

Themadag NVTH, Werkgroep Hemostase Diagnostiek, 17 maart 2016

De jaarlijkse Themadag vond dit jaar plaats in het Jeroen Bosch ziekenhuis Den Bosch te Den Bosch.

Het thema: Hemofilie

Als gastsprekers waren aanwezig:

- Paul van der Valk, Creveld kliniek Utrecht
- Piet Meijer, ECAT Foundation, Voorschoten
- Joost Meijers, AMC/Sanquin, Amsterdam
- Dr. Rolf Urbanus, onderzoeker, UMCU

Programma:

10:15-11:15 State of the art: Hemofilie, Paul van der Valk, Creveld kliniek Utrecht

Een presentatie waarbij vooral de kliniek en therapieën aan de orde zijn gekomen inclusief nieuwe ontwikkelingen t.a.v. de long halftime stollingspreparaten.

11:15-11:30 PAUZE

11:30-12:30 ECAT resultaten m.b.t. hemofilie, Piet Meijer, ECAT Foundation

Piet Meijer gaf een overzicht van de resultaten van het extern kwaliteitscontroleprogramma van de ECAT voor Factor VIII en IX. Hieruit bleek dat voor Factor VIII de variabiliteit van de resultaten zodanig was dat 5 – 30% van de deelnemers niet in staat was om ernstig, matig en milde hemofilie A plasma's correct te classificeren. Verder bleek dat zowel voor Factor VIII als Factor IX de variabiliteit tussen het meten van een zelfde mild hemofilie plasma met een tussenpoze van 6 maanden kan oplopen tot ruim 40%.

Uit een casuïstiek survey bleek dat een plasma van een milde hemofilie B patient door ruim 92% van de deelnemers goed werd gediagnosticeerd. Eén deelnemer diagnosticeerde het plasma als een hemofilie A patient. Een andere deelnemer vond geen abnormaliteiten. Een aantal andere deelnemers dachten aan andere afwijkingen dan Factor IX of onverklaarbare bloedingsneigingen.

12:30-13:30 LUNCH

13:30-15:30 Interactieve sessie, o.a. hemofilie kennisvragen en inventarisatie, pitfalls hemofilie testen en andere onderwerpen, allen.

Tussen half twee en half drie vond deel 1 van de interactieve sessie plaats bestaande uit diverse presentaties.

We zijn gestart met een casus vanuit de van Creveldkliniek. Over een buitenlandse patiënte die in haar geboorteland gediagnosticeerd is met de ziekte van von Willebrand. Echter in Nederland kan dit niet gereproduceerd worden! Vervolgens volgde discussie over de tot nu bekende resultaten van de van Creveldkliniek en mogelijke differentiaal diagnoses! Tevens werd aandacht besteed aan een

studie die de van Creveldkliniek gaat opzetten m.b.t. tot onderzoek naar trombocytopathie in Nederland.

Vervolgens volgde een interessante validatie van een chromogene factor VIII bepaling die in UMC Nijmegen is gevalideerd. Uitgelegd werd na enkele achtergronden de werking van chromogene factor VIII bepaling en de meerwaarde hiervan, namelijk beter kunnen diagnosticeren van de zogenaamde discrepante milde hemofilie A. De uitgevoerde validatie werd uitgelegd (o.a. methodevergelijk, EP10 protocol om te controleren op lineariteit, Carry over, drift en variatie, vaststellen LLOQ (laagst nauwkeurig te meten concentratie)). Als laatste volgde een validatie van verschillende typen factor VIII concentraten die zowel met de standaard one-stage clotting assay en de chromogene factor VIII zijn bepaald. Hierin kwam duidelijk naar voren dat sommige producten duidelijke discrepanties laten zien, en dat de one stage factor VIII assay niet geschikt is voor het monitoren van deze producten. Conclusie van deze presentatie was dan ook de chromogene factor VIII bepaling onmisbaar is in diagnostiek en follow up van hemofilie A.

Aansluitend werd een interessante casus verteld vanuit het MUMC in Maastricht. Dit was een casus van een pasgeboren kind dat een duidelijke bloedingsneiging ontwikkelde binnen het eerste jaar. Deze casus liet ook zien dat het soms erg moeilijk kan zijn om op de meest voor de hand liggende en correcte manier hemostase onderzoek te verrichten indien maar weinig plasmamateriaal voorhanden is. Uiteindelijk is ernstige Hemofilie B (<1%) aangetoond (bevestigd met mutatieonderzoek). Daarnaast werd ook verlaagd factor VIII en XI aangetoond. Nader onderzoek hier van is nog niet afgerond.

Vervolgens werd door het AMC een presentatie gegeven over de achtergronden van ADAMTS13 deficiëntie bij TTP. En werd hun (bewerkelijke) bepaling voor antistoffen tegen ADAMTS13 uitgelegd.

Aansluitend vond de tweede sessie plaats, een inventarisatie onder de aanwezige deelnemers op het gebied van hemofiliediagnostiek. Dit leverde voldoende discussie op, en alle antwoorden werden doorgesproken. Hieronder een overzicht van de vragen met de gegeven antwoorden.

Vraag 1: Worden standaard ook andere routine testparameters aangevraagd bij factor VIII aanvragen (voor bloedingsneiging)? Zo ja, welke? 13 van de 14 deelnemers antwoorden met ja, en de APTT werd door alle 12 tegelijkertijd aangevraagd.

Vraag 2: Welk APTT reagens gebruikt u voor de diagnostiek van FVIII?

4X Actin FS

2X Actin FSL

2X SynthAsil (APTT-SS) (IL)

1X Cephascreeen (Stago), STA PTTa (Stago)

1X STA PTTa (Stago)

1X Triniclot APTT

3X geen antwoord

Vraag 3: Wordt hetzelfde APTT reagens ook gebruikt voor de diagnostiek van een APTT?

Ja: 10X

Nee: 4X

Vraag 4: Welke waarde heeft de laagste standaard van de kalibratie curve voor de FVIII stolbepaling?

0% = 2 X

5% = 4

Anders: 7X

Weet niet: 1X

Vraag 5: In hoeveel verschillende verdunningen wordt het patiënten plasma standaard bepaald in de factor VIII bepaling?

1 verdunning: 6X

2 verdunningen: 2X

3 verdunningen: 6X

Vraag 6: Indien er standaard 1 verdunning gebruikt wordt voor de factor VIII bepaling, wordt dan alsnog bij verlaagde uitslagen een multi dilution analysis (MDA) ingezet?

Ja 1 verdunning: 3X

Ja 2 verdunningen: 5X

Ja 3 verdunningen: 1X

Geen antwoord: 5X

Vraag 7: Wordt een aPTT mengproef uitgevoerd bij jullie op het laboratorium? Zo ja, hoe wordt deze uitgevoerd?

Ja: 13X geen antwoord: 1X

Ja, 1+1 Verdund en direct aPTT meten (geen extra incubatie): 5X

Ja, 1+1 Verdund en meten na 1 of 2 uur incubatie bij 37 graden Celcius: 7X

Ja, 1+1 Verdund en direct aPTT meten (geen extra incubatie), en, 1+1 Verdund en meten na 1 of 2 uur incubatie bij 37 graden Celcius. : 1X

Vraag 8: Wordt er diagnostiek m.b.t. remmers tegen FVIII uitgevoerd bij je op het lab?

Ja: 10X Nee: 4X

Vraag 9: Is de FVIII chromogeen bepaling beschikbaar binnen jullie laboratorium?

Ja: 5X Nee: 9X

Na deze inventarisatie wordt afgesloten met een aantal quizvragen op het gebied van stolling en hemofilie!

15:30-15:45

PAUZE

15:45-16:30

Trombocyten, thema 2017, Joost Meijers, AMC/Sanquin, Amsterdam

TROMBOCYTEN

Humane trombocyten of in beter Nederlands bloedplaatjes zijn ovale, kernloze celfragmenten die in het beenmerg uit megakaryocyten worden gevormd. Megakaryocyten worden gevormd uit de pluripotente stamcel. Voor de differentiatie van stamcel tot megakaryocyt is de aanwezigheid van het cytokine trombopoëetine essentieel. Rijpe megakaryocyten gaan lange, vaak vertakte uitlopers vormen. De uiteinden van deze uitlopers worden de plaatjes die na afsnoering van de megakaryocyt in de circulatie terechtkomen. Een gezonde volwassene produceert ongeveer 200 miljard bloedplaatjes per dag. Ongeveer 30% van de bloedplaatjes bevindt zich in de milt, en deze voorraad

wordt uitgewisseld met de bloedplaatjes in het bloed. De levensduur van een bloedplaatje is zeven tot negen dagen.

ADHESIE VAN BLOEDPLAATJES

Wanneer een bloedvat wordt beschadigd komen collageenvezels in contact met het bloed. Von Willebrand factor, aanwezig in het plasma, zal direct binden aan collageen. Hierdoor treedt een conformatieverandering op in het von Willebrand factor molecuul waardoor er bindingsplaatsen beschikbaar komen voor de hechting van bloedplaatjes. Het bloedplaatje heeft op zijn oppervlak een receptorcomplex speciaal voor de hechting aan von Willebrand factor, het glycoproteïne Ib-V-IX-complex (GPIb:V:IX). Door de interactie tussen GPIb:V:IX en von Willebrand factor begint het bloedplaatje over het oppervlak te rollen, waardoor de snelheid van het bloedplaatje sterk wordt verminderd. Hierdoor ontstaat de mogelijkheid voor het bloedplaatje om via andere receptoren met de vaatwand te reageren. Tijdens het rollen wordt het bloedplaatje licht geactiveerd waardoor deze receptoren een actieve conformatie aannemen. Na interactie met deze receptoren wordt het bloedplaatje stevig verankerd aan het oppervlak.

AGGREGATIE VAN BLOEDPLAATJES

Het basisprincipe dat ten grondslag ligt aan aggregatie van bloedplaatjes is dat, na activatie, de fibrinogeenreceptor op het oppervlak wordt geopend. Deze receptor is in een rustend bloedplaatje 'gesloten' en niet bereikbaar voor fibrinogeen. Fibrinogeen is een symmetrisch molecuul met twee identieke delen waardoor één molecuul fibrinogeen aan twee bloedplaatjes tegelijk kan binden. Er zijn ten minste vijftigduizend van deze receptoren op het oppervlak van één enkel bloedplaatje waardoor er een sterke interactie tussen bloedplaatjes onderling plaats kan vinden, en een aggregaat wordt gevormd.

BLOEDPLAATJESDIAGNOSTIEK

Voor volledig bloedplaatjesonderzoek zijn afnamen in twee verschillende anticoagulantia nodig; een afname met EDTA als anticoagulans om het aantal bloedplaatjes te kunnen bepalen en een afname met door citraat ontstold bloed. De meeste bloedplaatjesfuncties kunnen plaatsvinden bij een lage vrije Ca²⁺-concentratie. In citraatbloed (eindconcentratie citraat 11 mmol/l) zijn, in tegenstelling tot in EDTA bloed, nog voldoende vrije Ca²⁺-ionen beschikbaar. De bloedplaatjesfunctietests dienen binnen vier uur na bloedafname te worden uitgevoerd, aangezien de respons van bloedplaatjes op de verschillende agonisten in de tijd achteruitgaat.

De volgende testen zijn beschikbaar:

Het aantal bloedplaatjes

Bloedingstijd

Aggregatieonderzoek

Andere bloedplaatjesfunctietests:

Bij gestoorde aggregaties wordt vaak gemeten of er voldoende secretie optreedt. In een zogeheten lumi-aggregometer kunnen tegelijkertijd optische aggregatie en ATP-secretie worden gemeten.

β-tromboglobuline en plaatjesfactor 4 (PF4)

Het meten van tromboxaan afbraakproducten 2,3-dinor-tromboxaan B2 of 11-dehydroxy-tromboxaan B2 in urine.

Het meten van de MPV (mean platelet volume).

Assays voor het meten van antibloedplaatjesmedicatie

Doelstelling van deze assays is de effecten te meten van antibloedplaatjesmedicatie op de bloedplaatjesfunctie in al haar aspecten, het liefst aan de operatietafel of aan het bed van de patiënt (point-of-caretest).

De platelet function analyzer (PFA)

VerifyNow

Plateletworks

Cone and platelet analyser

Kinetic aggregometer.

De volgende apparaten zijn bedoeld om het effect op de totale hemostase te meten: plaatjesfunctie, fibrinevorming en fibrinolyse.

Trombo-elastografie

Sonoclot

16:30-17:00

Afsluiting