

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Onkologisches Zentrum

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikdirektor

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

**Einfluss der Methode zur Bestimmung der
von Willebrand-Faktor-Aktivität auf die klinische Diagnostik des
von Willebrand-Syndroms: eine retrospektive Analyse**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anne-Kathrin Heicks

Hamburg 2015

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.01.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Florian Langer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Das von Willebrand-Syndrom	1
1.2	Klassifikation des von Willebrand-Syndroms	2
1.3	Diagnostik	4
1.3.1	Klinische Symptome	4
1.3.2	Familienanamnese/Genetik	5
1.3.3	Hämostaseologische Diagnostik	6
1.3.4	Diagnostische Herausforderung des vWS Typ 1	10
1.4	Therapie	11
1.5	Fragestellung	12
2.	Material und Methoden	13
2.1	Patientenkollektiv	13
2.2	Datenerfassung	15
2.2.1	Allgemeine Daten und Diagnose	15
2.2.2	Klinische Symptome	16
2.2.3	Familienanamnese	16
2.2.4	Hämostaseologische Diagnostik	17
2.3	Statistik	18
3.	Ergebnisse	19
3.1	Demographische Daten	19
3.2	Klinische Symptome	19
3.3	Familienanamnese	23
3.4	Hämostaseologische Diagnostik im Kohortenvergleich	24
3.5	vWF-Aktivität	25
3.5.1	vWF-Aktivität in den Kohorten RCo und Ac	26
3.5.2	vWF-Aktivität in der Kohorte V	27
3.6	Erweiterte vWS-Diagnostik	29
3.7	Diagnosenverteilung	32
3.8	Vergleich der diagnostischen Tests zur Bestimmung der vWF-Aktivität	36
4.	Diskussion	39
5.	Zusammenfassung	50
6.	Abkürzungsverzeichnis	52
7.	Literaturverzeichnis	53
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	59
9.	Danksagung	60
10.	Lebenslauf	61
11.	Eidesstattliche Versicherung	61

1. EINLEITUNG

1.1 DAS VON WILLEBRAND-SYNDROM

Im Jahr 1926 beschrieb Erik Adolf von Willebrand erstmals eine vererbare Bluterkrankheit am Beispiel einer betroffenen Familie von den finnischen Ålandinseln in der Ostsee, die mit verlängerter Blutungszeit bei normaler Thrombozytenzahl im Blut einherging.

Von Willebrand beschrieb den Erbgang des Krankheitsbildes als autosomal (im Gegensatz zur X-chromosomalen Hämophilie), allerdings geschlechtsgeprägt, da Frauen stärker an Blutungen zu leiden schienen, und nannte die Krankheit aufgrund der Ähnlichkeit zur Hämophilie "hereditäre Pseudohämophilie" (*Von Willebrand EA 1999*).

Heute weiß man, dass das nach seinem Erstbeschreiber benannte von Willebrand-Syndrom (vWS) durch quantitative oder qualitative Defekte des von Willebrand-Faktors (vWF) verursacht wird. Der vWF ist ein adhäsives Glykoprotein mit multipler Funktion, das hauptsächlich von Endothelzellen (*Jaffe EA et al. 1974*) und Megakaryozyten (*Sporn LA et al. 1987*) gebildet wird. Zum einen bewirkt der vWF über das Thrombozytenoberflächen-Glykoprotein Ib (GPIb) die Thrombozytenadhäsion an subendotheliale Strukturen, die durch Gefäßläsionen freigelegt wurden, und zum anderen die Thrombozytenaggregation über das Glykoprotein IIb/IIIa (*Ruggeri ZM 2001*). Da der vWF die Thrombozytenadhäsion- und aggregation unter Einfluss hoher Scherkräfte vermittelt, ist er von besonderer Bedeutung für die primäre Hämostase im arteriellen Stromgebiet (*Weiss HJ et al. 1989*). Der vWF wird in globulärer Form vorübergehend an subendotheliale (Kollagen) oder zelluläre Strukturen gebunden. Hohe Scherkräfte führen zu einer Entfaltung des globulären vWF in eine lineare Form, die durch Freilegung intramolekularer Domänen eine höhere Aktivität aufweist und somit zur Thrombozytenadhäsion führt (*Siedlecki CA et al. 1996*).

Eine weitere wichtige Funktion des vWF ist die Bindung des Faktor VIII (FVIII), wodurch dieser stabilisiert und somit vor einem schnellen Abbau geschützt wird (*Weiss HJ et al. 1977*). Damit spielt ein intakter und ausreichend vorhandener vWF für den regelrechten Ablauf der sekundären Hämostase ebenfalls eine große Rolle.

Das vWS ist mit einer Prävalenz von bis zu 1-2% in der Gesamtbevölkerung die häufigste angeborene Hämostasestörung (*Rodeghiero F et al. 1987; Castaman G et al. 2003*).

Weitaus seltener sind jedoch die sich tatsächlich klinisch manifestierenden Fälle mit etwa 100 pro 1 Millionen Einwohner (0,01%) (*Sadler JE et al. 2000*).

1.2 KLASSIFIKATION DES VON WILLEBRAND-SYNDROMS

Das vWS ist eine Hämostasestörung, die von genetisch bedingten Veränderungen in der Konzentration (Typ 1 und 3) oder der molekularen Struktur (Typ 2) verursacht wird.

Die Klassifikation des vWS wurde vom *Subcommittee on von Willebrand Factor* des *Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis* 1994 entwickelt und 2006 überarbeitet (*Sadler JE 1994, Sadler JE et. al. 2006*) (Tabelle 1). Das vWS wird in drei primäre Kategorien eingeteilt, die die Ausprägung der Blutungssymptomatik widerspiegeln. Der Typ 1, der durch einen zwar quantitativ verminderten, aber strukturell intakten vWF gekennzeichnet ist, ist die mildeste und auch häufigste Variante. Die molekulargenetischen Ursachen für das vWS Typ 1 sind bis heute noch nicht ausreichend geklärt. Bei dem schweren vWS Typ 3 fehlt der vWF vollständig, was zusätzlich zu einem FVIII-Mangel führt, da dieser ohne den vWF eine verkürzte Halbwertszeit hat. Bei dem vWS Typ 2 handelt es sich um qualitative Defekte des vWF. Es wird in die Subtypen A, B, M und N eingeteilt. Das vWS Typ 2A geht mit einer verminderten vWF-abhängigen Thrombozytenadhäsion aufgrund des Verlustes der großen vWF-Multimere einher, welche vor allem in der primären Hämostase aktiv sind. Beim vWS Typ 2B besteht eine erhöhte Affinität des vWF für das Thrombozytenglykoprotein Ib (GPIb), wobei die großen Multimere normal oder vermindert sein können. Das vWS Typ 2M beruht, wie beim Typ 2A, auf Defekten in der vWF-abhängigen Thrombozytenadhäsion, jedoch bei normaler Multimerverteilung, z.B. bedingt durch eine abnorme Faltung des Moleküls. Das vWS Typ 2N geht mit einer defekten FVIII-Bindung und aufgrund der dadurch verkürzten Halbwertszeit mit einem erniedrigten FVIII-Spiegel einher. Diese sechs Kategorien des vWS korrelieren mit klinischen Besonderheiten und therapeutischen Anforderungen (*Sadler JE 1994, Sadler JE et. al. 2006*). Durch die unterschiedlichen Defekte lassen sich isolierte Störungen der primären Hämostase (z. B. Typ 2A) und der sekundären Hämostase (Typ 2N) sowie Kombinationen aus beiden (Typ 1, Typ 3) beobachten.

Tabelle 1: Klassifikation des vWS

(nach Sadler JE 1994)

<u>Typ</u>	<u>Subtyp</u>	<u>Definition</u>
1		quantitativ verminderter vWF
2		qualitativer vWF-Defekt
	2A	verminderte vWF-abhängige Thrombozytenadhäsion durch selektiven Verlust/Verminderung der großen vWF-Multimere
	2B	erhöhte Affinität des vWF für das Thrombozytenglykoprotein GPIb
	2M	verminderte vWF-abhängige Thrombozytenadhäsion ohne Verlust/Verminderung der großen vWF-Multimere
	2N	verminderte Affinität des vWF für FVIII
3		vollständiges Fehlen des vWF

Eine Studie über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen vWS-Typen im *Italian National Registry of vWD* ergab eine prozentuale Verteilung von 73% Typ 1, 21% Typ 2 und 6% Typ 3 aus insgesamt 1.268 Patienten mit dem vWS (Federici AB et al. 2002). Allerdings wurden in den letzten Jahren durch verbesserte diagnostische Methoden einige der ursprünglich als Typ 1 diagnostizierten Fälle in einen Typ 2 korrigiert, sodass sich die prozentuale Verteilung der vWS Typen teilweise verschoben hat (Goodeve A et al. 2007). Federici et al. fanden 2011 unter vWS-Patienten demnach nur 63% mit vWS Typ 1, 32% mit vWS Typ 2 und 5% mit vWS Typ 3.

Zusätzlich zu dem hereditären vWS existiert eine erworbene Form. Beim erworbenen vWS wird der vWF zunächst in normaler oder sogar erhöhter Konzentration und intaktem Zustand sezerniert, dann erfährt er jedoch im Plasma qualitative oder quantitative Veränderungen. Es gibt zahlreiche Pathomechanismen für die erworbene Form des vWS, die hier nicht umfassend genannt werden können. Sie hängen jedoch meist mit einer Grunderkrankung des Patienten zusammen. Als Beispiele sollen hier der quantitative Verlust des vWF durch Immunkomplexbildung bei lymphoproliferativen und anderen neoplastischen Erkrankungen sowie die qualitative Veränderung des vWF bei pathologischem Scherstress im Rahmen von Gefäß- und Herzklappenerkrankungen genannt werden.

1.3 DIAGNOSTIK

Für die korrekte Diagnose eines vWS sind drei Hauptkriterien erforderlich:

- eine positive Blutungsanamnese seit der Kindheit
- eine positive Familienanamnese mit autosomal dominantem oder rezessivem Erbgang
- eine reduzierte vWF-Aktivität im Plasma

1.3.1 KLINISCHE SYMPTOME

Die typische Manifestation des vWS sind mukokutane Blutungen. Sehr häufig sind Epistaxis, Blutungen der Mundschleimhaut, kutane Hämatome und verlängertes Bluten aus kleinen Wunden. Oft kommt es zur vermehrten Blutung nach chirurgischen Eingriffen, am häufigsten nach Zahnextraktionen und anderen Eingriffen in gut durchbluteten Geweben. Bei Frauen kommen Menorrhagien und verstärkte Blutungen nach Geburten hinzu. Weichteil- und Gelenkblutungen treten selten und am ehesten bei Patienten mit vWS Typ 3 auf. Auch Blutungen des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitalsystems sowie intrazerebrale Blutungen sind sehr selten.

Tabelle 2: Inzidenz der Symptome bei vWS

Inzidenz der Symptome in % bei Patienten mit vWS vom Typ 1, 2 oder 3 in Italien (n=1.286) (Federici AB et al. 2002)

	<u>Typ 1</u>	<u>Typ 2</u>	<u>Typ 3</u>
Epistaxis	56	63	74
Menorrhagien	31	32	32
Blutungen nach Zahnextraktionen	31	39	53
Kutane Hämatome	14	19	31
Blutungen aus kleinen Wunden	36	40	50
Schleimhautblutungen	30	37	48
Perioperative Blutungen	20	23	41
Postpartale Blutungen	17	18	26
Gastrointestinale Blutungen	5	11	18
Gelenkblutungen	2	5	42
Hämaturie	2	4	11
Intrazerebrale Blutungen	0,5	0,3	8

In einer Studie von Federici et al. (2002) wurden 994 Patienten vom Typ 1, 268 vom Typ 2 und 74 vom Typ 3 hinsichtlich ihrer Blutungssymptome untersucht. Vor allem die Symptome Epistaxis, Blutungen aus kleinen Wunden und nach Zahnextraktionen wurden häufig gefunden. Außerdem zeigte sich ein Anstieg der Inzidenz von Blutungssymptomen von Typ 1 zu Typ 3 hin (Tabelle 2).

Die klinische Manifestation der Erkrankung ist meist milde bei Patienten mit vWS Typ 1 und 2N, während diese zunimmt in Fällen von Typ 2M, 2B, 2A und besonders Typ 3.

Das vWS hat ein großes Spektrum an klinischen Ausprägungen, welches von wenig bedeutsamen hämorrhagischen Symptomen bis zu lebensbedrohlichen Blutungsepisoden reicht. Diese klinische Variabilität ist nicht nur durch unterschiedliche Defekte des vWF-Gens bedingt, die die hämostatische vWF-Funktion beeinflussen, sondern auch durch den Einfluss anderer Gene mit variabler Expression (z. B. spezifische AB0-Blutgruppen) (Castaman et al. 1999). Außerdem spielen viele erworbene Umstände wie Stress, Entzündung oder Schwangerschaft eine Rolle in der Ausprägung der klinischen Symptomatik (Rodeghiero F u. Castaman G 2001).

1.3.2 FAMILIENANAMNESE/GENETIK

Neben den klinischen Auffälligkeiten spielt die positive Familienanamnese eine große Rolle in der Diagnostik des vWS sowie bei der Festlegung auf die spezifischen Typen und Subtypen. Die häufigste Form, das vWS Typ1, wird autosomal dominant vererbt und tritt dementsprechend in aufeinanderfolgenden Generationen auf. Unterschiedliche Penetranzen in derselben Familie führen jedoch zu verschieden starken Ausprägungen, sodass ein sehr mildes vWS auch verborgen bleiben kann. Der Erbgang des vWS Typ 2A variiert; er kann rezessiv oder dominant sein. Die Subtypen 2B und 2M werden autosomal dominant vererbt. Das vWS Typ 2N resultiert aus einer autosomal rezessiv vererbten Mutation der Faktor VIII-Bindungsdomäne des vWF. Auch das seltene vWS Typ 3 wird autosomal rezessiv vererbt und tritt bei homozygoten oder compound-heterozygoten Trägern eines vWF-Gendefekts auf (Gadisseeur A et al. 2009). Das codierende Gen für den vWF ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 lokalisiert (Ginsburg et al. 1985).

1.3.3 HÄMOSTASEOLOGISCHE DIAGNOSTIK

Die hämostaseologische Diagnostik liefert neben der klinischen Symptomatik und der Familienanamnese einen wichtigen Bestandteil in der Diagnostik des vWS. Im Folgenden sind die Bedeutungen der in der vWS-Diagnostik etablierten Tests aufgeführt. Die charakteristischen Befundkonstellationen der vWS-Diagnostik sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Orientierende Diagnostik

Die üblichen Hämostaseparameter Thrombozytenzahl, Prothrombinzeit (Quick-Wert), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Thrombinzeit und Fibrinogen (gemessen nach der Clauss-Methode) dienen eher dem Ausschluss anderer Störungen der primären oder sekundären Hämostase und geben nur indirekte Hinweise auf das mögliche Vorhandensein eines vWS. Beim Typ 2B können durch die erhöhte Bindung des vWF an das Thrombozytenglykoprotein GPIb Thrombozytopenien auftreten. vWS-Typen mit verminderter FVIII-Aktivität (v. a. Typ 2N und Typ 3) können in der orientierenden Diagnostik durch eine verlängerte aPTT auffallen.

Blutungszeit

Aus dem klinischen Alltag ist die Bestimmung der in vivo Blutungszeit z. B. nach Ivy fast vollständig verschwunden. Dabei wird unter standardisierten Druckverhältnissen durch eine Blutdruckmanschette ein Schnitt am Unterarm gesetzt. Das Blut wird mittels Filterpapier alle 30 Sekunden entfernt ohne die Wunde zu berühren. Die in vivo Blutungszeit ist abgeschlossen, wenn auf dem Papier keine Rötung mehr nachweisbar ist. Die in vitro Blutungszeit (oder Verschlusszeit) wird heute meist apparativ im PFA 100[®] bestimmt. Bei diesem Test fließt Blut durch eine künstliche Kapillare, in der hohe Scherkräfte herrschen. Die hohen Scherkräfte führen wie in vivo zu einer Konformationsänderung des vWF in eine lineare, aktivere Form. Zur Verfügung stehen zwei verschiedene Messzellen mit Membranen, die mit Kollagen und zusätzlich entweder mit Epinephrin oder ADP beschichtet sind (Col/Epi oder Col/ADP) (<http://www.healthcare.siemens.de> abgerufen am 15.02.2015). Die in vitro Blutungszeit ist zwar sehr sensitiv, für das vWS aber wenig spezifisch und die Messung ist sehr anfällig für Störfaktoren wie z. B. Unterfüllung der Blutabnehmeröhrchen, Proben transport, Thrombozytopenie oder Anämie. Die Blutungszeit zeigt bei Überschreiten des

Grenzwertes eine gestörte primäre Hämostase an. In der Regel ist sie somit bei allen Typen des vWS, mit Ausnahme des vWS Typ 2N, verlängert.

Faktor VIII-Aktivität (FVIII:C)

Ein verminderter FVIII wird bei denjenigen Fällen des vWS gemessen, bei denen die Konzentration an vWF nicht ausreicht, um den FVIII im Plasma zu stabilisieren und vor einem beschleunigten Abbau zu schützen. Dies ist in der Regel erst dann der Fall, wenn der vWF 30% der normalen Plasmakonzentration unterschreitet. Der FVIII ist also in schwereren Fällen des vWS, besonders beim Typ 3, vermindert. Beim Typ 2N ist der FVIII ebenfalls deutlich vermindert, da hier grundsätzlich eine gestörte Bindung zwischen vWF und FVIII vorliegt.

von Willebrand-Faktor-Antigen (vWF:Ag)

Das vWF-Antigen beschreibt rein quantitative Defekte des vWF. Es wird immunologisch mit einem ELISA oder einem Latexpartikel-Agglutinationstest bestimmt. Dieser Parameter ist sehr wichtig zur Differenzierung zwischen vermindertem und dysfunktionalem vWF. Bei vWS-Typen mit normaler vWF-Struktur und regelrechter thrombozytenabhängiger Funktion (Typ 1, 2N) fallen die vWF:RCo- bzw. vWF:Ac-Werte und die vWF:Ag-Werte in etwa gleich hoch aus. Ein vWF:RCo/vWF:Ag- bzw. vWF:Ac/vWF:Ag-Quotient von $<0,7$ weist dagegen auf einen qualitativen Defekt des vWF hin (Typ 2A, 2M und die meisten Fälle vom Typ 2B) (*Federici AB et al. 2000*).

Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (vWF:RCo)

Die vWF-Aktivität wird üblicherweise durch die Messung des Ristocetin-Cofaktors bestimmt. Er ist einer der wichtigsten Tests in der vWS-Diagnostik, da er zusammen mit der vWF-Antigen Bestimmung den Unterschied zwischen quantitativen und qualitativen Defekten des vWF herausstellen kann. Das Antibiotikum Ristocetin bindet sowohl an den vWF als auch an das Glykoprotein GPIb der Thrombozyten. Die Fähigkeit des vWF, zusammen mit Ristocetin eine Agglutination der Thrombozyten zu bewirken wird als Ristocetin-Cofaktor-Aktivität bezeichnet. Die Bindung mit Ristocetin ist abhängig von der Multimerstruktur des vWF und wird somit nicht nur von quantitativen, sondern auch qualitativen Defekten beeinflusst. Die Reaktion kann auf Testplatten, in Thrombozytenaggregometern oder in Gerinnungsautomaten durchgeführt werden und ist relativ aufwändig durchzuführen. Mittlerweile sind auch ELISAs verfügbar

(Vanhoorelbeke K et al., 2000), jedoch ist die Verfügbarkeit automatisierter Testsysteme begrenzt. Die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität ist in der akuten Gerinnungsanalyse fest etabliert; sie liefert aber schwankende und oft nicht reproduzierbare Ergebnisse und hat eine geringe Sensitivität bei niedrigen vWF-Konzentrationen (<10%) (Favaloro EJ et al. 2008). Es wurde eine vWF A1-Domänen-Mutation, P1467S, in der Ristocetin-Bindungsregion gefunden, die zu erniedrigten vWF:RCo-Werten führt, ohne dass in vivo eine erhöhte Blutungsneigung besteht (Flood VH et al. 2009). Weiterhin ist in der gesunden Bevölkerung ein A1-Domänen-Polymorphismus, D1472H, mit einem erniedrigten vWF:RCo/vWF:Ag-Quotienten assoziiert (Flood VH et al. 2010). Alternative, ristocetinunabhängige Tests zur Bestimmung der vWF-Funktion könnten somit die Diagnostik des vWS verbessern und potentielle, auf Ristocetin basierende, Fehler vermeiden.

von Willebrand-Faktor-Aktivität (vWF:Ac)

Um den vWF:RCo-Test zu verbessern oder zu ersetzen, wurde bereits eine Reihe an Alternativen entwickelt, von denen jedoch keine endgültig Eingang in die klinische Routine gefunden hat. Ein neuer Latexpartikel-Agglutinationstest (INNOVANCE® VWF Ac) ohne Verwendung von Ristocetin wurde nun als Alternative zum vWF:RCo-Test in der Diagnostik des vWS entwickelt (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Deutschland). Es werden Latexpartikel mit einem Antikörper gegen GPIIb beschichtet und ein rekombinantes humanes GPIIb-Fragment dazugegeben. Dieses bindet sowohl an den Antikörper als auch an den vWF. Aufgrund zweier Gain-of-function-Mutationen innerhalb des rekombinanten GPIIb-Fragmentes benötigt der Test kein Ristocetin. Das Zufügen von Patientenplasma löst eine vWF-abhängige Agglutinationsreaktion aus, die turbidimetrisch bestimmt werden kann (<http://www.healthcare.siemens.de> abgerufen am 15.02.2015).

Der vWF:Ac-Test ist vollkommen automatisiert. Im Vergleich zum vWF:RCo-Test konnte eine verbesserte Sensitivität bei niedrigen vWF-Konzentrationen gefunden werden (Lawrie AS et al. 2013) mit einer unteren Messgrenze von 4% (Patzke J et al. 2014). In Studien wurde beim Vergleich des vWF:RCo-Tests und des vWF:Ac-Tests mit normalen und pathologischen Proben eine sehr gute Korrelation ($r = 0,99$) der beiden Tests bestätigt (Patzke J et al. 2014, Lawrie AS et al. 2013). Weiterhin weist der vWF:Ac-Test eine höhere Reproduzierbarkeit gegenüber dem vWF:RCo-Test auf (Graf L et al. 2014). Bei ristocetinunabhängigen Tests wurde ein hohes Maß an Präzision festgestellt (Lasne D et al. 2012). Außerdem haben Aktivitätstests, die unabhängig von Ristocetin sind, den Vorteil,

dass bei Personen mit P1467S und D1472H Polymorphismen eine normale Aktivität gemessen wird (*Flood VH et al. 2011*).

Kollagen-Bindungsaktivität (vWF:CB)

Die Kollagen-Bindungsaktivität kann eine verminderte Aktivität des vWF aufgrund eines Fehlens oder einer Verminderung an großen Multimeren zeigen. Das Vorhandensein der großen Multimere ist wichtig für die Adhäsion des vWF an Kollagen während der primären Hämostase. Die Bildung des Quotienten aus vWF:CB/vWF:Ag erlaubt eine Aussage über die Funktionsfähigkeit des vWF, sodass dieser zur Differenzierung zwischen vWS Typ 1 und Typ 2 herangezogen werden kann. Diese Methode ist im Vergleich zur Ristocetin-Cofaktor-Aktivität deutlich sensitiver in der Überprüfung der vWF-Funktion (*Brown JE u. Bosak JO 1986*). Der vWF:CB-Test kann den vWF:RCo-Test bzw. den vWF:Ac-Test jedoch nicht vollständig ersetzen, da die Kollagen-Bindung zwar ein Aspekt der vWF-Funktion in vivo ist, der Test jedoch nicht die vWF-Thrombozyten-Interaktion (über GPIb) misst. Somit stellt er eher eine Ergänzung zum vWF:RCo-Test bzw. vWF:Ac-Test in der vWS-Diagnostik dar (*Favaloro EJ 2009*). Der Kollagen-Bindungsaktivitäts-Test ist ein ELISA, der vor allem in Speziallabors durchgeführt wird.

Ristocetin-induzierte Thrombozytenagglutination (RIPA)

Die Ristocetin-induzierte Thrombozytenagglutination wird durch Zugabe verschiedener Konzentrationen von Ristocetin zum thrombozytenreichen Plasma gemessen. Der RIPA-Test dient zur Identifizierung einer gesteigerten oder verminderten Interaktion zwischen dem vWF und dem thrombozytären Glykoprotein GPIb. Damit ist er vor allem zur Erkennung des vWS Typ 2B geeignet, bei dem ein erhöhtes Ansprechen auf Ristocetin bedingt durch eine gesteigerte Affinität des vWF zum GPIb vorliegt (*Ruggeri ZM 1980*). Bei Typ 1, 2A und 2M kann die RIPA vermindert sein.

vWF-Multimer-Analyse

Die vWF-Multimer-Analyse mittels Elektrophorese in Agarosegel ist die beste Methode zur Typisierung und Subtypisierung des vWS. Die Analyse ist jedoch zeitaufwändig und wird nur in Speziallabors durchgeführt. Im Agarosegel trennen sich die vWF-Multimere, die üblicherweise in groß, mittelgroß und klein eingeteilt werden (*high, intermediate und low molecular weight multimers*). Bei den vWS-Typen 1, 2M und 2N sind alle Multimere vorhanden, während bei Typ 2A die großen und gegebenenfalls mittelgroßen Multimere

fehlen. Die meisten Fälle von Typ 2B zeigen einen Verlust der großen Multimere, wobei es auch Patienten mit normaler Multimerverteilung gibt (*Federici AB et al. 2009*).

Patienten mit Typ 2A können mithilfe der vWF-Multimer-Analyse in weitere Subtypen unterteilt werden (IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH).

Tabelle 3: Charakteristische Befundkonstellation der vWS-Typen

(modifiziert von Schneppenheim R u. Budde U 2010)

vWS-Typ	<u>1</u>	<u>2A</u>	<u>2B</u>	<u>2M</u>	<u>2N</u>	<u>3</u>
Erbgang	AD	AD/AR	AD	AD	AR	AR
VZ	↑	↑	↑	↑	N	↑↑
FVIII:C	↓	↓/N	↓/N	↓/N	↓↓	↓↓
vWF:Ag	↓	↓	↓/N	↓	↓/N	Fehlt
vWF:RCo und vWF:Ac	↓	↓	↓	↓/N	↓/N	Fehlt
Aktivität/Antigen-Quotient	N	↓	↓/N	↓	N	-
vWF:CB	↓	↓	↓	↓/N	↓/N	Fehlt
RIPA	↓/N	↓/N	↑↑	↓/N	N	Fehlt
vWF-Multimere	Alle vorhanden	Große u. ggf. Mittelformen fehlen	Große fehlen/Alle vorhanden	Alle vorhanden	Alle vorhanden	Fehlen

AD: autosomal dominant; AR: autosomal rezessiv; N: normal; VZ: Verschlusszeit; FVIII:C: Faktor VIII-Aktivität; vWF:Ag: vWF-Antigen; vWF:CB: vWF-Kollagen-Bindungsaktivität; RIPA: Ristocetin-induzierte Thrombozytenagglutination; ↓, ↓↓, ↑, ↑↑: Grad der Verminderung bzw. Erhöhung

1.3.4 DIAGNOSTISCHE HERAUSFORDERUNG DES vWS TYP 1

Das vWS Typ 1, das durch ein moderates quantitatives Defizit des vWF gekennzeichnet ist, ist der häufigste Typ des vWS. Trotz zahlreicher zur Verfügung stehender Testsysteme stellt insbesondere das vWS Typ 1 im klinischen Alltag eine diagnostische Herausforderung dar. Dies liegt vor allem daran, dass für das vWS Typ 1 kein etablierter molekulargenetischer Test zur Verfügung steht und auch die vWF-Multimer-Analyse diesbezüglich nicht weiterführend ist. Aufgrund der Größe und Komplexität des vWF-Gens ist eine komplette Genanalyse keine Option für die klinische Routine. Besonders in milden Fällen des vWS Typ 1 können Patienten mit einem reduzierten, jedoch strukturell unauffälligen vWF phänotypisch nicht von gesunden Individuen mit vWF-Spiegeln im

unteren Normbereich oder geringfügig unterhalb des Normbereichs unterschieden werden. In diesen Fällen stellt sich oft die Frage, ob es sich um eine manifeste Krankheit handelt, oder nur eine klinische Blutungsneigung evtl. assoziiert mit einem leichten vWF-Defizit vorliegt. Erschwerend hinzu kommt, dass der vWF von Alter, Geschlecht, Ethnie, Menstruationszyklus und Gebrauch von oralen Kontrazeptiva beeinflusst wird (*Kadir RA et al. 1999*), sowie als Akute-Phase-Protein erheblichen Schwankungen in Situationen wie Stress, Krankheit und Schwangerschaft unterliegt. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, dass die Plasmakonzentration des vWF mit dem AB0-Blutgruppensystem korreliert, wobei die Blutgruppe 0 mit einem um bis zu 30% verminderten vWF im Plasma einhergehen kann (*Gill JC et al. 1987*). Da die Werte eines Patienten in den oben genannten diagnostischen Tests durch die zahlreichen beeinflussenden Faktoren von Zeit zu Zeit schwanken können, müssen sie wiederholt bestimmt werden, um eine endgültige Diagnose stellen zu können. Aus dieser Problematik resultiert, dass im klinischen Alltag oft die unbefriedigenden Diagnosen "vWS nicht sicher auszuschließen", "mögliches vWS Typ 1" oder "vWS im Grauzonenbereich" gestellt werden. Wünschenswert wäre eine verbesserte Diagnostik für den häufigen Typ 1, um falsch positive Diagnosen zu vermeiden, welche zur Stigmatisierung der Patienten als Bluter führen. Mit einer falsch positiven Diagnose könnten unnötige Therapien mit kostspieligen und potentiell infektiösen Plasmapräparaten oder gar die Ablehnung operativer bzw. interventioneller Eingriffe wegen einer vermeintlichen Gerinnungsstörung als Kontraindikation verbunden sein. Andererseits ist es vorstellbar, dass tatsächlich erkrankte Patienten, die aufgrund einer kurzfristigen Erhöhung der vWF-Parameter als gesund eingestuft werden, gefährlichen Blutungsrisiken z. B. im Rahmen operativer bzw. interventioneller Eingriffe ausgesetzt werden.

1.4 THERAPIE

Bei Vorliegen eines vWS kann eine Therapie als Bedarfstherapie bei Auftreten von Blutungen, als Prophylaxe vor Operationen sowie als Dauertherapie bei schweren Formen des vWS (Typ 2 und 3) indiziert sein. Es bieten sich zwei Haupttherapieoptionen an: das Vasopressinanalogen DDAVP (Desmopressin), das parenteral entweder als Infusion (Minirin[®]) oder als Nasenspray (Octostim[®]) verabreicht werden kann, sowie vWF/FVIII-Plasmakonzentrate (z. B. Haemate[®] P). Kombinierte Östrogen-Progesteron-Präparate und Antifibrinolytika (z. B. Tranexamsäure) können ebenfalls eine Rolle in der Behandlung spielen (*Mannucci PM 2004*). Desmopressin ist ein synthetisches Analogon des

antidiuretischen Hormons Vasopressin, das eine gesteigerte Freisetzung des vWF aus den Speichern der Endothelzellen bewirkt und somit die primäre Hämostase verbessert. Desmopressin wird hauptsächlich beim vWS Typ 1 beim Auftreten von Blutungen oder als Prophylaxe vor Operationen angewendet, jedoch ist auch ein Einsatz bei einigen Subtypen des Typ 2 möglich (*Federici et al. 2004*). Das Ansprechen und die Verträglichkeit von Desmopressin sind individuell sehr unterschiedlich und sollten daher nach Möglichkeit vor der Anwendung mit einem entsprechenden Belastungstest (DDAVP-Test) überprüft werden (*Sutor AH 1998*). Plasmakonzentrate, die mit vWF und FVIII angereichert sind, kommen als Bedarfstherapie für mittlere bis schwere Formen des vWS (einige Subtypen des Typ 2 und Typ 3) oder als Dauertherapie zur Prophylaxe von Blutungen beim schweren vWS Typ 3 in Betracht.

1.5 FRAGESTELLUNG

Im Diagnostikzentrum des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf wurde im Jahr 2011 die Methode zur Bestimmung der vWF-Aktivität von der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (vWF:RCo) auf die vWF-Aktivität (vWF:Ac) mit dem INNOVANCE® VWF Ac-Test umgestellt. Der vWF:RCo-Test ist in der Diagnostik des vWS fest etabliert, scheint jedoch einige messtechnische Nachteile gegenüber neueren vWF-Aktivitätstests zu haben. In dieser Arbeit soll durch retrospektive Analyse untersucht werden, ob die Umstellung der Aktivitätstests zu einer Verbesserung der vWS-Diagnostik im klinischen Alltag geführt hat, insbesondere im Hinblick auf die relativ schwierig zu stellende Diagnose des milden vWS Typ 1. Der Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass die Anwendung des vWF:Ac-Tests unter anderem aufgrund einer verbesserten Präzision im unteren Normbereich und erhöhter Reproduzierbarkeit häufiger den definitiven Ausschluss eines vWS erlaubt und seltener in den unbefriedigenden Diagnosen “vWS nicht sicher auszuschließen“, “mögliches vWS Typ 1“ oder “vWS im Grauzonenbereich“ resultiert als die Anwendung des vWF:RCo-Tests. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die drei wesentlichen Diagnosekriterien positive Blutungsanamnese seit der Kindheit, positive Familienanamnese und reduzierte vWF-Aktivität im Plasma an einem definierten Kollektiv von 606 Patienten retrospektiv untersucht. Da das vWS die häufigste angeborene Hämostasestörung ist und sowohl die falsch positive als auch die falsch negative Diagnose mit erheblichen Risiken verbunden ist, erscheint es mir sehr wichtig, den Fortschritt in der vWS-Diagnostik zu überprüfen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Im Diagnostikzentrum des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf wurde im September 2011 der vWF-Aktivitätstest vom vWF:RCo-Test auf die Anwendung des vWF:Ac-Tests umgestellt.

Das Patientenkollektiv dieser Studie umfasst alle Patienten, die sich in dem Zeitraum 12 Monate vor (09/2010) bis 12 Monate nach (09/2012) der Umstellung des Aktivitätstestes in der Gerinnungsambulanz der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Onkologischen Zentrums am UKE zur Abklärung einer Hämostasestörung vorgestellt und eine vWS-Diagnostik erhalten haben. Darunter waren sowohl Patienten, die sich zur Erstuntersuchung vorstellten, als auch Patienten, bei denen eine Verlaufskontrolle einer (potentiellen) Hämostasestörung durchgeführt wurde. Dieses Kollektiv bestand aus männlichen und weiblichen Patienten im Alter von 15 bis 89 Jahren.

Insgesamt fanden sich in den zwei Jahren 658 Patienten zur Durchführung einer vWS-Diagnostik in der Gerinnungsambulanz des UKE ein (identifizierte Patienten) (Abbildung 1). Einige von diesen Patienten stellten sich mehrfach zur Verlaufskontrolle bzw. Befundsicherung vor, sodass insgesamt 835 Untersuchungen mit einer vWS-Diagnostik durchgeführt wurden. Insgesamt 52 Patienten wurden von der Auswertung ausgeschlossen (Abbildung 1): 38 Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung schwanger; bei 4 Patienten wurde die vWS-Diagnostik im Rahmen eines DDAVP-Tests durchgeführt; 10 Patienten wurden ausgeschlossen, da in ihrer Akte relevante Daten für die Analysen dieser Arbeit fehlten.

Somit wurden in diese retrospektive Analyse insgesamt 606 Patienten aufgenommen (Gesamtkollektiv). Das Gesamtkollektiv lässt sich nach dem Zeitraum der Vorstellung und der Art des angeforderten vWF-Aktivitätstestes in drei Kohorten einteilen. Die erste Kohorte umfasst 322 Patienten, die sich vor der Umstellung von 09/2010 bis einschließlich 08/2011 in der Gerinnungsambulanz des UKE vorstellten und bei denen eine vWS-Diagnostik inklusive der Bestimmung der vWF:RCo-Werte durchgeführt wurde (diese Gruppe wird im Folgenden als "Kohorte RCo" bezeichnet). Die zweite Kohorte umfasst 298 Patienten, bei denen während der 12 Monate nach der Umstellung, also von 09/2011 bis einschließlich 08/2012, eine vWS-Diagnostik mit dem vWF:Ac-Test durchgeführt

wurde (diese Gruppe wird im Folgenden als “Kohorte Ac“ bezeichnet). Die kleine dritte Gruppe umfasst 10 Patienten, bei denen in einem kurzen Zeitraum im Rahmen der Umstellung beide vWF-Aktivitätstests parallel durchgeführt wurden, sodass bei dieser Gruppe direkt miteinander vergleichbare Werte von vWF:RCo und vWF:Ac vorliegen (diese Gruppe wird im Folgenden als “Kohorte V“ [V für Vergleich] bezeichnet). 23 Patienten sind sowohl in Kohorte RCo als auch in Kohorte Ac vertreten, da sie sich in beiden Analyse-Zeiträumen in der Gerinnungsambulanz vorgestellt und somit zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils einen anderen Aktivitätstests erhalten haben. Außerdem ist ein Patient sowohl in Kohorte RCo als auch in Kohorte V vertreten. Dadurch erklärt sich die Differenz zwischen der Anzahl der Patienten des Gesamtkollektivs und der Summe der Patienten in den einzelnen Kohorten.

Von den Patienten, bei denen innerhalb eines Untersuchungsjahres mehr als eine vWS-Diagnostik erfolgte, wurden die hämostaseologischen Laborparameter als gemittelte Werte in die Analyse aufgenommen.

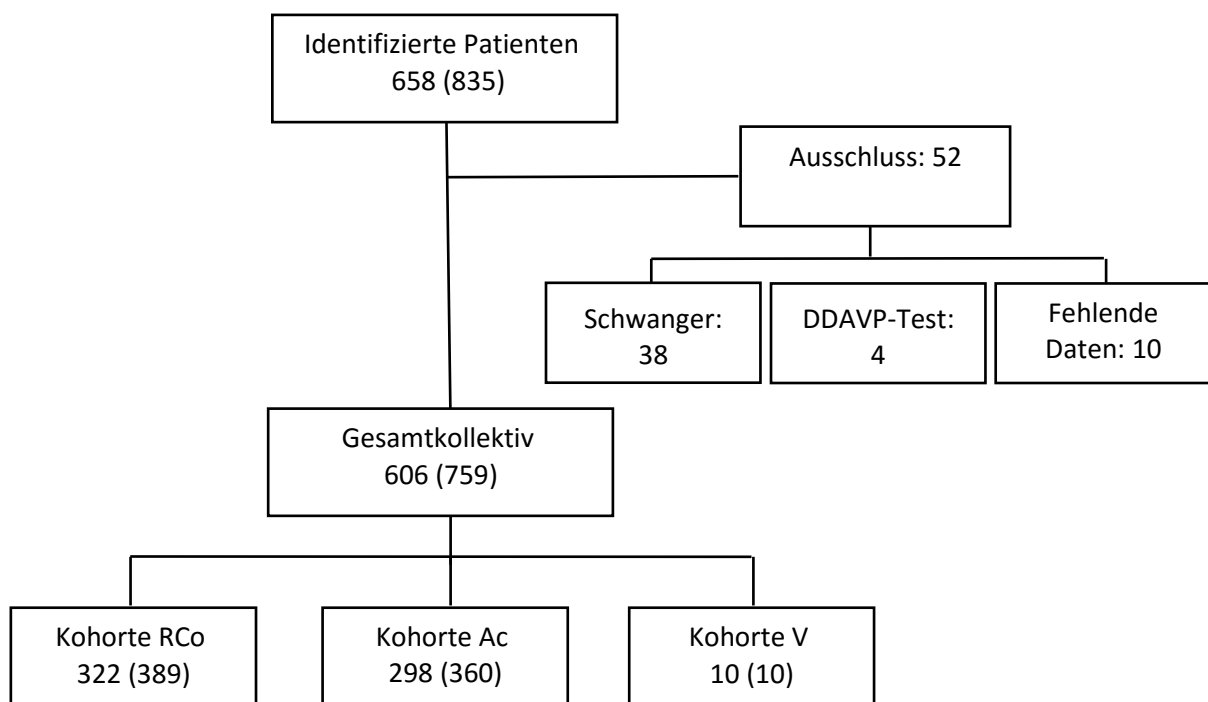


Abbildung 1: Patientenkollektiv und Ausschlüsse

Dargestellt ist die Patientenzahl und in Klammern die Zahl der durchgeführten diagnostischen Untersuchungen; die Differenz zwischen der Anzahl der Patienten des Gesamtkollektivs und der Summe der Patienten in den jeweiligen Kohorten erklärt sich dadurch, dass einige Patienten in zwei Kohorten vertreten sind.

2.2 DATENERFASSUNG

Mithilfe eines elektronischen Suchauftrages wurden alle Patienten herausgefiltert, die innerhalb des Untersuchungszeitraumes 09/2010 bis einschließlich 08/2012 eine vWS-Diagnostik erhielten. Unter Verwendung des elektronischen Krankenhausinformationssystems Soarian® wurden die relevanten demographischen, klinischen und laborchemischen Daten, die im Rahmen der klinischen Routine erhoben und dokumentiert worden waren, extrahiert und für die weitere Auswertung anhand einer Patienten-ID pseudonymisiert in eine Datenbank eingetragen.

2.2.1 ALLGEMEINE DATEN UND DIAGNOSE

Von allen Patienten wurden zunächst Alter, Geschlecht und das Datum der ambulanten Vorstellung erfasst. Schließlich wurde die Diagnose notiert, die nach Vorstellung des Patienten im Arztbrief gestellt worden war. Folgende Diagnosen wurden formuliert:

- "kein Hinweis auf ein vWS"
- "vWS nicht sicher auszuschließen"
- "mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich"
- vWS Typ 1, 2, 3 sowie die Subtypen des Typ 2 (A, B, M, N) ggf. mit dem Zusatz "Verdacht auf" (V.a.)
- erworbenes vWS ggf. mit dem Zusatz "Verdacht auf"

Die Diagnose "kein Hinweis auf ein vWS" ist als Ausschlussdiagnose zu verstehen. Der Diagnose "vWS nicht sicher auszuschließen" liegt in der Regel eine unvollständige Erfüllung der drei entscheidenden Diagnosekriterien des vWS zugrunde: der Blutungs- und Familienanamnese und der vWF-Aktivität. Zum Beispiel kann ein Patient zwar typische Blutungssymptome, aber eine formal im Referenzbereich liegende vWF-Aktivität aufweisen. Oder der Patient hat (zeitweise) eine erniedrigte vWF-Aktivität und/oder eine positive Familienanamnese, nicht jedoch die typische Blutungsanamnese. In diesen Fällen ist ein manifestes vWS zwar unwahrscheinlich, aber nicht immer sicher auszuschließen, sodass den Patienten empfohlen wird, sich zu einem anderen Zeitpunkt erneut zu einer Untersuchung vorzustellen. Die Diagnose "mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich" bedeutet, dass der Befund des Patienten zwischen einem Normalbefund und einem milden vWS einzuordnen ist, sodass es in Situationen, in denen

das Hämostasesystem verstärkt beansprucht wird, durchaus zu einer leichtgradig vermehrten Blutungsneigung kommen kann. Diese Patienten weisen oft eine vWF-Aktivität auf, die nur geringfügig unterhalb des Referenzbereiches liegt.

Im Folgenden werden die im Arztbrief als Typ 1, Typ 2 mit Subtypen, Typ 3 und erworbenes vWS notierten Diagnosen als “gesichertes vWS“ zusammengefasst. Mit dem Begriff “Übergangsdiaagnosen“ werden im Folgenden die Diagnosen “mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ und “vWS nicht sicher auszuschließen“ zusammengefasst.

2.2.2 KLINISCHE SYMPTOME

Folgende klinische Symptome wurden dokumentiert: kutane Hämatome, Epistaxis, Zahnfleischbluten, Blutung nach Zahnextraktion, Menorrhagie, perioperative Blutung, postpartale Blutung, Gelenkblutung und sonstige Blutung. Diesbezüglich wurde notiert, ob ein klinisches Symptom in der Vergangenheit bei einem Patienten aufgetreten war oder nicht, unabhängig von der Häufigkeit oder Stärke des Symptoms.

Bei 586 Patienten (97% des Gesamtkollektivs) waren die aufgetretenen klinischen Symptome in den Patientenakten dokumentiert worden. (Bei der Zuordnung der aufgetretenen Symptome zu den Diagnosegruppen [unter 3.2] wurde bei Mehrfachvorstellung eines Patienten nur die aktuellste bzw. “endgültige“ Diagnose bewertet, sodass revidierte Diagnosen nicht berücksichtigt wurden).

2.2.3 FAMILIENANAMNESE

Es wurde dokumentiert, ob die Familienanamnese bezüglich eines vWS unauffällig war, ein familiäres vWS bekannt war oder in der Familie zwar eine Blutungsneigung bestand, diese aber bisher nicht sicher einem vWS oder einer anderen Gerinnungsstörung zugeordnet werden konnte (Letzteres wird im Folgenden als “ungeklärte familiäre Blutungsneigung” bezeichnet). Insgesamt war bei 261 Patienten (43% des Gesamtkollektivs) eine Familienanamnese in der Patientenakte dokumentiert worden. (Bei der Zuordnung der Familienanamnese zu den Diagnosegruppen [unter 3.3] wurde bei Mehrfachvorstellung eines Patienten nur die aktuellste bzw. “endgültige“ Diagnose bewertet, sodass revidierte Diagnosen nicht berücksichtigt wurden).

2.2.4 HÄMOSTASEOLOGISCHE DIAGNOSTIK

Die erhobenen Laborparameter lassen sich in orientierende Diagnostik, Kerndiagnostik und erweiterte Diagnostik einteilen. Die *orientierende Diagnostik* beinhaltet die folgenden “globalen“ Gerinnungsparameter: Thrombozytenzahl [Mrd/l] im Citratblut, Quick [%], aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) [sec], Thrombinzeit (TZ) [sec] und Fibrinogen nach Clauss [g/l]. Bei der *Kerndiagnostik* handelt es sich um die erste Stufe der hämostaseologischen Spezialanalytik des vWS: In-vitro-Blutungszeit im PFA-100® [sec] (Verschlusszeiten mit Kollagen/Epinephrin [Col/Epi] und Kollagen/ADP [Col/ADP]), Faktor VIII-Aktivität (FVIII:C) [%], vWF-Antigen (vWF:Ag) [%], und entweder der alte Aktivitätstest vWF:RCo [%] oder der neue Aktivitätstest vWF:Ac [%] (in der vorgelegten Arbeit ist mit vWF:Ac immer explizit der INNOVANCE® VWF Ac gemeint). Die *erweiterte Diagnostik*, also die zweite Stufe im Rahmen der hämostaseologischen Spezialanalytik, wurde nur bedarfsgerecht durchgeführt und umfasst: Ristocetin-induzierte Thrombozytenagglutination [%] (RIPA mit 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml und 1,5 mg/ml), Kollagen-Bindungsaktivität (vWF:CB) [%] und die vWF-Multimer-Analyse. Die beiden letzteren Parameter gehören zur externen Diagnostik, die außerhalb des UKE in einem MEDILYS-Labor durchgeführt wird. Mit Ausnahme der Kollagen-Bindungsaktivität wurden in dieser Arbeit die Referenzwerte des UKE-Zentrallabors verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Referenzbereiche der Laborparameter

<u>Laborparameter</u>	<u>Referenzbereich</u>
Thrombozytenzahl (Citrat)	135 - 360 Mrd/l
Quick	80 - 130 %
aPTT	25 - 38 sec
TZ	16 - 22 sec
Fibrinogen n. Clauss	1,8 - 4,0 g/l
VZ mit Col/Epi	84 - 160 sec
VZ mit Col/ADP	68 - 121 sec
FVIII:C	60 - 160 %
vWF:Ag	60 - 200 %
vWF:RCo	66 - 183 %
vWF:Ac	61 - 179 %
RIPA 0,4 mg/ml	bis 10 %
RIPA 0,6 mg/ml	bis 13 %
RIPA 1,2 mg/ml	60 - 95 %
RIPA 1,5 mg/ml	75 - 100 %
vWF:CB	50 - 250 %

2.3 STATISTIK

Die extrahierten Daten wurden zur Auswertung pseudonymisiert anhand von Patienten-IDs in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office Excel 2007) übertragen. Für die statistische Analyse der Daten wurden die Programme Excel und GraphPad Prism 6.0 verwendet. Die Darstellung der Ergebnisse in Tabellen und Graphiken erfolgte mithilfe von Excel. Die deskriptive Statistik erfolgte für unterschiedliche Variablen. Bei den kontinuierlichen Variablen (z. B. Alter und Laborparameter) wurde auf Lagemaße (Mittelwert oder Median) und auf Streuungsmaße (Standardabweichung oder Interquartilsabstand) zurückgegriffen. Um signifikante Unterschiede zu erkennen, wurde bei parametrischen Daten der studentsche t-Test verwendet, bei nichtparametrischen Daten der Mann-Whitney-U Test. Dazu wurden die relevanten Daten zunächst mit dem D'Agostino-Pearson-Test und dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung geprüft. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Zur Korrelationsanalyse zweier Variablen wurde bei parametrischen Daten der Pearson-Korrelationskoeffizient r und bei nichtparametrischen Daten der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient r_s errechnet. Die kategorialen Variablen (z. B. Geschlecht, Diagnose und klinische Symptome) wurden auf absolute und relative Häufigkeiten untersucht. Unterschiede in kategorialen Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test errechnet. Auch hier wurde das Ergebnis $p < 0,05$ als signifikant gewertet. Anhand von epidemiologischen Vierfeldertafeln wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten sowie die positiv und negativ prädiktiven Werte der beiden vWF-Aktivitätstests vWF:RCo und vWF:Ac errechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 DEMOGRAPHISCHE DATEN

Im Gesamtkollektiv (n = 606) lag der Anteil der weiblichen Patienten bei 71% und der der männlichen Patienten bei 29%. Somit lag das Verhältnis von Frauen zu Männern im Gesamtkollektiv bei etwa 2,4:1. Bei Patienten mit gesichertem vWS lag das Verhältnis bei 1,9:1. In den Kohorten RCo und Ac zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Geschlechterverteilung (Tabelle 5).

Die Patienten, die in diese Arbeit eingeschlossen wurden, waren zum Zeitpunkt der Vorstellung (Erstvorstellung) zwischen 15 und 89 Jahre alt. In Kohorte RCo betrug der Altersmedian 50 Jahre, in Kohorte Ac 47 Jahre. Die Kohorten unterscheiden sich hinsichtlich der Altersverteilung nicht signifikant voneinander (Tabelle 5).

Tabelle 5: Demographische Daten im Kohortenvergleich

	Geschlechterverteilung (%)		Alter (Jahre)
	m	w	Median (IQR)
Kohorte RCo	30%	70%	50 (36 - 66)
Kohorte Ac	29%	71%	47 (33 - 64)
Mann-Whitney-U Test	-	-	p = 0,2063
Chi-Quadrat-Test	p = 0,7241		-

3.2 KLINISCHE SYMPTOME

Innerhalb des Gesamtkollektivs (n = 606) konnten die klinischen Symptome von 586 Patienten (97%) aus den Patientenakten extrahiert werden; davon waren 412 weiblich (70%) und 174 männlich (30%) (Tabelle 6).

Bei 45% dieser Patienten waren in der Vergangenheit vermehrt kutane Hämatome spontan oder nach nur geringfügigen Traumata aufgetreten. Als zweithäufigstes Blutungssymptom war es bei 35% der Patienten zu übermäßigen perioperativen Blutungen gekommen. Etwas weniger häufig waren Menorrhagien bei Frauen (24%), Epistaxis (19%), übermäßige Blutungen nach Zahnextraktionen (16%) und sonstige Blutungen (15%) aufgetreten. Bei 9% der weiblichen Patienten war im Rahmen einer Geburt eine postpartale Blutung

aufgetreten. Ebenfalls 9% der Patienten hatten in der Vergangenheit unter Zahnfleischbluten gelitten. Sehr selten war von Gelenkblutungen berichtet worden (3%). Bei den Patienten mit vWS Typ 1 kam es im Vergleich zu anderen Diagnosen auffällig oft zu Menorrhagien (54%) (Tabelle 6).

Insgesamt waren im Gesamtkollektiv durchschnittlich 1,8 Blutungssymptome pro Patient in der Vergangenheit aufgetreten (Tabelle 6). Die Gruppe mit der am stärksten ausgeprägten klinischen Symptomatik (3,2 Symptome pro Patient) war die Gruppe vWS Typ 3, wobei angemerkt werden muss, dass in dieser Gruppe nur 3 Patienten vertreten waren. Die Patienten mit der Diagnose vWS Typ 1 wiesen in diesem Kollektiv durchschnittlich 2,6 Blutungssymptome pro Patient auf, womit die Quote etwas höher lag als in der Gruppe des (V.a.) vWS Typ 2 mit 2,5 Symptomen pro Patient. Auch die Übergangsd Diagnosen "vWS nicht sicher auszuschließen" (2,3 Symptome pro Patient) und "mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich" (2,0 Symptome pro Patient) hatten ein relativ häufiges Vorkommen an Blutungssymptomen. Beim vWS Ausschluss "kein Hinweis auf ein vWS" lag die Quote hingegen nur bei 1,5 Symptomen pro Patient, genauso wie bei den Patienten mit (V. a.) erworbenem vWS.

Tabelle 6: Auftreten klinischer Symptome bei verschiedenen Diagnosen

	kein Hinweis auf ein vWS	vWS nicht sicher auszuschließen	mögliches VWS Typ 1/VWS im Grauzonenbereich	vWS Typ 1	(V.a.) vWS Typ 2	vWS Typ 3	(V.a.) erworbenes vWS	Gesamt
	n=405; n♀=284	n=48; n♀=34	n=53; n♀=42	n=40; n♀=28	n=20; n♀=14	n=3; n♀= 2	n=17; n♀= 8	n=586; n♀=412
kutane Hämatome	173	23	24	24	8	3	7	262
	43%	48%	46%	60%	40%	100%	41%	45%
Epistaxis	60	14	10	18	6	1	5	114
	15%	29%	19%	45%	30%	33%	29%	19%
Zahnfleischbluten	26	6	9	5	6	0	1	52
	6%	13%	17%	13%	25%	-	6%	9%
Blutung nach Zahnextraktion	56	10	7	9	6	1	4	93
	14%	21%	13%	23%	30%	33%	24%	16%
Menorrhagie	54	13	11	15	5	0	0	98
	19%	38%	26%	54%	36%	-	-	24%
Perioperative Blutung	125	21	25	20	8	2	2	203
	31%	44%	48%	50%	40%	67%	12%	35%
Postpartale Blutung	24	4	4	3	2	0	0	37
	8%	12%	10%	11%	14%	-	-	9%
Gelenkblutung	11	2	1	0	1	2	0	17
	3%	4%	2%	-	5%	66,7	-	3%
sonstige Blutung	55	9	9	4	5	0	3	85
	14%	19%	17%	10%	25%	-	18%	15%
Durchschnittliche Symptome pro Patient	1,5	2,3	2,0	2,6	2,5	3,2	1,5	1,8

Das Vorkommen der klinischen Symptome bei den verschiedenen Diagnosen ist als absoluter Wert (Patientenanzahl) und als relative Häufigkeit in % (Patientenanteil) angegeben. Letztere bezieht sich auf die Anzahl "n" der Patienten mit dokumentierten klinischen Symptomen in der jeweiligen Diagnosegruppe bzw. auf die Anzahl der weiblichen Patienten "n♀" im Falle der Symptome "Menorrhagie" und "Postpartale Blutung". Außerdem ist das durchschnittliche Vorkommen von Symptomen pro Patient in den Diagnosegruppen dargestellt.

Beim gesicherten vWS war das Vorkommen aller Blutungssymptome häufiger als im Gesamtkollektiv; im Mittel 1,4-fach häufiger (Abbildung 2). Am deutlichsten unterschieden sich die Patienten mit gesichertem vWS vom Gesamtkollektiv in Bezug auf die Symptome Epistaxis und Menorrhagie. Diese beiden Symptome waren bei Patienten mit gesichertem vWS etwa doppelt so häufig vorgekommen (Abbildung 2). Am größten war die Differenz zwischen vWS Typ 1 und Gesamtkollektiv: Epistaxis und Menorrhagien waren 2,3-fach häufiger vorgekommen.

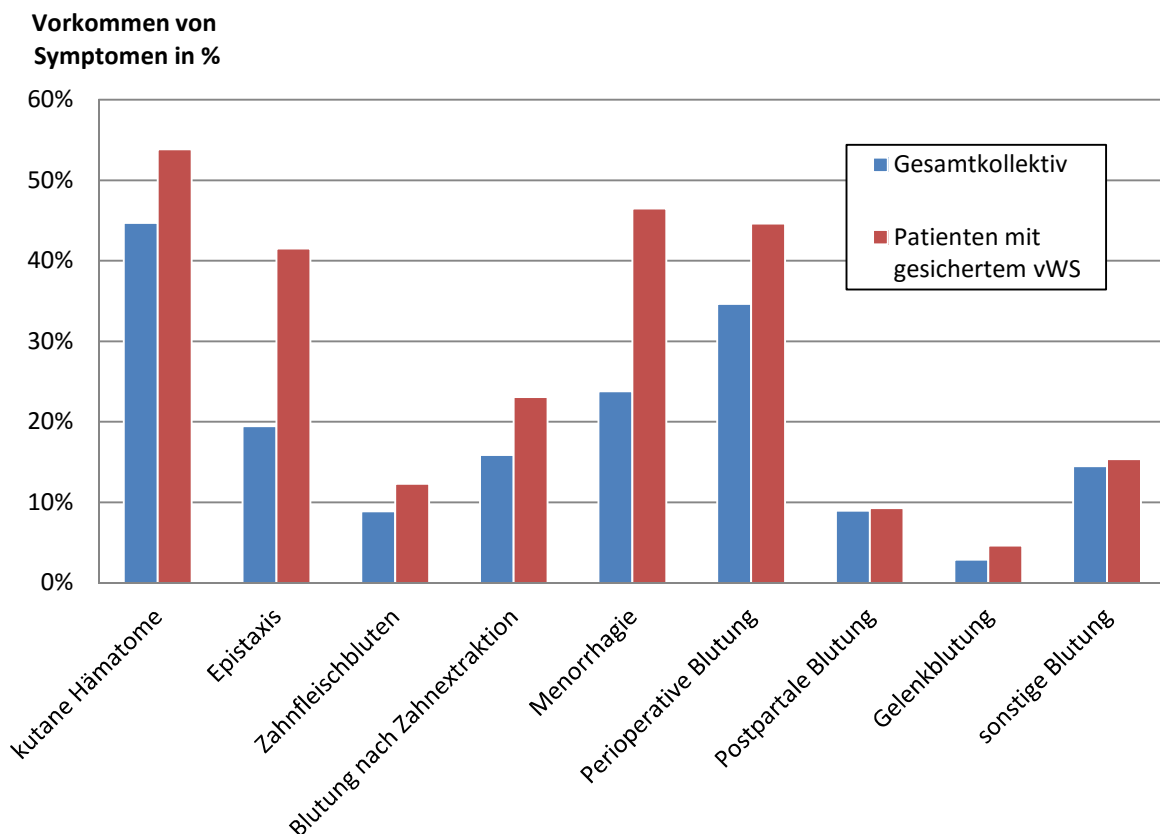


Abbildung 2: Klinische Symptome im Gesamtkollektiv und bei Patienten mit gesichertem vWS

Vergleich des relativen Vorkommens klinischer Symptome (in %) zwischen dem Gesamtkollektiv (n = 586; n♀ = 412) und den Patienten mit gesichertem vWS (Typ 1, 2, 3 und erworbenes vWS) (n = 65; n♀ = 43). Die Symptome “Menorrhagie“ und “postpartale Blutung“ beziehen sich nur auf die weiblichen Patienten.

3.3 FAMILIENANAMNESE

Aus dem Gesamtkollektiv ($n = 606$) konnten bei 261 Patienten (43%) aus den Patientenakten Angaben bezüglich des Vorliegens eines familiären vWS extrahiert werden (Tabelle 7). Bei den übrigen Patienten war die Familienanamnese unbekannt.

157 der erfassten Patienten (60%) hatten eine unauffällige Familienanamnese bei ihrer Vorstellung in der Gerinnungsambulanz angegeben. Nach den Patienten mit (V.a.) erworbenem vWS, lag in der Gruppe mit der Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“ mit 66% am häufigsten eine unauffällige Familienanamnese vor. Auch in der Gruppe der Übergangsdiaagnosen war zum überwiegenden Teil eine unauffällige Familienanamnese dokumentiert worden (62%).

Bei insgesamt 39 der erfassten Patienten (15%) wurde das Vorliegen eines familiären vWS angegeben; das heißt, dass bei einem oder mehreren Familienmitgliedern des Patienten bereits ein vWS bekannt war. Aus der Diagnosegruppe “kein Hinweis auf ein vWS“ gaben nur 7% ein bekanntes familiäres vWS an. Dagegen war in der Gruppe der Übergangsdiaagnosen häufiger ein vWS in der Familie bekannt gewesen (18%). Bei den Patienten mit gesichertem hereditären vWS (Typ 1, Typ 2 mit Subtypen und Typ 3) wiesen 45% der Patienten ein familiäres vWS auf. Vor allem bei (V.a.) vWS Typ 2 war die Angabe eines bekannten familiären vWS häufig (67%).

Bei 65 der erfassten Patienten (25%) waren bei Familienmitgliedern vermehrt Blutungsereignisse aufgetreten, ohne dass die Diagnose einer definierten Gerinnungsstörung gestellt worden war. Diese ungeklärten familiären Blutungsneigungen waren vor allem bei dem vWS Ausschluss “kein Hinweis auf ein vWS“ (27%), bei den Übergangsdiaagnosen (20%) und beim vWS Typ 1 (31%) berichtet worden.

Tabelle 7: Familienanamnese in den Diagnosegruppen

Diagnose		familiäres vWS		ungeklärte familiäre Blutungsneigung		unauffällige Familienanamnese	
kein Hinweis auf ein vWS	n = 161	11	7%	43	27%	107	66%
vWS nicht sicher auszuschließen	n = 27	3	11%	5	19%	19	70%
mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich	n = 28	7	25%	6	21%	15	54%
Übergangsd Diagnosen	n = 55	10	18%	11	20%	34	62%
vWS Typ 1	n = 29	9	31%	9	31%	11	38%
(V.a.) vWS Typ 2	n = 12	8	67%	2	17%	2	17%
vWS Typ 3	n = 0	0	-	0	-	0	-
Gesichertes hereditäres vWS (Typ 1, Typ 2, Typ 3)	n = 38	17	45%	10	26%	11	29%
(V.a.) erworbenes vWS	n = 4	1	25%	0	-	3	75%
Gesamt	n = 261	39	15%	65	25%	157	60%

Die Angaben zur Familienanamnese bei den verschiedenen Diagnosen sind als absoluter Wert (Patientenanzahl) und als relative Häufigkeit in % (Patientenanteil) angegeben. Letztere bezieht sich auf die Anzahl "n" der Patienten mit dokumentierter Familienanamnese in der jeweiligen Diagnosegruppe.

3.4 HÄMOSTASEOLOGISCHE DIAGNOSTIK IM KOHORTENVERGLEICH

Um weiterführende Vergleiche der Kohorten im Hinblick auf die beiden unterschiedlichen vWF-Aktivitätstests anzustellen, werden zunächst die orientierende hämostaseologische Diagnostik und die Kerndiagnostik des vWS im Kohortenvergleich gegenübergestellt. Von den Patienten, die innerhalb eines Untersuchungsjahres mehrfach eine vWS-Diagnostik erhielten, wurden die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen hämostaseologischen Laborparameter jeweils als gemittelte Werte in die Analyse aufgenommen.

Tabelle 8 zeigt die Mediane mit Interquartilsabstand der orientierenden Gerinnungsparameter aus den beiden Kohorten. Alle Mediane befinden sich innerhalb der jeweiligen Referenzbereiche. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten für die Parameter Thrombozyten und Quick ($p < 0,0001$). Auch die Parameter aPTT, TZ und Fibrinogen wiesen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten auf.

Tabelle 8: Orientierende Diagnostik im Kohortenvergleich

	Thrombozyten Mrd/l [135-360]	Quick % [80-130]	aPTT sec [25-38]	TZ sec [16-22]	Fibrinogen g/l [1,8-4,0]
Kohorte RCo	318,5 (247,0 - 393,5)	108,2 (99,5-115,8)	32,0 (29,3-35,2)	18,4 (17,5-19,2)	3,0 (2,4 - 3,7)
Kohorte Ac	257,0 (203 - 317)	100,1 (91 - 105,9)	30,7 (28,6 - 34,6)	18,5 (17,8-19,4)	2,8 (2,4 - 3,4)
Mann-Whitney- U Test	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,0159	p = 0,0399	p = 0,0089

Angabe in Median (IQR)

Die in Tabelle 9 aufgeführten medianen Laborwerte der Kerndiagnostik zur Abklärung eines vWS zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten. Die mediane Col/Epi-Verschlusszeit im PFA-100® lag in beiden Kohorten leicht über dem Referenzbereich. Die Col/ADP-Verschlusszeit und die Werte für FVIII:C und vWF:Ag lagen innerhalb der jeweiligen Referenzbereiche.

Tabelle 9: Kerndiagnostik im Kohortenvergleich

	VZ Col/Epi sec [84-160]	VZ Col/ADP sec [68-121]	FVIII:C % [60-160]	vWF:Ag % [60-200]
Kohorte RCo	168,0 (134 – 261,4)	106,0 (89,2 - 131)	111,3 (93,1 – 136,8)	105,0 (76,6 – 146,9)
Kohorte Ac	164,0 (130 – 244,9)	108,0 (90 - 136)	113,5 (93,5 – 134,9)	104,6 (73,5 – 143,8)
Mann-Whitney-U Test	p = 0,6147	p = 0,2754	p = 0,9708	p = 0,5527

Angabe in Median (IQR)

3.5 vWF-AKTIVITÄT

Die Kohorte RCo, deren 322 Patienten sich im Jahr vor der Umstellung des vWF-Aktivitätstests in der Gerinnungsambulanz des UKE vorstellten, wurde mit der Kohorte Ac, deren 298 Patienten sich im Jahr nach der Umstellung vorstellten, verglichen.

Außerdem wurde innerhalb der Kohorte V, die 10 Patienten umfasste, ein direkter Vergleich zwischen den beiden parallel gemessenen Aktivitätstests durchgeführt.

3.5.1 vWF-AKTIVITÄT IN DEN KOHORTEN RCo UND AC

Tabelle 10 zeigt den Median mit Interquartilsabstand der vWF-Aktivität nach dem jeweiligen vWF-Aktivitätstest (vWF:RCo oder vWF:Ac). Für Kohorte RCo ergab sich ein vWF:RCo-Median von 92,2%. In der Kohorte Ac lag der vWF:Ac-Median bei 97,8%. Die Ergebnisse der jeweiligen Aktivitätstests unterschieden sich zwischen den beiden Kohorten nicht signifikant voneinander ($p = 0,2691$).

Tabelle 10: vWF-Aktivität im Kohortenvergleich

		Median (IQR) %	Mann-Whitney-U Test
Kohorte RCo	n = 322	92,2 (62,8 - 131)	p = 0,2691
Kohorte Ac	n = 298	97,8 (65,5 – 136,1)	

Der Anteil der Patienten der Kohorte RCo, der einen erniedrigten vWF:RCo-Wert aufwies, lag bei 28,9%. Im Gegensatz dazu ergab sich für die Kohorte Ac nur ein Patientenanteil von 21,8% mit einem erniedrigten vWF:Ac-Wert (Tabelle 11). Das heißt, dass im Gesamtkollektiv dieser Arbeit 7,1% mehr erniedrigte vWF-Aktivitätswerte gemessen wurden, wenn der vWF:RCo-Test zur Anwendung kam. Mit einem Chi-Quadrat-Test konnte berechnet werden, dass das Merkmal “Art des Aktivitätstests“ (vWF:RCo vs. vWF:Ac) und das Merkmal “vWF-Aktivität“ (erniedrigt vs. normal) statistisch signifikant voneinander abhingen ($p = 0,0435$): mit dem vWF:RCo wurde signifikant häufiger eine vWF-Aktivität unterhalb des Normbereichs gemessen.

Von den Patienten der Kohorte RCo, bei denen ein erniedrigter vWF:RCo-Wert gemessen wurde (93 Patienten), wiesen 21,5% trotzdem eine normale PFA-100[®]-Verschlusszeit in beiden Kartuschen (Col/Epi und Col/ADP) auf. Von den Patienten der Kohorte Ac mit erniedrigten vWF:Ac-Werten (65 Patienten) hatten nur 7,7% trotzdem eine normale PFA-100[®]-Verschlusszeit. Die Anzahl der Patienten mit normalen PFA-100[®]-Verschlusszeiten trotz erniedrigter vWF-Aktivität unterschied sich ebenfalls signifikant voneinander zwischen den beiden Kohorten ($p = 0,0192$) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Erniedrigter Aktivitätstest im Kohortenvergleich

		Aktivitätstest erniedrigt		davon mit normaler VZ	
		Patientenanzahl	Anteil	Patientenanzahl	Anteil
Kohorte RCo	n = 322	93	28,9%	20	21,5%
Kohorte Ac	n = 298	65	21,8%	5	7,7%
Chi-Quadrat-Test		p = 0,0435		p = 0,0192	

Patientenanzahl und Anteil (in %) der Patienten innerhalb der Kohorte mit erniedrigter vWF-Aktivität; von diesen Patienten mit erniedrigter vWF-Aktivität (Kohorte RCo n = 93; Kohorte Ac n = 65) wurde die Patientenanzahl und der Anteil (in %) mit normaler Verschlusszeit ermittelt.

3.5.2 vWF-AKTIVITÄT IN DER KOHORTE V

Im Umstellungszeitraum des vWF-Aktivitätstests im September 2011 wurden bei 10 Patienten, die sich in der Gerinnungsambulanz des UKE vorstellten, beide Aktivitätstests parallel durchgeführt. Diese Patienten werden als Kohorte V zusammengefasst. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse der vWF-Aktivität in % beider Tests in Kohorte V. Das Ergebnis des vWF:RCo-Tests fiel in 9 von 10 Fällen niedriger aus als das des vWF:Ac-Tests. Die vWF-Aktivität, die in Kohorte V mit dem vWF:RCo-Test gemessen wurde, betrug im Mittel 114,1%, während die vWF-Aktivität, die mit dem vWF:Ac-Test gemessen wurde, im Mittel bei 132,1% lag. Die Ergebnisse der beiden Tests unterschieden sich signifikant voneinander (p = 0,0277) (Tabelle 12).

Tabelle 12: vWF-Aktivität in Kohorte V

Aktivitätstest		MW ± SAW	gepaarter t-Test
vWF:RCo	n = 10	114,1 ± 41,1	p = 0,0277
vWF:Ac		132,1 ± 50,1	

In zwei Fällen (Patienten-ID: 599 und 601) lag der ermittelte vWF:RCo-Wert unterhalb seines Referenzbereiches (66 - 183%), während der vWF:Ac-Wert noch innerhalb seines Referenzbereiches (61 - 179%) lag. Bei Patient 599 wurde nach kompletter vWS-Diagnostik, also nach Analyse aller Laborparameter sowie nach Würdigung der klinischen Symptomatik (bei dem Patienten war eine Gelenkblutung und eine perioperative Blutung aufgetreten) und der Familienanamnese (unauffällig) im Arztbrief die Diagnose "vWS nicht sicher auszuschließen" gestellt. Patient 601 erhielt trotz erniedrigtem vWF:RCo-Wert

bei unbekannter Familienanamnese und Auftreten einer “sonstigen Blutung“ (Einblutung in eine Bakerzyste) die Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“. Auch die anderen acht Patienten der Kohorte V wurden mit der Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“ entlassen.

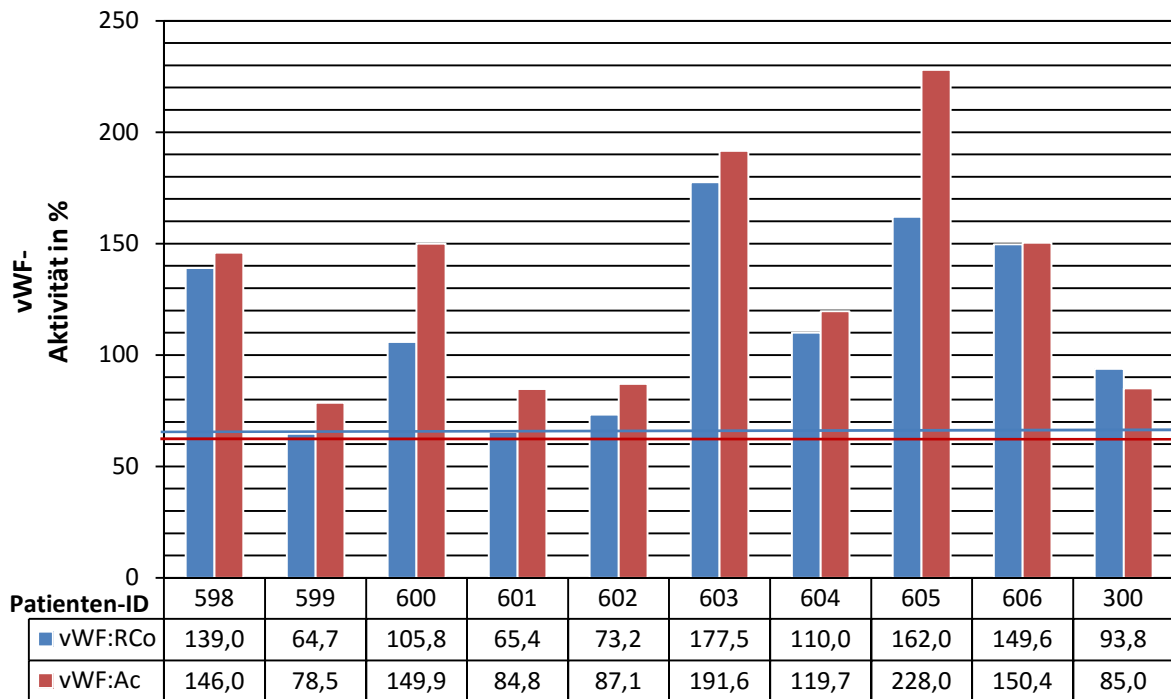


Abbildung 3: vWF-Aktivität bei parallel gemessenen Tests

Für die 10 Patienten aus Kohorte V (jeweils einer Patienten-ID zugeordnet) sind die Werte (in %) der parallel gemessenen Aktivitätstests vWF:RCo und vWF:Ac gegenübergestellt. Die unteren Grenzen der jeweiligen Referenzbereiche sind durch farbige horizontale Linien gekennzeichnet (untere Grenze vWF:RCo 66%; untere Grenze vWF:Ac 61%).

Der Vergleich der vWF:RCo- und vWF:Ac-Werte der 10 Patienten aus Kohorte V ergab eine gute Korrelation der beiden Tests (Abbildung 4) mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r = 0,909$. Der Regressionskoeffizient von 1,121 zeigt, dass die vWF:Ac-Werte, wie bereits zuvor dargestellt, durchschnittlich etwas höher ausfielen als die vWF:RCo-Werte.

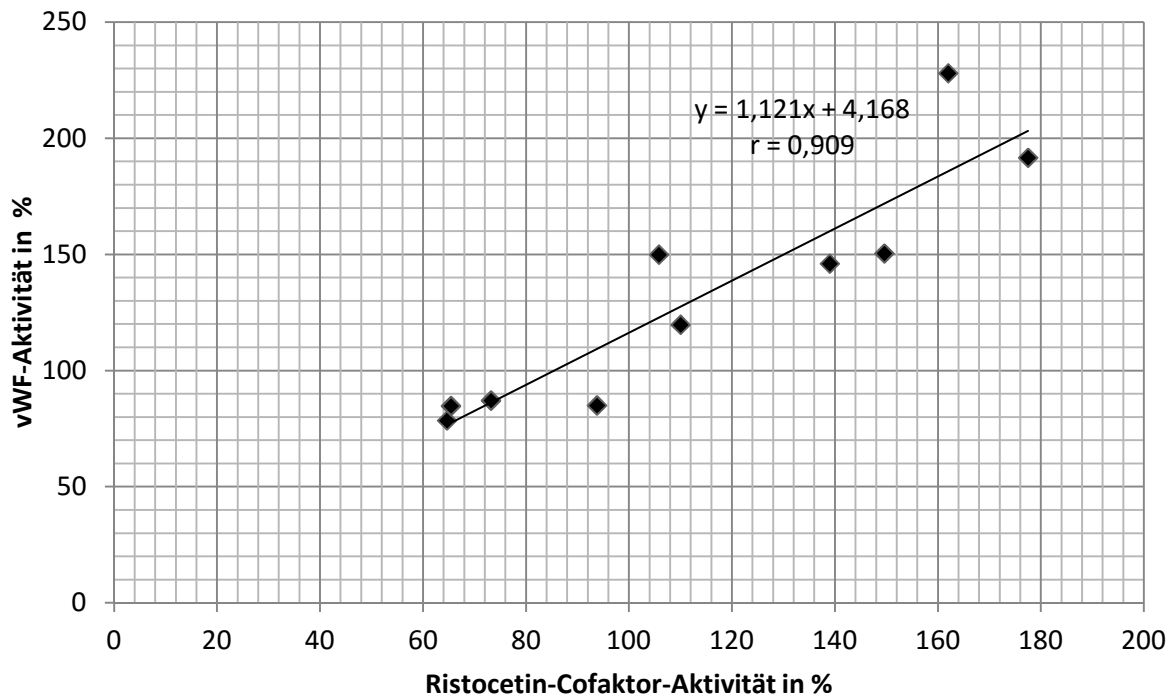


Abbildung 4: Korrelation von Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und vWF-Aktivität in der Kohorte V

r = Pearson-Korrelationskoeffizient

3.6 ERWEITERTE VWS-DIAGNOSTIK

Kollagen-Bindungsaktivität

Bei einigen Patienten, bei denen es Hinweise auf ein vWS gab, wurde in einem externen Labor die Kollagen-Bindungsaktivität des vWF (vWF:CB) bestimmt, welche ebenfalls ein Parameter für die vWF-Funktion darstellt. In Kohorte RCo wurde die Ermittlung der vWF:CB bei 62 Patienten (19% der Kohorte), in Kohorte Ac bei 59 Patienten (20% der Kohorte) veranlasst. Die Ergebnisse der vWF:CB-Tests wurden gegen die zum selben Untersuchungszeitpunkt erhobenen Ergebnisse des vWF:RCo-Tests bzw. des vWF:Ac-Tests aufgetragen und jeweils ein Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient (r_s) errechnet (Abbildung 5 u. 6).

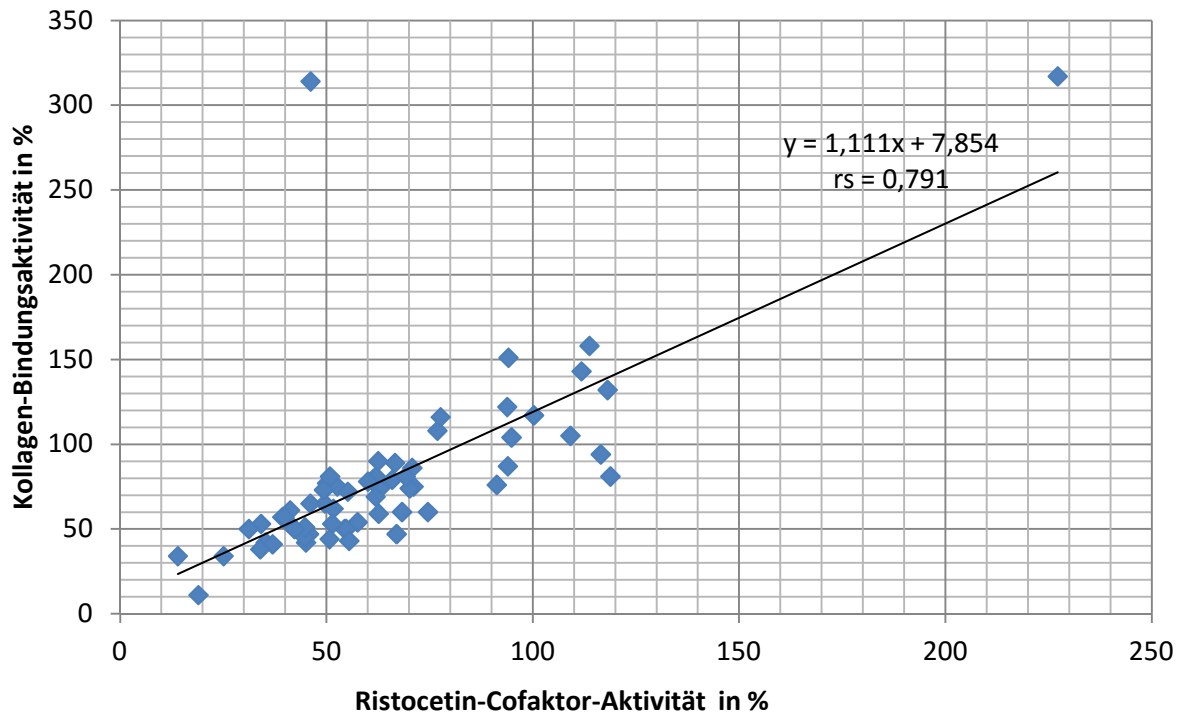


Abbildung 5: Korrelation von Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und Kollagen-Bindungsaktivität

rs = Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient

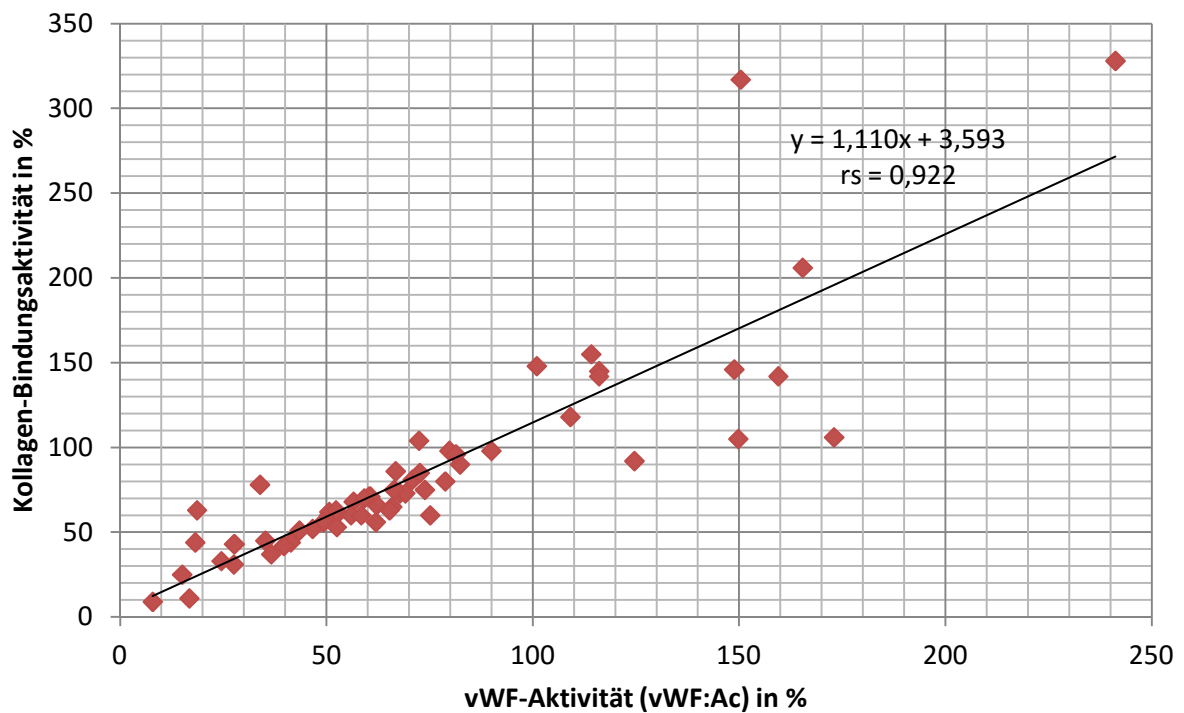


Abbildung 6: Korrelation von vWF-Aktivität und Kollagen-Bindungsaktivität

rs = Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient

Abbildung 5 zeigt die in Kohorte RCo ermittelten Ergebnisse der Kollagen-Bindungsaktivität in % gegenüber der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität in %. Es bestand ein positiver linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient r_s betrug 0,791. Auch in der Kohorte Ac wurde ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Kollagen-Bindungsaktivität und der vWF-Aktivität gefunden; hier betrug r_s 0,922. Das heißt die vWF:CB- und vWF:Ac-Werte korrelierten stärker als die vWF:CB- und vWF:RCo-Werte.

In beiden Gruppen wurde bei der Gegenüberstellung der vWF:CB- und vWF:RCo-Werte bzw. vWF:Ac-Werte ein Regressionskoeffizient von 1,11 berechnet, was zeigt, dass die Werte der vWF:CB im Mittel geringfügig höher ausfielen als die der anderen beiden Aktivitätstests. Die Patienten, die im ersten Beobachtungsjahr eine erweiterte vWS-Diagnostik erhielten, hatten einen vWF:RCo-Median von 56,5% und einen vWF:CB-Median von 70,5%. Im zweiten Beobachtungsjahr ergab sich für die Patienten ein medianer vWF:Ac-Wert von 62,2% und ein medianer vWF:CB-Wert von 70,0%.

Ristocetin-induzierte Thrombozytenagglutination (RIPA)

Bei 555 Patienten (92% des Gesamtkollektivs), die in der Gerinnungsambulanz des UKE eine vWS-Diagnostik erhielten, wurde die RIPA in der Verdünnungsstufe 1,2 mg/ml getestet. Der Median in der Kohorte RCo betrug 94,4% und in der Kohorte Ac 87,8% (Tabelle 13). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten bezüglich der Ergebnisse des RIPA-Tests. Die RIPA in anderen Verdünnungsstufen wurde deutlich seltener durchgeführt, vor allem bei Verdacht auf vWS Typ 2B.

Tabelle 13: RIPA im Kohortenvergleich

		Median (IQR) % [60 - 95]	Mann-Whitney-U Test
Kohorte RCo	n = 299	94,4 (89 - 99)	< 0,0001
Kohorte Ac	n = 256	87,8 (81 - 94)	

RIPA in der Verdünnungsstufe 1,2 mg/ml

vWF-Multimer-Analyse

Bei 125 Patienten des Gesamtkollektivs (21%) wurde bei Verdacht auf vWS eine erweiterte Diagnostik im Sinne einer vWF-Multimer-Analyse durchgeführt.

Bei 109 (87%) der Untersuchten ergab sich, dass alle Multimere des vWF vorhanden waren. Von diesen Patienten erhielten 36 die Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“ und 43 Patienten wurde eine der beiden Übergangsdiasgnosen zugewiesen. Bei 25 Patienten, deren vWF-Multimere vollständig vorhanden waren, ergab sich die Diagnose vWS Typ 1 und bei 5 Patienten (V.a.) erworbenes vWS (Tabelle 14).

In der vWF-Multimer-Analyse stellte sich bei 16 der untersuchten Patienten ein Fehlen oder eine relative Abnahme der großen und ggf. mittelgroßen vWF-Multimere heraus. In diesen Fällen wurden die Diagnosen (V.a.) vWS Typ 2A, vWS Typ 2B oder (V.a.) erworbenes vWS gestellt (Tabelle 14).

Tabelle 14: vWF-Multimer-Analyse und Diagnosen

	alle vorhanden	Große und Mittelgroße fehlen	Große fehlen	relative Abnahme der Großen
kein Hinweis auf ein vWS	36	-	-	-
Übergangsdiasgnosen	43	-	-	-
vWS Typ 1	25	-	-	-
(V.a.) vWS Typ 2A	-	-	1	6
vWS Typ 2B	-	1	2	-
(V.a.) erworbenes vWS	5	-	1	5
Gesamt (n = 125)	109	1	4	11

3.7 DIAGNOSENVERTEILUNG

In Tabelle 15 ist für die beiden Kohorten die Häufigkeit der Diagnosen, die nach jeder Patientenvorstellung inklusive vWS-Diagnostik im Arztbrief dokumentiert wurden, aufgezeigt. Bei Patienten, die sich im jeweiligen Untersuchungsjahr mehrfach vorstellten, wurde die nachfolgende Diagnose nur dann mit in die Berechnung einbezogen, wenn diese von der vorherigen Diagnose abwich. Das heißt, dass ein Patient, dessen mehrfache vWS-Diagnostik immer in derselben Diagnose resultierte, nur einmal in die Berechnung aufgenommen wurde. In der Kohorte RCo gab es 54 Patienten, die sich mehr als einmal vorstellten (47 Patienten zwei Vorstellungen; 6 Patienten drei Vorstellungen; 1 Patient mehr als drei Vorstellungen). Bei 25 dieser Patienten (46% der Fälle) wurde die Diagnose bei der Zweit- oder Drittvorstellung geändert. In der Kohorte Ac wurde die Diagnose bei 16 von 50 Patienten (32% der Fälle) bei der Zweit- oder Drittvorstellung geändert (41

Patienten zwei Vorstellungen; 7 Patienten drei Vorstellungen; 2 Patienten mehr als drei Vorstellungen). Die beiden Kohorten unterschieden sich im Hinblick auf den Anteil revidierter Diagnosen bei Mehrfachvorstellung nicht signifikant voneinander ($p = 0,1361$). Die häufigste Diagnoseänderung in Kohorte RCo bezog sich auf den Wechsel von “vWS nicht sicher auszuschließen“ zu der Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“ (in 6 von 25 Fällen), wohingegen in der Kohorte Ac bei Wiedervorstellung die Diagnose am häufigsten von “nicht sicher auszuschließen“ zu “mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ wechselte (in 5 von 16 Fällen). Am zweithäufigsten konnte in beiden Kohorten die Diagnose “mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ bei Wiedervorstellung schließlich als Diagnose “vWS Typ 1“ gesichert werden.

Tabelle 15 zeigt, dass in mehr als der Hälfte der Fälle in beiden Kohorten die Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“ gestellt wurde. Darauf folgten als zweit- und dritthäufigste Diagnosen die unklaren Übergangsdagnosen “mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ und “vWS nicht sicher auszuschließen“.

Im Vergleich beider Kohorten fällt auf, dass mit einer Differenz von 5,9% in der Kohorte Ac deutlich häufiger die Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“ gestellt wurde als in der Kohorte RCo (Kohorte Ac: 65,0%; Kohorte RCo: 59,1%) ($p = 0,1194$).

Die unbefriedigenden Übergangsdagnosen “vWS nicht sicher auszuschließen“ und “mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ sind in der Kohorte RCo mit 11,2% und 12,7% häufiger vertreten als in der Kohorte Ac mit 9,5% und 9,2% ($p = 0,4792$; $p = 0,1583$). Ebenso wurde die endgültige Diagnose “vWS Typ 1“ mit 7,8% häufiger in der Kohorte RCo gestellt als in der Kohorte Ac mit 5,7% ($p = 0,2964$).

In Abbildung 7 sind die häufigsten Diagnosen im Kohortenvergleich graphisch dargestellt.

Tabelle 15: Diagnosehäufigkeiten in den Kohorten

Diagnose	Gesamt		Kohorte RCo		Kohorte Ac	
	Anzahl n = 647	Anteil in %	Anzahl n = 347	Anteil in %	Anzahl n = 314	Anteil in %
kein Hinweis auf ein vWS	404	62,4%	205	59,1%	204	65,0%
vWS nicht sicher auszuschließen	67	10,4%	39	11,2%	30	9,5%
mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich	72	11,1%	44	12,7%	29	9,2%
Übergangsd Diagnosen	139	21,5%	83	23,9%	59	18,8%
vWS Typ 1	44	6,8%	27	7,8%	18	5,7%
vWS Typ 2 (noch keinem Subtyp zugeordnet)	1	0,1%	1	0,3%	1	0,3%
vWS Typ 2A	15	2,3%	4	1,1%	11	3,5%
vWS Typ 2B	4	0,6%	2	0,6%	3	1,0%
vWS Typ 2M	1	0,1%	1	0,3%	1	0,3%
V. a. vWS Typ 2	9	1,4%	5	1,4%	4	1,3%
V. a. vWS Typ 2A	2	0,3%	-	-	2	0,6%
V. a. vWS Typ 2B	1	0,1%	-	-	1	0,3%
vWS Typ 3	3	0,5%	2	0,6%	2	0,6%
erworbenes VWS	8	1,2%	6	1,7%	3	1,0%
V. a. erworbenes VWS	16	2,5%	11	3,2%	5	1,6%

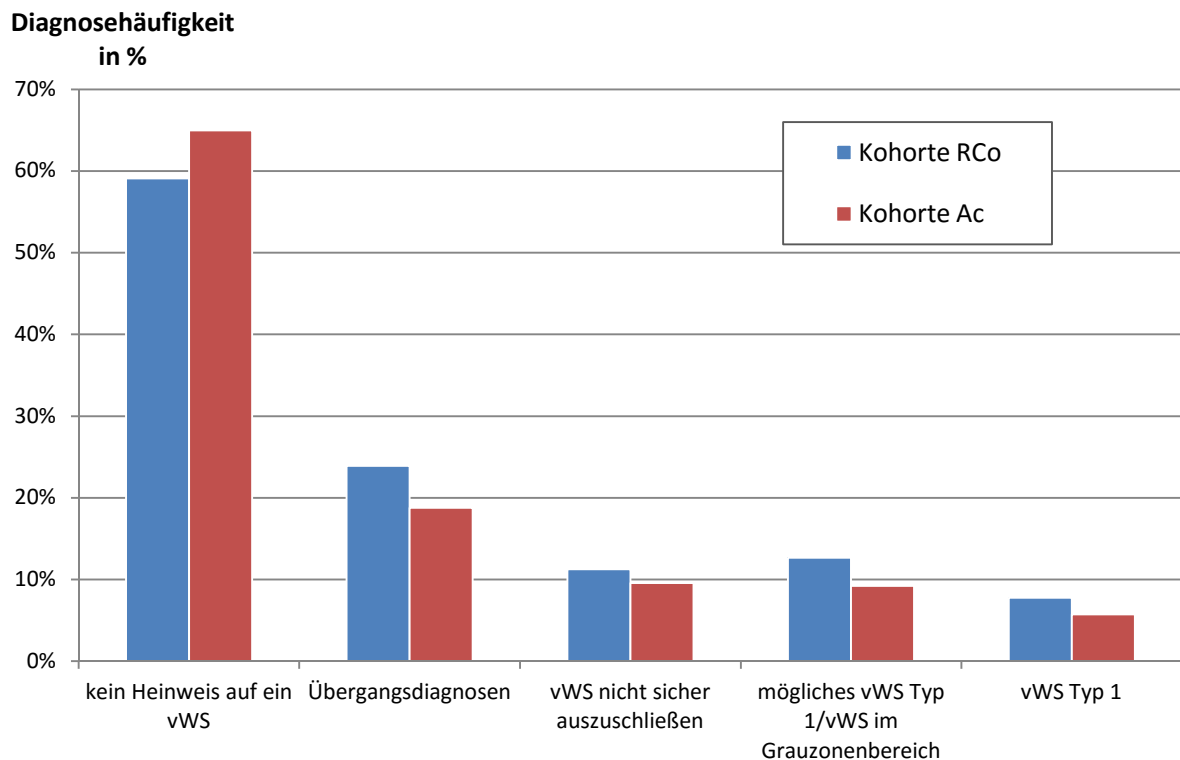


Abbildung 7: Vergleich der Diagnosehäufigkeit zwischen den Kohorten

In diesem Diagramm sind die am häufigsten gestellten Diagnosen „kein Hinweis auf ein vWS“, „vWS nicht sicher auszuschließen“, „mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ (die beiden letzteren auch als Übergangsd Diagnosen zusammengefasst) und „vWS Typ 1“ in den beiden Kohorten gegenübergestellt. Dargestellt ist die Häufigkeit der Diagnose in % bezogen auf alle in der jeweiligen Kohorte gestellten Diagnosen (Kohorte RCo n = 347; Kohorte Ac n = 314).

In Tabelle 16 ist der Median mit Interquartilsabstand der vWF-Aktivität, gemessen mit dem jeweiligen Test, in den Diagnosegruppen dargestellt. Die vWF-Aktivität in den beiden Kohorten unterschied sich für keine Diagnosegruppe signifikant voneinander. Die mediane vWF-Aktivität bei der Ausschlussdiagnose „kein Hinweis auf ein vWS“ betrug mit dem vWF:RCo-Test 118,1% und mit dem vWF:Ac-Test 119,2%. Die Patienten mit der Diagnose vWS Typ 1 hatten einen Median der vWF-Aktivität von 39,8% mit dem vWF:RCo-Test und von 43,5% mit dem vWF:Ac-Test. Die Übergangsd Diagnose „vWS nicht sicher auszuschließen“ wurde in Kohorte RCo mit einem median erniedrigten Wert gestellt, während diese Diagnose in Kohorte Ac mit einem innerhalb des Referenzbereichs liegenden vWF-Aktivitätswerts gestellt wurde. Die Diagnose „mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ wurde in beiden Kohorten mit einem Median unterhalb des jeweiligen Referenzbereichs der vWF-Aktivität formuliert.

Tabelle 16: Median der vWF-Aktivität in den Diagnosegruppen

	Kein Hinweis auf ein vWS	vWS nicht sicher auszuschließen	mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich	vWS Typ 1
vWF:RCo [66 - 183%]	118,1 % (93,4 – 140,8)	64,3 % (57,6 – 71,1)	54,5 % (48 – 60,7)	39,8 % (31,2 – 47,5)
vWF:Ac [61 - 179%]	119,2 % (91,8 – 145,3)	63,3 % (56,3 – 71,3)	54,1 % (47,1 – 60,3)	43,5 % (35,9 – 58,5)
Mann-Whitney-U Test	p = 0,6042	p = 0,6397	p = 0,9340	p = 0,2375

Median (IQR) der vWF-Aktivität in % (jeweils mit dem vWF:RCo-Test oder mit dem vWF:Ac-Test gemessen [jeweiliger Referenzbereich]) für die einzelnen Diagnosegruppen.

Innerhalb der Gruppe von Patienten mit gesichertem hereditärem vWS (n = 68) ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung: 65% vWS Typ 1, 31% vWS Typ 2 und 4% vWS Typ 3 (Tabelle 17).

Tabelle 17: Häufigkeit der hereditären vWS-Typen

hereditäres vWS	Anzahl (n = 68)	Anteil in %
Typ 1	44	65%
Typ 2	21	31%
Typ 3	3	4%

3.8 VERGLEICH DER DIAGNOSTISCHEN TESTS ZUR BESTIMMUNG DER vWF-AKTIVITÄT

Unter allen gestellten Diagnosen (das heißt, dass auch die Diagnosen eingeschlossen wurden, die bei Mehrfachvorstellung eines Patienten nicht mit der initial gestellten Diagnose übereinstimmten) der Kohorte RCo (n = 347) konnte 43-mal ein vWS gesichert werden. Somit ergibt sich in dieser Arbeit für die Kohorte RCo eine Prävalenz des vWS von 12,4%. 37 dieser Patienten mit gesichertem vWS zeigten erwartungsgemäß eine erniedrigte vWF-Aktivität im vWF:RCo-Test. Bei 6 Patienten wurde trotz eines vWF:RCo-Wertes im Normbereich nach sorgfältiger Analyse der weiteren Diagnostik inklusive klinischer Symptome und Familienanamnese ein vWS als gesichert im Arztbrief formuliert. Diese Konstellation ergibt für das Patientenkollektiv der Kohorte RCo in dieser Arbeit eine Sensitivität von 86,0% für den vWF:RCo-Test (Tabellen 18 und 20).

Unter den Patienten, bei denen ein vWS ausgeschlossen bzw. nicht sicher diagnostiziert werden konnte (n = 304), hatten 230 einen vWF:RCo-Wert im Normbereich. Bei 74 Patienten konnte jedoch trotz eines erniedrigten vWF:RCo-Wertes kein vWS sicher diagnostiziert werden. Daraus resultiert eine Spezifität des vWF:RCo-Tests von 75,7% (Tabellen 18 und 20).

Tabelle 18: Vierfeldertafel vWF:RCo-Test

Ergebnis vWF:RCo-Test	Gesichertes vWS		Gesamt
	Ja	Nein	
Im Normbereich	6	230	236
Erniedrigt	37	74	111
Gesamt	43	304	347

Gesichertes vWS: Typ 1, Typ 2 mit Subtypen, Typ 3 oder erworbenes vWS im Arztbrief

In der Kohorte Ac lag die Prävalenz für ein gesichertes vWS ebenfalls bei 12,4%. Unter den Patienten, bei denen ein vWS gesichert werden konnte (n = 39), hatten 33 Patienten erwartungsgemäß einen erniedrigten Wert im vWF:Ac-Test, sodass sich eine Sensitivität von 84,6% für den vWF:Ac-Test ergibt (Tabellen 19 und 20).

In der Kohorte Ac hatten, unter den Patienten, bei denen ein vWS ausgeschlossen bzw. nicht sicher diagnostiziert werden konnte (n = 275), 42 Patienten einen erniedrigten vWF:Ac-Wert und 233 Patienten einen vWF:Ac-Wert im Normbereich. Für den vWF:Ac-Test ergibt sich aus dieser Konstellation eine Spezifität von 84,7% (Tabellen 19 und 20).

Tabelle 19: Vierfeldertafel vWF:Ac-Test

Ergebnis vWF:Ac-Test	Gesichertes vWS		Gesamt
	Ja	Nein	
Im Normbereich	6	233	239
Erniedrigt	33	42	75
Gesamt	39	275	314

Gesichertes vWS: Typ 1, Typ 2 mit Subtypen, Typ 3 oder erworbenes vWS im Arztbrief

Tabelle 20: Vergleich der diagnostischen Tests zur Bestimmung der vWF-Aktivität

	Prävalenz	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
vWF:RCo-Test	12,4%	86,0%	75,7%	33,3%	97,5%
vWF:Ac-Test	12,4%	84,6%	84,7%	44,0%	97,5%

Die Prävalenz ist hier als das relative Vorkommen des gesicherten vWS in der jeweiligen Kohorte gemeint; PPW = positiv prädiktiver Wert; NPW = negativ prädiktiver Wert.

Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich ein positiv prädiktiver Wert des vWF:RCo-Tests von 33,3% errechnen. Das heißt, dass nur bei einem Drittel der Patienten, bei denen ein erniedrigter vWF:RCo-Wert gemessen wird, tatsächlich ein vWS diagnostiziert werden kann.

Für den vWF:Ac-Test ergibt sich in dieser Arbeit ein positiv prädiktiver Wert von 44%. Das heißt, wenn mit dem vWF:Ac-Test gemessen wird, haben statistisch gesehen 44 von 100 Patienten mit einem erniedrigten Aktivitätswert tatsächlich ein vWS. Der negativ prädiktive Wert ist für beide Aktivitätstests deutlich höher. Für beide Tests gilt, dass ein Patient, mit einer vWF-Aktivität im Normbereich mit einer Wahrscheinlichkeit von 97,5% tatsächlich gesund ist (Tabelle 20).

4. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es, durch retrospektive Analyse herauszustellen, ob die Umstellung der Methode zur Bestimmung der vWF-Aktivität im September 2011 am UKE zu einer Verbesserung der vWS-Diagnostik im klinischen Alltag geführt hat. Da vor allem die Diagnose des milden vWS Typ 1 eine diagnostische Herausforderung darstellt, sollte insbesondere untersucht werden, ob die Verwendung des neuen vWF:Ac-Tests häufiger den definitiven Ausschluss eines vWS oder die definitive Diagnose vWS Typ 1 erlaubte und seltener in den Übergangsdagnosen "vWS nicht sicher auszuschließen" oder "mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich" resultierte als die Verwendung des vWF:RCo-Tests. Dazu wurden die Kohorten RCo und Ac, in denen die Diagnostik mit den beiden unterschiedlichen vWF-Aktivitätstests ein Jahr vor und ein Jahr nach Umstellung erfolgt war miteinander verglichen. Außerdem wurden in Kohorte V die Ergebnisse der vWF-Aktivitätsmessung mit beiden Tests, die in einem kurzen Zeitraum parallel erfolgte, gegenübergestellt. Die dazu verwendeten Methoden und die Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

Eine Grundvoraussetzung, um die zahlreichen Vergleiche zwischen den beiden Kohorten RCo und Ac in dieser Arbeit durchzuführen und zu bewerten, ist, dass sich die Kohorten in demographischen Daten wie Geschlechterverteilung ($p = 0,7241$) und Alter ($p = 0,2063$) nicht signifikant voneinander unterschieden. In der Gesamtbevölkerung betrifft das vWS Frauen und Männer etwa gleich häufig. In dem Patientenkollektiv dieser Arbeit lag das Verhältnis von Frauen zu Männern bei etwa 2,4:1 und bei Patienten mit vWS bei 1,9:1. Da das Kollektiv dieser Arbeit aus Patienten bestand, die sich aus eigenem Antrieb wegen des Verdachts auf eine Hämostasestörung in der Gerinnungsambulanz des UKE vorstellten, kann eine mögliche Erklärung für diese Geschlechterverteilung ein generell häufigeres Aufsuchen eines Arztes durch Frauen sein. Außerdem machen sich Blutungsneigungen bei Frauen oft früher bemerkbar, da sie durch die Menstruation und durch Geburten zusätzlichen Provokationen der Hämostase ausgesetzt sind. Die ungleiche Geschlechterverteilung des Gesamtkollektivs sollte jedoch keinen Einfluss auf die weiteren Auswertungen dieser Arbeit haben, da sie in beiden Kohorten vorlag.

Zur Diagnosestellung eines vWS gehören drei Hauptkriterien: eine positive Blutungsanamnese seit der Kindheit, eine positive Familienanamnese und eine reduzierte

vWF-Aktivität im Plasma. Diese drei Kriterien wurden in der vorliegenden Arbeit an einem Patientenkollektiv von 606 Patienten untersucht.

Die Blutungsneigung nimmt beim vWS typischerweise vom Typ 1 mit eher milden Symptomen über die verschiedenen Subtypen des Typ 2 bis hin zum Typ 3 mit schwerer Blutungsneigung zu. Diese Abstufung wurde bei den vWS-Patienten dieser Arbeit nicht vollständig übereinstimmend gefunden. Es fand sich zwar eine Zunahme der Blutungsschwere vom vWS-Ausschluss über die verschiedenen Übergangsdagnosen und die Typen 1 und 2 bis hin zum schweren vWS Typ 3; die Patienten der Gruppe (V. a.) vWS Typ 2 (2,5 Symptome pro Patient) hatten jedoch geringfügig weniger Blutungssymptome als die Patienten mit einem vWS Typ 1 (2,6 Symptome pro Patient) (Tabelle 6). Die deutlichere Blutungsneigung beim vWS Typ 1 in dieser Arbeit kann durch die Problematik der Diagnosestellung des Typ 1 beeinflusst und somit leichtgradig gegenüber der wahren Ausprägung der Blutungsneigung beim vWS verschoben sein. Bei sehr milder Blutungsneigung, wie sie beim Typ 1 durchaus üblich ist, kann ein vWS leicht übersehen werden (und somit nicht in die Gruppe vWS Typ 1 dieser Arbeit einfließen), während bei Patienten mit stärker ausgeprägter Blutungsneigung eher die gesicherte Diagnose vWS Typ 1 gestellt wird. In der klinischen Routine kann die Diagnose des vWS Typ 1 nicht durch eine molekulargenetische Diagnostik gesichert werden, und eine eindeutige Blutungsneigung ist zwingend für die Diagnosesicherung erforderlich, wohingegen beim vWS Typ 2 die Diagnosesicherung klassischerweise durch die vWF-Multimer-Analyse sowie das Verhältnis von vWF-Aktivität zu vWF-Antigen erfolgt und beim vWS Typ 3 das komplette Fehlen des vWF relativ einfach nachzuweisen ist. Es zeigt sich also in dieser Arbeit, dass insbesondere für die Erkennung des vWS Typ 1 eine eindeutige Blutungsanamnese von zentraler Bedeutung ist und erheblich zur Differenzierung eines vWS Typ 1 von Normvarianten mit einer vWF-Konzentration im unteren Grenzbereich beiträgt.

Als häufigstes Blutungssymptom kam es bei vWS-Patienten dieser Arbeit zu kutanen Hämatomen gefolgt von Menorrhagien, perioperativen Blutungen und Epistaxis. In der Untersuchung zur Inzidenz von Blutungssymptomen bei 1.286 vWS-Patienten von Federici et al. (2002) waren die vier häufigsten Symptome ähnlich (diejenigen ausgenommen, die in dieser Arbeit nicht erfasst wurden): Epistaxis, Blutungen nach Zahnextraktionen, Menorrhagien und perioperative Blutungen.

Blutungssymptome traten bei Patienten mit gesichertem vWS 1,4-fach häufiger auf als im Gesamtkollektiv (Abbildung 2). Dieser Wert spiegelt nicht die Differenz von

Blutungssymptomen zwischen Patienten mit vWS und Normalpersonen wider (die sicherlich deutlich höher ausfallen würde), da die für diese Arbeit untersuchten Patienten aufgrund von Blutungssymptomen zur Abklärung einer Hämostasestörung vorstellig wurden.

Eine Studie über die Aussagekraft eines Fragebogens in der Diagnostik von Gerinnungsstörungen zeigte, dass Blutungen nach Zahnextraktionen und perioperative Blutungen einen größeren Voraussagewert hinsichtlich des Vorliegens einer Gerinnungsstörung hatten als andere Blutungssymptome (*Sramek A et al. 1995*). Das Vorkommen dieser Blutungssymptome unterschied sich in dieser Arbeit bei Patienten mit gesichertem vWS im Vergleich zum Gesamtkollektiv nicht deutlicher voneinander, als es bei anderen Symptomen der Fall war. Dies könnte daran liegen, dass im Gesamtkollektiv neben Patienten mit vWS auch Patienten mit anderen Hämostasestörungen vertreten waren. Im untersuchten Patientenkollektiv traten die Symptome Epistaxis und Menorrhagien bei vWS-Patienten deutlich häufiger auf als im Gesamtkollektiv und zwar vor allem beim vWS Typ 1 (2,3-fach häufiger) (Abbildung 2). In einer Studie von Kadir et al. (1998) wurden Patientinnen mit Menorrhagien auf erbliche Blutungsneigungen untersucht. In 17% der Fälle fanden sich erbliche Hämostasestörungen; mehr als die Hälfte davon waren Patientinnen mit vWS. In weiteren Studien reicht die Prävalenz des vWS bei Patientinnen mit Menorrhagien von 5 - 24% (*Shankar M et al. 2004*). Bei Patienten, die sich zur Abklärung einer Hämostasestörung vorstellen, wie es im Patientenkollektiv dieser Arbeit der Fall war, sollte demnach neben den perioperativen Blutungen und Blutungen nach Zahnextraktionen, vor allem beim Auftreten des Blutungssymptoms Menorrhagie an ein vWS gedacht werden. Andere Symptome wie z. B. kutane Hämatome, Zahnfleischbluten oder Gelenkblutungen scheinen aufgrund des geringen Unterschieds im Vorkommen zum Gesamtkollektiv in dieser Arbeit weniger auf ein manifestes vWS hinzudeuten.

Eine positive Familienanamnese ist nach der Blutungssymptomatik das zweite wesentliche Kriterium in der Diagnostik des vWS. In dieser Arbeit zeigte sich, dass unter den Patienten, die Angaben zur Familienanamnese gemacht hatten, diejenigen mit (V.a.) vWS Typ 2 am häufigsten ein familiäres vWS aufwiesen (67%). Bei den Patienten mit vWS Typ 1 gaben nur 31% ein bekanntes vWS in der Familie und ebenfalls 31% eine ungeklärte familiäre Blutungsneigung an. Bei 38% der Patienten mit vWS Typ 1 war jedoch eine unauffällige Familienanamnese dokumentiert worden. Eigentlich sollte, aufgrund der autosomal dominanten Vererbung des vWS Typ 1, bei diesen Patienten häufiger eine

positive Familienanamnese vorliegen. Ein vWS Typ 1 kann jedoch in aufeinander folgenden Generationen mit unterschiedlicher Penetranz auftreten, sodass milde Formen verborgen bleiben können, falls die Betroffenen keinen Ereignissen mit erhöhter Blutungsgefahr, wie z. B. operativen Eingriffen ausgesetzt sind. Außerdem könnte die Schwierigkeit der Diagnosesicherung des vWS Typ 1 dazu beigetragen haben, dass auch bei vermeintlich erkrankten Familienmitgliedern der hier erfassten Patienten häufig nur eine ungeklärte Blutungsneigung ohne endgültige Diagnose bestand und somit bei diesen Patienten oft keine eindeutig positive Familienanamnese festgehalten werden konnte. Umso herausfordernder ist auch beim diagnostischen Kriterium der Familienanamnese eine Differenzierung des milden vWS Typ 1 von Normalpersonen, woraus häufig unklare Übergangsd Diagnosen resultieren.

In dieser Arbeit ist deutlich geworden, dass mithilfe der Kriterien Blutungsanamnese und Familienanamnese in einem Patientenkollektiv mit Verdacht auf Hämostasestörung eine Differenzierung des vWS Typ 1 von Gesunden schwierig ist. Daher ist es umso wichtiger, in der klinischen Routine auf eine präzise, reproduzierbare, sensitive und spezifische hämostaseologische Labordiagnostik zurückgreifen zu können.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit wurde auf den Vergleich der beiden Kohorten RCo und Ac gelegt, in denen die vWF-Aktivität mit unterschiedlichen Tests gemessen worden war. In der orientierenden hämostaseologischen Diagnostik zeigten die Parameter Thrombozytenzahl, Quick, aPTT, TZ und Fibrinogen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten (Tabelle 8). In beiden Untersuchungsjahren wurden die gleichen Testverfahren für diese Parameter angewendet. Da sich jedoch keine klinische und laborchemische Relevanz daraus ergibt, ob ein Patient beispielsweise eine Thrombozytenzahl von 318,5 Mrd/l oder von 257,0 Mrd/l (jeweiliger Median in den Kohorten) hat, sollten die Unterschiede der Parameter der orientierenden Diagnostik keinen Einfluss auf die Kern- und Spezialdiagnostik des vWS haben.

Im Rahmen der Kerndiagnostik (PFA-100®-Verschlusszeit mit Col/Epi und Col/ADP, Faktor VIII-Aktivität, vWF-Antigen) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten festgestellt (Tabelle 9).

Für die Kohorte RCo ergab sich ein medianer vWF:RCo-Wert von 92,2%. In der Kohorte Ac lag der vWF:Ac-Median bei 97,8% (Tabelle 10). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der vWF-Aktivitätstests in den beiden Kohorten festgestellt werden ($p = 0,2691$). Auffällig ist jedoch, dass der vWF:Ac-Test höhere Werte ergab, obwohl der Referenzbereich für diesen Test sogar niedrigere Werte umfasst als

derjenige für den vWF:RCo-Test (Referenzbereich vWF:RCo: 66 – 183%; vWF:Ac: 61 – 179%).

Der Anteil der Patienten der Kohorte RCo, der einen erniedrigten vWF:RCo-Wert aufwies, lag bei 28,9%. In der Kohorte Ac hatten dagegen nur 21,8% der Patienten einen vWF:Ac-Wert unterhalb des Referenzbereichs. Das heißt, dass im gesamten Patientenkollektiv dieser Arbeit 7,1% mehr erniedrigte vWF-Aktivitätswerte gemessen wurden, wenn der vWF:RCo-Test angewendet wurde. Mit einem Chi-Quadrat-Test wurde berechnet, dass das Merkmal “Art des Aktivitätstests“ (vWF:RCo vs. vWF:Ac) und das Merkmal “vWF-Aktivität“ (erniedrigt vs. normal) statistisch voneinander abhängig waren ($p = 0,0435$) (Tabelle 11). Das heißt, dass sich die Auswahl der Methode zur Bestimmung der vWF-Aktivität signifikant auf die Anzahl erniedrigter vWF-Aktivitätswerte auswirkte. Die Anwendung des vWF:RCo-Test ergab häufiger einen vWF-Aktivitätswert unterhalb des Referenzbereichs, was einen erheblichen Einfluss auf die Diagnosestellung gehabt haben könnte.

Die Anzahl der Patienten mit einer PFA-100[®]-Verschlusszeit im Normbereich trotz erniedrigter vWF-Aktivität unterschied sich in den beiden Kohorten signifikant voneinander ($p = 0,0192$). Von den Patienten der Kohorte RCo, bei denen ein erniedrigter vWF:RCo-Wert gemessen wurde, wiesen 21,5% trotzdem eine normale Verschlusszeit auf. Unter den Patienten der Kohorte Ac mit erniedrigtem vWF:Ac-Wert fanden sich 7,7% mit normaler Verschlusszeit. Bei einem vWS ist die PFA-100[®]-Verschlusszeit prinzipiell verlängert, da diese eine Störung der primären Hämostase anzeigt (außer beim vWS Typ 2N, der in dieser Berechnung allerdings nicht vorkam), sodass sich eine normale Verschlusszeit und eine erniedrigte vWF-Aktivität theoretisch widersprechen. Dies deutet auf eine verbesserte Präzision des vWF:Ac-Tests gegenüber dem vWF:RCo-Test hin, die dazu beigetragen haben könnte, dass in der Zusammenschau der diagnostischen Kriterien in der Kohorte RCo weniger häufig ein definitiver vWS Ausschluss erfolgte und häufiger die unbefriedigenden Übergangsd Diagnosen gestellt wurden als in der Kohorte Ac.

In der Kohorte V wurden bei 10 Patienten im Umstellungszeitraum beide Aktivitätstests parallel durchgeführt. Der vWF:RCo-Test fiel signifikant niedriger aus als der vWF:Ac-Test ($p = 0,0277$), und zwar im Mittel um 18%. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einer Studie mit deutlich mehr Proben ($n = 362$) ein im Vergleich zum vWF:RCo-Test im Mittel um 7% niedriger ausfallender vWF:Ac-Test (Graf L et al. 2014). In zwei der zehn Fälle der Kohorte V (Patienten ID: 599 und 601) lag der ermittelte vWF:RCo-Wert unterhalb seines Referenzbereiches, während der vWF:Ac-Wert noch im Normalbereich lag

(Abbildung 3). Einer der Patienten (601) wurde trotz des erniedrigten vWF:RCo-Tests mit einem vWS-Ausschluss entlassen. Der andere Patient (599) erhielt die Übergangsd Diagnose “vWS nicht sicher auszuschließen“ und sollte sich zu einem späteren Zeitpunkt erneut zur Abklärung in der Gerinnungsambulanz vorstellen. Wenn bei diesen beiden Patienten nur der vWF:RCo-Test durchgeführt worden wäre, hätte aufgrund der als vermindert eingeschätzten vWF-Aktivität ein sicherer vWS-Ausschluss erschwert sein können, oder es hätte sogar eine falsch positive vWS-Diagnose resultieren können. Wünschenswert für diese Arbeit wäre eine größere Fallzahl in Kohorte V gewesen, da hier der direkte Vergleich zwischen beiden Aktivitätstests möglich war und daher genauere Aussagen über die Präzision im unteren Normbereich hätten gemacht werden können als beim Vergleich der beiden großen Kohorten RCo und Ac. Dies wäre ein guter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, in denen in einer größeren Kohorte parallel der vWF:RCo-Test und der vWF:Ac-Test gemessen wird und in Zusammenschau mit den diagnostischen Kriterien der Blutungs- und Familienanamnese beurteilt wird.

Die beiden Aktivitätstests wiesen in Kohorte V eine gute Korrelation auf ($r = 0,909$). In anderen Studien, in denen ebenfalls der vWF:RCo-Test mit dem vWF:Ac-Test verglichen wurde, zeigten sich noch bessere Korrelationen; Lawrie et al. haben in 2013 eine Korrelation von $r_s = 0,97$ ermittelt und Patzke et al. in 2014 eine Korrelation von $r = 0,99$. Im Rahmen der erweiterten vWS-Diagnostik zeigte sich bei dem Vergleich der Korrelation der beiden vWF-Aktivitätstests mit der Kollagen-Bindungsaktivität, dass anhand der Daten dieser Arbeit eine stärkere Korrelation zwischen dem vWF:Ac-Test und dem vWF:CB-Test ($r = 0,922$) als zwischen dem vWF:RCo-Test und dem vWF:CB-Test ($r = 0,791$) bestand (Abbildung 5 u. 6). In anderen Studien sind ähnliche Korrelationen ($r = 0,80$) zwischen dem vWF:RCo-Test und dem vWF:CB-Test gemessen worden (*Vanhoorelbeke K et al. 2000*). Bei der erweiterten Diagnostik stellte sich eine signifikant höhere RIPA (in der Verdünnungsstufe 1,2 mg/dl) in der Kohorte RCo heraus. Da in der Kohorte RCo weder deutlich mehr Patienten mit vWS Typ 2B (RIPA ist bei diesen Patienten gesteigert) noch zusammengefasst deutlich weniger Betroffene mit vWS Typ 1, 2A oder 2M (RIPA kann vermindert sein) vorhanden waren, lässt sich keine ursächliche Erklärung für diesen Unterschied finden. Da die RIPA bei vWS Typ 1, 2A und 2M vermindert oder normal sein kann, könnte jedoch ein zufälliger Unterschied in der Ausprägung der RIPA bei diesen Typen zu dem vorliegenden Ergebnis geführt haben. Besonders für die Differenzierung von Patienten mit vWS Typ 1 und Normalpersonen sollten die unterschiedlichen RIPA-

Werte in den Kohorten jedoch nicht relevant sein, da sie hauptsächlich zur Identifizierung des vWS Typ 2B dienen.

Für die Zuordnung zu einem Typ oder Subtyp des vWS wurde bei 125 Patienten des Gesamtkollektivs eine vWF-Multimer-Analyse durchgeführt (Tabelle 14). Dadurch konnte die Diagnose vWS Typ 2 bestätigt und meist eindeutig einem Subtyp (A, B, M oder N) zugeordnet werden. Mit dieser Analyse kann jedoch nicht zwischen dem vWS-Ausschluss, einer Übergangsdiaagnose oder einem vWS Typ 1 differenziert werden, da in allen Fällen keine Veränderung der Multimerstruktur vorliegt. Dadurch waren zum überwiegenden Teil (in 109 untersuchten Fällen) alle Multimere des normalen Plasmapools vorhanden, sodass die vWF-Multimer-Analyse im Bereich der problematischen Diagnostik des vWS Typ 1 keine Hilfestellung bot. Die fehlende Möglichkeit, bei Verdacht auf ein vWS Typ 1 in der klinischen Routine eine molekulargenetische Untersuchung durchzuführen, trägt zur Problematik der Diagnosestellung des Typ 1 bei. Das Problem beruht jedoch nicht nur auf der zu aufwändigen vollständigen Gensequenzierung des vWF, sondern auch darauf, dass nicht in allen Fällen des vWS Typ 1 ein genetischer Defekt im vWF-Gen gefunden werden kann. Eine Studie von Castaman et al. (1999) zeigte, dass eine eigene oder familiäre Blutungsanamnese sowie ein verminderter vWF:RCo-Wert, gemäß der geltenden Kriterien des vWS Typ 1, möglicherweise nicht immer mit Mutationen im vWF-Gen einhergeht. Nur in einer von 14 Familien, in denen ein vWS Typ 1 diagnostiziert worden war, konnte eine eindeutige Assoziation des Phänotyps mit einem bestimmten vWF-Allel festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse zur Assoziation des Phänotyps mit dem Genotyp wurden in einer europäischen multizentrischen Studie herausgefunden: Die Diagnose vWS Typ 1 wurde in 70% der 143 untersuchten vWS-Familien auf eine Mutation im vWF-Gen zurückgeführt. Nach Ausschluss von qualitativen vWF-Defekten (als Hinweis auf ein vWS Typ 2) waren es sogar nur noch etwa 50%. Wenn ein Zusammenhang bestand, war der Phänotyp, im Sinne einer schweren Blutungsneigung, meist stark ausgeprägt (*Eikenboom J et al. 2006*). Die häufig fehlende Kopplung von Genotyp und Phänotyp beim vWS Typ 1 könnte durch verschiedene Faktoren bedingt sein: Umweltfaktoren, *de novo* Mutationen, Genloкус-Heterogenität, Assoziation mit anderen Genen (z. B. des AB0-Blutgruppensystems) oder Fehldiagnosen des vWS, z. B. durch zufällige Koinzidenz von Blutungen und einem erniedrigten vWF. Sadler et al. stellten 2003 in einer Studie heraus, dass sehr häufig falsch positive Diagnosen eines vWS Typ 1 gestellt werden. Sie schlugen vor, einen erniedrigten vWF als epidemiologischen Risikofaktor für Blutungsereignisse und nicht als Krankheit zu werten, vergleichbar z. B. zur Hypercholesterinämie, die als

Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse angesehen wird. Die Diagnose vWS Typ 1 solle für Patienten mit dominantem Erbgang, deutlicher Symptomatik und schwerem vWF-Mangel vorbehalten sein; die meisten dieser Patienten weisen genetische Mutationen auf (*Castamann et al. 2000*). Ein besseres Verständnis von den Vererbungsmechanismen, die einem erniedrigten vWF ohne manifestes vWS zugrunde liegen, und von den Interaktionen mit anderen Faktoren, die ein Blutungsrisiko bedingen, könnte den Umgang mit den häufig gestellten Übergangsdagnosen bei nur geringfügig erniedrigtem vWF und den damit potentiell verbundenen Blutungsrisiken vereinfachen.

Die Patienten, die für diese Arbeit untersucht wurden, stellten sich wegen einer noch unsicheren Diagnose oder wegen eines noch nicht definitiv erfolgten Ausschlusses eines vWS teilweise mehr als einmal in der Gerinnungsambulanz des UKE vor. Bei Mehrfachvorstellung wurde die Diagnose, die im Rahmen der Erstvorstellung dokumentiert worden war, in der Kohorte RCo in 46% der Fälle und in der Kohorte Ac in 32% der Fälle im Rahmen der Nachfolgeuntersuchung(en) modifiziert. Die Notwendigkeit, eine gestellte Diagnose zu revidieren, war in Kohorte Ac allerdings nicht signifikant seltener ($p = 0,1361$). Interessant ist jedoch, dass die Art der Modifikation einer ursprünglich gestellten Diagnose zwischen den beiden Kohorten unterschiedlich war: In der Kohorte RCo kam es am häufigsten zum Wechsel von der Übergangsdagnose “vWS nicht sicher auszuschließen“ zu der Ausschlussdiagnose “kein Hinweis auf ein vWS“ (1/4 der Diagnoseänderungen). Dagegen wurde in der Kohorte Ac im Rahmen der Wiedervorstellung am häufigsten von der Diagnose “vWS nicht sicher auszuschließen“ zu “mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich“ gewechselt. Diese Beobachtung lässt sich dahingehend interpretieren, dass der vWF:RCo-Test in einem Befund resultierte, aufgrund dessen ein vWS zunächst nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Im Rahmen der Nachfolgeuntersuchung(en) war dieser Ausschluss dann jedoch möglich. Diese Konstellation passt zu den häufig niedriger ausfallenden Werten des vWF:RCo-Tests, die den definitiven Ausschluss eines vWS erschweren können. Die im Vergleich zu den vWF:Ac-Werten niedrigeren vWF:RCo-Werte, die auch häufiger unterhalb des Referenzbereichs lagen, wurden sowohl im Vergleich der Kohorten RCo und Ac als auch innerhalb der Kohorte V beobachtet (Tabellen 10, 12 u. Abbildung 3). Im Gegensatz dazu ging in der Kohorte Ac (bei etwa 1/3 der Diagnoseänderungen) ein Befund, aufgrund dessen ein vWS zunächst nicht gänzlich auszuschließen war, im Rahmen der Wiedervorstellung(en) in einen erhärteten Verdacht auf ein vWS Typ 1 über. Dies entspricht eher der allgemeinen Erfahrung, dass zur sicheren Diagnose eines vWS

Mehrfachvorstellungen, inklusive einer Wiederholung der diagnostischen Tests, erforderlich sind.

Die Problematik der Übergangsd Diagnosen wurde in dieser Arbeit durch die Auszählung der Diagnosen verdeutlicht. So wurden Übergangsd Diagnosen insgesamt deutlich häufiger gestellt als die Diagnose eines gesicherten vWS. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, bei denen der vWF:RCo-Test verwendet wurde, häufiger eine Übergangsd Diagnose erhielten (23,9% der Diagnosen) als Patienten, bei denen der vWF:Ac-Test zur Anwendung kam (18,8% der Diagnosen). Außerdem wurde in der Kohorte RCo etwas häufiger ein vWS Typ 1 diagnostiziert (7,8% der Diagnosen) als in Kohorte Ac (5,7% der Diagnosen). Im Gegensatz dazu konnte in der Kohorte Ac häufiger ein vWS ausgeschlossen werden (5,9% mehr Ausschlüsse) (Tabelle 15). Die Unterschiede im Anteil gestellter Diagnosen waren zwar statistisch nicht signifikant; es bestand aber die Tendenz, dass mit Hilfe des vWF:Ac-Tests einfacher zwischen einem vWS-Ausschluss und der Diagnose eines vWS Typ 1 differenziert werden konnte und daher seltener das Stellen einer Übergangsd Diagnose erforderlich war.

Bei dem Vergleich der mittleren vWF-Aktivität in den verschiedenen Diagnosegruppen (Tabelle 16) zeigte sich, dass in der Kohorte RCo durchschnittlich mit einem niedrigeren vWF-Aktivitätswert (39,8%) die Diagnose vWF Typ 1 gestellt wurde als in der Kohorte Ac (43,5%). Dieser Unterschied war zwar statistisch nicht signifikant; der mediane vWF:RCo-Wert lag damit aber bei der Diagnose vWS Typ 1 26,2% unterhalb der unteren Normgrenze [66%], während der mediane vWF:Ac-Wert nur 17,5% unterhalb der unteren Normgrenze [61%] lag. Dies lässt vermuten, dass mit dem vWF:RCo-Test ein deutlich unterhalb der Normgrenze liegender Wert für die sichere Diagnose eines vWS Typ 1 notwendig war. Bei den Übergangsd Diagnosen und beim vWS-Ausschluss zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im medianen vWF-Aktivitätswert zwischen den beiden Kohorten. In einer Studie von Graf et al. in 2014 zeigte sich unter Gesunden und unter vWS-Patienten nur bei Patienten mit vWS Typ 2M ein signifikant niedrigerer vWF-Aktivitätswert, wenn mit dem vWF:Ac-Test gemessen wurde (MW $\pm$ SAW in U/ml vWF:Ac: $0,09 \pm 0,06$; vWF:RCo: $0,13 \pm 0,05$; $p = 0,04$).

Innerhalb der Gruppe von Patienten mit gesichertem hereditärem vWS ($n = 68$) ergab sich in dieser Arbeit folgende Häufigkeitsverteilung: 65% vWS Typ 1, 31% vWS Typ 2 und 4% vWS Typ 3. Diese Verteilung stimmt mit denen in anderen, größeren Studien beobachteten Häufigkeiten überein: Federici et al. fanden im Jahr 2011 unter 1.234 vWS-Patienten 63% mit vWS Typ 1, 32% mit vWS Typ 2 und 5% mit vWS Typ 3.

Beim Vergleich der beiden diagnostischen Tests zur Bestimmung der vWF-Aktivität in dieser Arbeit (Tabelle 20) wurde die Prävalenz des vWS im Studienkollektiv als Grundlage verwendet. Diese Prävalenz entspricht jedoch nicht der Häufigkeit des vWS in der Allgemeinbevölkerung, da die Patienten Ratsuchende in der Gerinnungsambulanz waren. Daher erfolgte die Untersuchung der Testkriterien (Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW) nicht mit dem Ziel der Übertragung auf ein mögliches Screening der Allgemeinbevölkerung; dennoch ist diese Analyse für die Reflektion der Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung der vWF-Aktivität von Bedeutung.

Der vWF:RCo-Test hatte eine Sensitivität von 86,0%, während die Sensitivität des vWF:Ac-Tests bei 84,6% lag. Der vWF:RCo-Test erkannte also geringfügig besser die an einem vWS erkrankten Patienten. Eine Studie aus dem Jahr 2007 mit 70 vWS-Patienten zeigte eine Sensitivität von 98,6% sowohl für den vWF:RCo-Test als auch für einen ristocetinunabhängigen Test, der auf der Bindung des vWF an einen auf Latexpartikel adsorbierten monoklonalen Antikörper beruht, der gegen die GPIb-Bindungsstelle des vWF-Moleküls gerichtet ist (HemosILTM VWF Activity) (Piñol M et al. 2007). Die Spezifität lag jedoch in der vorgelegten Arbeit beim vWF:Ac-Test mit 84,7% deutlich höher als die des vWF:RCo-Tests mit 75,7%, sodass gesunde Patienten besser mit dem vWF:Ac-Test erkannt wurden. In einer anderen Studie, zum oben genannten ristocetinunabhängigen vWF-Aktivitätstest wurde eine Spezifität von 97,7% gemessen (Lasne D et al. 2012). In der vorgelegten Arbeit war auch der positiv prädiktive Wert mit dem vWF:Ac-Test deutlich besser: er konnte zu 44,0% voraussagen, dass ein Patient mit erniedrigter vWF-Aktivität auch tatsächlich am vWS erkrankt war. Dies war mit dem vWF:RCo-Test nur zu 33,3% möglich. Dies bedeutet, dass nur ein Drittel der Patienten, bei denen ein erniedrigter vWF:RCo-Wert gemessen wurde, tatsächlich an einem vWS erkrankt waren. Der negativ prädiktive Wert fiel bei beiden Tests deutlich besser aus: Für beide Tests gilt, dass ein Patient, bei dem die vWF-Aktivität im Normbereich liegt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 97,5% tatsächlich gesund ist. Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass eine wesentliche Problematik der vWS-Diagnostik darin liegt, dass bei vielen Gesunden fälschlicherweise eine pathologisch verminderte vWF-Aktivität gemessen wird, sodass die Gefahr von falsch positiven Diagnosen besteht. Das Risiko einer falsch positiven Diagnose scheint aufgrund der höheren Spezifität und des höheren positiv prädiktiven Wertes mit dem vWF:Ac-Test geringer zu sein als mit dem vWF:RCo-Test. Die Problematik der häufig falsch positiven Diagnose eines vWS Typ 1 beschrieb auch Sadler im Jahr 2003. Die Gefahr besteht, dass diese Patienten als Bluter stigmatisiert

werden und lebenslang insbesondere im Fall von notwendigen operativen Eingriffen, Schwierigkeiten in der Behandlung erfahren, da sie als Risikopatienten eingestuft werden. Möglicherweise erhalten diese Patienten unnötig Desmopressin, was mit relevanten Nebenwirkungen (z. B. Kopfschmerzen, Bluthochdruck, Hyponatriämie und Ödemen) einhergehen kann. Zudem könnten vermeintliche vWS-Patienten zur Optimierung der Hämostase, z. B. im Sinne einer Prophylaxe vor Operationen, aus Plasma hergestellte vWF/FVIII-Konzentrate erhalten, die neben erheblichen Kosten auch potentielle Risiken wie z. B. Infektionen, thrombotische Ereignisse oder anaphylaktische Reaktionen bergen. Daher ist es sehr wichtig, die Diagnose eines vWS nicht leichtfertig zu stellen, und sicher zu sein, dass tatsächlich ein vWS vorliegt. Es sollten auf jeden Fall mehrere Verlaufskontrollen der hämostaseologischen Diagnostik erfolgen, bevor eine definitive Diagnose gestellt wird, vor allem vor dem Hintergrund, dass der vWF ein Akute-Phase-Protein ist.

In einer Studie von Lasne et al. in 2012 wurde der o. g. Aktivitätstest (HemosIL™ VWF Activity) mit dem vWF:RCo-Test verglichen. Es zeigte sich, dass mit dem vollautomatisierten ristocetinunabhängigen Aktivitätstest keine Diagnose des vWS übersehen worden wäre. Für den vWF:Ac-Test spricht, dass er eine höhere Reproduzierbarkeit als der vWF:RCo-Test aufweist, was sowohl Plasmaproben mit normalen als auch Plasmaproben mit pathologischen Werten betrifft (Variationskoeffizient normales Plasma: 5,6% vs. 13,0%, $p < 0,005$; Variationskoeffizient pathologisches Plasma: 9,4% vs. 14,5%, $p < 0,005$) (Graf L et al. 2014). Lawrie et al. ermittelten im Jahr 2013 sogar einen Variationskoeffizienten von $<3,5\%$ für den vWF:Ac-Test. Die Reproduzierbarkeit des vWF:RCo-Tests ist allgemein geringer; es wird mitunter sogar ein Variationskoeffizient von 20 - 40% gemessen (Favaloro EJ et al. 2000). Als weiteren Vorteil weist der vWF:Ac-Test eine verbesserte untere Messgrenze verglichen mit dem vWF:RCo-Test auf (4% vs. 10%) (Graf L et al. 2014). Der vWF:RCo-Test ist mit einem relativ hohen Arbeitsaufwand verbunden, hat eine geringere Sensitivität bei niedrigen vWF-Konzentrationen und den Nachteil, dass das Ansprechen auf Ristocetin durch bestimmte Polymorphismen beeinflusst wird.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit diejenigen anderer kürzlich veröffentlichter Studien, wonach der INNOVANCE® VWF Ac-Test eine sehr gute Alternative zum vWF:RCo-Test darstellt und in der Diagnostik des vWS zu empfehlen ist (Lawrie AS et al. 2013, Graf L et al. 2014, Patzke J et al. 2014).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Messung einer verminderten vWF-Aktivität ist ein wichtiges Diagnosekriterium des vWS. Neuere, vollautomatisierte Tests, die unabhängig von Ristocetin sind, wie der vWF:Ac-Test, scheinen laut kürzlich veröffentlichter Studien dem vWF:RCo-Test hinsichtlich messtechnischer Kriterien überlegen zu sein. Unklar ist, ob dies einen Einfluss auf die Diagnostik des vWS im klinischen Alltag hat. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die vWS-Diagnostik mit der Umstellung auf den vWF:Ac-Test im Jahr 2011 verbessert hat. Die Auswahl der Methode zur Bestimmung der vWF-Aktivität wirkte sich statistisch signifikant auf die Anzahl erniedrigter vWF-Aktivitätswerte aus. Die Merkmale "Art des Aktivitätstests" (vWF:RCo vs. vWF:Ac) und "vWF-Aktivität" (erniedrigt vs. normal) waren statistisch signifikant voneinander abhängig ($p = 0,0435$): Mit dem vWF:RCo-Test wurde häufiger eine vWF-Aktivität unterhalb des Normbereichs gemessen. Auffällig war, dass in 21,5% der Fälle, in denen mit dem vWF:RCo-Test eine erniedrigte vWF-Aktivität gemessen wurde, trotzdem eine normwertige PFA-100®-Verschlusszeit vorlag, was als widersprüchliche Befundkonstellation gewertet werden kann. In der Kohorte, in der mit dem vWF:Ac-Test gemessen wurde, lag diese Befundkonstellation in signifikant weniger Fällen vor (7,7%) ($p = 0,0192$), was für eine höhere Präzision dieses Tests spricht. In Kohorte V, in der mit beiden vWF-Aktivitätstests parallel gemessen wurde, fielen die Werte des vWF:RCo-Tests signifikant niedriger aus als die Werte des vWF:Ac-Tests ($p = 0,0277$). Die Überlegenheit des vWF:Ac zeigte sich in zwei von zehn konkreten Fällen der Kohorte V: Obwohl abschließend kein vWS diagnostiziert werden konnte, lag der ermittelte vWF:RCo-Wert unterhalb seines Referenzbereiches, während der vWF:Ac-Wert im Normalbereich lag. Die Korrelation zwischen den vWF:Ac- und vWF:CB-Werten ($r_s = 0,922$) war stärker als die zwischen den vWF:RCo- und vWF:CB-Werten ($r_s = 0,791$). Der Vergleich der Diagnosen in Kohorte RCo und Ac ergab, dass der vWF:Ac-Test dem vWF:RCo-Test in der Vermeidung der unbefriedigenden Übergangsdagnosen "vWS nicht sicher auszuschließen" und "mögliches vWS Typ 1/vWS im Grauzonenbereich" überlegen war (5,1% weniger) und häufiger der vWS Ausschluss möglich war (5,9% häufiger). Weiterhin wies der vWF:Ac-Test beim Vergleich der Kriterien diagnostischer Tests eine höhere Spezifität sowie einen deutlich höheren positiv prädiktiven Wert auf, was über die Vermeidung falsch positiver Diagnosen mit einem erheblichen Vorteil verbunden ist. Zusammenfassend kann festgehalten werden,

dass die Umstellung der Methode zur Bestimmung der vWF-Aktivität vom vWF:RCo- auf den vWF:Ac-Test für die Gerinnungsambulanz des UKE im Klinikalltag praktische Vorteile gebracht hat, indem eine bessere Differenzierung zwischen einem vWS Typ 1 und einem Normalbefund möglich war. Dennoch sollte die Diagnose eines vWS Typ 1 auch mit dem vWF:Ac-Test weiterhin vorsichtig gestellt werden, da auf der einen Seite relativ häufig eine erniedrigte vWF-Aktivität bei Gesunden gemessen wird und auf der anderen Seite Patienten mit vWS, zumindest vorübergehend, eine vWF-Aktivität im Normbereich aufweisen können. Somit besteht die Gefahr, einerseits einen Gesunden fälschlicherweise als Bluter zu stigmatisieren und andererseits einen Risikopatienten mit hämorrhagischer Diathese nicht korrekt zu identifizieren.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
CV	Coefficient of variation
d. F.	der Fälle
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbend assay
Fibrinogen n. Cl.	Fibrinogen nach Claus
FVIII	Faktor VIII
FVIII:C	Faktor VIII-Aktivität
GPIb	Thrombozytenoberflächen-Glykoprotein Ib
IQR	Interquartilsabstand
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Patienten
n♀	Anzahl weiblicher Patienten
NPW	negativ prädiktiver Wert
PPW	positiv prädiktiver Wert
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
RIPA	Ristocetin-induzierte Thrombozytenagglutination
rs	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
SAW	Standardabweichung
TZ	Thrombinzeit
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
V. a.	Verdacht auf
vs.	versus
vWF	von Willebrand Faktor
vWF:Ac	von-Willebrand-Faktor-Aktivität
vWF:Ag	von-Willebrand-Faktor-Antigen
vWF:CB	Kollagen-Bindungsaktivität
vWF:RCo	Ristocetin-Cofaktor-Aktivität
vWS	von Willebrand Syndrom
VZ	Verschlusszeit
VZ Col/ADP	Verschlusszeit in der Kollagen/ADP-Kartusche
VZ Col/Epi	Verschlusszeit in der Kollagen/Epinephrin-Kartusche

7. LITERATURVERZEICHNIS

Zeitschriften/Bücher

1. Brown JE u. Bosak JO (1986). An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thrombosis Research* 43: 303-311.
2. Castaman G, Eikenboom JC, Bertina RM, Rodeghiero F (1999). Inconsistency of association between type 1 von Willebrand disease phenotype and genotype in families identified in an epidemiological investigation. *Thrombosis and Haemostasis* 82: 1065-1070.
3. Castaman G, Eikenboom JC, Missiaglia E, Rodeghiero F. (2000) Autosomal dominant type 1 von willebrand disease due to G3639T mutation (C1130F) in exon 26 of von Willebrand factor gene: description of five Italian families and evidence for a founder effect. *British Journal of Haematology* 108(4):876-9.
4. Castaman G, Federici AB, Rodeghiero F, Mannucci PM (2003). Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica* 88: 94–108.
5. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G et al. (2006). Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4(4): 774-82.
6. Favaloro EJ, Thom J, Baker R, Australasian Society for Thrombosis and Haemostasis (ASTH) Emerging Technologies Group. (2000). Assessment of current diagnostic practice and efficacy in testing for von Willebrands disorder: results from the second Australasian multi-laboratory survey. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 11: 729–738.
7. Favaloro EJ, Bonar R, Marsden K (2008) Lower limit of assay sensitivity: an under-recognised and significant problem in von Willebrand disease identification and classification. *Clinical Laboratory Science* 21: 178–83.
8. Favaloro EJ (2009) Toward a new paradigm for the identification and functional characterization of von Willebrand disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 35(1): 60-7.

9. Federici AB, Canciani MT, Forza I, Cozzi G (2000) Ristocetin cofactor and collagen binding activities normalized to antigen levels for a rapid diagnosis of type 2 von Willebrand disease—single center comparison of four different assays. *Thrombosis and Haemostasis* 84: 1127–8.
10. Federici AB, Castaman G, Mannucci PM; Italian Association of Hemophilia Centers (AICE). (2002) Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. *Haemophilia* 8(5): 607-21
11. Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J et al. (2004) Biological response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. *Blood* 103: 2032–8.
12. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, Baronciani L, Bucciarelli P, Canciani MT et al. (2009) 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* 113: 526–34.
13. Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Baronciani L, Canciani MT, Mazzucconi MG, et al. (2011) Management of inherited von Willebrand disease in Italy: results from the retrospective study on 1234 patients. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 37(5): 511-21.
14. Flood VH, Friedman KD, Gill JC, Morateck PA, Wren JS, Scott JP, Montgomery RR. (2009) Limitations of the ristocetin cofactor assay in measurement of von Willebrand factor function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7(11): 1832-1839.
15. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL et al. (2010) Common VWF exon 28 polymorphisms in African Americans affecting the VWF activity assay by ristocetin cofactor. *Blood* 116(2): 280-286.
16. Flood VH, Gill JC, Morateck PA, Christopherson PA, Friedman KD, Haberichter SL et al. (2011) Gain-of-function GPIb ELISA assay for VWF activity in the Zimmerman Program for the Molecular and Clinical Biology of VWD. *Blood* 117: e67– 74
17. Gadisseur A, Hermans C, Berneman Z, Schroyens W, Deckmyn H, Michiels JJ. (2009) Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematologica* 121(2-3):71-84.

18. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ Jr, Montgomery RR. (1987) The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 69(6):1691-5.
19. Ginsburg, D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH. (1985). Human von Willebrand factor (vWF): isolation of Science complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 228(4706): 1401-1406.
20. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J et al. (2007) Phenotype and genotype of cohort of families historically diagnosed with type von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood* 109/1: 112-121.
21. Graf L, Moffat KA, Carlino SA, Chan AK, Iorio A, Giulivi A, Hayward CP. (2014) Evaluation of an automated method for measuring von Willebrand factor activity in clinical samples without ristocetin *International Journal of Laboratory Hematology*. 36(3):341-51.
22. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. (1974) Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71(5): 1906-1909.
23. Kadir RA, Economides DL, Sabin CA, Owens D, Lee CA. (1998) Frequency of inherited bleeding disorders in women with menorrhagia. *Lancet* 351:485-489.
24. Kadir RA, Economides DL, Sabin CA, Owens D, Lee CA. (1999) Variations in coagulation factors in women: effects of age, ethnicity, menstrual cycle and combined oral contraceptive. *Thrombosis and Haemostasis* 82(5):1456-61.
25. Lasne D, Dey C, Dautzenberg MD, Cherqaoui Z, Monge F, Aouba A et al. (2012) Screening for von Willebrand disease: contribution of an automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 18(3): e158-63
26. Lawrie AS, Stufano F, Canciani MT, Mackie IJ, Machin SJ, Peyvandi F. (2013) A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. *Haemophilia* 19(2): 338-42.
27. Mannucci PM. (2004) Treatment of von Willebrand's Disease. *The New English Journal of Medicine* 351(7): 683–94.

28. Patzke J, Budde U, Huber A, Méndez A, Muth H, Obser T, Peerschke E, Wilkens M, Schneppenheim R. (2014) Performance evaluation and multicentre study of a von Willebrand factor activity assay based on GPIb binding in the absence of ristocetin. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 25(8):860-70.
29. Piñol M, Sales M, Costa M, Tosetto A, Canciani MT, Federici AB. (2007) Evaluation of a new turbidimetric assay for von Willebrand factor activity useful in the general screening of von Willebrand disease. *Haematologica*. 92(5):712-3
30. Rodeghiero F, Castaman G & Dini E. (1987) Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 69(2): 454-459.
31. Rodeghiero F u. Castaman G. (2001) Congenital von Willebrand disease type 1: definition, phenotypes, clinical and laboratory assessment. *Bailliere's Clinical Haematology* 14: 321-335.
32. Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM, Ciavarella N, Zimmerman TS. (1980) Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *The New English Journal of Medicine* 302: 1047-51.
33. Ruggeri ZM. (2001) Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Practice and Research. Clinical Haematology* 14(2): 257-279.
34. Sadler JE. (1994) A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* 71(4): 520-3.
35. Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D et al. (2000) Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* 84: 160-74.
36. Sadler JE. (2003) Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood*. 15;101(6):2089-93
37. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC et al. (2006) 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; 4: 2103–14

38. Schneppenheim R u. Budde U (2010) von Willebrand-Syndrom und von Willebrand-Faktor – Aktuelle Aspekte der Diagnostik und Therapie. 3. Auflage, UNI-MED, Bremen, S. 42.
39. Shankar M, Lee CA, Sabin CA, Economides DL, Kadir RA (2004). Von Willebrand disease in women with menorrhagia: a systematic review. *BJOG* 111(7): 734–740.
40. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. (1996) Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 88(8): 2939-50.
41. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. (1987) von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that Bloodsecreted constitutively. *Blood* 69(5): 1531-1534.
42. Sramek A, Eikenboom JC, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. (1995) Usefulness of patient interview in bleeding disorders. *Archives of Internal Medicine* 155: 1409-1415.
43. Sutor AH. (1998) Desmopressin (DDAVP) in bleeding disorders of childhood. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 24(6): 555-66.
44. Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Vauterin S, Schlamadinger A, Mazurier C, Deckmyn H. (2000) A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis* 83: 107–113.
45. Von Willebrand EA (1999) Hereditary pseudohaemophilia. *Haemophilia* 5(3): 223-31.
46. Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. (1977) Stabilization of Factor VIII in Plasma by the von Willebrand Factor. *The Journal of Clinical Investigation* 60: 390-404.
47. Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM, Turitto VT, Thiagarajan P, Hoffmann T. (1989) Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *The Journal of Clinical Investigation* 83: 288-297.

Websites

48. Produktbeschreibung INNOVANCE[®] VWF Ac und PFA 100[®]:
http://www.healthcare.siemens.de/siemens_hwem-hwem_ssxa_websites-context-root/wcm/idc/siemens_hwem-hwem_ssxa_websites-context-root/wcm/idc/groups/public/@de/@lab/documents/download/mdax/ntky/~edisp/dx-de-haemostase-diagnostik-shd-reagenzien-kontrollen-kalibratoren-09-01-13-00837732.pdf; [abgerufen am 15.02.2015]

8. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Patientenkollektiv und Ausschlüsse	14
Abbildung 2: Klinische Symptome im Gesamtkollektiv und bei Patienten mit gesichertem vWS	22
Abbildung 3: vWF-Aktivität bei parallel gemessenen Tests.....	28
Abbildung 4: Korrelation von Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und vWF-Aktivität in der Kohorte V	29
Abbildung 5: Korrelation von Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und Kollagen- Bindungsaktivität.....	30
Abbildung 6: Korrelation von vWF-Aktivität und Kollagen-Bindungsaktivität	30
Abbildung 7: Vergleich der Diagnosehäufigkeit zwischen den Kohorten	35
Tabelle 1: Klassifikation des vWS	3
Tabelle 2: Inzidenz der Symptome bei vWS	4
Tabelle 3: Charakteristische Befundkonstellation der vWS-Typen	10
Tabelle 4: Referenzbereiche der Laborparameter	17
Tabelle 5: Demographische Daten im Kohortenvergleich	19
Tabelle 6: Auftreten klinischer Symptome bei verschiedenen Diagnosen.....	21
Tabelle 7: Familienanamnese in den Diagnosegruppen	24
Tabelle 8: Orientierende Diagnostik im Kohortenvergleich	25
Tabelle 9: Kerndiagnostik im Kohortenvergleich	25
Tabelle 10: vWF-Aktivität im Kohortenvergleich	26
Tabelle 11: Erniedrigter Aktivitätstest im Kohortenvergleich	27
Tabelle 12: vWF-Aktivität in Kohorte V	27
Tabelle 13: RIPA im Kohortenvergleich.....	31
Tabelle 14: vWF-Multimer-Analyse und Diagnosen	32
Tabelle 15: Diagnosehäufigkeiten in den Kohorten	34
Tabelle 16: Median der vWF-Aktivität in den Diagnosegruppen	36
Tabelle 17: Häufigkeit der hereditären vWS-Typen	36
Tabelle 18: Vierfeldertafel vWF:RCo-Test.....	37
Tabelle 19: Vierfeldertafel vWF:Ac-Test.....	37
Tabelle 20: Vergleich der diagnostischen Tests zur Bestimmung der vWF-Aktivität.....	37

9. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei der gesamten II. medizinischen Klinik und Poliklinik des Onkologischen Zentrums des UKE und dem Klinikdirektor Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer bedanken, dafür dass ich die Möglichkeit hatte meine Doktorarbeit in dieser Klinik zu absolvieren.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Florian Langer für seine gute, und überaus freundliche Betreuung und ständige Unterstützung während meiner gesamten Dissertationszeit.

Beim Team der Gerinnungsambulanz, dem Leiter Dr. med. Florian Langer, sowie Dr. med. Katharina Holstein, Dr. med. Bernd Lentz, Dr. med. Christina Dicke und Jessica Gäßler, möchte ich mich außerordentlich bedanken für die kollegiale Hilfe, die zahlreichen Auskünfte bei der Datenerhebung und das stets freundliche Arbeitsklima, das ich auch neben meiner Dissertation im Rahmen meiner Arbeit als studentische Hilfskraft in der Gerinnungsambulanz erleben durfte.

Für die Listung und Zurverfügungstellung der Patienten- und Labordaten danke ich herzlich Frau Dr. med. Claudia Schnabel vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin.

Ich danke meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung während meiner Dissertationszeit und während meines gesamten Studiums. Meiner Mutter danke ich außerdem für ihr großes fachliches Interesse und ihre guten Ratschläge. Ein großes Dankeschön geht an meinen Mann, nicht nur für seine Unterstützung und ständige Ermunterung, sondern auch für seine Hilfestellungen bei Statistik- und Softwarefragen.

10. LEBENSLAUF

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:.....