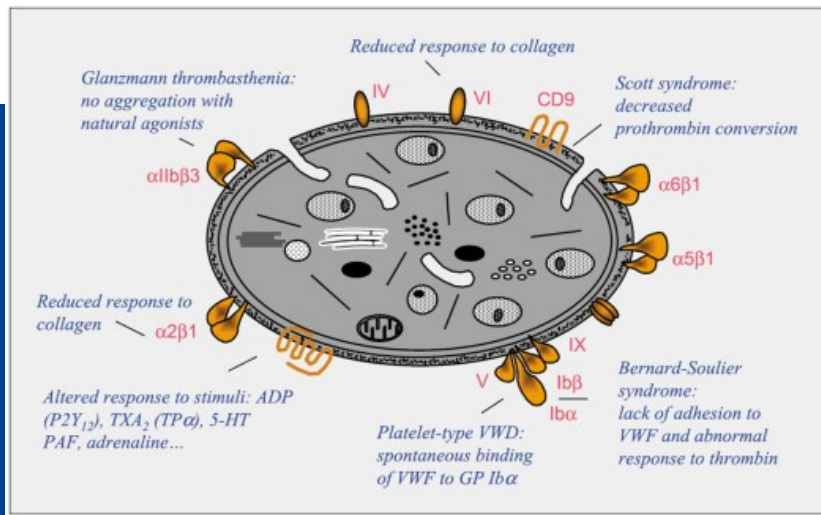




Harmonisatie van Licht Trombocyten Aggregatie (LTA) in NL



Yvonne Henskens, klinisch chemicus
Clusterhoofd Hematologie, Transfusie & Hemostase
Centraal Diagnostisch Laboratorium

Hoe goed moet het?

SKML congres
De ReeHorst Ede, 6 juni 2017

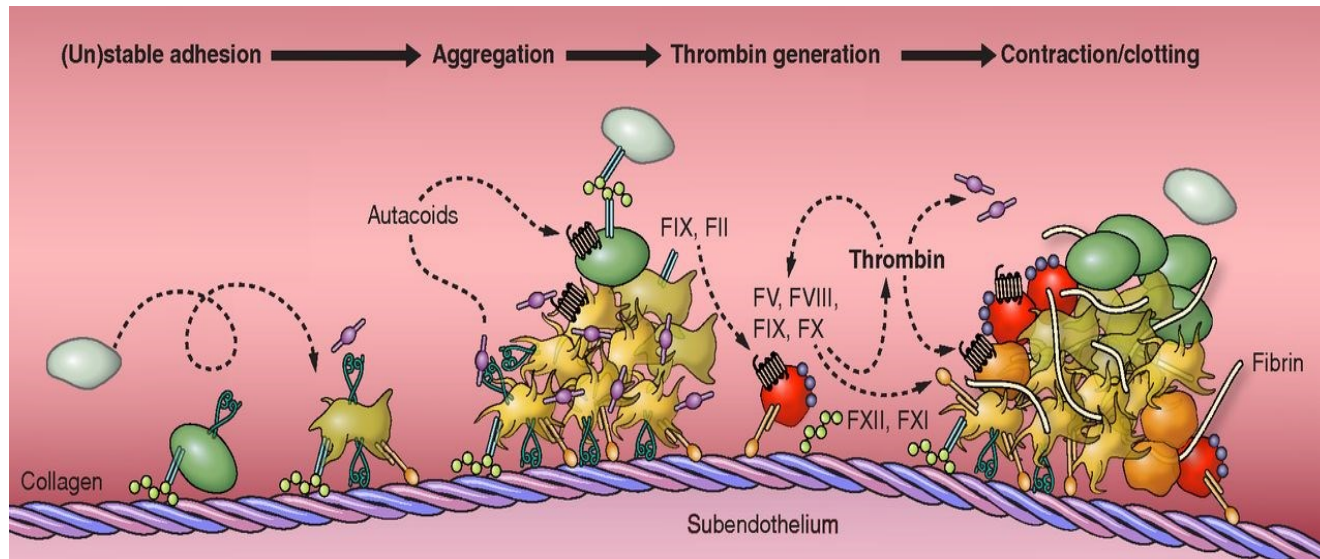


Disclosure

De spreker heeft

- Geen financiële banden met de IVD industrie
- Sponsoring door meerdere belanghebbende firma's in de vorm van verstrekking van reagentia en cartridges op het gebied van hemostase testen
- Geen honoraria van belanghebbende industrie
- Geen aandeelhouder van belanghebbende industrie
- Geen andere relaties met belanghebbende industrie die gezien kunnen worden als belangenverstremgeling

De werking van bloedplaatjes en de fibrine vorming

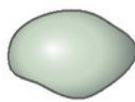


VORM

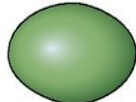
SECRETIE

ACTIVATIE

PS



Resting



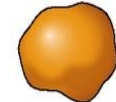
Shape change



Integrin activation

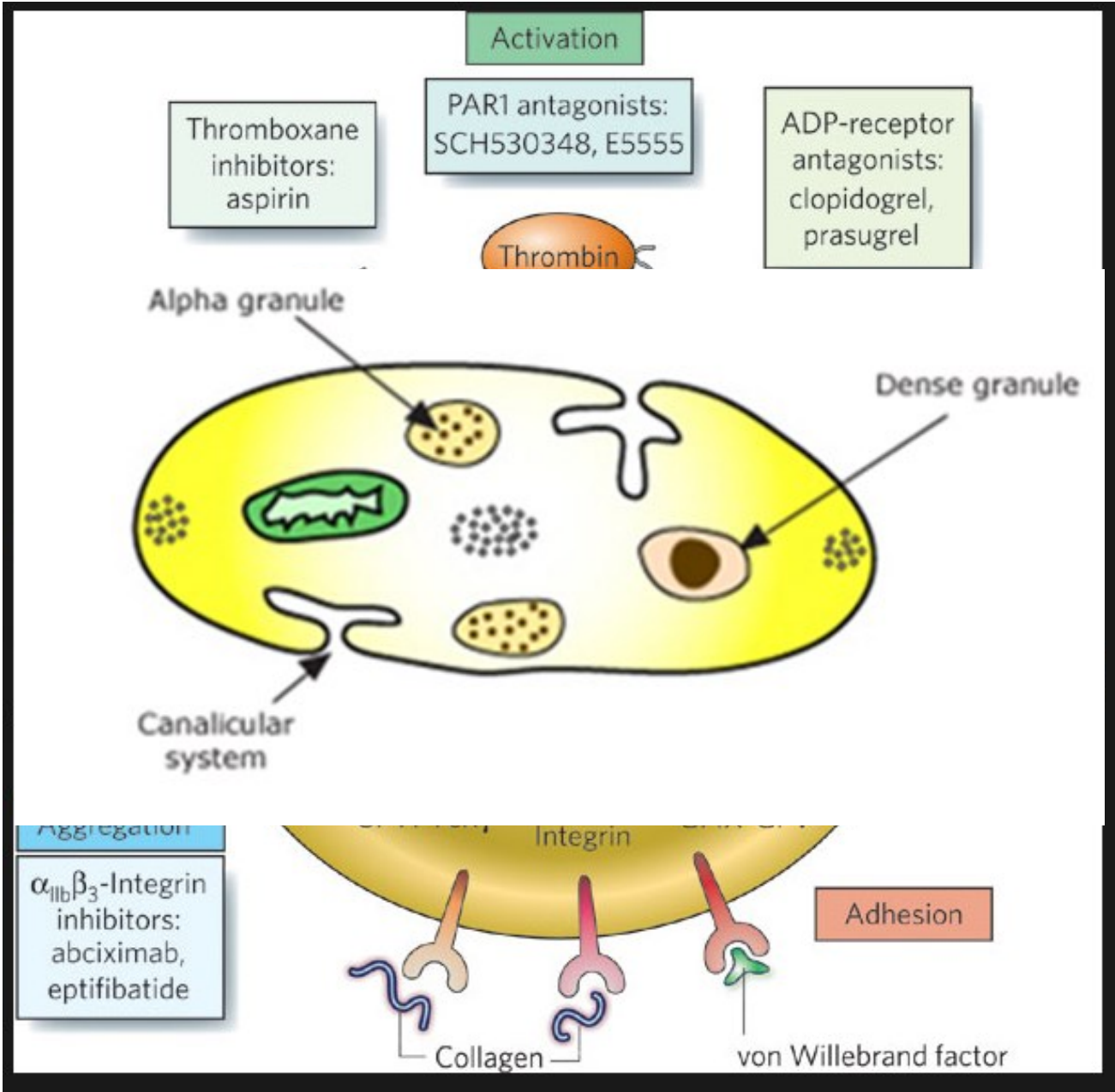


Secretion



Procoagulant activity





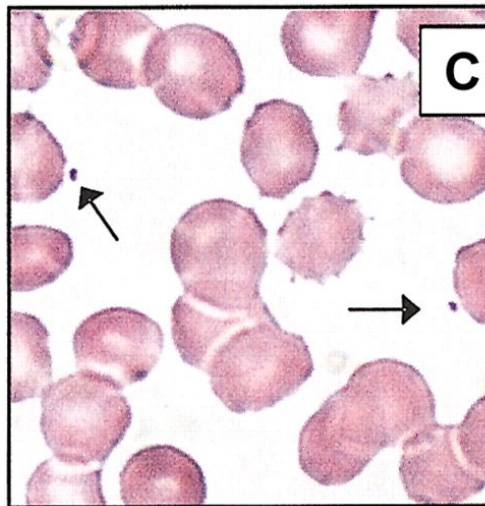
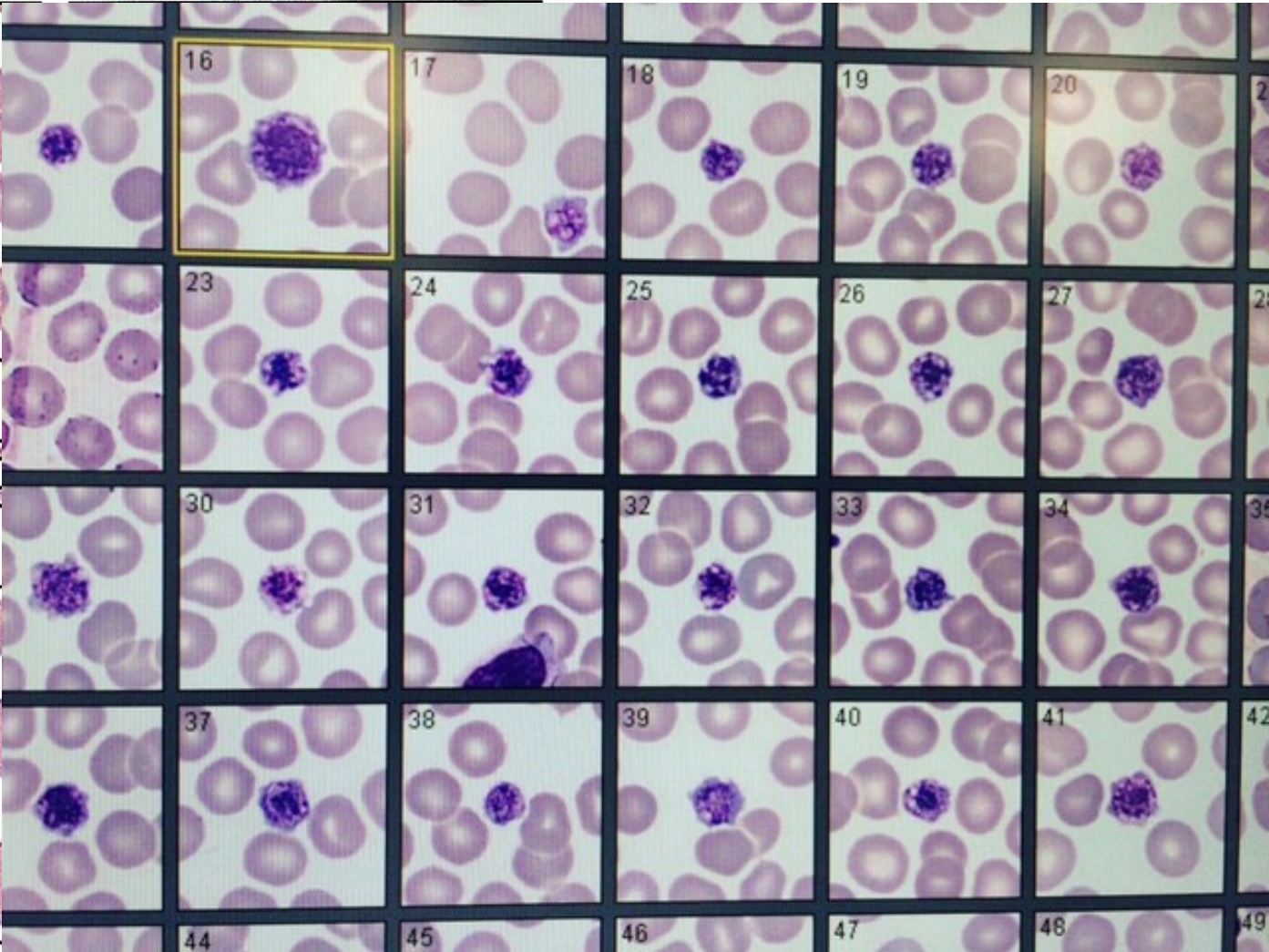
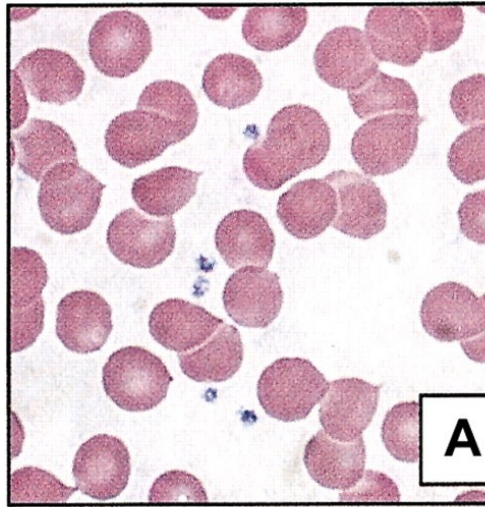
Dense/delta granula:

ADP, ATP, Ca²⁺, Serotonine

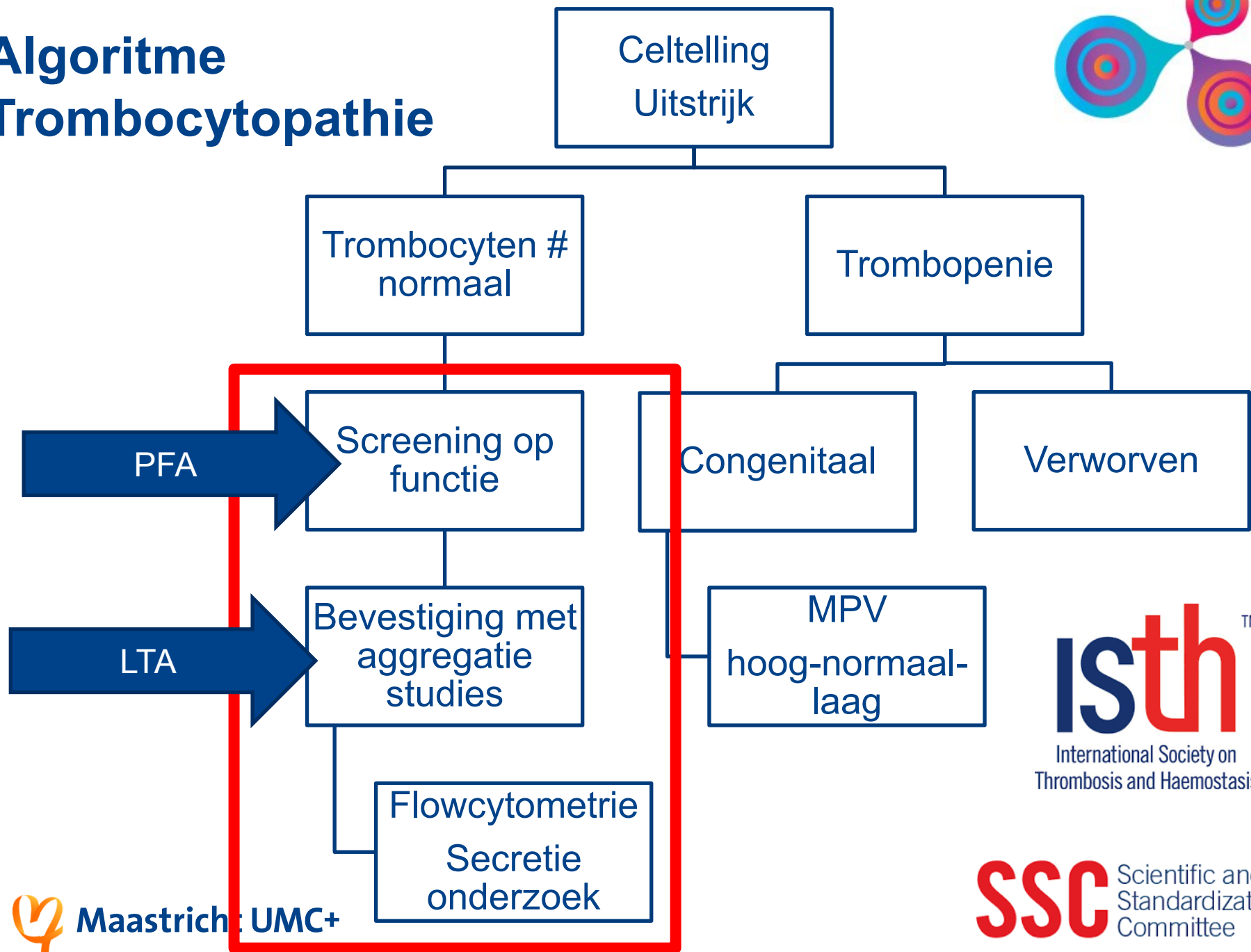
Alfa granula:

fibrinogeen, fibronectine, VWF, Platelet factor 4, Factor V en XIII, PDGF

Is trombocytopathie “zichtbaar” ?



Algoritme Trombocytopathie

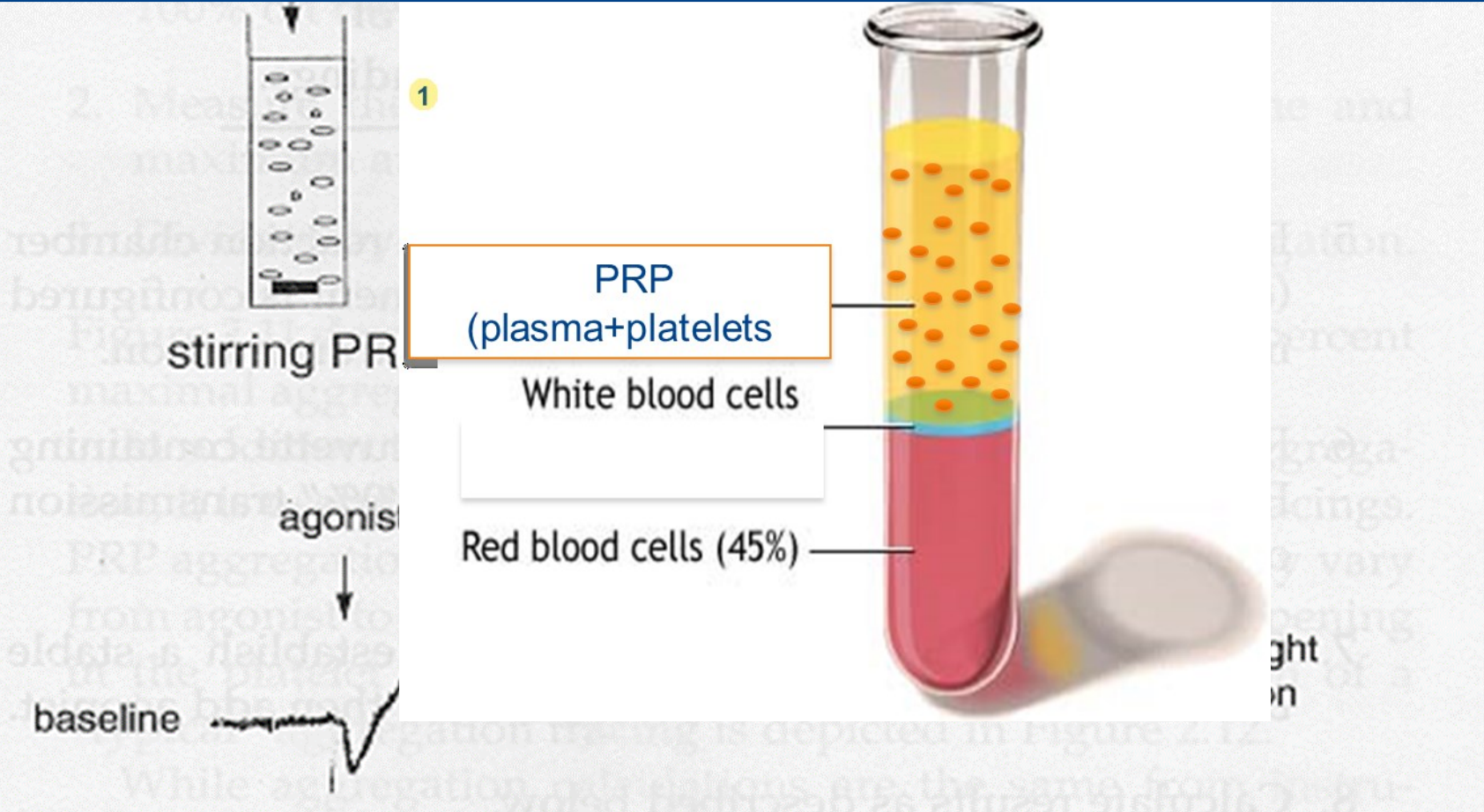


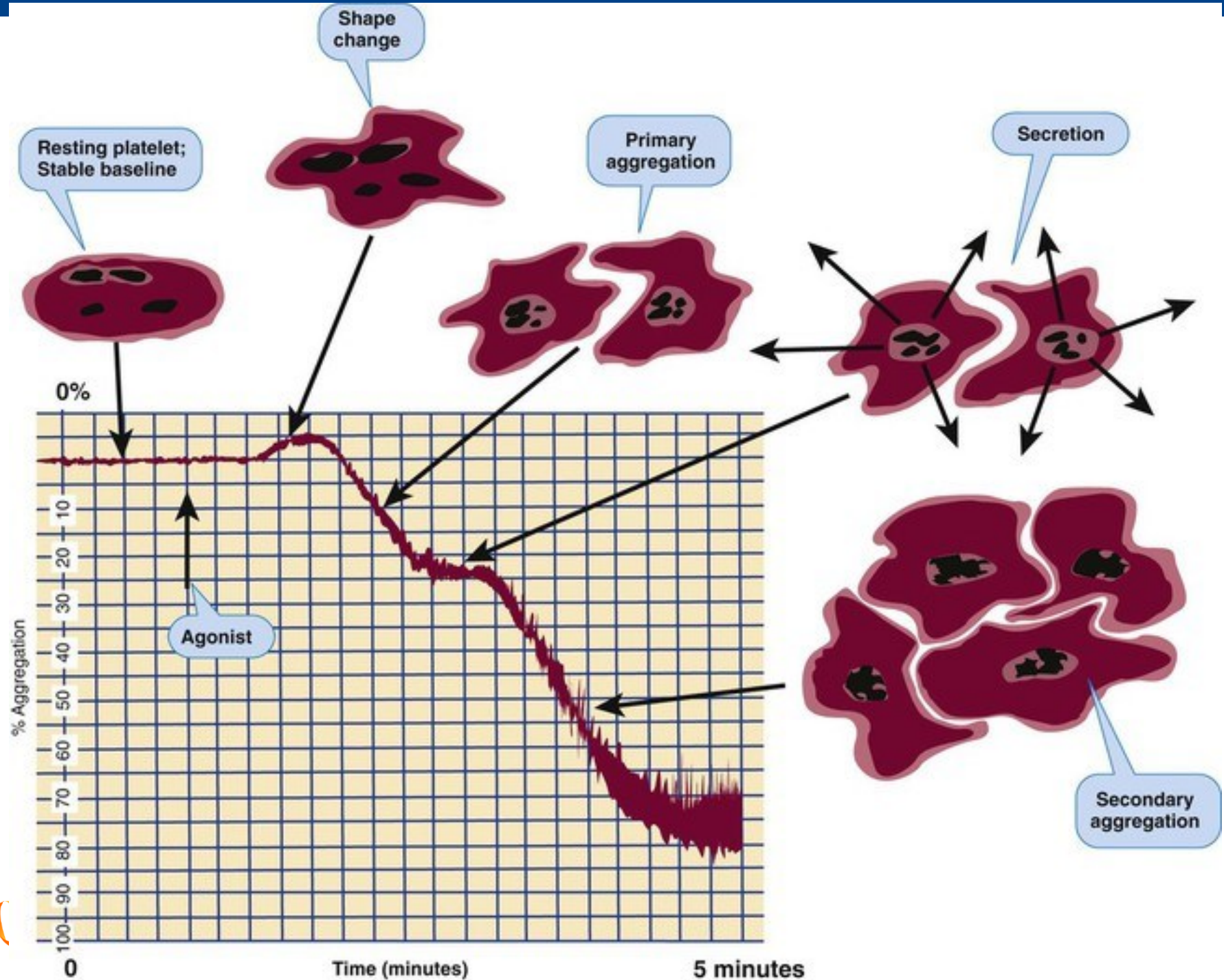
Licht transmissie aggregometrie



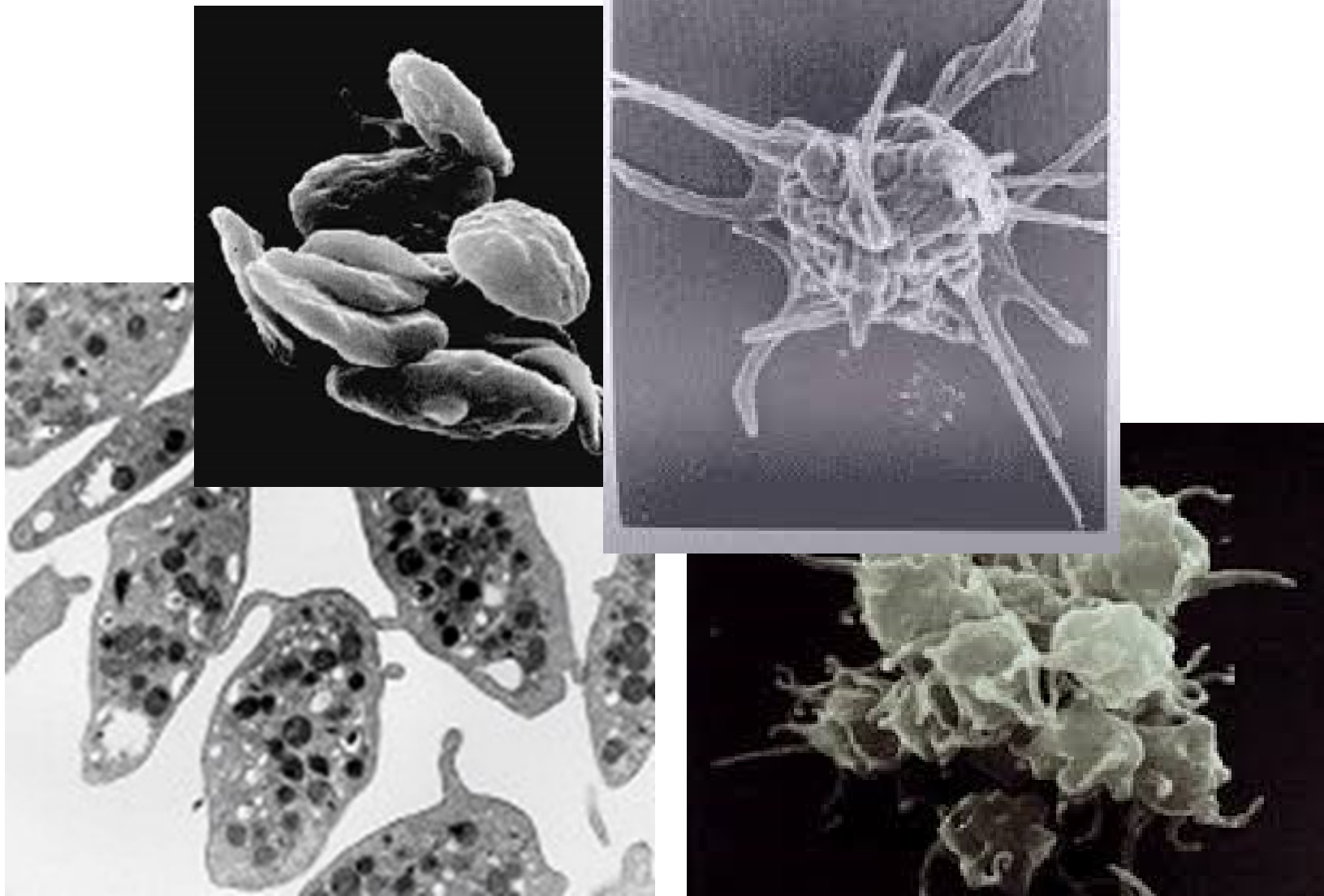
O'Brien JR. [The adhesiveness of native platelets and its prevention.](#) J Clin Pathol 1961;14:140-149.

Born GV. [Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.](#) Nature. 1962;194:927-929.





Pre-analyse en analyse met behulp van PRP ! Een uitdaging !



Casus

Mw. X, 1979

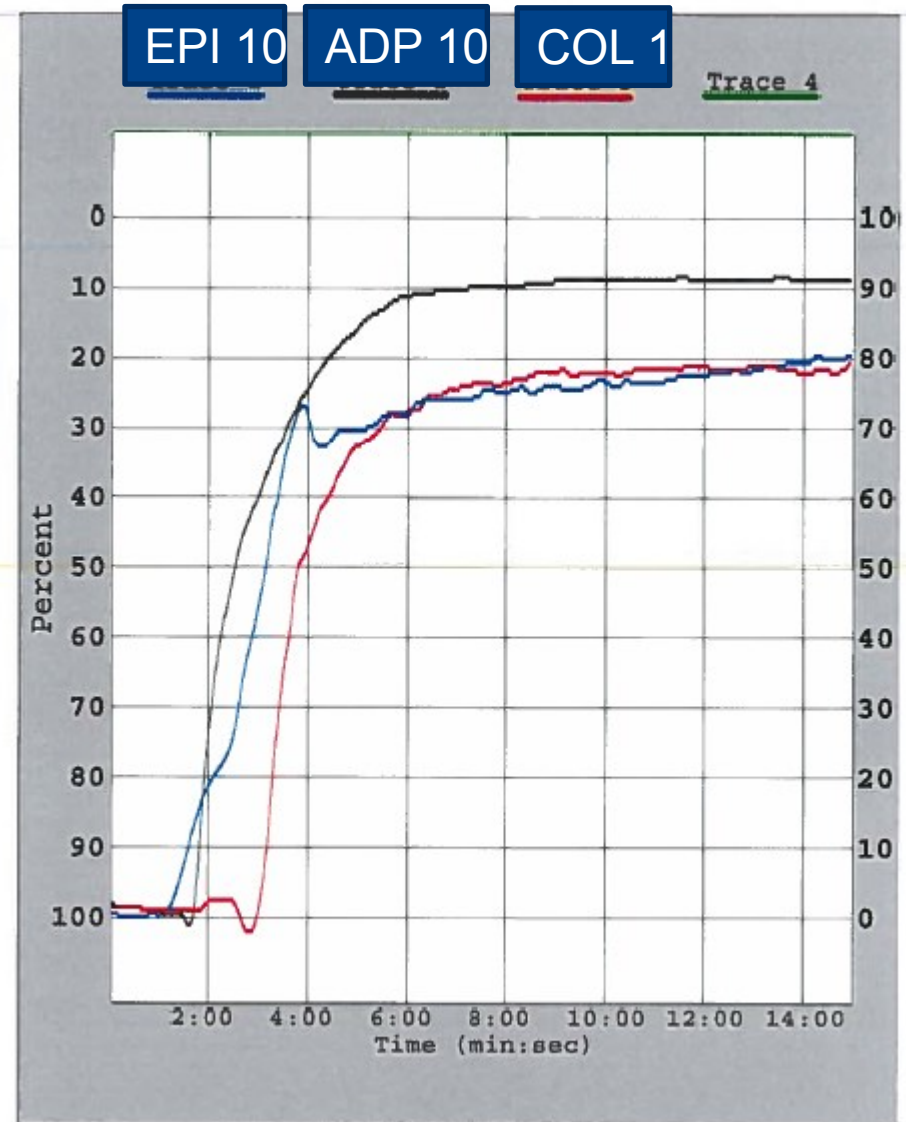
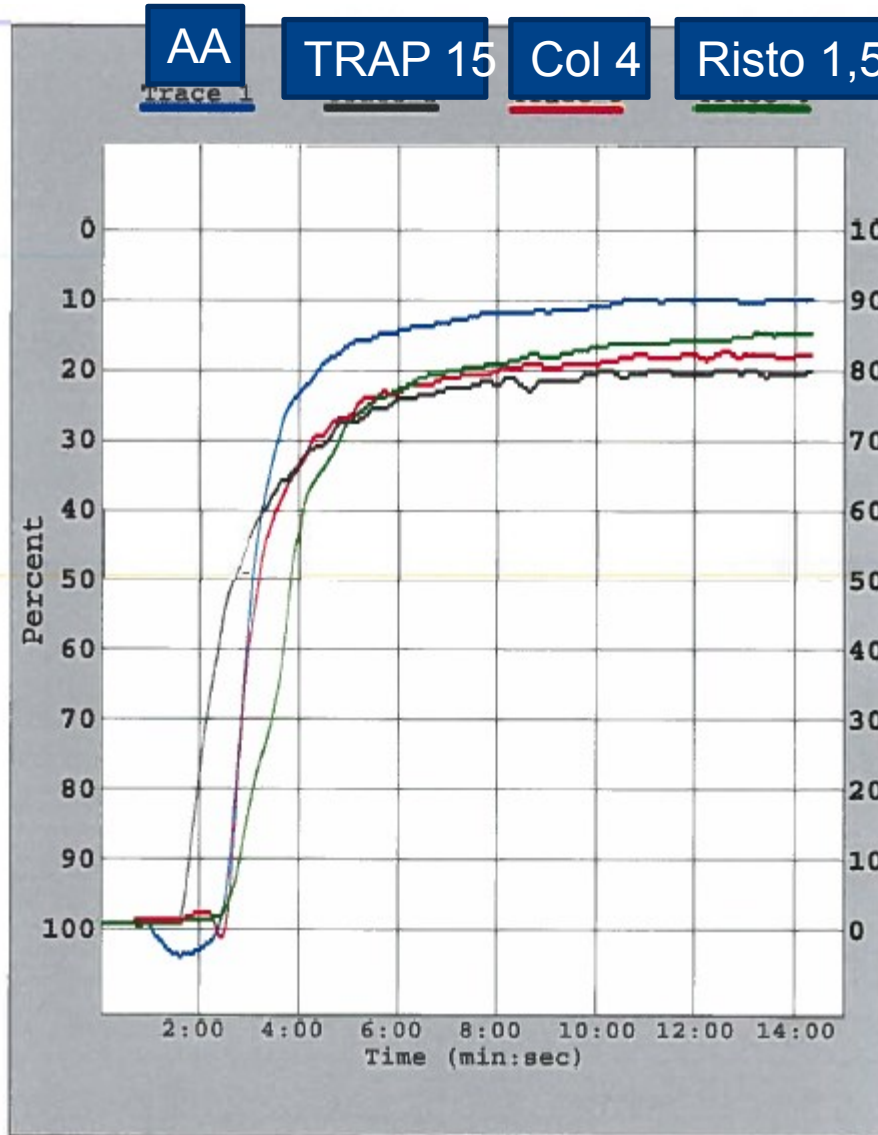
Reden van Verwijzing: analyse bloedingsneiging

Anamnese:

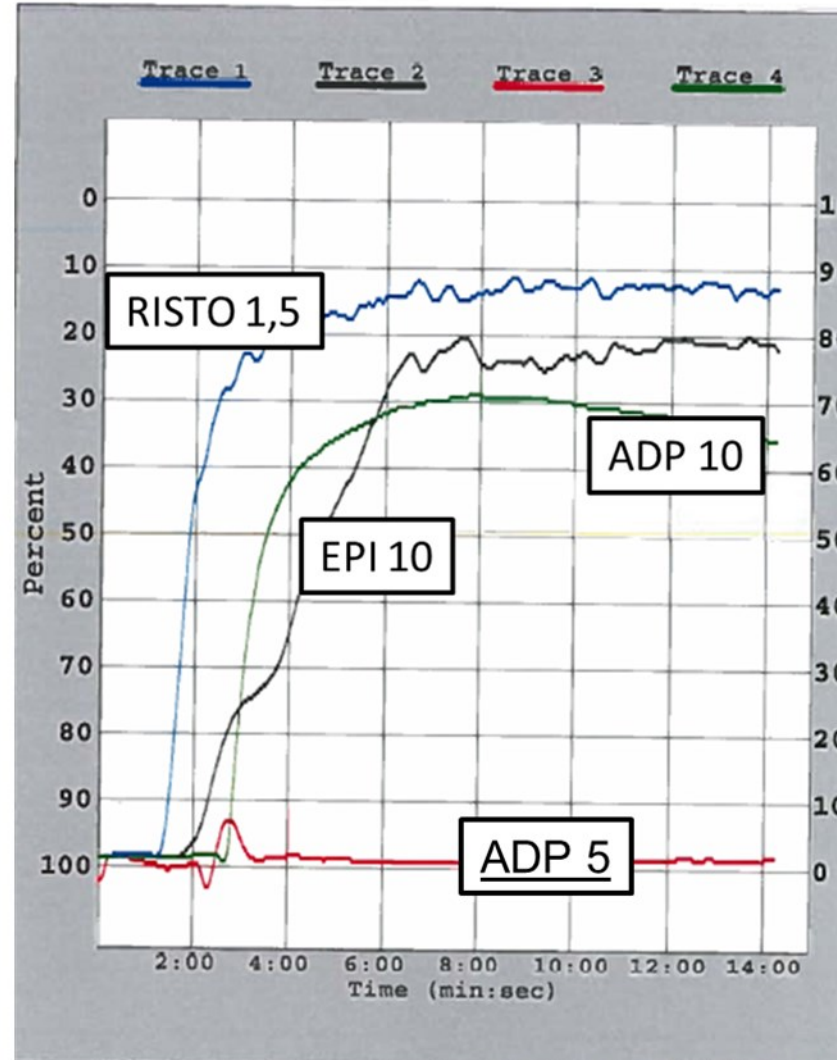
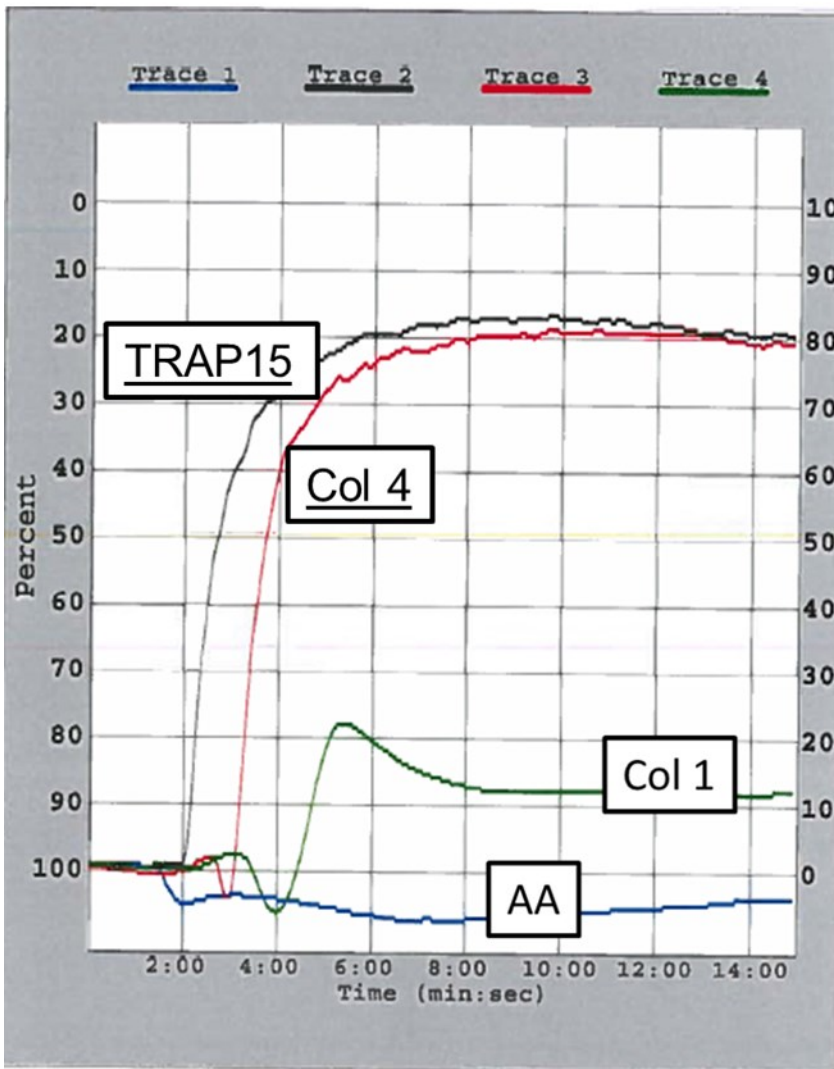
Er is sprake van positieve bloedingsanamnese: ISTH- BAT score van 7

- **Mondholte: bloedend tandvlees na tandenpoetsen**
- **Huid: hematomen; bloeding kleine wondjes**
- **Zwangerschap: 2x postpartum bloeding**

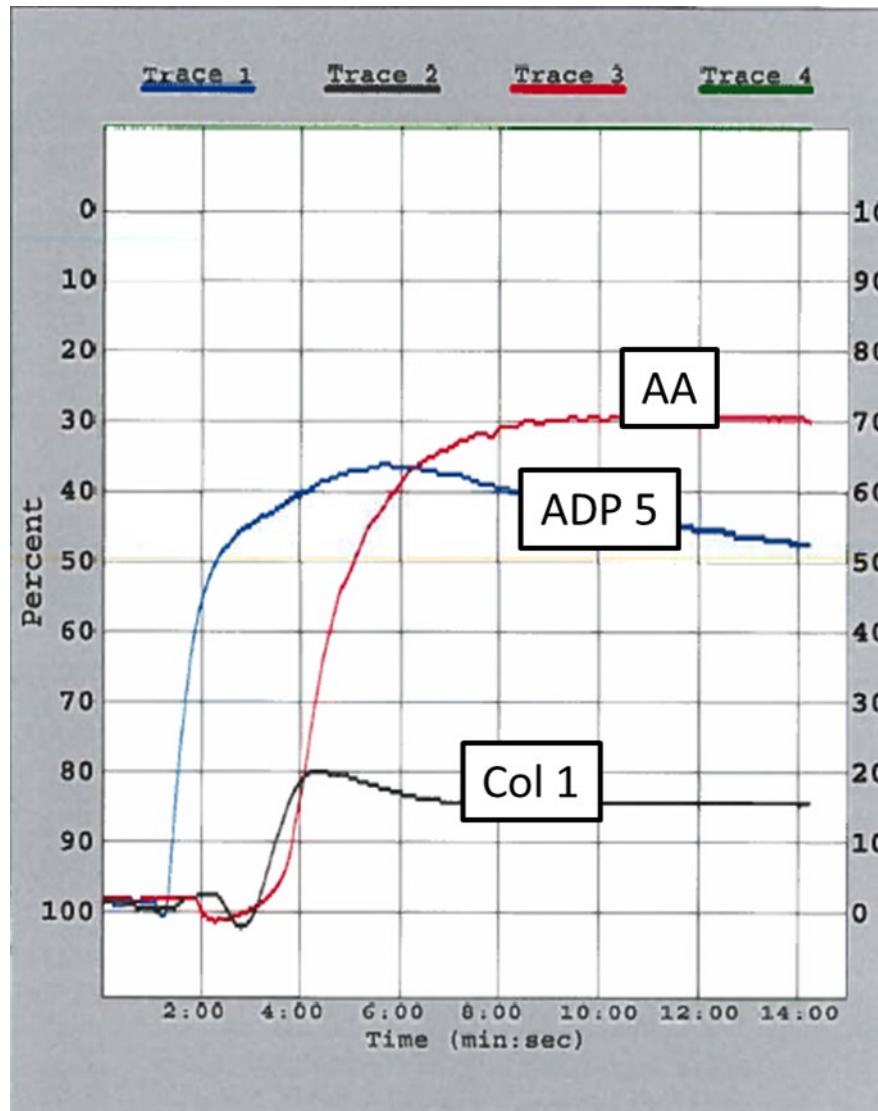
LTA, Normaal, controle , gezonde vrijwilligers



1^{ste} meting



Herhaling van afwijkingen met hetzelfde materiaal



Casus X: CONCLUSIE ?

Na-Arachidonzuur 1 mmol/L	Normaal	normaal		
TRAP 15 umol/L	Normaal	normaal		
Collageen 1 ug/mL	verlaagd	verlaagd		
Collageen 4 ug/mL	Normaal	normaal		
Ristocetine 1.5 mg/mL	Normaal	normaal		
Adrenaline 10 umol/L	Normaal	normaal		
ADP 5 umol/L	Licht verlaagd en reversibel	normaal		
ADP 10 umol/L		normaal		
ATPrelease-COLLAGEEN		1.09	nmol	1.20 - 2.79
ATPrelease-EPINEFRINE		0.78	nmol	0.86 - 2.47
ATPrelease-U46619		0.13	nmol	0.39 - 1.87

Anamnese

2 LTA aparte afnames

overleg MDT én aanvullend onderzoek

Trombocytopathie; secretie defect

Behandeling: tranexaminezuur; laagdrempelig

overgaan op trombocyten transfusie

Het is dus niet zo eenvoudig !

Doelen VHL werkgroep Hemostase (2011-heden)

Standaardisatie LTA (en andere trombocytenfunctie testen)

1. Enquete
2. Onderzoek naar agonisten van verschillende firma's
3. Onderzoek naar verschillende analysers
4. Onderzoek naar ontbrekend bewijs rondom pre-analyse
5. Implementeren van NL versie van de ISTH richtlijn
6. Meten van verschillen voor en na implementatie richtlijn
7. Vaststellen van referentiewaarden ?
8. Handreiking opstellen rondom IQC/EQC (?)
9. Aanvraag van SKMS beurs voor literatuuronderzoek

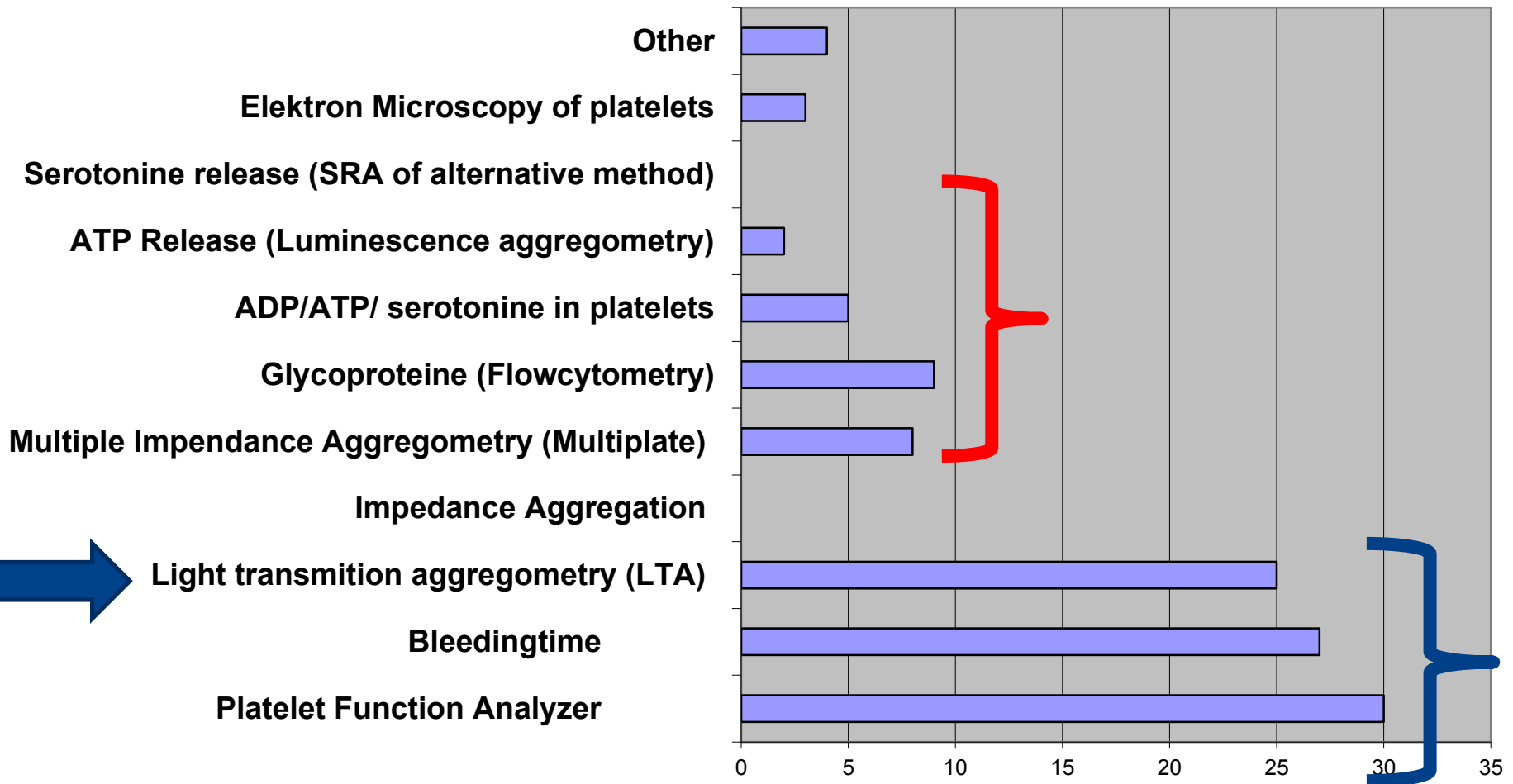
WERELDWIJD ISTH-SSC Platelet Physiology Enquete 2011/Platelet function assays

- n=177 laboratoria
- 32 landen
- gemiddeld 140 patiënten/jaar

1. LTA	73 %
2. Flowcytometrie	57 %
3. PFA-100/200	56 %
4. Luminescentie aggregometrie (ATP release)	38 %
5. Multiple electrode impedantie aggregometrie	31 %
6. Andere technieken	30 %

VHL enquête in 2013 naar bloedplaatjes functie testen in Nederland.

n=46



LTA welke richtlijn ?

The logo consists of two circular targets with concentric rings in blue, red, and purple. A red horizontal bar is superimposed over the right target, containing the text 'VHL CONSENSUS !' in white.

VHL CONSENSUS !

SSC-ISTH Cattaneo et al

- Journal Thrombosis Hemostasis april 2013

• **CLSI**

- Clinical and Laboratory Standards Institute/2008/Platelet Function testing by aggregometry/

• **Dawood and Watson /GAPP**

- Genotyping and Platelet Phenotyping)/UK/Blood 2012 and JTH 2013

• **C. Hayward et al.**

- Development of North American Consensus Guidelines for Medical Laboratories That Perform and Interpret Platelet Function Testing Using Light Transmission Aggregometry) USA/Am J Clin Pathol 2010

• **P. Harrison et al**

- Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function/ British Committee for Standards in Haematology/ BJH 2011

Pre-analyse:

Overeenkomsten met de SSC richtlijn (2013) in Nederland.

De SSC aanbeveling is in grijs gemarkeerd.



n=25/SSC guideline	Yes	No
Patient resting	8	17
Fasting	3	22
Vacutainers	16	9
Citrate 109 or 129 mM	18	7
Discard tube	15	10
Sample resting	18	7
Centrifugal force 200 g	4	21
Centrifugal time 10 min	12	13
Use brake	5	20
Reference values	6	19
Normal subject use	11	14
Adjustment of count	17	8

Platelet aggregation by LTA and Multiplate® in healthy subjects is not affected by smoking, drinking coffee, consuming a high-fat meal or performing physical exercise (submitted for publication)

J.P.M Krekels*, P.W.M. Verhezen*, Y.M.C. Henskens*

** Central Diagnostic Laboratory, Cluster for Hemostasis and Transfusion, Maastricht University Medical Center (MUMC+), Maastricht, The Netherlands*

Table 2: Demographic characteristics of each group.

The amount of subjects, male:female ratio and average age (\pm SD) is represented for each group.

Group	Parameter	Amount of subjects (n)	Male: female ratio	Average age in years (\pmSD)
I	Smoking	5	0:5	50 (\pm 14)
II	Drinking coffee	5	0:5	32 (\pm 16)
III	Consuming high-fat meal	5	2:3	30 (\pm 12)
IV	Performing physical exercise	5	1:4	32 (\pm 14)
V	Control	6	1:5	33 (\pm 12)

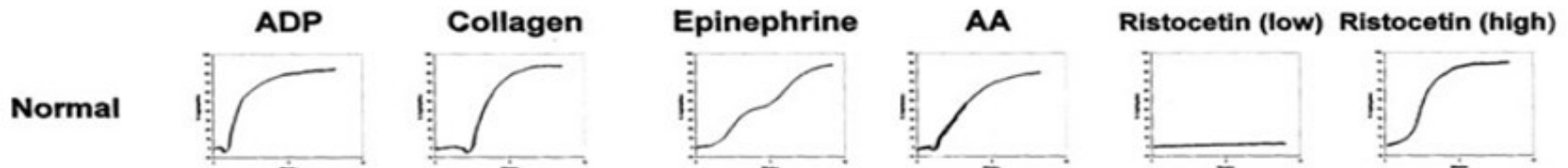
SD: standard deviation

Agonisten keuze

- Sterke agonisten: directe plaatjes aggregatie en secretie (collageen, trombine)

Zwakke agonisten: plaatjes aggregatie en geen directe secretie (ADP, epinephrine)

Agonisten	Receptor
ADP	P2Y1, P2Y12
Collageen	GPIa/IIa, GpVI
Ristocetine	GPIb-IX-V (VWF)
Adrenaline	Adrenerge receptoren
Arachidonzuur	Omzetting naar TXA2 - receptor
Trombine	Trombine receptor (PAR-1)



Agonisten keuze en concentratie in NL (2013)

	End conc	SSC-ISTH	NL	% (n=25) Used by
ADP	μM	2 and higher	0,4-100	100 %
Collagen	μg/ml	2 and higher	1-10	100 %
Arachidonic Acid	mM	1 and higher	0,5-3,0	76 %
Epinephrine	μM	5 and higher	0,025-200	60 %
Ristocetin	mg/ml	1,2 and higher	0,5-12,5	96 %
TRAP-Par-1 SFLLRN	μM	10 and higher	15	12 %
U46619	μM	1 and higher	1	8 %

Onderzoek 2012-2013

Zijn er verschillen bij gezonde vrijwilligers ? in:

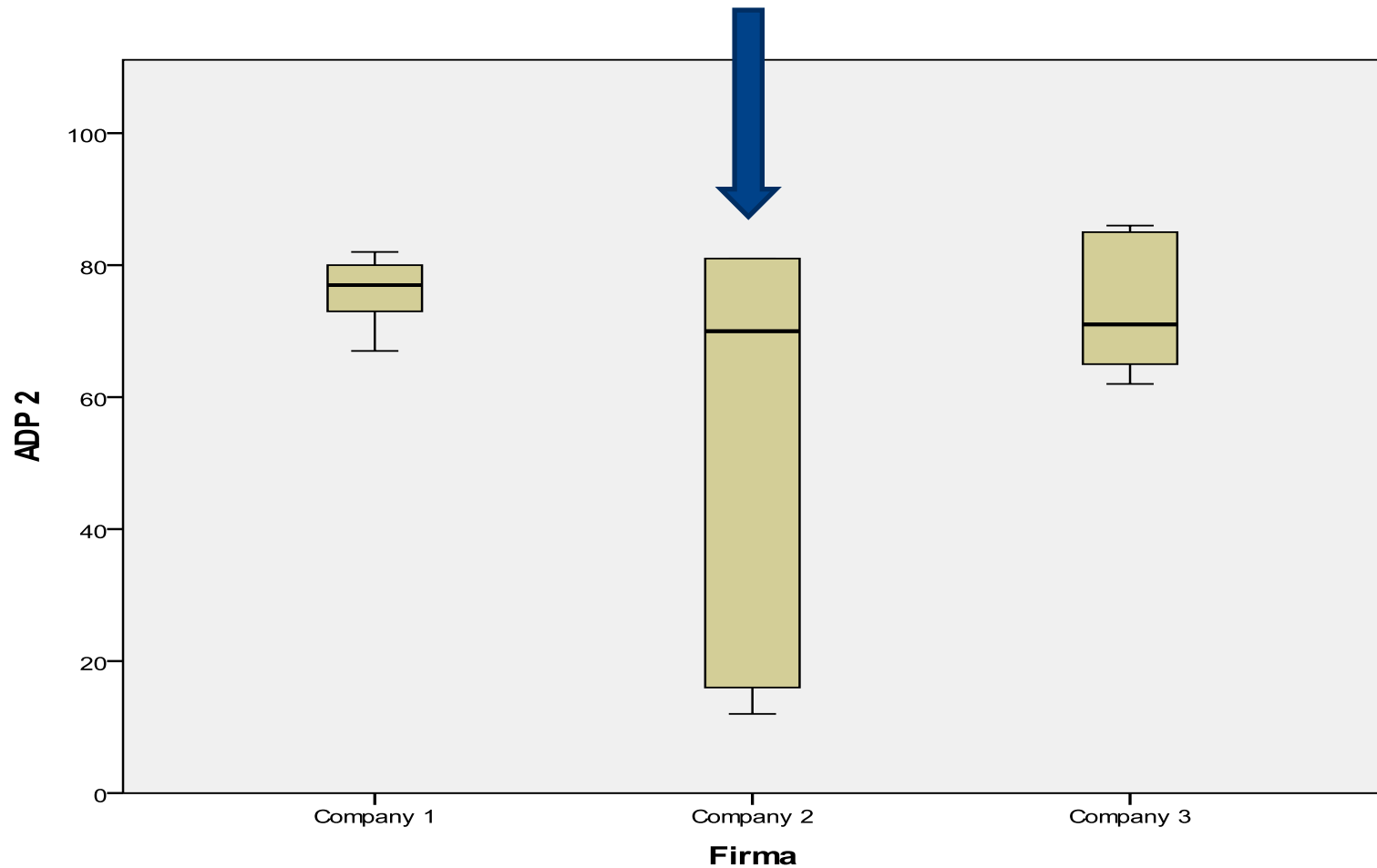
- agonisten van verschillende firma's
- analyser types
- wel of niet adjusteren van PRP

One analyser (PAP8)
Healthy volunteers (n=6)
Different reagent brands
SSC advised concentration

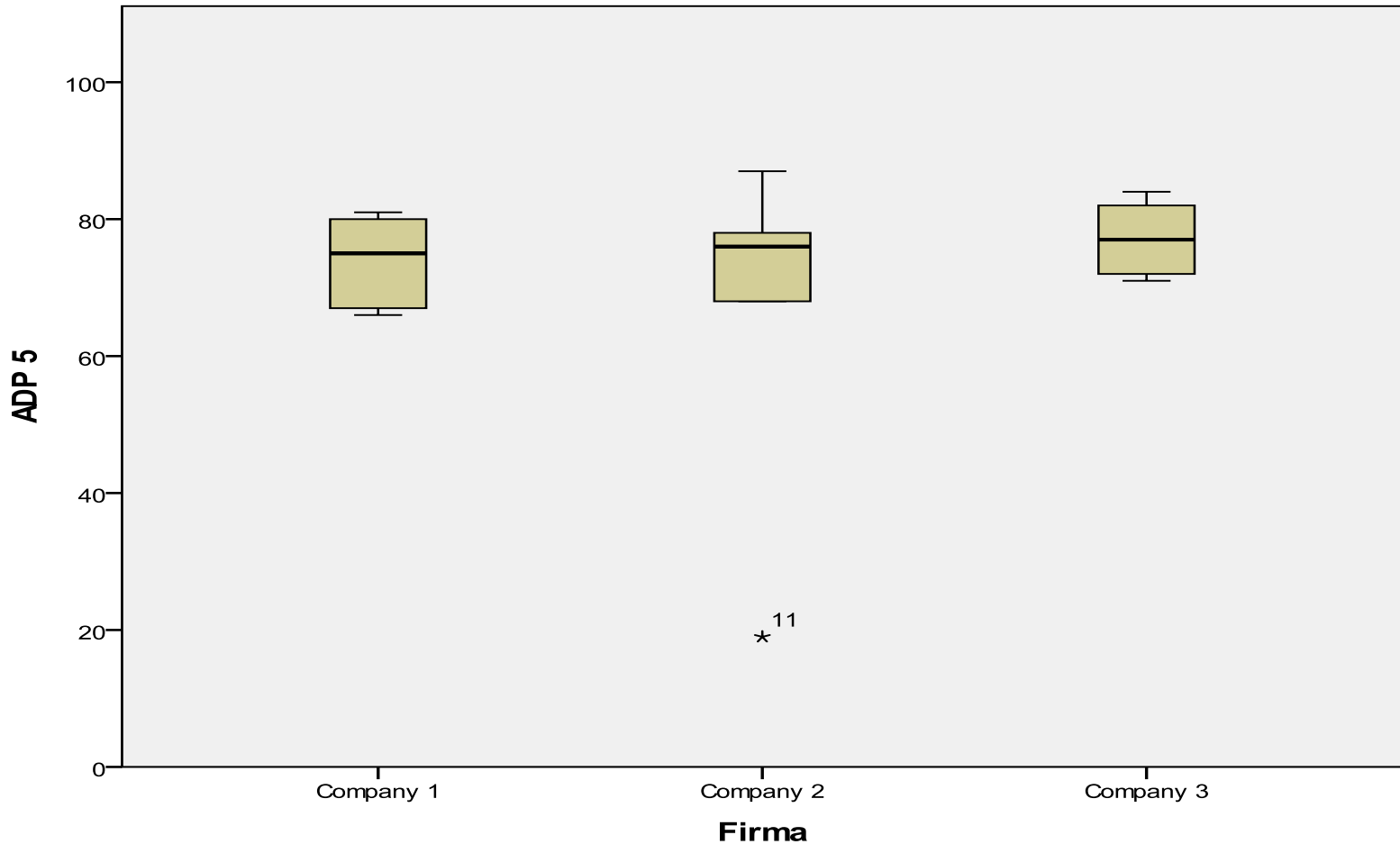


Agonist	Concentration	Company 1	Company 2	Company 3
Epinephrine	5 μ M	BioData	ABP	Chronolog
ArachidonicA	1 mM	BioData	Hart	Sigma
Ristocetin	1.2 mg/mL	Biopool	ABP	Chronolog
ADP	2 en 5 μ M	BioData	Chronolog	Sigma
Collagen	2 en 5 mg/L	BioData	Chronolog	Horm

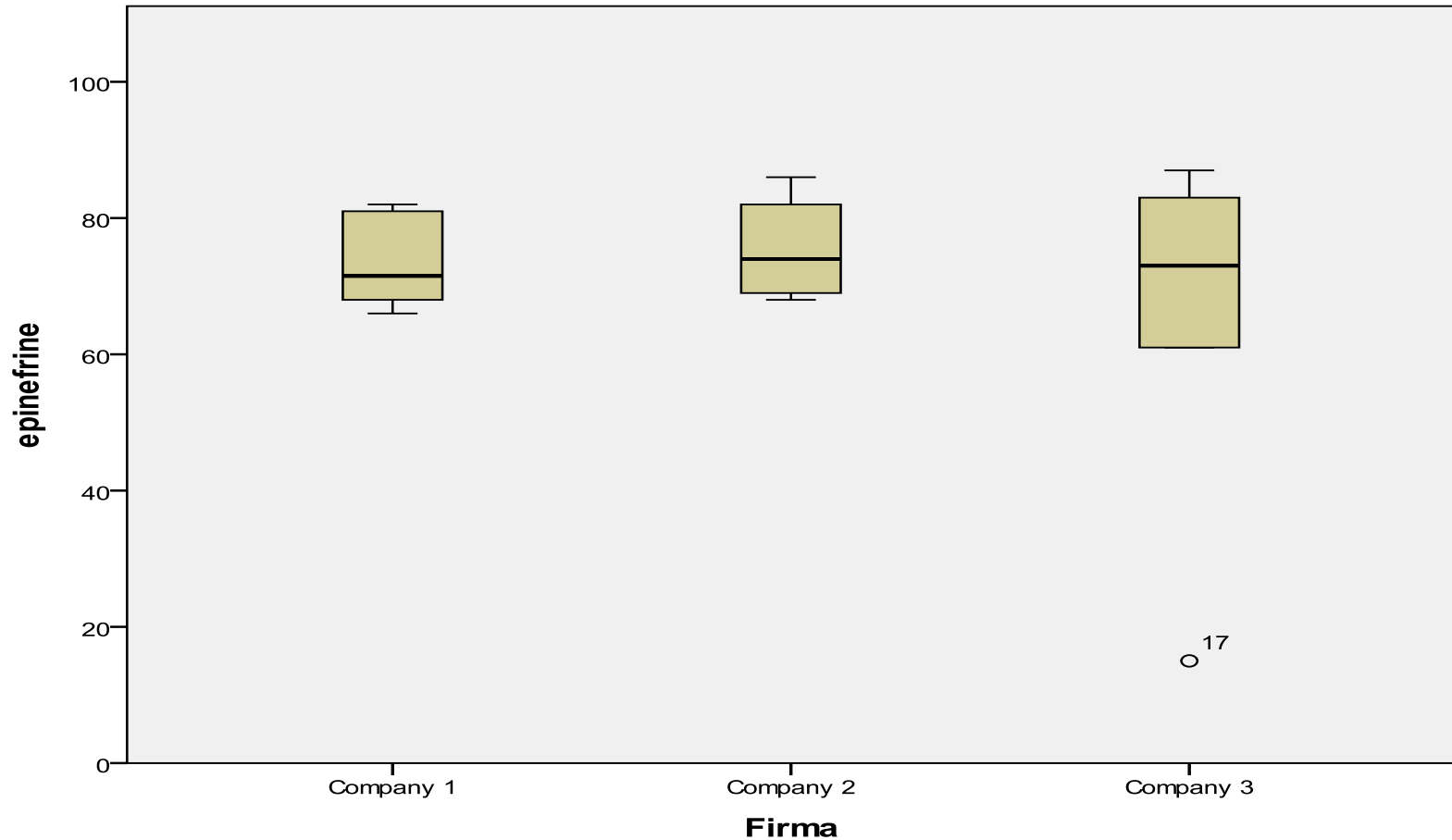
Maximal aggregation (%) on PAP8 ADP 2 μ M



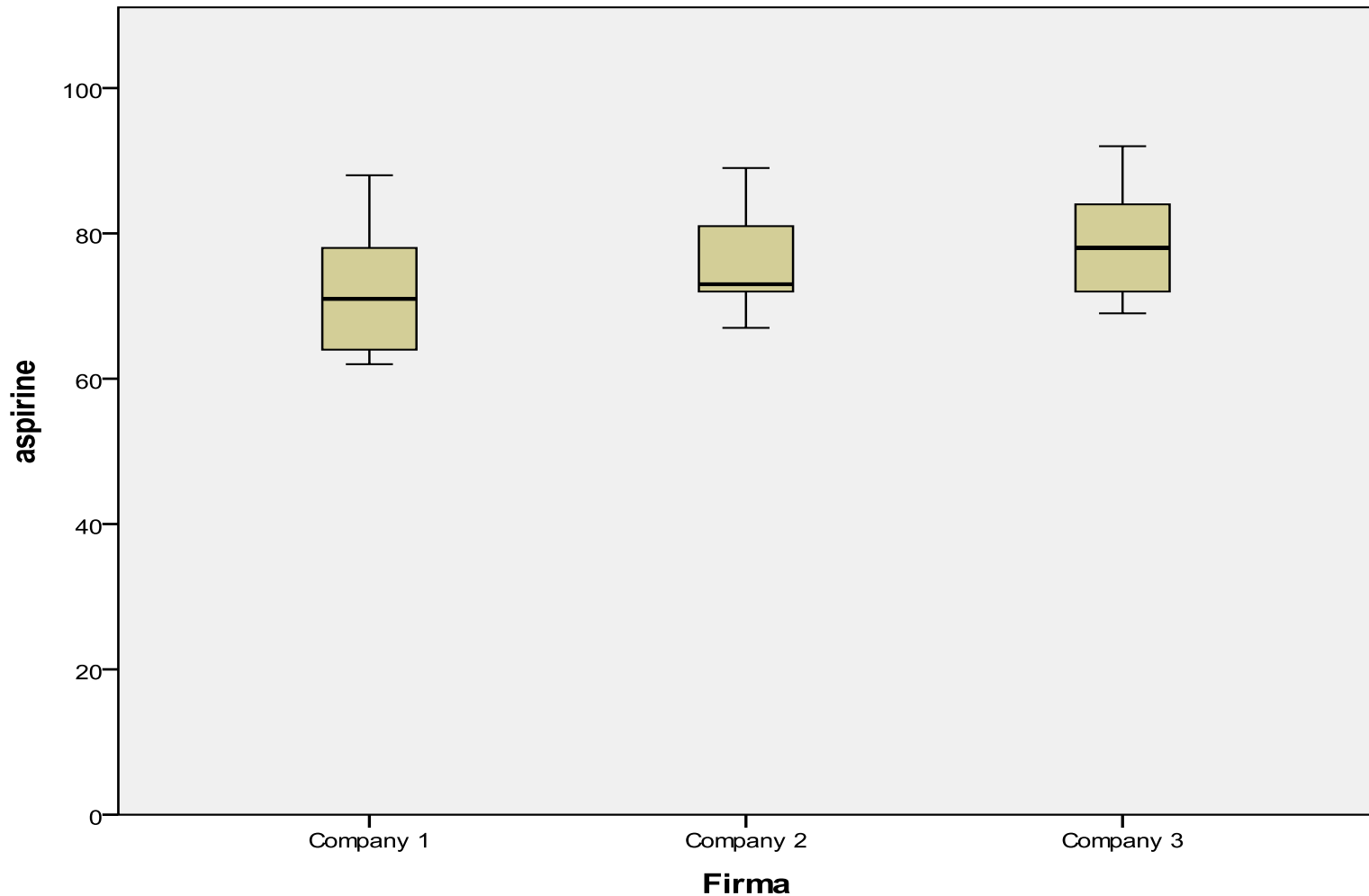
Maximal aggregation (%) on PAP8 ADP 5 μ M



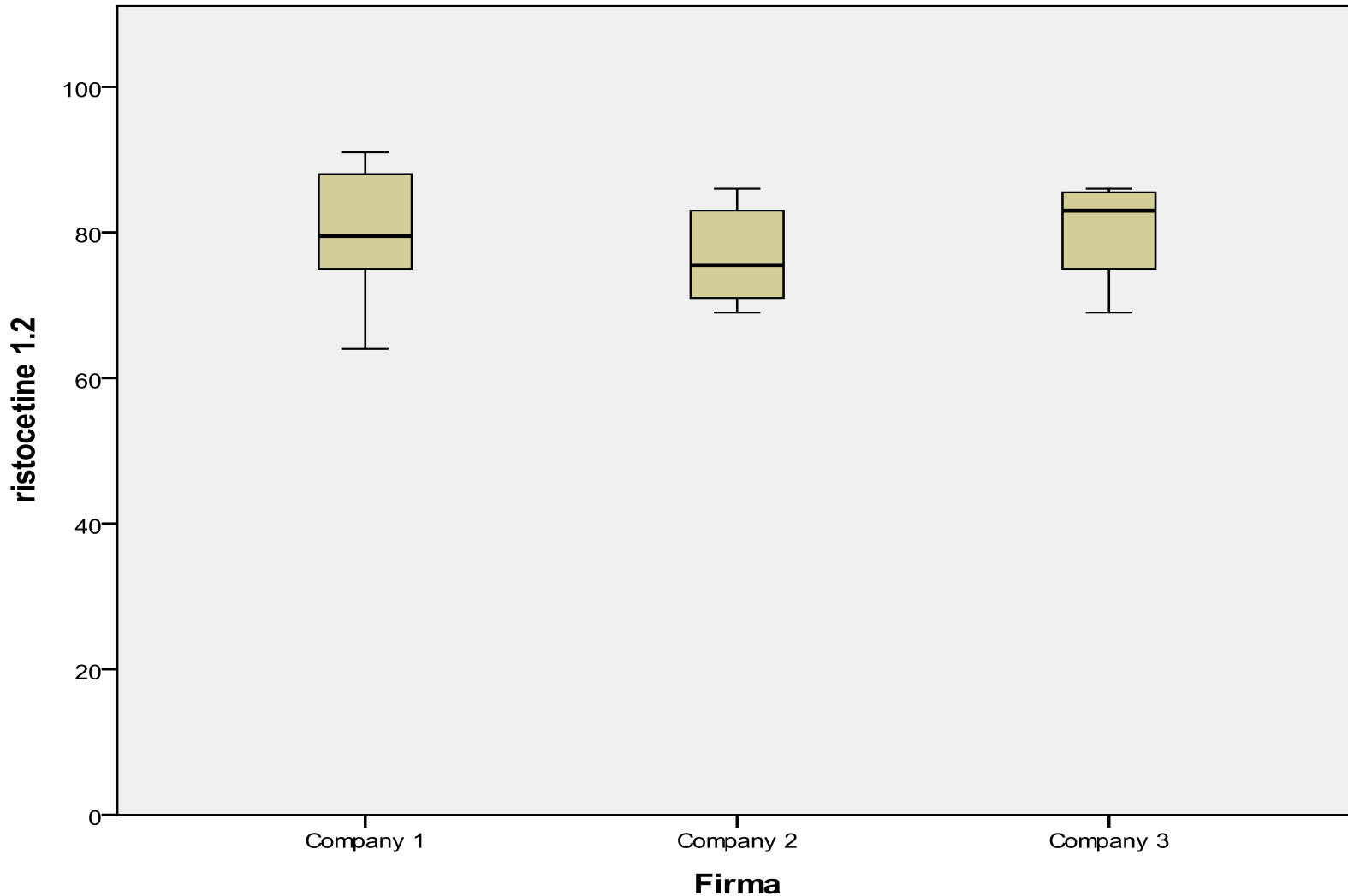
Maximal aggregation (%) on PAP8 Epinephrine 5 $\mu\text{mol/L}$



Maximal aggregation (%) on PAP8 Arachidonic acid 1 mmol/L



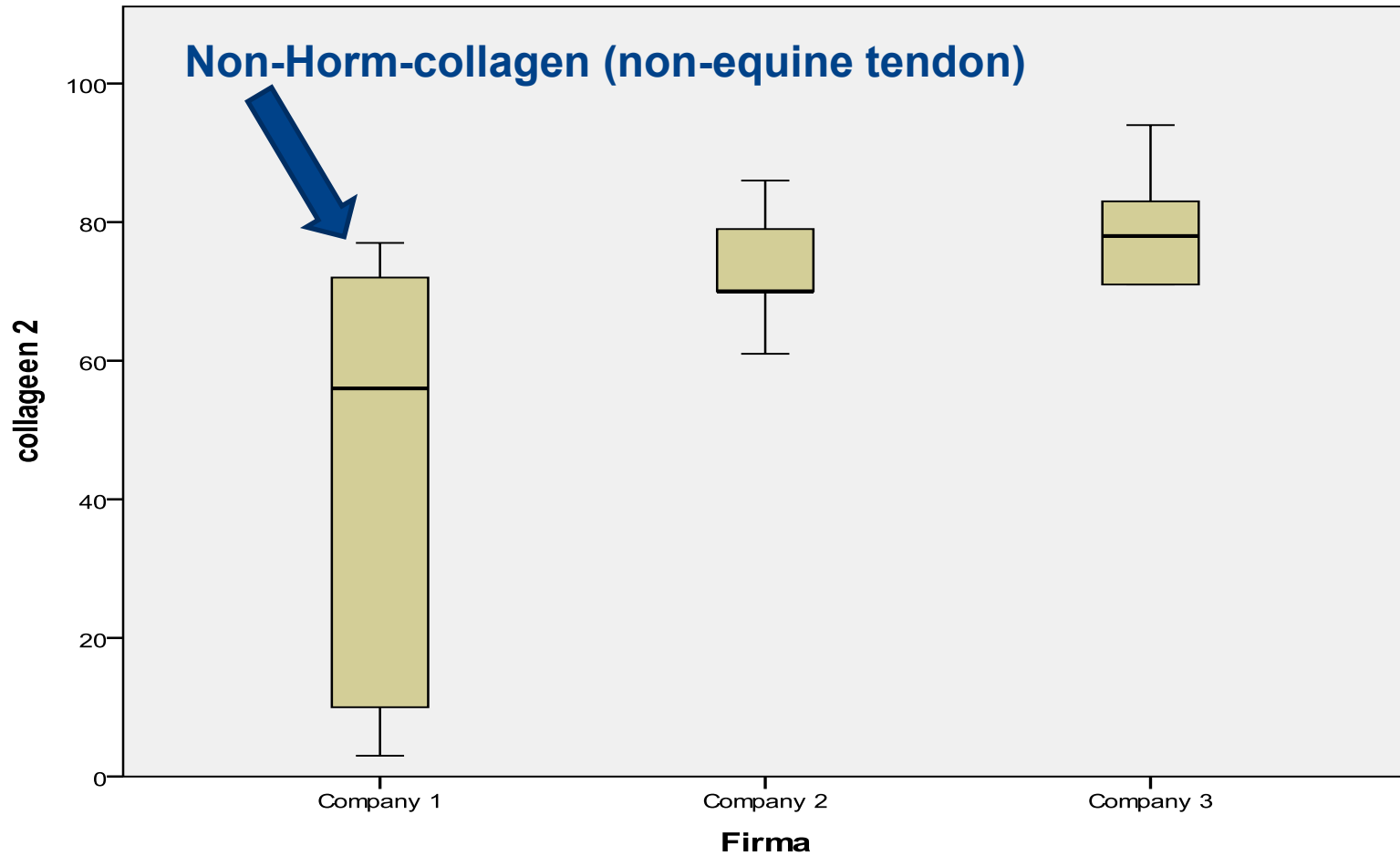
Maximal aggregation (%) on PAP8 Ristocetin 1,2 mg/mL



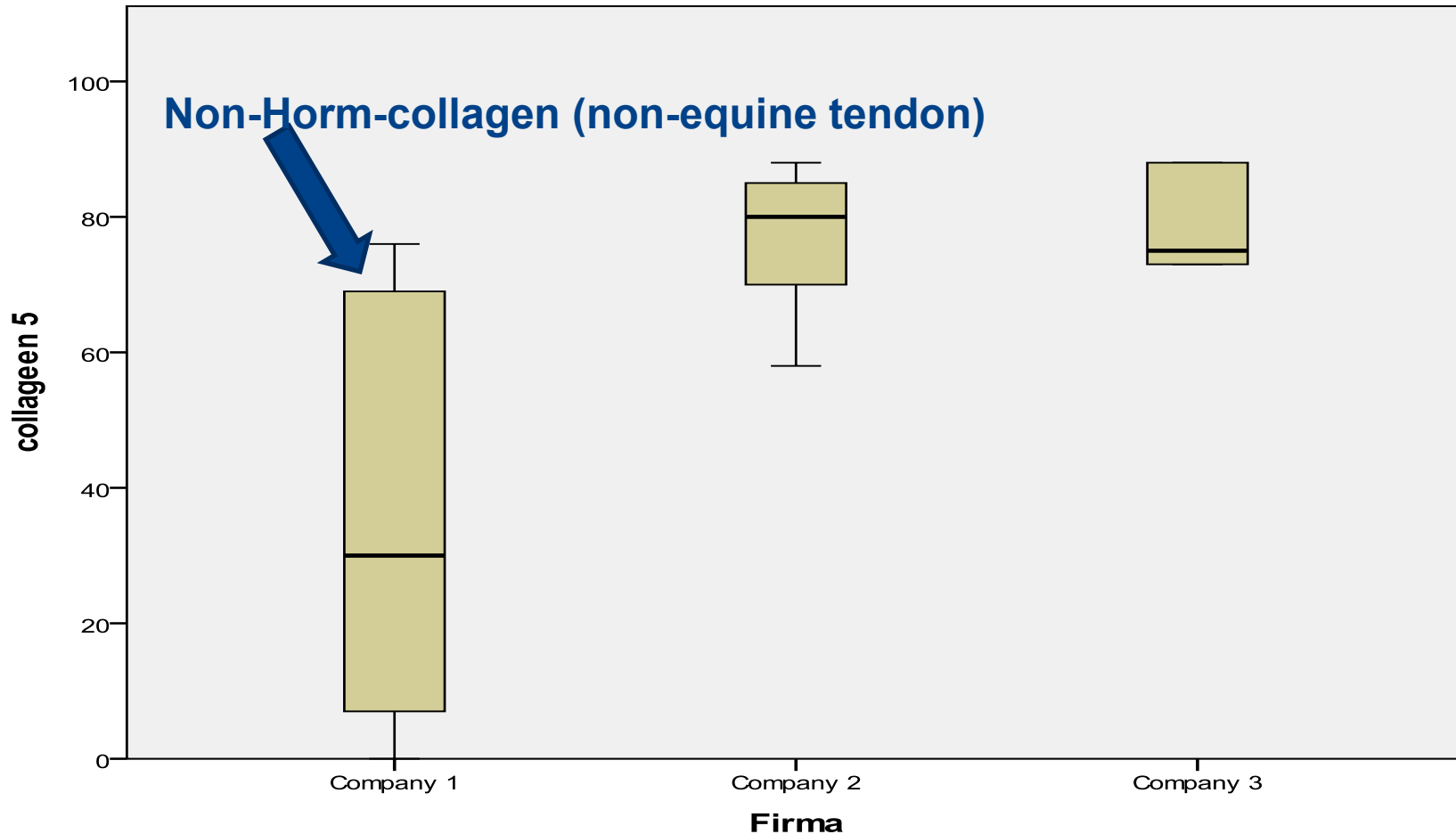
Henskens/SSC/30-6-2013

Maximal aggregation (%) on PAP8

Collagen 2 mg/L



Maximal aggregation (%) on PAP8 Collagen 5 mg/L



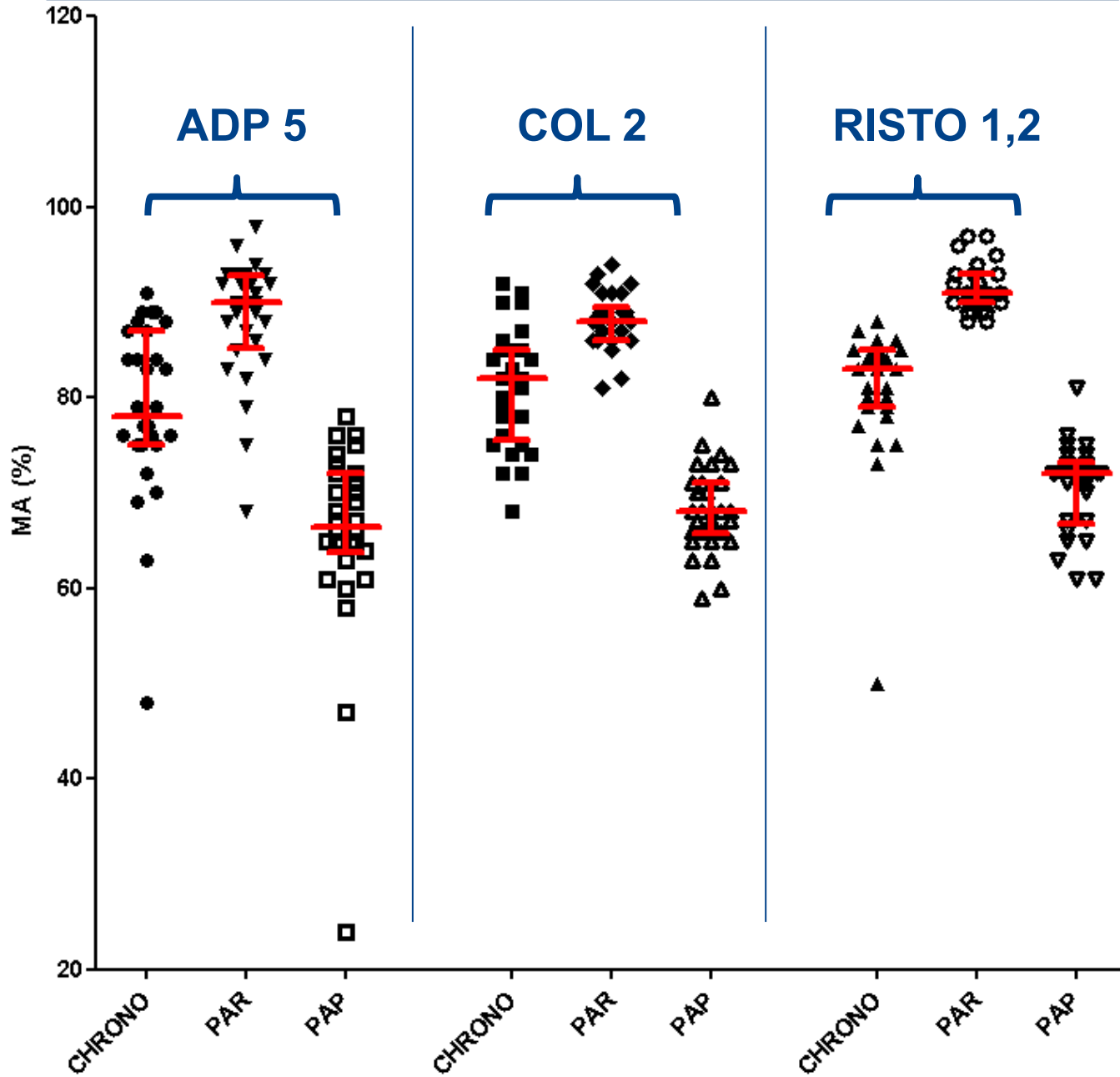
Three different analysers

Healthy volunteers (n=30)

Adjusted and non-adjusted PRP

Agonist	Chrono-log	PAR8	PAP8e
ADP (5 μ M)			
Collagen (2 μ g/mL)			
Ristocetine (1.2 mg/mL)			

NON-adjusted PRP on 3 analyzers'



Agonist	End Conc	Chrono-log	PAR8	PAP8e
		Median (25 – 75 %)		
ADP NA	5 μ M	78 (75 – 86)	90 (86 – 92)	67 (64 – 72)
ADP A		78 (73 – 82)	90 (86 – 92)	70 (67 – 73)
Collageen NA	2 μ g/mL	82 (76 – 85)	88 (86 – 90)	68 (66 – 71)
Collageen A		83 (79 – 86)	88 (86 – 90)	74 (71 – 77)
Ristocetine NA	1.2 mg/mL	83 (79 – 85)	90 (90 – 92)	72 (67 – 73)
Ristocetine A		83 (78 – 87)	92 (90 – 94)	75 (71 – 78)

2013: nulmeting uitgevoerd in NL

2016: NL richtlijn opgesteld en opnieuw gemeten

- Voldoet voor 99 % aan de ISTH richtlijn
- 10 deelnemende laboratoria conformeren zich aan NL richtlijn
- Gezonde vrijwilligers (10 per lab)
- Maximale aggregatie (LTA)

- *Resultaten wel getoond bij SKML sessie maar ivm aankomende publicatie hier verwijderd.*

Agonisten 2013 versus 2017

	2013	2016 Concentratie
ADP laag	0,5-2,5	2
ADP midden	4-5	5
ADP hoog	10-20	10
Collageen laag	1-2	2
Collageen hoog	4-10	5
Risto laag	< 0,7	< 0,7
Risto hoog	> 1	1,2
Epinefrine laag	5	5
Epinefrine hoog	10	10
Arachidonzuur laag	DIVERS	1

Harmonisatie & referentiewaarden

Conclusies

- Zwakke agonisten geven nog steeds grotere spreiding
- Spreiding is het grootst bij lage concentratie
- Met name ADP is een variabele agonist
- Oorzaak: stoppen met adjusteren van PRP ?

- VHL werkgroep → formuleert conclusies en aanbevelingen na analyse en bespreking

IQC en EQC voor LTA: bestaat niet

Handreiking VHL (in 2017 vaststellen)

IQC


- **Technische controles apparatuur gebruiken**
- **ISTH Richtlijnen zegt: neem ALTIJD een gezonde vrijwilliger mee**
 - ETHIEK (dus toestemming vragen)
 - MET MATE
 - Altijd bij lotnummer wisselingen
 - Indien nodig bij twijfel bij een patiënt
- **Herhaal** afwijkingen altijd binnen de run en bevestig in nieuwe bloedafname
- **Overleg met de clinicus** over de uitslag in de context van de patiënt

EQC

- **Nascola** papieren rondzending (casuïstiek en beoordeling)

Wat hebben we (bijna) bereikt door VHL samenwerking

1. NL gedragen richtlijn LTA voor de uitvoering plus indicatie voor de van range gezonde vrijwilligers (publicatie wordt opgesteld)
2. Onderzoeksresultaten aangeleverd voor aanpassing richtlijn op ontbrekende onderdelen van de pre-analyse (publicatie submitted).
3. Handreiking voor IQC voor bloedplaatjesfunctietesten
4. Subsidie (SKMS gelden) ontvangen voor een literatuurstudie naar pre-analyse en analyse variabelen met als doel een “handreiking, aanbeveling of richtlijn”.
Top 10-20 meest aangevraagde testen in NL.

MUMC+-CDL-BAM! team	VHL werkgroep hemostase	Deelnemers landelijke standaardisatie LTA 2013 en/of 2016
Paul Verhezen	An Stroobants	Lab Noord - Groningen
Erik Beckers	Moniek de Maat	AMC - Amsterdam
Bernd Granzen	Ciska Hudig	St. Elisabeth - Tilburg
Katrien van Rooy	Gabrielle Ponjee	Antonius - Nieuwegein
Hugo ten Cate	Daan vd Kerkhoff	OLVG - Amsterdam
Minka Vries (PhD)	Paul Verhezen	Haga - Den Haag
Floor Moenen (PhD)	Carolien Klopper	Medlon - Enschede
Geert Jan Kuiper (PhD)	Kim Debruyn	MMC - Veldhoven
Team Lab Speciele Hemostase	Paul Verhezen	MUMC+ - Maastricht
		Rijnstate-Arnhem
		Noord West ZHG - Alkmaar Den Helder
		Erasmus UMC - Rotterdam
		VUMC – Amsterdam
		Catharina ZH Eindhoven
		Radboud UMC-Nijmegen
		St. Anna Ziekenhuis- Geldrop

