

Verslag Themadag Werkgroep Hemostase Diagnostiek 21 maart 2024 Radboud UMC

Dit jaar stond de jaarlijkse themadag in het teken van Trombofilie en antistolling.

De dag werd geopend door de nieuwe voorzitter Coby Wegman

Programma themadag 2024:

10:00-10:15	Opening en mededelingen: Coby Wegman, voorzitter WHD
10:15-11:15	State of the art, Prof. dr. Saskia Middeldorp, Erasmus MC Rotterdam
11:15-12:00	Anti-Xa en DOAC's, Dr. An Stroobants, Radboud UMC Nijmegen
12:00-13:00	LUNCH
13:00-13:45	Anti-Xa/ DOAC's, dr. Piet Meijer, ECAT
13:45-15:45	Interactieve sessie, allen
15:45-16:30	Thema 2025: vWF, Iris van Moort Radboud UMC Nijmegen

State of the art: Trombofilie en antistollingsbehandeling in zwangerschap.

Door: Saskia Middeldorp, prof.dr. Internist-vasculaire geneeskunde Radboud UMC Nijmegen

Een mooi, overzichtelijk en vooral interessante presentatie over:

- Trombofilie en zijn klinische impact bij zwangere vrouwen
- Antistollingstherapie bij zwangerschap complicaties
- Preventie van zwangerschap gerelateerde VTE
- Geduld en volhardendheid; Er zouden nog meer studies naar dit onderwerp kunnen worden gedaan, maar de studies duren lang en dat is een uitdaging.

Bij erfelijke trombose bij vrouwen is er 2 tot 3x verhoogde kans op miskramen (studie van 1996-1999) en indien APS (antifosfolipide syndroom) geeft dit 2 tot 10 x meer complicaties. Deze presentatie richt zich echter op vrouwen met herhaalde miskramen door *erfelijke* trombose neiging. Hiervoor werd in de jaren 90 elke zwangere vrouw met deze achtergrond behandeld met LMWH. Omdat dit ook risico kon geven op bloedingen en het toedienen van LMWH behoorlijk belastend is, was de ALIFE studie gestart in 2003, een gerandomiseerde studie, waarbij zwangere vrouwen werden behandeld met aspirine + LMWH of alleen met aspirine. Conclusie uit deze 10 jaar durende studie:

Geen effect tussen de 2 verschillende behandelingen aantoonbaar.

Er startte een 2^e studie, waarbij 41 centra in 5 landen deelnamen = ALIFE-2 studie: Vrouwen met 2 of meer miskramen vroeg in de zwangerschap en met een erfelijke belasting met als eind meetpunt een goede outcome, oftewel een levende baby na de bevalling.

Aan de studie namen 326 vrouwen deel (2011-2023) en kregen

162 ♀ 1x daags een lage dosering LMWH

158 ♀ geen behandeling met LMWH

De vrouwen waren gemid. 33 jaar oud en de erfelijke afwijking was:

FV-Leiden/FII mut: 3%

AT def: 2%

Prot c def: 5%

Prot S def: 14%

Combi: 5%

Uitkomst van deze studie: Van **beide** groepen had 71% een goede outcome, dus er was geen verschil aantoonbaar tussen behandeling met LMWH of geen behandeling, ook niet m.b.t. bloedingsneiging.

Conclusie 1 : Deze vrouwen (met meerdere miskramen en erfelijke trombofilie) in de zwangerschap geen LMWH meer geven en ook geen trombofilie bloedonderzoek uitvoeren.

In een andere grote studie Highlow (2012-2022, gepubliceerd in The Lancet) zijn 1100 vrouwen met zwangerschap gerelateerde VTE geïnccludeerd die tijdens gehele zwangerschap én 6 weken postpartum 1x dgs een intermediate dosis LMWH kregen (N = 535) óf een low dosis LMWH (deze dosis werd evt verhoogd bij toename van gewicht) (N= 491). Er is gecheckt hoeveel bloedingen en hoeveel trombotische events er waren tijdens de zwangerschap:

De vrouwen waren gemid. 32 jaar oud met de vlg uitkomsten:

<u>VTE</u>	<u>VTE + SVT</u>	<u>Major bleeding</u>	<u>klin opname</u>
31%	55%	4%	9%

Uitkomst van deze studie: Er is een reductie van 2% en resp. 2,5% aantoonbaar betreffende VTE resp SVT.

Er wordt echter vaker trombose gezien tot 6 wkn postpartum, m.n. DVT (lies/bekken) of post trombotisch syndroom.

Recidief trombose postpartum: Er is een significant verschil aantoonbaar na behandeling bij intermediate (0.9%) en low dose (4%) LMWH (en ook minder LE en tromboflebitis).

Conclusie 2: Advies vanuit deze studie maar nog niet in de richtlijnen: Antepartum low dose LMWH geven en postpartum intermediate dosis LMWH bij  met zwangerschap gerelateerde trombose en herhaalde miskramen.

Antistolling in het laboratorium

Door: An Stroobants, klinisch chemicus Radboud UMC Nijmegen

Nadat An iedereen had opgefrist over de primaire, secundaire hemostase en fibrinolyse, nam ze ons mee in de verschillende soorten antistollingsmedicatie. Ook de verschillende meetprincipes en mogelijke stoornissen kwamen aan bod. Het overzicht van waar welke soort medicijn remt in de stollingscascade geeft inzicht in welke testen gebruikt kunnen worden om de werking van deze middelen te kunnen monitoren. Vitamine K antagonist (VKA) remmen vitamine K-epoxide reductase waardoor de stollingsfactoren niet in actieve vorm kunnen worden omgezet. Dit kan gemeten worden met de INR en kan meerdere testen verstoren zoals bv Vitamine afhankelijke factoren en de lupus anticoagulans.

Heparine remt trombine vorming door het versterken van de werking van antirombine, dit remt zowel IIa als Xa. Dit kan gemeten worden middels de aPTT of anti-Xa activiteitsassay. De van heparine afgeleide antistollingsmiddelen, zoals de low molecular weight heparines, heparinoid en pentasaccharide, hebben enkel anti-Xa activiteit. Ook heparine en heparine achtige stoffen storen diverse testen zoals bv lupus anticoagulans proteïne S en C.

Directe orale antistollingsmiddelen (DOACs) remmen Xa of IIa, hier speelt eenzelfde effect op diverse stollingstesten.

Trombocytenaggregatiemiddelen worden veel minder vaak gemonitord. Als dit nodig is, zijn er specifieke testen voor als Verify Now en PFA met P2Y12 cartridge. Deze middelen hebben effect op trombocyten functie testen als trombocytenaggregatie en tromboelastografie.

Antistollingsmiddel	Metten met
VKA	INR
Heparine	aPTT
Heparine achtigen	Anti-Xa
DOAC IIa remmer	dTT
DOAC Xa remmer	Anti-Xa
Trombocyten aggregatie remmers	Verify now

Ook zijn er een aantal casus besproken waaruit blijkt dat je goed moet opletten met het effect dat antistollingsmiddelen hebben op hemostase testen. Gelukkig zijn er mogelijkheden om heparine of DOACs weg te vangen uit monsters van patiënten die echt niet kunnen stoppen met antistollingstherapie. Het is advies is ook in dergelijke gevallen om op een dal moment bloed af te nemen voor monitoring.

De anti-Xa test kan voor meerdere antistollingsmiddelen gebruikt worden. Er werden diverse tips gegeven om deze test in de praktijk te vereenvoudigen:

- Geen antitrombine toevoegen aan de test (bv poolplasma)
- 1 ijklijn voor DOACs en 1 voor de rest, controle met enkel fraxiparine controles.
- Resultaten uitdrukken in percentage remming: DAXA test en eventueel dit laatste weer terugrekenen naar huidige eenheden.

Vervolgens gingen we dieper in op wanneer en voor wie monitoring van DOACs van belang is.

Verandering in therapie na een meting werd vaker gezien bij patiënten met:

atriumfibrilleren,
ouderen,
slechtere nierfunctie,
vaker opgenomen in ziekenhuis en
vaker neurologie en chirurgie patiënten.

Verder werden de resultaten besproken van de FAST studie met als doel op een snelle en eenvoudige manier anti-Xa te meten waarbij 16 laboratoria monsters met/zonder DOACs hebben gemeten.

Kwaliteit Heparine en DOAC

Door: Onze vaste spreker, Piet Meijer van de ECAT Foundation

Laboratoria die deelnemen aan de ECAT rondzendingen krijgen 4x per jaar monsters voor het bepalen van UFH en LMWH toegestuurd en 2x per jaar monsters voor het bepalen van Orgaran, Fondaparinux, directe Xa en trombine remmers.

UFH:

De CV (tussenlab variatie) is heel goed bij de UFH, circa 9%.

Metingen met Stago reagens vallen significant lager uit dan de overige reagentia.

Een verklaring hiervoor kan zijn dat Stago als enige geen Dextranulfaat aan het anti-Xa reagens toevoegt.

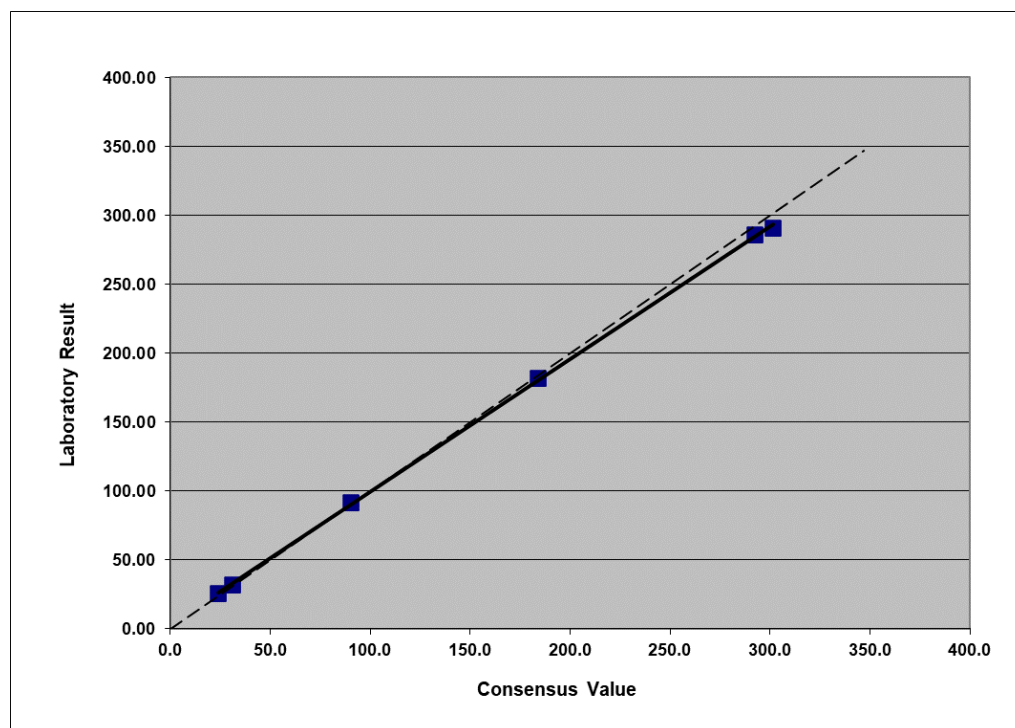
LMWH:

De CV is hier ongeveer 12% door de jaren heen (en is heel stabiel).

Longitudinale evaluatie EQA

Hierbij wordt het verband tussen de opgegeven waarde en de gemeten waarden in monsters bekeken over een langere periode. Als de LCVa laag is, betekent het dat je test stabiel is door de jaren heen.

LCVa = 1.2%



Als de LCVa die in Nederland wordt gevonden wordt vergeleken met de LCVa van andere landen is er geen significant verschil met de LCVa van LMWH in Nederland t.o.v. de overige deelnemende landen.

DOAC's:

Rivaroxaban:

Ook hier ligt reagens van Stago wat lager dan de overige reagentia. (het verschil is echter wel kleiner dan bij de UFH).

Rivaroxaban blijkt overall een stabiele bepaling te zijn.

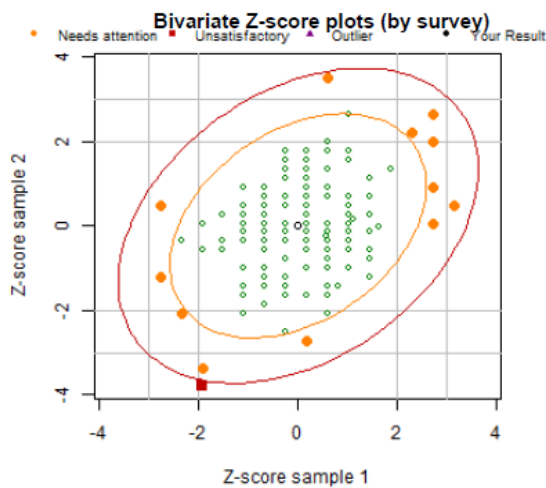
Dabigatran:

Reagens is gebaseerd op Anti-IIa of dTT metingen waarbij de CV wat hoger is bij de Anti-IIa metingen. Ook Dabigatran is door de jaren heen een stabiele bepaling.

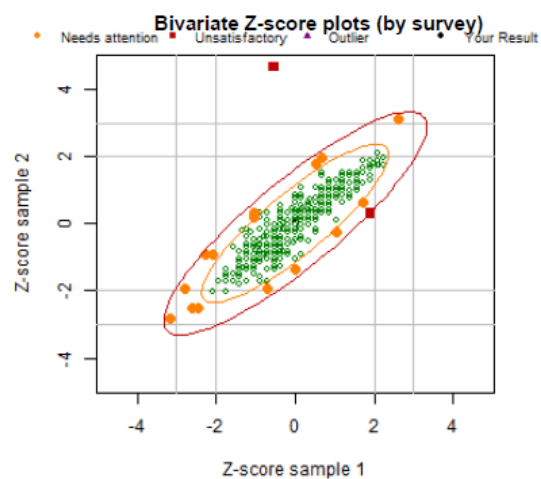
Bivariate Z score analyse

Omdat de twee monsters die de E

CAT opstuurt vaak in dezelfde batch worden gemeten zijn de twee monsters in principe afhankelijk van elkaar. Als je de Z waardes van beide monsters weergeeft in een zogenaamde bivariate Z score grafiek kun je zien met welk soort type fout je te maken kunt hebben.



ORGARAN



LMWH

Als er een hoge correlatie is tussen de twee waardes zal de cirkel meer een platte ellips vorm krijgen. Zie bovenstaande grafieken.

LMWH, Fondaparinux en Dabigatran hebben de beste bivariate Zscore. Dit ligt echter ook aan de concentratie in de opgestuurde monsters. Als de concentratie van de te meten parameter bijvoorbeeld in de buurt ligt van de detectiegrens vind je meer variatie.

Interactieve Sessie:

De aftrap van de interactieve sessie is gestart met een aantal casus besprekingen vanuit het Erasmus MC door Robbie de Jong en Ivanka Bregman.

Casus 1: Betreft een tweetal patiënten met een discrepantie tussen de anti-Xa metingen en de APTT. De hoge anti-Xa levels passen niet bij de relatief lagere APTT uitslagen. Na informeren blijkt dat beide patiënten een DOAC gebruiken (apixaban, rivaroxaban).

Casus 2: Betreft een patiënt met een congenitale ADAMTS13 deficiëntie. Na behandeling met omni plasma eens per 2 weken, stijgt de ADAMTS13 van 5% naar 15%. De patiënt heeft klinisch veel klachten: last van de transfusies en neurologische achteruitgang. De patiënt wordt nu behandeld met een recombinant ADAMTS13 eiwit (TAK-755), een medicijn dat is goedgekeurd voor studies. Na behandeling stijgt de ADAMTS13 tot 137% en heeft de patiënt geen klachten meer.

Casus 3: Betreft een patiënt met een onverklaarbare neus- en tandvlees bloedingen. Na inzetten van de routine stolling wordt geen oorzaak gevonden. Bij de 2^{de} afname wordt de primaire stolling gecheckt waaruit blijkt dat de ADP, collageen, arachidonzuur aggregaties “plat” liggen. Echter de ristocetine laat wel een aggregatiepatroon zien. Het betreft een patiënt met de ziekte van Glanzmann.

Casus 4: Betreft een patiënt met chronische ademhalingsproblemen en een ruitereMBOLIE. Na het meten van de Prot S activiteit blijkt deze heel erg hoog te zijn. De patiënt wordt na de trombose behandeld met dabigatran. Na neutralisatie van de dabigatran wordt de Prot S activiteit opnieuw gemeten en is normaal. De Prot S assay is APTT gebaseerd met deficiënt plasma. De dabigatran verlengt de APTT in de Prot S activiteit assay, de eerste uitslag is vals verhoogd. De patiënt heeft na uitgebreid trombofilie onderzoek FV Leiden.

Casus 5: Betreft een patiënt met een trombocytose, hiervoor krijgt de patiënt het medicijn Hydrea (*medicijn dat o.a. gegeven wordt bij vormen van bloedarmoede en stollingsziekten*). Vanwege de ziekte van Parkinson is de patiënt gestopt met deze medicatie. Het trombocyten aantal is torenhoog en de VWF activiteit erg laag. De patiënt blijkt een verworven VWF remmer te hebben door het hoge trombocyten aantal.

Dominique Garnier: In het Reinier de Graaf Gasthuis Delft is de validatie gestart voor DOAC spiegels op de Sysmex CN3000. Het betreft apixaban, rivaroxaban (met Innovance Xa reagens van Siemens) en dabigatran. Vanwege het lage aanbod van klinische samples loopt de validatie al meer dan een jaar. De vraag aan de groep is, of iemand samples beschikbaar heeft om de validatie af te kunnen ronden.

Tips vanuit de zaal: bij de ECAT extra monsters opvragen, dabigatran spiken (echter wel met de juiste vorm dabigatran)

Selene Schoormans vanuit het Radboud Nijmegen licht een complexe casus toe van een patiënt met remmers. Het betreft een patiënt met extreem lage VWF parameters (passend bij type 3 Von Willebrand Disease).

Klinisch beeld patiënt: forse Hb daling na menarche. De patiënt krijgt tranexaminezuur (*medicijn wat bloedingen voorkomt; is een competitieve remmer van plasminogeen en remt daardoor de omzetting in plasmine in het fibrinolytisch systeem*)

Patiënt heeft geen goede response op Hemate-P, de Von Willebrand factor parameters stijgen nauwelijks. Er wordt een VWF remmer ingezet (*op dezelfde manier als de FVIII remmers, Nijmegen BE*) en er blijkt een VWF remmer aanwezig te zijn. Hiervoor volgt een behandeling met recombinant VWF (VEYVONDI). Na deze therapie ontwikkelt de patiënt een Factor VIII remmer.

Paul Verhezen vanuit het UMC Maastricht wordt een casus besproken van een patiënt opgenomen met een herseninfarct. De patiënt heeft een trombopathie, gebruikt bloedverdunners en heeft eerder meerdere ingrepen ondergaan zonder complicaties.

Na het inzetten van uitgebreid stollingsonderzoek blijkt dat de APTT verlengd is. Verder is de trombinetijd sterk verlengd en valt buiten het meetbereik. De FVIII (chromogeen) en FIX zijn verhoogd/normaal. Echter de FXI en FXII zijn verlaagd (one-stage assays). Het blijkt dat de patiënt dabigatran krijgt. Na het toevoegen van DOAC remove worden de lab testen herhaald. De eerder afwijkende parameters zijn na de DOAC remove genormaliseerd op de FXII na.

Het meetsysteem betreft de Sysmex CS2100 m.b.v. Siemens reagents. De testprotocollen van Siemens gaan uit van een 10x plasma verdunning. De FVIII, FIX en FXII worden standaard uitgevoerd in een 20x verdunning en de FXI in een 5x verdunning (kleinere verdunning). Conclusie is dat de FXI op de Sysmex extra gevoelig is voor dabigatran omdat de patiënt in 1 verdunning wordt gemeten. Daarbij is er ook sprake van een milde FXII deficiëntie, wat klinisch minder relevant is.

In Medlon Enschede worden de trombocyten aggregaties op de Sysmes CS gevalideerd, dit ter vervanging van de chronolog meters (Light transmission detection). De resultaten zien er goed uit.

Inleiding Thema 2025: vWF

Door: dr. Iris van Moort Head of diagnostic hemostasis laboratory

Beat The Bleed

Studying VWF secretie under flow using microfluids

Nadat Iris iedereen opgefrist had met een introductie over de werking en functie van Von Willebrand tijdens de hemostase, ging zij dieper in op de factor zelf. De VWF monomeren worden in het endoplasmatisch reticulum (ER) dimeren. Vervolgens gaan de dimeren naar het golgiapparaat waar het multimeren worden. Als multimeer ligt het VWF opgeslagen in de Weibel-Palade bodies. Tijdens de primaire hemostase komt VWF vrij uit de Weibel-Palade bodies. Hier zijn verschillende stimuli voor om dit proces in gang te zetten, een van deze is DDAVP.

De ziekte van Von Willebrand is de meest voorkomende bloedingsziekte, dit gaat vaak gepaard met slijmvlies bloedingen/blauwe plekken. De ziekte van Von Willebrand bestaat uit meerdere types, elk met een andere behandeling en oorzaak. Om de verschillende types te onderscheiden worden er meerdere goede diagnostische testen in gezet. Je zou zeggen dat er dan geen wolkje aan de lucht is.

Echter, er zijn meerdere uitdagingen. De ziekte van Von Willebrand heeft een grote onverklaarbare heterogeniteit, er zijn meer dan 750 mutaties en geen modellen welke dit kunnen verklaren.

Het Von Willebrand is in de endotheel cellen opgeslagen in Weibel-Palade bodies. Zou het zo kunnen zijn dat hier een verklaring zit voor het grote verschil in de bloedings fenotypen? Dit heeft Iris met o.a. Prof Wilbur Lam onderzocht. Het doel van de studie was om de VWF secretie te onderzoeken. Hierbij wordt er gebruik gemaakt van een 'vessel on a chip' model. Het protocol en de werking werden uitgelegd d.m.v. een filmpje. Endotheelcellen van patiënten of gezonde vrijwilligers werden geïsoleerd uit bloed en vervolgens op kweek gezet. Deze kunnen vervolgens in een vessel on a chip een endotheel laag, net als in een bloedvat, vormen. Door er vervolgens een flow doorheen te sturen kan een bloedvat nagebootst worden. De werking van het model werd aangetoond door gebruik te maken van een familie met een mutatie op p.C1190R welke type 2A veroorzaakt. In deze familie heeft de dochter een homozygote mutatie. Zij heeft een broer welke heterozygoot is, even als de moeder. In het plasma van de dochter ontbreken alle multimeren, terwijl moeder en zoon vooral minder HMW multimeren hebben. Ook is er nog gebruik gemaakt van een 4^{de} patiënt. Deze is geen familie en ook een mutatie heeft in het p.C1190 gen. Alleen niet de p.C1190R maar een p.C1190Y mutatie. Van zowel een gezonde vrijwilliger als de p.C1190R en p.C1190Y mutatie zijn de Weibel-Palade bodies aangekleurd en morfologisch bekeken. Hieruit bleek dat er de Weibel-Palade bodies rond en smaller zijn in de patiënten met de p.C1190R mutatie. Vervolgens is er gekeken naar het aantal multimeren in het supernatant en lysaat van de ongestimuleerde endothelial colony forming cells (ECFC's). Dit is gedaan van zowel de controle als de patiënten met de p.C1190R en p.C1190Y mutatie. Hieruit bleek dat er geen verschil zat in het supernatant, maar wel in het lysaat. Het lysaat van de patiënten met de mutaties bevatte meer LMW VWF dan de controle. Hetzelfde experiment werd herhaald alleen dan met gestimuleerde ECFC's. De conclusie is dat beide mutaties een secretie defect veroorzaken.

Vervolgens zijn de ECFC's van zowel een gezonde vrijwilliger als de patiënt met de p.C1190R mutatie geïsoleerd en opgekweekt in de vessel on a chip. De endotheelcellen werden gestimuleerd met histamine. Een antilichaam tegen VWF werd tevens onder flow door de chip gedaan en dit werd onder een microscoop bekeken gedurende 25 minuten. Hier was duidelijk zichtbaar dat er VWF secretie aanwezig was in de gezonde ECFC's en een heel stuk minder in de patiënt. Tevens moest er bij de patiënt ook langer gestimuleerd worden voordat er iets zichtbaar was.

Om het fenotypisch effect te onderzoeken werd er gebruik gemaakt van bleeding on a chip. Hierin werden ECFC's van een gezonde vrijwilliger gebruikt. Deze werden gekweekt in het model totdat er een mooie endotheel laag ontstond. Vervolgens werden er trombocyten door de chip gepompt. D.m.v. een filmpje konden we vervolgens het effect van een wondje zien. Er was duidelijk te zien dat er een stolsel gevormd werd.

Concluderend zouden vessel on a chip modellen een goede toevoeging zijn in de diagnostiek en research omdat er met de huidige testen niet goed gekeken wordt naar de werking van het endotheel.

Samenvattend is VWD een uitdagende ziekte en zouden vessel on a chip modellen in de toekomst een goede aanvulling zijn op de huidige diagnostiek omdat deze modellen net als in het bloedvat gebruik maken van een flow en ze inzicht geven in de fysiologische processen van VWF secretie.

Met zeer veel dank aan alle fantastische sprekers en enthousiaste deelnemers van de Werkgroep Hemostase Diagnostiek van de NVTH voor deze interessante, leerzame en leuke Themadag!

De volgende themadag is 20 maart 2025 in het Erasmus MC Rotterdam met als thema:

von Willebrand

