

**Función plaquetaria y diagnóstico
de enfermedad de von Willebrand**

**Platelet function tests and von Willebrand
disease diagnosis**

Tecnologías automatizadas para evaluar la actividad de cofactor de ristocetina del factor von Willebrand

**Automated technology to evaluate ristocetin
cofactor von Willebrand factor activity**

Duboscq C

Servicio de Hematología del Hospital Británico de Buenos Aires

cduboscq58@hotmail.com



**TOPICOS
DE LABORATORIO**

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 • Número Extraordinario
XII Congreso del Grupo CAHT: 156-163
Septiembre 2016

Palabras clave: Factor von Willebrand,
Cofactor de ristocetina automatizado,
Factor von Willebrand antigénico.

Keywords: Von Willebrand factor,
Ristocetin cofactor assay,
Automated methods.

La enfermedad de von Willebrand (EVW), descrita por Erik von Willebrand, es la alteración hemorrágica más frecuente^(1,2). Sus principales síntomas son sangrados mucocutáneos como epistaxis, del tracto gastrointestinal, gingivorragia, menorragia y excesivo sangrado post trauma o post cirugía. Esta enfermedad se debe a un defecto, cuali o cuantitativo de la molécula del factor von Willebrand (VWF)⁽¹⁻³⁾. El VWF es una proteína multimérica compuesta por subunidades idénticas que presentan varios dominios funcionales: dominio A1, que contiene el sitio de unión a la glicoproteína Ib (GPIb) plaquetaria; dominio A3, sitio de unión al colágeno, dominio C1, sitio de interacción con las integrinas y dominio D-D3, sitio de unión al FVIII⁽⁴⁾. Las principales funciones del VWF son promover la adhesión plaqueta-plaqueta y plaqueta sub endotelio (hemostasia primaria) así como unir y estabilizar al FVIII. La concentración plasmática de VWF está dada por un equilibrio complejo entre su velocidad de síntesis,

almacenamiento y secreción desde los gránulos de Weibel-Palade, la velocidad de proteólisis controlada por ADAMTS 13 y la velocidad de depuración⁽⁵⁾. Aquellas mutaciones que afectan estos procesos producen diferentes fenotipos de la enfermedad de von Willebrand. Además, existen muchos otros factores que influyen en la concentración de VWF como el estrés, la inflamación y el ejercicio físico, que producen aumento de los niveles plasmáticos de VWF, los cuales también aumentan fisiológicamente durante el embarazo. Los individuos del grupo sanguíneo 0 presentan valores de VWF significativamente menores que los no 0. Se ha reportado que los pacientes grupo 0 presentan una velocidad aumentada de depuración del VWF^(6,7). Algunas guías recomiendan la utilización de valores de referencia grupo sanguíneos específicos para el diagnóstico de esta enfermedad^(8,9).

La enfermedad de von Willebrand se clasifica en 6 tipos diferentes: tipo 1 (defecto parcial en la canti-

dad de VWF), tipo 3 (falta total de producción de VWF) y los tipos 2A, 2B, 2M y 2N (defectos cualitativos). Esta clasificación se basa en los hallazgos fenotípicos al medir los niveles de FVIII, VWF antigénico (VWF:Ag) y actividad de VWF, medida como cofactor de ristocetina (VWF:RCo) o ensayo de unión al colágeno (VWF:CB) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Nomenclatura para las actividades de FVIII y factor von Willebrand⁽⁴⁾

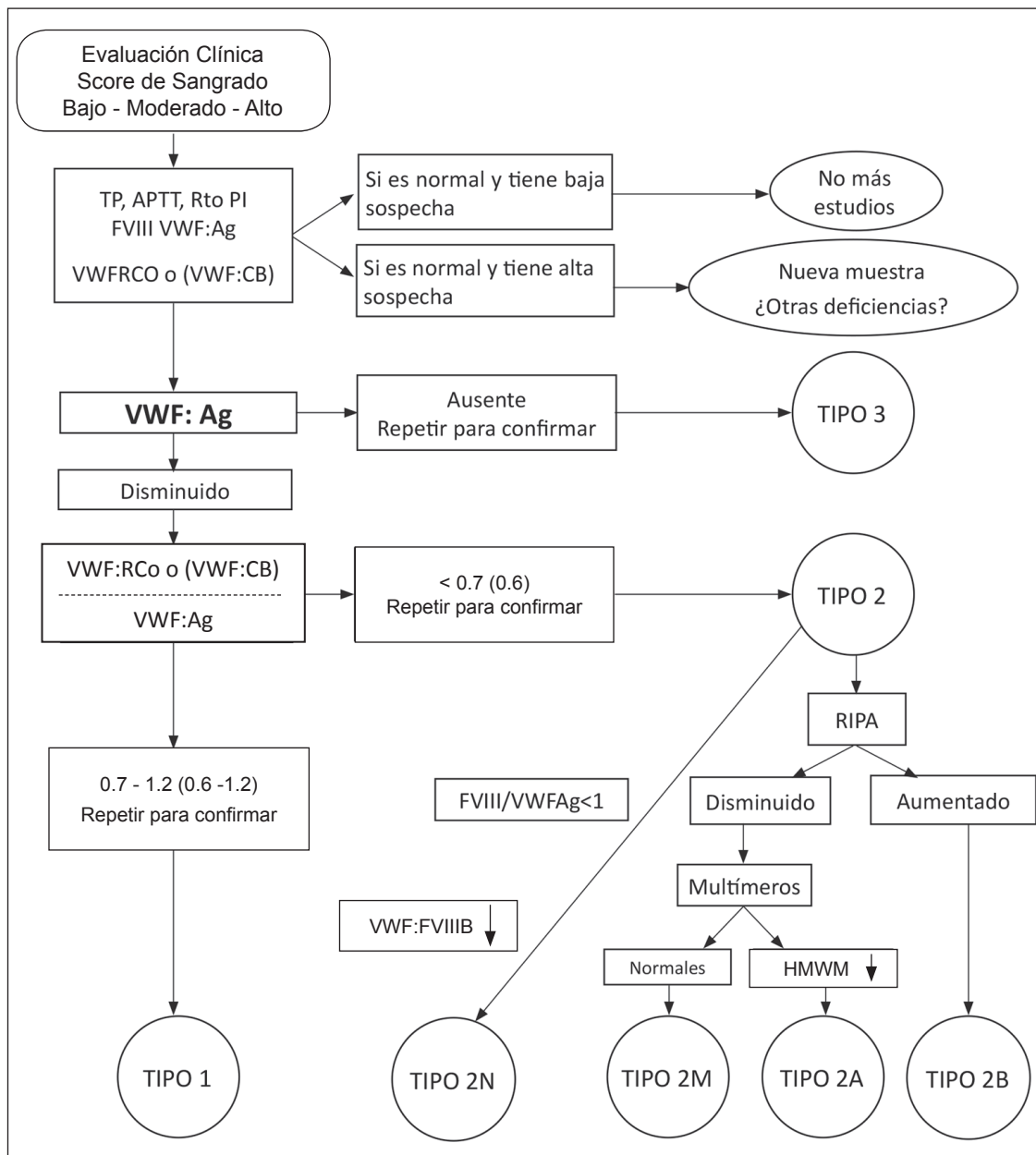
FVIII	Nomenclatura recomendada
FVIII proteína	FVIII
FVIII antígeno	FVIII:Ag
FVIII función	FVIII:C
Factor von Willebrand	Nomenclatura recomendada
Proteína madura	VWF
Antígeno	VWF:Ag
Actividad de cofactor de ristocetina	VWF:RCo
Capacidad de unión a colágeno	VWF:CB
Capacidad de unir FVIII	VWF:FVIII B

Así, si la razón VWF:RCo/VWF:Ag es < 0.7 (ó 0.6 para algunos autores) sugiere un defecto tipo 2 y si en cambio la razón VWF:RCo/VWF:Ag es > 0.7 (ó 0.6 para algunos autores) con Ag disminuido sugiere un defecto tipo 1⁽¹⁰⁾. Estas pruebas fenotípicas pueden ser complementadas con el análisis multimérico, la aglutinación inducida por ristocetina (RIPA), el ensayo de unión de FVIII (VWF:FVIII unión), la cuantificación del nivel de propéptido (VWF:pp) que está ligado a la producción de VWF y en algunos casos seleccionados el análisis genético. Como parte del diagnóstico de esta enfermedad es necesario que el paciente tenga una historia personal de sangrado, lo cual puede establecerse en forma estandarizada utilizando algún puntaje de sangrado^(10,11). Existen diversas causas por la que es difícil realizar el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand. Una de ellas es que los niveles plasmáticos de los individuos normales se solapan con los de los individuos afectados que presentan la enfermedad. Así, los métodos usuales para establecer los rangos de

referencia de los ensayos fenotípicos (por ej. media $\pm 2x$ desvío estándar) por definición adscribe aproximadamente 2,5 % de la población normal con valores bajos de VWF. Además, el VWF es una proteína reactante de fase aguda y se incrementa con el ejercicio físico, el estrés, la infección y en algunas patologías, por lo que es difícil la detección de niveles ligeramente disminuidos del factor. Por otro lado, como se verá más adelante, las metodologías utilizadas para el diagnóstico tienen alto límite de detección y alto CV en los rangos de baja actividad, lo cual dificulta el diagnóstico sobre todo de las formas más severas. Teniendo en cuenta estas variables y dependiendo de los resultados que se obtienen, pacientes con déficit leves del VWF tipo 1 pueden no ser identificados (falsos negativos), individuos con valores en el límite inferior normal podrían ser calificados como déficit de VWF (falsos positivos), mientras que los individuos tipo 3 podrían clasificarse erróneamente como tipo 1 ó tipo 2. El diagnóstico podría mejorarse incrementando el panel de pruebas, mejorando las metodologías utilizadas y respetando estrictamente la fase preanalítica^(8,10).

En resumen, para investigar la enfermedad de von Willebrand los laboratorios clínicos debe realizar las pruebas globales, tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activado, la actividad de FVIII, los niveles antigénicos y la actividad del VWF a través del ensayo con ristocetina y/o colágeno. (**Figura 1**)^(9,10,12,13).

Tener en cuenta que si el paciente presenta un APTT normal y tiene sospecha clínica alta o moderada se deben realizar las pruebas específicas para cuantificar el VWF. El tiempo de sangría, aún haciéndolo con los dispositivos recomendados, es poco reproducible y operador dependiente y no es buen predictor para la EVW tipo 1, incluso en algunas guías de diagnóstico ya no se lo menciona. La utilidad del PFA100/200 es discutida; el estudio multicéntrico Europeo sugiere que tiene alto valor predictivo negativo para excluir EVW, pero reportan que da normal en el VWF 2N. Sin embargo otros autores reportan que el PFA da normal en algunos individuos con EVW tipo 1 con niveles plasmáticos entre 30 y 50 %⁽¹⁴⁾.

Figura 1. Algoritmo de diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand

Existen desórdenes adquiridos que mimetizan la enfermedad de von Willebrand a los que el von Willebrand factor Subcommittee de la ISTH ha denominado síndrome de factor von Willebrand adquirido (AVWS). En la mayoría de los pacientes con síndrome de VW adquirido, a excepción de los pacientes hipotiroideos quienes exhiben un descenso en la síntesis del factor, el VWF es sintetizado normalmente. Los niveles bajos de VWF se deben a su remoción acelerada del plasma para la cual se han sugerido cuatro mecanismos fisiopatológicos: a) autoanti-

cuerpos específicos o no específicos que forman complejos inmunes que contienen VWF inactivo, resultando en descenso de actividad y de concentración antigénica; b) absorción de VWF en las células malignas; c) pérdidas de los multímeros de alto peso molecular bajo condiciones de alto shear stress. En estos dos últimos casos se produce un descenso de la actividad del VWF permaneciendo el nivel antigénico prácticamente normal y d) incremento de la degradación proteolítica de la molécula de VW lo cual ocurre en numerosas situaciones clínicas en las

cuales existen proteasas circulando. Ninguno de los mecanismos propuestos parece ser enfermedad específica y el mismo mecanismo podría ser responsable del AVWS en diferentes enfermedades^(8,15).

El diagnóstico del AVWS está basado en las mismas pruebas diagnósticas que se utilizan para el estudio del déficit congénito en individuos sin historia de sangrado ni antecedentes familiares. Siempre se deben realizar las pruebas para excluir la presencia de anticuerpos, midiendo la actividad de von Willebrand en los experimentos de mezcla de volúmenes iguales de plasma de paciente y plasma normal incubado a 37 °C entre 1 y 4 horas. Se ha desarrollado recientemente un kit de ELISA para medir anticuerpos anti VWF pero aún no ha sido estandarizado.

Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand

Variables preanalíticas. Se debe realizar un estricto control de las variables preanalíticas⁽¹⁶⁾. Es recomendable que el paciente no realice ejercicio la noche previa y la mañana en que se realiza el estudio.

Determinación de factor VIII. La determinación de FVIII se realiza habitualmente por ensayo coagulable en una etapa. La recomendación internacional es realizar el dosaje en tres diluciones para disminuir el CV del ensayo^(17,18). La curva de calibración debe realizarse con un calibrador calibrado frente a un estándar internacional de FVIII y se debe realizar en batch cuando se utilizan curvas en coagulómetros automáticos o semiautomáticos de tres puntos o cuando el control lo requiera; en curvas con más puntos se debe recalibrar por cambio de lotes de reactivos o cuando el control interno lo indique. La muestra debe procesarse antes de 4 hs de extraída. También podría realizarse el dosaje de FVIII por técnicas cromogénicas.

Determinación del VWF:Ag

Los niveles de VWF:Ag fueron inicialmente determinados por técnicas de ELISA, actualmente se realizan por ensayos inmunoturbidimétricos (VWF-LIA) automatizados con Ac monoclonales o el sistema ELFA (BioMerieux –VIDAS) que han demostrado ser confiables y más rápidos. Se han reportado CV menores de 10 % para los distintos métodos turbidimétricos en los programas de evaluación externa y existen reportes de que los VWF-LIA tienden a sobreestimar el valor de VWF antigénico respecto a lo hallado por ELISA, en especial en presencia del

factor reumatoideo. Estos métodos antigénicos difieren más a concentraciones bajas de VWF^(9,19).

Niveles bajos de VWF:Ag sugieren la EVW pero no distinguen los subtipos, por lo cual es necesario determinar también la funcionalidad del VWF para completar el diagnóstico^(8,9,12,13).

Determinación de la actividad del factor von Willebrand

Estas técnicas examinan la habilidad del VWF para unirse a la GPIb plaquetaria o al colágeno. Si bien ambas pruebas exploran diferentes aspectos de la función del VWF, ambas son sensibles a la pérdida de los multímeros de alto peso molecular.

Investigación de la unión del VWF a la glicoproteína Ib plaquetaria

El método de referencia para estudiar la función del VWF es el ensayo del cofactor de ristocetina (VWF:RCo), basado en la habilidad de VWF para inducir la aglutinación de las plaquetas en presencia de ristocetina monitoreada en un agregómetro. Los dímeros de ristocetina se unen a la molécula de VWF induciendo un cambio conformacional que facilita la unión del mismo al complejo glicoproteico Ib-IX-V de la membrana plaquetaria *in vitro*, reconociendo la presencia de los multímeros de alto peso molecular y de la integridad del sitio de unión a GPIb⁽⁸⁻¹⁰⁾. Hay que tener en mente que utilizar ristocetina en lugar del shear stress para inducir la unión del VWF a las GPIb no es fisiológico. Así, variaciones en las secuencias (por ejemplo p.P1467S y el alelo H de pD1472H), que afectan los sitio de unión a ristocetina del dominio A1, podrían conducir a estimar niveles bajos de VWF:RCo en ausencia de un real defecto fisiológico del VWF⁽¹⁹⁾.

El método tradicional por agregometría consiste en enfrentar plasma del paciente con plaquetas normales (lavadas y fijadas en formol o liofilizadas) y ristocetina, monitoreando la aglutinación a través de la transmisión de luz en un agregómetro. La velocidad de reacción (pendiente de la curva de agregación) se compara contra la de un calibrador. Es un método muy laborioso y variable con un CV entre 15 a 25 %; además tiene un límite de detección entre 15 y 20 IU/dL según diversos reportes^(9,10,12). El problema más importante quizás sea su baja reproducibilidad con altos CV inter ensayo e inter laboratorio según lo muestran los distintos programas de evaluación externa de la calidad⁽¹⁹⁾.

Por estos inconvenientes, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para estudiar la funcionalidad de esta molécula. El *VWF Subcommittee of the Standardization and Scientific Committee (SSC) of the ISTH* desarrolló las guías para establecer qué función del VWF mide cada ensayo y como debería nombrarse cada uno (**Tabla 2**)⁽²¹⁾.

Tabla 2. Nomenclatura aprobada para los distintos ensayos de actividad del VWF, adaptado de las guías del VWF Subcommittee of the Standardization and Scientific Committee (SSC) of the ISTH⁽²⁰⁾

Abreviatura para ensayos de actividad de VWF	Descripción
VWF:RCo	Actividad de cofactor de ristocetina: todos los ensayos que usan plaquetas y ristocetina.
VWF:GPIbR	Todos los ensayos que están basados en la unión inducida por ristocetina del VWF a un fragmento no mutado de GPIb.
VWF:GPIbM	Todos los ensayos basados en la unión espontánea del VWF a un fragmento de GPIb con ganancia de función.
VWF:Ab	Todos los ensayos basados en la unión de un anticuerpo monoclonal a un epítopo del dominio A1 del VWF

Los ensayos de actividad de cofactor de ristocetina (VWF:RCo) son aquellos que utilizan plaquetas (nativas, fijadas en formol o liofilizadas) y ristocetina. Esta guía los clasifica en: ensayos VWF:RCo de primera generación (manual), de segunda generación (semiautomáticos), de tercera y cuarta generación (totalmente automatizados) y VWF:RCo por citometría de flujo.

Determinación de VWF: RCo por quimioluminiscencia. El reactivo consiste en un fragmento de la G1b alfa inmovilizada a una fase sólida por unión a un Ac monoclonal y un segundo Ac monoclonal anti VWF conjugado con isoluminol. Este ensayo se automatiza en el sistema AcuStar (Instrumentation Laboratory). Se ha reportado que este ensayo tiene un menor límite de detección y correlaciona bien

con la prueba tradicional⁽²²⁾. La propuesta de ISTH es llamarlo ensayo de unión a GPIb inducido por ristocetina (VWF:GPIbR)⁽²¹⁾.

Determinación por inmunoturbidimetría de la actividad del VWF (INNOVANCE VWFAC, Siemens). El reactivo consiste en partículas de poliestireno recubiertas con un anticuerpo anti GPIb que son puestas en contacto con una GPIb mutada con ganancia de función que es capaz de unirse al VWF en ausencia de ristocetina. Diversos autores han reportado que este método tiene buena reproducibilidad y precisión, originando resultados comparables con el método de referencia en el rango 5-150 UI/dl en diferentes coagulómetros automáticos^(23,24). Los CV en los programas de evaluación externo reportados están alrededor de 10 %. La guía de la ISTH sugiere el nombre de ensayos de unión a la GPIb mutada con ganancia de función VWF:GPIbM⁽²¹⁾.

Determinación por inmunoturbidimetría de la actividad VWF (VWF HemosIL Activity, Instrumentation Laboratory). El reactivo consiste en partículas de látex recubiertas por un Ac monoclonal dirigido contra el sitio de la molécula de VWF responsable de la unión a la glicoproteína Ib plaquetaria. El grado de aglutinación del reactivo de látex es directamente proporcional a la actividad del VWF en la muestra y se mide por el descenso de la transmitancia. En trabajos previos hemos encontrado, en concordancia con otros autores, una buena correlación ($R > 0.92$) entre este método y el VWF:RCo por agregación en el plasma de 112 individuos cuya actividad estaba entre 12 a 185 %⁽²⁵⁻²⁷⁾. El CV intraensayo para el control normal fue de 4.2 % y para el control patológico 3,7 %⁽²⁵⁾. Sin embargo, diversos autores sugieren que esta determinación no es lo suficientemente confiable para reemplazar al VWF:RCo y otros sugieren utilizarla como *screening*⁽²⁶⁻²⁸⁾. Este ensayo reporta la unión del dominio A1 del VWF a un anticuerpo monoclonal y no a la GPIb, existen dudas acerca de si el anticuerpo es capaz de recrear la superficie de la GPIb. Los CV de los programas externos de calidad están alrededor del 15 %. Se sugiere nombrarlo como VWF:Ab⁽²¹⁾.

Determinación de VWF:RCo por citometría de flujo. Una mezcla de fluorocromo verde y rojo con plaquetas fijadas en formol se incubó con plasma del paciente en presencia de ristocetina. Se ha reportado que este método es simple, preciso y reproducible y

muy sensible en la EVW tipo 2, el inconveniente es que hay que disponer de un citómetro⁽²⁹⁾.

Determinación inmunoturbidimétrica de VWF:RCo (HemosILVWF:RCo, Instrumentation Laboratory). Es una prueba recientemente desarrollada en la cual el reactivo consiste en partículas de látex recubiertas con GPIb recombinante capturadas con Ac monoclonal que orienta la GPIb alfa recombinante a interactuar con el VWF en presencia de ristocetina. Este método recibe el nombre de ensayo de unión a GPIb desencadenada por ristocetina (nombre recomendado VWF:GPIbR).

Se ha reportado que este método muestra buena linealidad hasta 130 UI/dL, con un CV de 4 % para el control normal y 2,68 % para el control patológico. Ha demostrado ser un método preciso y sensible para detectar la actividad de VWF, además de presentar una buena concordancia con el método tradicional^(30,33). En nuestra experiencia la precisión interensayo para el control normal fue 3,2 % y para el control patológico 5.1%.

Comparando muestras de 60 pacientes y considerando un error total permitido de 15 %, los resultados obtenidos por este método y por el método VWF:actividad fueron estadísticamente equivalentes en el rango evaluado (10-168 % de actividad). Cuando se compararon los resultados de 30 pacientes obtenidos por el VWF:RCo por inmunoturbidimetría con el método tradicional por agregometría, se obtuvo una buena correlación ($r=0.90$). El sesgo obtenido fue de 18.9 %, pero considerando un error total permitido de 15 %, los resultados obtenidos por ambas metodologías fueron estadísticamente comparables⁽³²⁾.

Ensayo de unión al colágeno

Existen ELISAs que permiten medir la unión del VWF del paciente a colágeno inmovilizado. Esta unión depende de la presencia de los multímeros de alto peso molecular y de que el sitio de unión al colágeno esté intacto. Los ensayos que utilizan colágeno tipo III o mezclas de colágeno tipo I/III son los que han demostrado tener mayor sensibilidad^(8,9,33,34). En resumen, las tecnologías automatizadas, desarrolladas y mejoradas en los últimos años para la detección de la actividad del VWF, tienen un menor CV y menor límite de detección, y lentamente están reemplazando al método tradicional según los programas de evaluación externa de calidad. Es necesaria

mayor experiencia en su utilización para establecer claramente cuáles son sus limitaciones y su verdadero desempeño^(35,36). Finalmente, la sugerencia de las guías internacionales para el diagnóstico de la enfermedad es establecer la historia personal o familiar de sangrado con un puntaje, realizar un panel amplio con las pruebas FVIII, VWF:Ag, VWF:RCo y VWF:CB y confirmar el diagnóstico, tanto positivo como negativo, en al menos dos oportunidades. El hallazgo de algunos resultados de estos ensayos disminuidos, sin historia previa de sangrado, debería ser considerado como AVWS^(8,9,10,35,36).

Declaración de conflictos de interés:

La autora declara haber recibido honorarios como asesora científica de WM Argentina para productos IL.

Bibliografía

1. Koutts J. A short history of diagnostic tests for von Willebrand disease: in memory of Barry Firkin (1930 to 2001) and Ted Zimmerman (1937 to 1988). *Semin Thromb Hemost.* 2006 Jul;32 (5):445-55.
2. Berntorp E, Peake I, Budde U y col. Willebrand's disease: a report from a meeting in the Åland islands. *Haemophilia.* 2012 Sep;18 Suppl 6:1-13.
3. Sadler JE. von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1702-9.
4. Goodeve AC, Eikenboom JC, Ginsburg D et al. ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 2001 May;85(5):929-31.
5. de Groot R, Lane DA, Crawley JT. The role of the ADAMTS13 cysteine-rich domain in VWF binding and proteolysis. *Blood.* 2015 Mar 19;125(12):1968-75.
6. Albáñez S, Ogiwara K, Michels A y col. Aging and ABO blood type influence VWF and FVIII levels through interrelated mechanisms. *J Thromb Haemost.* 2016 May;14(5):953-63.
7. Rabinovich O, Duboscq C, Stemmelin G y col. Relación entre los grupos ABO y los niveles plasmáticos de factor VIII y Factor Von Willebrand. Efecto sobre la preparación de crioprecipitado. *Revista Argentina de Transfusión.* 2008; 34:51-56.

8. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS y col. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization Guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2014 Nov;167(4):453-65.
9. Assays factor von Willebrand Antigen and Ristocetin Cofactor Activity H51- A. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute 2002.
10. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC y col. Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost.* 2006 Oct;4(10):2103-14.
11. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Bleeders, bleeding rates, and bleeding score. *J Thromb Haemost.* 2013 Jun;11 Suppl 1:142-50.
12. Favaloro EJ. Laboratory identification of von Willebrand disease: technical and scientific perspectives. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Jul;32(5):456-71.
13. Adcock DM, Bethel M, Valcour A. Diagnosing von Willebrand disease: a large reference laboratory's perspective. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Jul;32(5):472-9.
14. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G y col. Impact of plasma von Willebrand factor levels in the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMMDM-1VWD). *J Thromb Haemost.* 2007 Apr;5(4):715-21.
15. Tiede A. Diagnosis and treatment of acquired von Willebrand syndrome. *Thromb Res.* 2012 Dec;130 Suppl 2:S2-6.
16. Kordich L. Calidad Preanalítica Analítica en el laboratorio de Hemostasia en Fundamentos para el Manejo Práctico del Laboratorio de Hemostasia. Grupo CAHT. Editores en Jefe Kordich L. y Blanco A. Buenos Aires, Segunda Edición 2013.
17. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol.* 2013 Feb;35(1):1-13.
18. CLSI.H48-Determination of Coagulation Factor Activities Using the One-Stage Clotting Assay, 2nd Edition H48-A Approved Guideline March 2016.
19. Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J y col. Quality Assurance Program in Haematology Haemostasis Committee. Laboratory diagnosis of von Willebrand disorder. Current practice in the southern hemisphere. *Am J Clin Pathol.* 2003;119:882-893.
20. Flood VH, Friedman KD, Gill JC y col. Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *J Thromb Haemost.* 2009 Nov;7(11):1832-9.
21. Bodó I, Eikenboom J, Montgomery R y col. von Willebrand factor Subcommittee of the Standardization and Scientific Committee of the International Society for Thrombosis and Haemostasis Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015 Jul;13(7):1345-50.
22. Verfaillie CJ, De Witte E, Devreese KM. Validation of a new panel of automated chemiluminescence assays for von Willebrand factor antigen and activity in the screening for von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol.* 2013 Oct;35(5):555-65.
23. Dong J, Schade AJ, Romo GM y col. A. Novel gain-of-function mutations of platelet glycoprotein IB alpha by valine mutagenesis in the Cys209-Cys248 disulfide loop. Functional analysis under static and dynamic conditions. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27663-7.
24. Martinuzzo M, Barrera L, Ujhelly C y col. Validación de una técnica de actividad de factor von Willebrand que utiliza glicoproteína Ib mutada. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2014;48(2):243-8.
25. Duboscq C, Martinuzzo M, Cerrato G y col. Validación del método inmunoturbidimétrico para determinar la actividad de factor von Willebrand frente a la agregometría. VIII Congreso Argentino de la Calidad en el Laboratorio Clínico Buenos Aires 2010. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica.* 2010, 44 Supp 3:554 P69.
26. Sucker C, Senft B, Scharf RE, Zotz RB. Determination of von Willebrand factor activity: evaluation of the HaemosIL assay in comparison with established procedures. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006 Jul;12(3):305-10.
27. De Vleeschauwer A, Devreese K. Comparison of a new automated von Willebrand factor activity assay with an aggregation von Willebrand ristocetin cofactor activity assay for the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2006 Jul;17(5):353-8.
28. Favaloro EJ, Bonar R, Chapman K, Meiring M, Funk Adcock D. Differential sensitivity of von Willebrand factor (VWF) 'activity' assays to large and small VWF molecular weight forms: a cross-laboratory

- study comparing ristocetin cofactor, collagen-binding and mAb-based assays. *J Thromb Haemost.* 2012 Jun;10(6):1043-54.
29. Chen D, Daigh CA, Hendricksen JI y col. A highly-sensitive plasma von Willebrand factor ristocetin cofactor (VWF:RCo) activity assay by flow cytometry. *J Thromb Haemost.* 2008 Feb;6(2):323-30.
30. Strandberg K, Lethagen S, Andersson K y col Evaluation of a rapid automated assay for analysis of von Willebrand ristocetin cofactor activity. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006 Jan;12 (1):61-7.
31. Lasne D, Dey C, Dautzenberg MD y col. Screening for von Willebrand disease: contribution of an automated assay for von Willebrand factor activity. *Hæmophilia.* 2012 May;18(3):e158-63.
32. Dubosq C, Martinuzzo M, Ceresetto J y col. Validación de un nuevo ensayo automatizado para determinar la actividad de cofactor de ristocetina del factor von Willebrand. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 2016 , Vol 50 Nro 2 (en prensa).
33. Favalaro EJ. An update on the von Willebrand factor collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Nov;33(8):727-44.
34. Flood VH, Gill JC, Christopherson PA et al. Comparison of type I, type III and type VI collagen binding assays in diagnosis of von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2012 Jul;10(7):1425-32.
35. Favalaro EJ. Rethinking the diagnosis of von Willebrand disease. *Thromb Res.* 2011 Jan;127 Suppl 2:S17-21.
36. Favalaro EJ. Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of the differential utility of various functional von Willebrand factor assays. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011 Oct;22(7):553-64.