo 1 sono attribuite ad una diminuzione della concentrazione di VWF, e non a una diminuzione selettiva dei multimeri emostaticamente efficaci o ad anomalie specifiche nei siti di legame (72). Tipicamente nella VWD di tipo 1 si riscontrano ridotti livelli di VWF con attività funzionali normali rispetto a VWF:Ag. La proporzione di HMWM sul totale dei multimeri VWF è normale o non particolarmente diminuita (8).

La VWD di tipo 1 è di solito ereditata con modalità di trasmissione autosomica dominante, anche se sono state riportate forme gravi di VWD di tipo 1 a causa di eterozigoti composti (73).

È molto importante sottolineare inoltre le difficoltà nella diagnosi differenziale tra VWD di tipo 1 e ridotti livelli di VWF. In questi casi la sintomatologia emorragica può essere dirimente al riguardo (74).

VWD tipo 2

La classificazione di tipo 2 si basa su specifici difetti funzionali del VWF che compromettono l'aggregazione e/o l'adesione piastrinica o compromettono l'emivita del FVIII plasmatico (8). La tabella 1 fornisce un riepilogo delle varianti qualitative del VWF (VWD tipo 2) che sono descritte in dettaglio di seguito.

VWD tipo 2A

Il VWD tipo 2A è caratterizzato da una diminuzione dell'adesione piastrinica VWF-dipendente dovuta a carenza selettiva di HMWM. La perdita di HMWM è associata a diminuzione delle interazioni tra piastrine e VWF (i.e. VWF:RCo) e tra VWF e collagene (i.e. VWF:CB) (75) rispetto a VWF:Ag. Il VWD tipo 2A è un gruppo eterogeneo di varianti (ulteriormente classificate come IIA, IIE, IID e IIC) in cui ciascun sottogruppo è caratterizzato da un diverso meccanismo patogenetico molecolare. Con l'eccezione del VWD tipo 2A IIC, le varianti di tipo 2A sono ereditate con un modello autosomico dominante. Allo stato attuale, la discriminazione tra diverse varianti di tipo 2A richiede l'analisi multimerica a risoluzione intermedia o il sequenziamento del VWF; queste tecniche non sono disponibili presso tutti i laboratori (8).

Le varianti più comuni di tipo 2A, riportate nella precedente versione della classificazione VWD come IIA (75), sono caratterizzate dalla perdita di MWM elevati e intermedi, che può derivare da difetti nell'assemblaggio e nella secrezione dei multimeri o da aumentata suscettibilità intrinseca al taglio proteolitico da parte di ADAMTS-13 (8).

La seconda variante più comune di VWD tipo 2A, precedentemente identificata come IIE (76), è caratterizzata da una modesta perdita di HMWM, associata all'assenza delle bande di triplette satellite a causa di una ridotta suscettibilità alla proteolisi di

Tabella 1

Classificazione della malattia di von Willebrand in tipi (A) e sottotipi e relativi esami di laboratorio (B).

A) Modificata da Leebeek FWG et al. Von Willebrand Disease. *N Engl J Med* 2017;376:701-2.

| Meccanismo patogenetico | Classificazione |
|--|------------------------------------|
| Nessuno | Soggetti con valori normali di VWF |
| Sintesi di bassi livelli di VWF | Low VWF |
| Assenza di sintesi del VWF | VWD di tipo 3 |
| Ridotta sintesi di VWF normale | VWD di tipo 1 |
| Ritenzione intracellulare del VWF Aumento della clearance del VWF | VWD di tipo 1 |
| Diminuzione adesione piastrinica per deficit dei multimeri ad HMW Difetto di multimerizzazione | VWD di tipo 2A |
| Difetto di dimerizzazione | VWD di tipo 2A |
| Aumento della proteolisi operata dall'ADAMTS13 | VWD di tipo 2A |
| Aumento spontaneo del legame con la GPIIb | VWD di tipo 2B |
| Diminuzione della adesione piastrinica o del legame con il collagene senza perdita dei multimeri HMW | VWD di tipo 2M |
| Diminuzione di legame con il FVIII | VWD di tipo 2N |

VWF, fattore di von Willebrand; VWD, malattia di von Willebrand; HMW, multimeri ad alto peso molecolare; ADAMTS13, A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13; GPIIb, glicoproteina Iba; FVIII, fattore VIII.

B) Modificata da National Heart, Lung, and Blood Institute. *The diagnosis, evaluation, and management of von Willebrand disease*. Bethesda, Md.: National Institutes of Health; NIH publication no. 08-5832. <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd>.

| Esame | Tipo 1 | Tipo 2A | Tipo 2B | Tipo 2M | Tipo 2N | Tipo 3 | Valori di riferimento |
|---------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|-----------------------|
| VWF:Ag | ↓ | ↓ | ↓ | N/↓ | N/↓ | ↓↓↓ | 50-200 UI/dL |
| VWF:GPIIbM o VWF:RCo | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓ | N/↓ | ↓↓↓ | 50-200 UI/dL |
| VWF:GPIIbM/VWF:Ag o VWF:RCo/VWF:Ag | N | ↓ | ↓ | ↓ | N | - | >0,6 |
| VWF:CB | ↓ | ↓↓ | ↓↓ | N/↓ | N/↓ | ↓↓↓ | 50-200 UI/dL |
| VWF:CB/VWF:Ag | N | ↓ | ↓ | N/↓ | N | - | >0,6 |
| FVIII:C | N/↓ | N/↓ | N/↓ | N/↓ | ↓ | ↓ | 50-150 UI/dL |
| FVIII:C/VWF:Ag | N | N | N | N | ↓ | - | >0,7 |

VWF:Ag, antigene di von Willebrand; VWF:GPIIbM, glicoproteina Ib mutata del fattore di von Willebrand; VWF:RCo, attività ristocetinica; VWF:CB, attività di legame con il collagene; FVIII:C, attività del Fattore VIII..

ADAMTS-13. Una rara variante di VWD tipo 2A, precedentemente identificata come IID (77), è caratterizzata dalla perdita di HMWM, associata alla presenza di bande "dispari" nell'analisi multimerica a risoluzione intermedia. Una variante rara, in precedenza identificata come IIC (78), è caratterizzata dalla perdita di multimeri ad alto e intermedio peso molecolare, associata all'assenza delle triplette a causa della ridotta suscettibilità alla proteolisi da parte di ADAMTS-13. Come menzionato sopra, il VWD tipo 2A IIC è ereditato con modalità di trasmissione autosomica recessiva.

VWD tipo 2B

Il VWD di tipo 2B è dovuto all'aumentata affinità del VWF per il recettore piastrinico GPIIb ed è caratterizzato da un esame RIPA alterato (cioè da un'agglutinazione piastrinica indotta da basse concentrazioni di ristocetina) (49). La maggiore affinità di questa variante VWF per GPIIb piastrinica porta al legame spontaneo di VWF alle piastrine *in vivo*, con conseguente formazione di aggregati e perdita di HMWM e occasionalmente trombocitopenia (79). Inoltre, l'interazione spontanea tra VWF e GPIIb accelera la proteolisi di VWF da parte dell'ADAMTS-13, con conseguente ulteriore consumo dei HMWM (80). La variante di tipo 2B è trasmessa come malattia autosomica dominante e condivide la maggior parte delle caratteristiche cliniche e di laboratorio del Platelet Type - Von Willebrand Disease (PT-VWD), che è una rara malattia emorragica autosomica dominante descritta per la prima volta da Weiss e Miller (81, 82). Il PT-VWD è anche caratterizzato da un RIPA aumentato, ma in questo caso l'interazione spontanea tra VWF e il recettore piastrinico GPIIb è dovuta alla presenza di mutazioni *gain-of-function* nel recettore piastrinico (83).

VWD tipo 2M

Il VWD di tipo 2M è caratterizzato da una ridotta adesione piastrinica VWF-mediata non associata all'assenza di HMWM. Le mutazioni identificate nei pazienti con VWD di tipo 2M comportano un difetto di interazione del VWF con la GPIIb piastrinica o con il collagene, ma non pregiudicano l'assemblaggio dei multimeri (da cui la denominazione M). La riduzione del legame piastrinico riduce l'esposizione delle subunità del VWF alla scissione mediata dall'ADAMTS-13, con conseguente riduzione delle bande satelliti. La variante 2M è ereditata con modalità autosomica dominante. La maggior parte dei casi di VWD tipo 2M sono stati identificati in base a un valore di VWF:RCo sproporzionatamente basso rispetto al VWF:Ag. Gli esami di primo livello (FVIII:C, VWF:Ag e VWF:RCo) per VWD tipo 2M e 2A sono simili e la diagnosi differenziale è possibile eseguendo l'analisi dei multimeri (84). Sono stati anche segnalati diversi casi di pazienti VWD di tipo 2M con VWF:CB sproporzionatamente basso rispetto al VWF:Ag (47, 48).

VWD tipo 2N

Il VWD di tipo 2N è caratterizzato da una ridotta capacità del VWF di legarsi al FVIII. La prima descrizione di questa variante è stata fatta in un paziente della Normandia (di qui la denominazione N). In particolare, il FVIII:C è diminuito rispetto al livello normale del VWF:Ag e anche il pattern dei multimeri è normale. Pertanto, il VWD di tipo 2N può essere erroneamente diagnosticato come emofilia A lieve, sebbene la prima sia una malattia autosomica recessiva mentre quest'ultima viene ereditata come una malattia legata al cromosoma X.

La diagnosi differenziale viene fatta utilizzando un immunodosaggio in fase solida per valutare la capacità del VWF del paziente di legare il FVIII (VWF:FVIII:B) (56). In alternativa, è possibile eseguire l'analisi genetica di FVIII e VWF. A differenza del tipo 2B, del tipo 2M e della maggior parte delle varianti del tipo 2A, il tipo 2N VWD è ereditato con modalità autosomica recessiva.

VWD tipo 3

La VWD di tipo 3 è caratterizzata da assenza completa di VWF sia nel plasma che nelle piastrine (85). Il tipo 3 di VWD è ereditato come carattere recessivo e i parenti eterozigoti di solito presentano sintomi di sanguinamento lievi o nulli (86,87). I valori di VWF:Ag, VWF:RCo e VWF:CB sono <1 IU/dL e anche i livelli del FVIII:C sono molto bassi (<10 UI/dL) (88).

SINDROME DI VON WILLEBRAND ACQUISITA

La sindrome di von Willebrand acquisita (AVWS) è una rara malattia emorragica causata da alterazioni della concentrazione, della struttura o della funzione del VWF. L'AVWS si manifesta in individui senza precedente storia personale o familiare di sanguinamento. La sindrome è associata a malattie linfoproliferative o mieloproliferative, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni e cancro, e di solito si presenta negli anziani. I risultati degli esami di laboratorio nei pazienti con AVWS sono simili a quelli dei pazienti con VWD e possono includere valori diminuiti di VWF:Ag, VWF:RCo e FVIII:C. La distribuzione dei multimeri può essere normale, ma in alcuni pazienti potrebbero mancare gli HMWM (in analogia al difetto di tipo 2) (89, 90). L'aumento della clearance plasmatica del VWF è uno dei meccanismi patogenetici che sono stati proposti per spiegare il deficit di VWF nei pazienti con AVWS (58).

Alloanticorpi e autoanticorpi VWF

Alloanticorpi contro il VWF sono una complicanza rara, con una prevalenza stimata che va dal 5,8% al 9,5% dei pazienti VWD di tipo 3 (91-93). Non ci sono segnalazioni sullo sviluppo degli alloanticorpi anti-VWF nella VWD tipo 1 o tipo 2. I pazienti con alloanticorpi anti-VWF di solito non hanno risposta emostatica ai

concentrati di VWF somministrati. I pazienti che hanno sviluppato un inibitore, specialmente quelli con alloanticorpi anti-VWF ad alto titolo, possono presentare reazioni anafilattiche gravi o potenzialmente letali in caso di riesposizione al VWF. Questi casi sono caratterizzati dall'attivazione del sistema del complemento e dalla formazione del complesso immunitario (93).

Mentre gli alloanticorpi anti-VWF sono esclusivi per i pazienti VWD di tipo 3 ripetutamente esposti al VWF, gli autoanticorpi giocano un ruolo nella patogenesi di alcuni pazienti con AVWS, in particolare quelli con disturbi linfoproliferativi. Al contrario dell'emofilia acquisita, che è dovuta agli autoanticorpi neutralizzanti il FVIII, una varietà di meccanismi patogenetici possono causare alterazioni strutturali o funzionali del VWF nella AVWS. Questi meccanismi includono autoanticorpi, che interferiscono con il legame FVW-piastrina (94,95) o con il collagene (FVW-collagene) (96,97) o aumentano la clearance del VWF dal plasma del paziente (98).

Solo il 20% dei pazienti con AVWS ha autoanticorpi contro il VWF; i metodi disponibili potrebbero non essere adeguatamente sensibili per rilevare anticorpi o l'AVWS potrebbe non avere sempre una base autoimmune (4).

Tuttavia, la presenza di autoanticorpi anti-VWF, insieme a diatesi emorragica tardiva, storia familiare di sanguinamento negativo, risultati di laboratorio che mimano la VWD e la presenza di una patologia di base solitamente associata all'AVWS, supportano ulteriormente la diagnosi di AVWS. Inoltre, il monitoraggio dei livelli di autoanticorpi VWF e anti-VWF potrebbe aiutare i clinici nella verifica dell'efficacia del trattamento.

Esami per la rilevazione di alloanticorpi anti-VWF

Non esiste un approccio standard di laboratorio per l'identificazione degli alloanticorpi anti-VWF. Le analisi disponibili si basano sul principio di studi di miscela per dimostrare l'inibizione della funzione piastrinica del VWF, sebbene esistano raccomandazioni per valutare la funzione del VWF in modo più ampio (incluso il collagene e il legame al FVIII) (99).

Gli esami di miscela sono simili agli esami di Bethesda per la ricerca degli inibitori dei pazienti emofilici. Le attività del VWF sono valutate in una miscela di plasma del paziente e di un pool di plasmi normali (NPP) dopo 2 ore di incubazione a 37 °C. Il titolo di inibitore anti-VWF è calcolato dalla diluizione del plasma del paziente in grado di inibire il 50% del NPP diluito 1:2 rispetto alla miscela di controllo. Risultati negativi dell'esame di miscela non possono escludere completamente gli inibitori, poiché gli alloanticorpi potrebbero influire su regioni non funzionali della proteina VWF.

Esami per la rilevazione degli autoanticorpi anti-VWF

La presenza di autoanticorpi sembra essere associata a una più marcata tendenza al sanguinamento nei pazienti con AVWS (99-100). A differenza

dell'emofilia acquisita, che è sempre caratterizzata da autoanticorpi anti-FVIII neutralizzanti, nell'AVWS gli autoanticorpi contro il VWF sono raramente identificati con gli studi di miscela che rilevano l'attività funzionale del VWF. Questi esami potrebbero non riuscire a rilevare autoanticorpi a basso titolo, ma clinicamente importanti. Pertanto, gli studi di miscela sono raramente utili nella diagnosi clinica di AVWS. Tiede et al e Siaka et al hanno descritto due saggi ELISA, utilizzando VWF purificato legato alle piastre, per rilevare autoanticorpi anti-VWF (101, 102) indipendentemente dalla loro attività neutralizzante. Di recente, Franchi et al. (103) hanno descritto un nuovo approccio combinato (un saggio ELISA seguito da un esame di conferma) per rilevare autoanticorpi anti-VWF.

CONCLUSIONI

La diagnosi di laboratorio della VWD è oggi alla portata di laboratori non specialistici grazie anche alla introduzione di nuovi metodi implementati sui coagulometri di ultima generazione o grazie all'utilizzo di nuove tecnologie. L'approccio al paziente con sospetto di VWD non può prescindere da tappe di approccio graduale che prevedano uno screening preliminare, esami di primo e di secondo livello. Sia gli esami di primo che di secondo livello devono essere interpretati in maniera corretta tenendo in debito conto l'importante influenza che rivestono sia le variabili biologiche che le variabili pre-analitiche.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Von Willebrand E. Hereditar pseudoemofilia. Fin Lakaresallsk Handl 1926;68:87-112.
2. Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand Disease. *Thromb Haemost* 2000;84:160-74.
3. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2004;351:683-94.
4. Nichols WL, Hultin MB, James AH, et al. Von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 2008;14:171-232.
5. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987;69:454-59.
6. Battle J, Perez-Rodriguez A, Corrales I, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost* 2016;115:40-50.
7. Castaman G, Goodeve A, Eikenboom J. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Haematologica* 2013;98:667-74.
8. 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.
9. Jin SY, Skipwith CG, Zheng XL. Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood* 2010;115:2300-10.
 10. Fujimura Y, Fukui H, Usami Y, et al. Domain structure of human von Willebrand factor, and its modulators involved in the platelet adhesion process in vitro. *Rinsho Ketsueki* 1991;32:475-80.
 11. Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl 1):24-7.
 12. Meyer D, Girma JP. von Willebrand factor: structure and function. *Thromb Haemost* 1993;70:99-104.
 13. Pimanda J, Hogg P. Control of von Willebrand factor multimer size and implications for disease. *Blood Rev* 2002;16:185-92.
 14. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:217-46.
 15. Bonthron DT, Handin RI, Kaufman RJ, et al. Structure of prepro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature* 1986;324:270-3.
 16. Purvis AR, Sadler JE. A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization. *J Biol Chem* 2004;279:49982-8.
 17. Vischer UM, Wagner DD. von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood* 1994;83:3536-44.
 18. Luo GP, Ni B, Yang X, et al. von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis *Acta Haematol* 2012;128:158-69.
 19. Verweij CL. Biosynthesis of human von Willebrand factor. *Haemostasis* 1988;18:224-45.
 20. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, et al. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* 2009;324:1330-4.
 21. Lak M, Peyvandi F, Mannucci PM. Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2000;111:1236-9.
 22. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost* 2006;4:766-73.
 23. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8:2063-5.
 24. Elbatarny M, Mollah S, Grabell J, et al. Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the Merging Project. *Haemophilia* 2014;20:831-5.
 25. Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1990;16:1-20.
 26. Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, et al. Evaluation of the PFA-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1999;82:35-9.
 27. Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, et al. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost* 2004;2:892-8.
 28. Potgieter JJ, Damgaard M, Hillarp A. One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A. *Eur J Haematol* 2015;94:38-44.
 29. MacFarlane DE, Stibbe J, Kirby EP, et al. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* 1975;34:306-8.
 30. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, et al. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 2013;19:338-42.
 31. Bodo I, Eikenboom J, Montgomery R, et al. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015;13:1345-50.
 32. 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;7:1832-9.
 33. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood* 2010;116:280-6.
 34. Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Schlamadinger A, et al. Plasma glycoalbumin as a source of GPIIb/IIIa in the von Willebrand factor ristocetin cofactor ELISA. *Thromb Haemost* 2005;93:165-71.
 35. Federici 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. *Haematol* 2004;89:77-85.
 36. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, et al. Gain-of-function GPIIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood* 2011;117:e67-e74.
 37. Patzke J, Budde U, Huber A, et al. Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIIb binding in the absence of ristocetin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25:860-70.
 38. Geisen U, Zieger B, Nakamura L, et al. Comparison of von Willebrand factor (VWF) activity VWF:Ac with VWF ristocetin cofactor activity VWF:RCo. *Thromb Res* 2014;134:246-50.
 39. Pinol M, Sales M, Costa M, et al. Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. *Haematologica* 2007;92:712-3.
 40. Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2009;94:610-5.
 41. Pareti FI, Niiya K, McPherson JM, et al. Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J Biol Chem* 1987;262:13835-41.
 42. Flood VH, Schlauderer AC, Haberichter SL, et al. Crucial role for the VWF A1 domain in binding to type IV collagen. *Blood* 2015;125:2297-304.
 43. Morales LD, Martin C, Cruz MA. The interaction of von Willebrand factor-A1 domain with collagen: mutation G1324S (type 2M von Willebrand disease) impairs the conformational change in A1 domain induced by collagen. *J Thromb Haemost* 2006;4:417-25.
 44. Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (vWF:CBA): detection of von Willebrand disease (vWD), and discrimination of vWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000;83:127-35.
 45. Flood VH, Gill JC, Friedman KD, et al. Collagen binding provides a sensitive screen for variant von Willebrand disease. *Clin Chem* 2013;59:684-91.
 46. Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Von Willebrand disease. *Am J Hematol* 2017;92:114-8.
 47. Ribba AS, Loisel I, Lavergne JM, et al. Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb Haemost* 2001;86:848-54.

48. Riddell AF, Gomez K, Millar CM, et al. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor. *Blood* 2009;114:3489-96.
49. Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, et al. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 1980;302:1047-51.
50. Scott JP, Montgomery RR. The rapid differentiation of type IIb von Willebrand's disease from platelet-type (pseudo-) von Willebrand's disease by the "neutral" monoclonal antibody binding assay. *Am J Clin Pathol* 1991;96:723-8.
51. Caron C, Hilbert L, Vanhoorelbeke K, et al. Measurement of von Willebrand factor binding to a recombinant fragment of glycoprotein Ibalpha in an enzyme-linked immunosorbent assay- based method: performances in patients with type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2006;133:655-63.
52. Stufano F, Baronciani L, Pagliari MT, et al. Evaluation of a heterogeneous group of patients with von Willebrand disease using an assay alternative to ristocetin induced platelet agglutination. *J Thromb Haemost* 2015;13:1806-14.
53. Favaloro EJ, Patterson D, Denholm A, et al. Differential identification of a rare form of platelet-type (pseudo-) von Willebrand disease (VWD) from Type 2B VWD using a simplified ristocetin-induced-platelet agglutination mixing assay and confirmed by genetic analysis. *Br J Haematol* 2007;139:623-6.
54. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, et al. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest* 1985;76:1102-6.
55. Ott HW, Griesmacher A, Schnapka-Koepf M, et al. Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection. *Am J Clin Pathol* 2010;133:322-30.
56. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, et al. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 1989;74:1591-9.
57. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, et al. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 1988;71:1366-74.
58. Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, et al. Heterogeneity of Type I von Willebrand Disease: Evidence for a Subgroup with an Abnormal von Von Willebrand Factor. *Blood* 1985;66:796-802.
59. Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003;1:682-9.
60. Federici AB. The use of desmopressin in von Willebrand disease: the experience of the first 30 years (1977-2007). *Haemophilia* 2008;14Suppl1:5-14.
61. Mannucci PM, Franchini M, Castaman G, et al. Italian Association of Hemophilia Centers. Evidence-based recommendations on the treatment of von Willebrand disease in Italy. *Blood Transfus* 2009;7:117-26.
62. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, et al. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood* 2008;111:3531-9.
63. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood* 2006;108:3344-51.
64. Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, et al. Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance. *J Thromb Haemost* 2005;3:2228-37.
65. Habe K, Wada H, Ito-Habe N, et al. Plasma ADAMTS13, von Willebrand factor (VWF) and VWF propeptide profiles in patients with DIC and related diseases. *Thromb Res* 2012;129:598-602.
66. Casonato A, Daidone V, Padriani R. Assessment of von Willebrand factor propeptide improves the diagnosis of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:456-63.
67. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ Jr, et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987;69:1691-5.
68. Nitu-Whalley IC, Lee CA, Griffioen A, et al. Type 1 von Willebrand disease - a clinical retrospective study of the diagnosis, the influence of the ABO blood group and the role of the bleeding history. *Br J Haematol* 2000;108:259-64.
69. Sanders YV, Giezenaar MA, Laros-van Gorkom BA, et al. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype. *J Thromb Haemost* 2014;12:1066-75.
70. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, et al. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J* 2016;14:49 doi: 10.1186/s12959-016-0123-z.
71. Favaloro EJ, Nair SC, Forsyth CJ. Collection and transport of samples for laboratory testing in von Willebrand's disease (VWD): time for a reappraisal? *Thromb Haemost* 2001;86:1589-90.
72. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood* 2007;109:112-21.
73. Favaloro EJ. Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:299-319.
74. Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:106-12.
75. Lyons SE, Cooney KA, Bockenstedt P, et al. Characterization of Leu777Pro and Ile865Thr type IIA von Willebrand disease mutations. *Blood* 1994;83:1551-7.
76. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, et al. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID and IIE). *J Clin Invest* 1986;77:947-51.
77. Schneppenheim R, Brassard J, Krey S, et al. Defective dimerization of the von Willebrand factor subunits due to a Cys->Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3581-6.
78. Lynch CJ, Cawte AD, Millar CM, et al. A common mechanism by which type 2A von Willebrand disease mutations enhance ADAMTS13 proteolysis revealed with a von Willebrand factor A2 domain FRET construct. *PLoS One* 2017;12:e0188405.017.
79. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 2009;113:526-34.
80. Nishio K, Anderson PJ, Zheng XL, et al. Binding of platelet

- glycoprotein Ib to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:10578-83.
81. Weiss HJ, Meyer D, Rabinowitz R, et al. Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. *N Engl J Med* 1982;306:326-33.
 82. Miller JL, Castella A. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder. *Blood* 1982;60:790-4.
 83. Othman M, Kaur H, Emsley J. Platelet-type von Willebrand disease: new insights into the molecular pathophysiology of a unique platelet defect. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:663-73.
 84. Meyer D, Fressinaud E, Hilbert L, et al. Type 2 von Willebrand disease causing defective von Willebrand factor-dependent platelet function. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:349-64.
 85. Mannucci PM, Bloom AL, Larrieu MJ, et al. Atherosclerosis and von Willebrand factor. Prevalence of severe von Willebrand's disease in western Europe and Israel. *Br J Haematol* 1984;57:163-9.
 86. Baronciani L, Cozzi G, Canciani MT, et al. Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells, Mol & Dis* 2003;30:264-70.
 87. Mannucci PM, Lattuada A, Castaman G, et al. Heterogeneous phenotypes of platelet and plasma von Willebrand factor in obligatory heterozygotes for severe von Willebrand disease. *Blood* 1989;74:2433-6.
 88. Barbui T, Baudo F, Ciavarella N, et al. (Italian Working Group). Spectrum of von Willebrand's disease: a study of 100 cases. *Br J Haematol* 1977;35:101-12.
 89. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, et al. Acquired von Willebrand Syndrome: data from an International Registry. *Thromb Haemost* 2000;84:345-9.
 90. Veyradier A, Jenkins CS, Freissinaud E, et al. Acquired von Willebrand Syndrome: from Pathophysiology to Management. *Thromb Haemost* 2000;84:175-82.
 91. Mannucci PM, Federici AB. Antibodies to von Willebrand factor in von Willebrand disease. *Adv Exp Med Biol* 1995;386:87-92.
 92. Iorio A, Oliovecchio E, Morfini M, et al. Italian registry of haemophilia and allied disorders. Objectives, methodology and data analysis. *Haemophilia* 2008;14:444-53.
 93. James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 2013;122:636-40.
 94. Fricke WA, Brinkhous KM, Garris JB, et al. Comparison of inhibitory and binding characteristics of an antibody causing acquired von Willebrand syndrome: an assay for von Willebrand factor binding by antibody. *Blood* 1985;66:562-9.
 95. Mohri H, Tanabe J, Ohtsuka M, et al. Acquired von Willebrand disease associated with multiple myeloma; characterization of an inhibitor to von Willebrand factor BI. *Coag Fibrin* 1995;6:561-6.
 96. van Genderen PJJ, Vink T, Michiels JJ, et al. Acquired von Willebrand disease caused by an autoantibody selectively inhibiting the binding of von Willebrand factor to collagen. *Blood* 1994;84:3378-84.
 97. Guerin V, Ryman A, Velez F. Acquired von Willebrand disease: potential contribution of the von Willebrand factor collagen-binding to the identification of functionally inhibiting auto- antibodies to von Willebrand factor: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2008;6:1051-2.
 98. Mannucci PM, Lombardi R, Bader R, et al. Studies of the Pathophysiology of Acquired von Willebrand Disease in Seven Patients with Lymphoproliferative Disorders or Benign Monoclonal Gammopathies. *Blood* 1984;64:614-21.
 99. Berntorp E, Peake I, Budde U, et al. von Willebrand's disease: a report from a meeting in the Aland islands. *Haemophilia* 2012;18:1-13.
 100. Mohri H, Motomura S, Kanamori H, et al. Clinical significance of inhibitors in acquired von Willebrand syndrome. *Blood* 1998;91:3623-9.
 101. Tiede A, Priesack J, Werwitzke S, et al. Diagnostic workup of patients with acquired von Willebrand syndrome: a retrospective single-centre cohort study. *J Thromb Haemost* 2008;6:569-76.
 102. Siaka C, Rugeri L, Caron C, et al. A new ELISA assay for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2003;9:303-8.
 103. Franchi F, Biguzzi E, Stufano F, et al. A two-step approach (Enzyme-linked immunosorbent assay and confirmation assay) to detect antibodies against von Willebrand factor in patients with Acquired von Willebrand Syndrome. *Thromb Res* 2014;134:1316-22.