

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 09.09.2020
Принята к печати 30.10.2020

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-102-106

Результаты расширенного фенотипирования болезни Виллебранда в рамках программы дистанционной диагностики у детей

А.В. Полетаев¹, Е.А. Серегина^{1, 2}, А.В. Пшонкин¹, Н.А. Карамян¹, Д.В. Федорова¹, П.А. Жарков¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Контактная информация:

Полетаев Александр Владимирович,
заведующий лабораторией клинического гемостаза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: poletaev_alexandr@mail.ru

В ходе ранее проведенного нами анализа в рамках программы дистанционной диагностики болезни Виллебранда (БВ) было выявлено 16 образцов крови, требующих расширенной диагностики в целях уточнения конкретного подтипа заболевания. Цель исследования: провести расширенное фенотипирование образцов крови пациентов с подозрением на 2-й тип БВ. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. С использованием 16 алиquotированных замороженных образцов выполнены исследования коллаген-связывающей (vWF:CB) и fVIII-связывающей активности фактора Виллебранда (vWF) (vWF:fVIIIb), а также мультимерный анализ vWF (MA). У 7 (44%) из 16 пациентов с первоначальным снижением соотношения активности fVIII к антигену vWF не было выявлено лабораторных признаков подтипа 2N БВ и был диагностирован изолированный дефицит fVIII. У оставшихся 9 пациентов оценена vWF:CB, которая показала снижение связи с коллагеном у 6 пациентов, что позволяет заподозрить тип 2A или 2B. У оставшихся 3 больных с нормальной vWF:CB заподозрен тип 2M. MA дополнительно помог выделить пациентов с подозрением на тип 2B БВ. Применение технологий дистанционной диагностики позволяет проводить фенотипирование большинства форм БВ даже у пациентов, проживающих в отдаленных регионах с ограниченными лабораторными возможностями.

Ключевые слова: болезнь Виллебранда, дети, фактор, диагностика, геморрагический синдром

Полетаев А.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (4): 102–106. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-102-106

Results of extended phenotyping of von Willebrand disease in the remote diagnostic program in children

A.V. Poletaev¹, E.A. Seregina^{1, 2}, A.V. Pshonkin¹, N.A. Karamyan¹, D.V. Fedorova¹, P.A. Zharkov¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

In the course of our earlier data obtained in remote diagnosis of von Willebrand disease (vWD) program, 16 samples were identified for extended laboratory work up in order to clarify a specific subtype of vWD. Purpose of the study: extended phenotyping of blood samples with suspected type 2 vWD. This study is supported by the Independent Ethics Committee and approved by the Academic Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. Using 16 aliquoted frozen samples, collagen-binding (vWF:CB) and fVIII-binding activity of vWF (vWF:fVIIIb) tests were performed, as well as multimeric analysis of vWF. Isolated fVIII deficiency with no laboratory signs of 2N vWD subtype were detected in 7 (44%) of 16 patients with an initial decrease in the ratio of fVIII activity to vWF antigen. In the remaining 9 patients, vWF:CB was assessed, which showed a decrease in association with collagen in 6 patients, which allows one to suspect type 2A or 2B. In the remaining 3 with normal vWF:CB patients, type 2M was suspected. MA helped to further identify patients with suspected type 2B vWD. The use of remote diagnostics technologies allows phenotyping most forms of vWD even in patients living in regions with limited laboratory capabilities.

Key words: von Willebrand disease, children, factor, diagnosis, hemorrhagic syndrome

Poletaev A.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (4): 102–106. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-102-106

Фактор Виллебранда (von Willebrand factor, vWF) представляет собой мультимерный протеин, синтезируемый эндотелиоцитами и мегакариоцитами. vWF осуществляет опосредованное взаимодействие тромбоцитов с субэндотелиальными структурами и между собой, которое особенно важно в условиях потока крови с высокой скоростью сдвига, а также связывание с молекулой

коагуляционного фактора VIII (fVIII), что защищает последний от преждевременного протеолиза в кровотоке и создает условия для реализации его коагулянтного потенциала в месте роста тромботического тромба [1–3]. Нарушения функциональной активности vWF можно разделить на количественные, при которых наблюдается частичный (1-й тип болезни Виллебранда (БВ)) или полный (3-й тип БВ) дефицит

vWF, и качественный дефект vWF (2-й тип БВ), при котором нарушается мультимерный состав или способность связывать тромбоциты или fVIII [4]. Учитывая многофункциональность vWF, особого интереса заслуживает поиск конкретного функционального дефекта, который опосредует те или иные геморрагические проявления и имеет значение в прогнозе заболевания [5–7]. Ранее мы сообщали о первых результатах дистанционной диагностики БВ у детей, где в уточнении типа заболевания нуждались 16 пациентов [8]. Настоящее исследование предусматривает дальнейшую диагностику образцов крови в целях уточнения подтипа заболевания у пациентов с подозрением на 2-й тип БВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Руководствуясь представленным ранее алгоритмом, в результате первичного анализа 72 образцов периферической крови лабораторная картина, характерная для БВ, была выявлена у 18 пациентов [8]. При проведении типирования в соответствии с клиническими рекомендациями [9–11] 1-й тип БВ устанавливался на основании пропорционального снижения антигена vWF (vWF:Ag) и ристоцетин-кофакторной активности vWF (vWF:RCo) на фоне снижения последней менее 30%. Данным критериям соответствовал 1 образец крови [8]. Второй тип подозревался при снижении отношения активности vWF к количеству менее 0,7 (подтипы 2А, 2В и 2М) или fVIII к vWF:Ag менее 0,6 [9] и был выявлен в 16 случаях [8]. К 3-му типу, для которого характерно практически полное отсутствие vWF (< 5%) [4], относился 1 образец крови [8]. Кроме того, было получено 6 образцов крови с изолированным снижением активности fVIII без конкурентного дефицита/

дефекта vWF, у 1 пациента снижение активности fVIII было непропорционально снижению уровня vWF:Ag [8]. Таким образом, в целях выявления подтипа 2-го типа БВ дальнейшему анализу было подвергнуто 16 образцов крови.

Лабораторная диагностика

Учитывая невозможность диагностики подтипа 2В БВ в рамках текущей программы [8], дальнейшее типирование было направлено на диагностику подтипов 2А, 2М и 2Н.

Для установления подтипов 2-го типа БВ на базе лаборатории клинического гемостаза ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России из замороженных аликвотированных образцов бедной тромбоцитами плазмы были выполнены исследования коллаген-связывающей активности vWF (vWF:CB; Diagnostica Stago S.A.S, France), fVIII-связывающей активности vWF (vWF:fVIIIb; Diagnostica Stago S.A.S, France), а также проведен мультимерный анализ vWF (МА; Hydragel 5 von Willebrand, Sebia, France).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У 7 из 16 пациентов было выявлено снижение соотношения активности fVIII к vWF:Ag, что требовало исключения подтипа 2Н БВ. Образцы крови данных пациентов были подвергнуты исследованию vWF:fVIIIb. Все полученные результаты анализа находились в пределах референсного интервала и представлены в *таблице 1*.

В ходе дальнейшего анализа у 9 пациентов со снижением соотношения vWF:RCo/vWF:Ag было проведено исследование vWF:CB. Снижение vWF:CB было отмечено в 6 из 9 образцов крови, что свидетельствовало в пользу подтипа 2А или 2В БВ. У оставшихся 3 пациентов с нормальной vWF:CB и нарушенным соотношением vWF:RCo/vWF:Ag было заподозрено нарушение связывания молекулы vWF и

Таблица 1

Демографические данные и результаты лабораторных тестов проб пациентов с подозрением на подтип 2Н БВ

Table 1

Demographic and laboratory data of samples from patients with suspected von Willebrand disease (vWD) type 2N

№	Пол Sex	Возраст Age	Группа крови Blood group	vWF:Ag	vWF:RCo	vWF:RCo/ vWF:Ag	fVIII	fVIII/ vWF:Ag	vWF:fVIII B
1	м m	2 года 2 y.o.	O(I) Rh+	39	30,3	0,78	3,8	0,10	97
2	м m	5 лет 5 y.o.	A(II) Rh+	62	61,8	1,00	8,8	0,14	89,2
3	м m	8 лет 8 y.o.	O(I) Rh+	72,2	62,6	0,87	26,5	0,37	91,3
4	м m	7 лет 7 y.o.	O(I) Rh+	71,3	74	1,04	8,5	0,12	101,7
5	м m	19 месяцев 19 months	A(II)Rh+	106,4	75,2	0,71	7,3	0,07	97,6
6	м m	7 лет 7 y.o.	A(II) Rh+	98,8	76,7	0,78	10,1	0,10	104,9
7	м m	10 лет 10 y.o.	O(I) Rh+	115,6	95,9	0,83	3	0,03	93,8

Примечание. м – мужской.

Note. m – male; vWF:Ag – von Willebrand factor (vWF) antigen; vWF:RCo – ristocetin cofactor activity; fVIII – coagulation factor VIII; vWF:fVIIIb – fVIII-binding activity of vWF.

Таблица 2

Демографические данные и результаты лабораторных тестов проб пациентов с подозрением на подтипы 2A, 2B и 2M БВ

Table 2

Demographic and laboratory data of samples from patients with suspected vWD type 2A, 2B or 2M

№	Пол Sex	Возраст Age	Группа крови Blood group	vWF:Ag	vWF:RCo	vWF:Rco/ vWF:Ag	fVIII	vWF:CB
1	м m	14 лет 14 y.o.	B(III)Rh+	23,3	1,6	0,07	45,9	26,7
2	ж f	6 месяцев 6 months	B(III)Rh+	186,8	24,4	0,13	240,8	55,6
3	м m	9 лет 9 y.o.	O(I) Rh+	13,2	5,6	0,42	48	29,4
4	ж f	16 лет 16 y.o.	O(I)Rh+	16,5	6,3	0,38	27,2	10,1
5	м m	8 лет 8 y.o.	A(II) Rh+	30,2	15,3	0,51	43,3	30,6
6	м m	6 лет 6 y.o.	A(II) Rh+	43,1	5,9	0,14	45,1	2,3
7	м m	15 лет 15 y.o.	O(I) Rh+	16,7	5,3	0,32	18,3	41,7
8	м m	15 лет 15 y.o.	O(I)Rh-	35,7	6,9	0,19	101,4	54,2
9	м m	5 лет 5 y.o.	O(I) Rh+	34,3	22,3	0,65	55,6	85,5

Примечание. м – мужской; ж – женский.

Note. m – male; f – female; vWF:Ag – von Willebrand factor (vWF) antigen; vWF:RCo – ristocetin cofactor activity; fVIII – coagulation factor VIII; vWF:CB – collagen-binding activity of vWF.

тромбоцитарного рецептора vWF, которое наиболее характерно для подтипа 2M БВ (таблица 2).

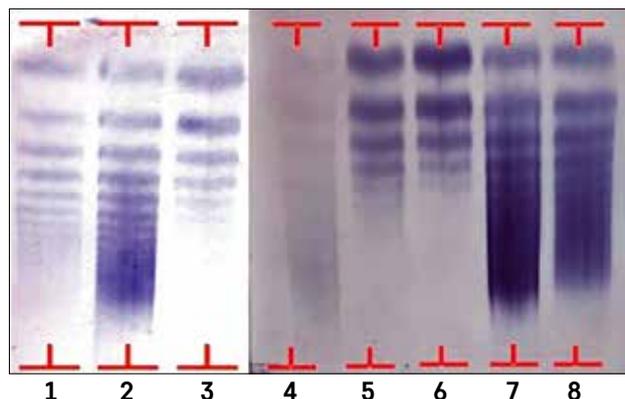
Для дальнейшей характеристики подтипа 6 пациентам со сниженным соотношением vWF:RCo/vWF:Ag (пациенты №1–6) было проведено исследование мультимерного профиля vWF, что позволило визуализировать его качественный состав и подтвердить результаты исследования vWF:CB (рисунок) [12].

На основании проведенного МА было выявлено изолированное снижение высокомолекулярных изоформ vWF у пациентов №3 и №5, у пациента №6 отмечалось снижение как высоко- так и среднемолекулярных изоформ vWF. Данные изменения характерны, особенно выявленные у пациентов №3 и №5,

Рисунок

Электрофореграмма пациентов с подозрением на типы 2A и 2M БВ. Контрольные образцы представлены на дорожках 7 (плазма) и 8 (сыворотка). Результаты пациентов представлены на дорожках 1–6. Номер дорожки соответствует номеру пациента в таблице 2.

Figure
Electrophoresis of patients suspected with vWD type 2A or 2M. Control samples are presented on tracks 7 (plasma), 8 (serum). Patients are presented on tracks 1–6. Track number matches to the patient number in table 2.



для подтипа 2B, в то время как изменения мультимерного профиля у пациента №6 более характерны для подтипа 2A. Тем не менее на основании проведенного анализа дифференцировать подтипы 2A и 2B не представляется возможным. У пациента №2 выявлено нормальное распределение изоформ vWF на фоне интенсивного окрашивания, что с учетом ранее полученных результатов (vWF:Rco/vWF:Ag = 0,13) позволяет заподозрить подтип 2M. Наибольшего интереса заслуживают результаты пациентов №1 и №4, у которых было получено визуальное нормальное распределение мультимеров vWF на фоне их неинтенсивного прокрашивания. С учетом ранее проведенного обследования (снижение vWF:Rco/vWF:Ag и vWF:CB; таблица 2) нельзя исключить, что выявленная лабораторная картина более характерна для подтипа 2M, однако точное определение подтипа БВ данным пациентам не представляется возможным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Расширенное фенотипирование БВ требует выполнения дополнительных исследований, которые зависят от характера нарушений. Установление подтипа 2N БВ является довольно трудной задачей ввиду схожести с гемофилией А как по клиническим проявлениям, так и по результатам стандартных лабораторных тестов [13]. Подтип 2N БВ характеризуется нарушением vWF: fVIIIb, гомозиготные формы обычно проявляются изолированным снижением активности fVIII на фоне нормальных значений vWF. Степень выраженности снижения активности fVIII коррелирует с тяжестью генетических нарушений. Так, пациенты с довольно распространенной легкой мутацией имеют более легкий фенотип по сравнению

с пациентами с тяжелой: активность $vWF:CB$ $21,8 \pm 9,8$ и $8,4 \pm 5,2$ соответственно [14]. Распространенность подтипа 2N в мире до конца не установлена и зависит от конкретного исследования, качества его выполнения, соблюдения преаналитических требований. По имеющимся на текущий момент данным, распространенность колеблется от 0,5 до 10% всех типов БВ в зависимости от страны [15–18]. Дифференциальный диагноз между подтипом 2N и гемофилией А основан на измерении $vWF:FVIII$, которая значительно снижается при БВ и остается в пределах референсных значений при гемофилии А [19]. Из 7 обследованных нами пациентов ни у одного не выявлено снижение $vWF:FVIII$. Учитывая, что все 7 больных являются мальчиками, наиболее вероятно, что все они имеют легкую форму гемофилии А и нуждаются в медикаментозном обеспечении и ведении в соответствии с диагнозом.

Диагностика подтипов 2A, 2B и 2M также требует выполнения специальных исследований, таких как $vWF:CB$ и МА vWF . Подтип 2A характеризуется отсутствием в плазме высокомолекулярных форм vWF . Значительный относительный дефицит может быть связан как с нарушением сборки молекулы, так и с повышенной чувствительностью vWF к расщеплению под действием ADAMTS13 [4]. Тип 2B включает в себя качественные нарушения с повышением аффинности к рецептору $Gr1b$ тромбоцитов, что также ведет к потере высокомолекулярных форм vWF вследствие повышенного клиренса. Для функционального подтверждения подтипа 2B необходимо выполнение исследования агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристомидина. Как было сказано ранее, ввиду невозможности проведения данного исследования в дистанционном формате МА и $vWF:CB$ неинформативны в дифференциальной диагностике подтипов 2A и 2B. В данной ситуации решающее значение будет иметь только генетическое исследование. Снижение $vWF:CB$ продемонстрировано у пациентов №3, 5 и 6, однако у пациента №5 наблюдалось пропорциональное снижение относительно vWF , а у пациента №3 $vWF:CB$ была в 2 раза выше.

Подтип 2M характеризуется снижением связывания vWF с тромбоцитами без селективного дефицита высокомолекулярных мультимеров. Лабораторно такие пациенты обычно демонстрируют нормальную $vWF:CB$ и нормальное распределение мультимеров vWF [4]. Хотя встречаются больные с сочетанным нарушением связывания тромбоцитов и коллагена [20]. Пациенты №2, 8, 9 имеют

нормальную $vWF:CB$ при снижении соотношения $vWF:Rco/vWF:Ag$, что более характерно для подтипа 2M и подтверждается результатами МА (рисунк; пациент №2). Однако данный подтип не может быть однозначно подтвержден у пациентов №8 и №9 без МА. Интересно, что введение в 3-й этап диагностики МА позволило усомниться в результатах, полученных при исследовании $vWF:CB$. Действительно, у пациентов №1 и №4 было получено визуальное нормальное распределение мультимеров vWF на фоне их неинтенсивного прокрашивания. С учетом ранее проведенного обследования (снижение $vWF:Rco/vWF:Ag$ и $vWF:CB$, таблица 2) нельзя исключить, что выявленная лабораторная картина более характерна для подтипа 2M, однако для точного определения подтипа БВ данным пациентам, по-видимому, необходимо проведение молекулярно-генетического тестирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение расширенного лабораторного фенотипирования в рамках программы дистанционной диагностики БВ позволяет точно определить подтип заболевания у большинства обследуемых. Применение многоуровневой диагностики с использованием МА обеспечивает подтверждение ранее полученных данных и потенциально служит инструментом отбора пациентов, нуждающихся в последующем молекулярно-генетическом обследовании. Таким образом, установка подтипа БВ является сложным многоступенчатым процессом, требующим нескольких этапов исследований с применением различных методик лабораторного анализа и может быть реализована в том числе и в дистанционном формате.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Poletaev A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5209-2099>

Seregina E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7534-3863>

Pshonkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2057-2036>

Fedorova D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

Karamyan N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-527X>

Zharkov P.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4384-6754>

Литература

- Reininger A.J., Heijnen H.F., Schumann H., Specht H.M., Schramm W., Ruggeri Z.M. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; 107 (9): 3537–45. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0618
- Wang J.-W., Bouwens E.A., Pintao M.C., Voorberg J., Safdar H., Valentijn K.M., et al. Analysis of the storage and secretion of von Willebrand factor in blood outgrowth endothelial cells derived from patients with von Willebrand disease. *Blood* 2013; 121 (14): 2762–72. DOI: 10.1182/blood-2012-06-434373
- Moake J.L., Turner N.A., Stathopoulos N.A., Nolasco L.H., Hellums J.D. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 1986; 78 (6): 1456–61. DOI: 10.1172/JCI112736
- Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C., Favaloro E.J., Hill F.G., Holmberg L., 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 (10): 2103–14. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02146
- Tosetto A., Castaman G. How I treat type 2 variant forms of von Willebrand disease. *Blood* 2015; 125 (6): 907–14. DOI: 10.1182/blood-2014-08-551960
- Sanders Y.V., Giezenaar M.A., Larosvan Gorkom B.A., Meijer K., van der Bom J.G., Crossen M.H., et al. von Willebrand disease and aging: an evolving phenotype. *J Thromb Haemost* 2014; 12 (7): 1066–75. DOI: 10.1111/jth.12586
- Tosetto A., Castaman G., Rodeghiero F. Bleeders, bleeding rates, and bleeding score. *J Thromb Haemost* 2013; 11 Suppl 1: 142–50. DOI: 10.1111/jth.12248
- Полетаев А.В., Серегина Е.А., Федорова Д.В., Жарков П.А. Современные возможности дистанционной диагностики болезни Виллебранда у детей, проживающих на территории РФ. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (3): 54–60. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-54-60
- Nichols W.L., Hultin M.B., James A.H., Manco-Johnson M.J., Montgomery R.R., Ortel T.L., 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 (2): 171–232. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x
- Румянцев А.Г., Масчан А.А., Вдовин В.В., Свиринов П.В. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению детей с гемофилией А, гемофилией В и болезнью Виллебранда. 2015. [Электронный ресурс]. URL: https://library.mededtech.ru/rest/documents/16%20Коагулопатии_16/#ФЕДЕРАЛЬНЫЕ_КЛИНИЧЕСКИЕ_РЕКОМЕНДАЦИИ_по_диагностике_и_лечению_детей_с_гемофилией_А_гемофилией_В_и_болезнью_Виллебранда_у_детей (Дата обращения 23.11.2020)
- Laffan M.A., Lester W., O'Donnell J.S., Will A., Tait R.C., Goodeve A., et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Hematology. *Br J Haematol* 2014; 167 (4): 453–65. DOI: 10.1111/bjh.13064
- Pérez-Rodríguez A., Batlle J., Corrales I., Borrás N., Rodríguez-Trillo A., Lourés E., et al. Role of multimeric analysis of von Willebrand factor (VWF) in von Willebrand disease (VWD) diagnosis: Lessons from the PCM-EVW-ES Spanish project. *PLoS One* 2018; 13 (6): e0197876. DOI: 10.1371/journal.pone.0197876
- Schneppenheim R., Budde U., Krey S., Drewke E., Bergmann F., Lechler E., et al. Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1. *Thromb Haemost* 1996; 76 (4): 598–602.
- Mazurier C., Meyer D. Factor VIII binding assay of von Willebrand factor and the diagnosis of type 2N von Willebrand disease. Results of an international survey. *Thromb Haemost* 1996; 76 (2): 270–4.
- Tagliaferri A., Rivolta G.F., Biasoli C., Valdré L., Roderigo G., D'Inca M., et al. A web-based registry of inherited bleeding disorders in the Region of Emilia-Romagna: results at three and a half years. *Haemophilia* 2008; 14 (2): 343–54. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2007.01623.x
- Iorio A., Olivecchio E., Morfini M., Mannucci P.M.; Association of Italian Haemophilia Centres Directors. Italian registry of haemophilia and allied disorders. Objectives, methodology and data analysis. *Haemophilia* 2008; 14 (3): 444–53. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01679.x
- Favaloro E.J., Mohammed S., Koutris J. Identification and prevalence of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20 (8): 706–14. DOI: 10.1097/MBC.0b013e328332d022
- Ghosh K., Trasi S., Shetty S., Mohanty D. Use of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of type 2N von Willebrand disease and its prevalence in an Indian population. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17 (1): 7–11. DOI: 10.1097/01.mbc.0000198048.42634.5a
- Casonato A., Pontara E., Zerbinati P., Zucchetto A., Girolami A. The evaluation of factor VIII binding activity of VWF by means of an ELISA method. Significance and practical applications. *Am J Clin Pathol* 1998; 109 (3): 347–52. DOI: 10.1093/ajcp/109.3.347
- Ribba A.S., Loisel I., Lavergne J.M., Juhan-Vague I., Obert B., Cherel G., 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 (3): 848–54.