

Congenitale trombocytopathie: huidige diagnostiek en toekomstperspectief

Inherited platelet function disorders: current diagnostic strategy and future perspectives

drs. M.W. Blaauwgeers¹, MSc I. van Asten², dr. A. Huisman³, dr. R.T. Urbanus⁴ en dr. R.E.G. Schutgens⁵

Samenvatting

Congenitale trombocytopathie is een relatief zeldzame stoornis van de hemostase en wordt gekenmerkt door mucocutane bloedingen en nabloedingen na een operatie of bevalling. De prevalentie wordt mogelijk onderschat door onderdiagnostiek. Ernstige vormen van trombocytopathie kunnen meestal goed worden gediagnosticeerd met behulp van routinediagnostiek. Voor de milde vormen van trombocytopathie is de huidige diagnostiek vaak ontoereikend. In dit overzichtsartikel worden van de huidige diagnostische testen de voor- en nadelen besproken en worden alternatieven gegeven voor effectievere trombocytenfunctietesten in de toekomst.

(*Ned Tijdschr Hematol* 2016;13:332-40)

Summary

Inherited platelet function disorders (PFDs) are a relatively rare cause of symptomatic bleeding and are characterized by mucocutaneous bleeds and prolonged bleeding after surgery and childbirth. The prevalence is probably underestimated due to under-diagnosis. Severe PFDs are readily identified using routine diagnostic tests. For the diagnosis of mild platelet function disorders, the current diagnostic tests are often insufficient. In this review, we will discuss the advantages and disadvantages of the currently available diagnostic tests and we provide alternatives for more effective platelet function assays.

Inleiding

Trombocytopathie is een stoornis in de primaire hemostase, waarbij de functie van de aanwezige trombocyten verminderd is. Er kan sprake zijn van een gestoorde adhesie, activatie, secretie of aggregatie van de trombocyten (zie *Figuur 1*, pagina 333). De meest bekende vormen gaan gepaard met afwijkingen in receptoren op de celmembraan, maar ook defecten in transcriptiefactoren of het cytoskelet kunnen ten grondslag liggen aan de trombocytopathie.

De meest bekende congenitale trombocytopathieën zijn Bernard-Soulier-syndroom (BSS), Morbus Glanzmann en 'storage pool disease' (SPD) (zie *Figuur 2*, pagina 334).

BSS wordt veroorzaakt door een deficiëntie van het glycoproteïne-Ib/IX/V-complex, leidend tot een gestoorde adhesie van trombocyten aan vonwillebrandfactor. Bij M. Glanzmann is er sprake van een partiële of totale deficiëntie van de fibrinogeenreceptor $\alpha IIb\beta 3$, waardoor trombocyten onvoldoende in staat zijn om te aggregeren. Bij SPD is er een gebrek aan alfa- of dense granula of een stoornis in de secretie ervan. Voorbeelden zijn 'gray platelet'-syndroom (GPS) en Hermansky-Pudlak-syndroom (HPS). GPS wordt gekenmerkt door een deficiëntie van alfa-granula, waardoor trombocyten een grijze kleur hebben onder de microscoop. Bij HPS is er een gebrek aan dense granula en deze aandoening

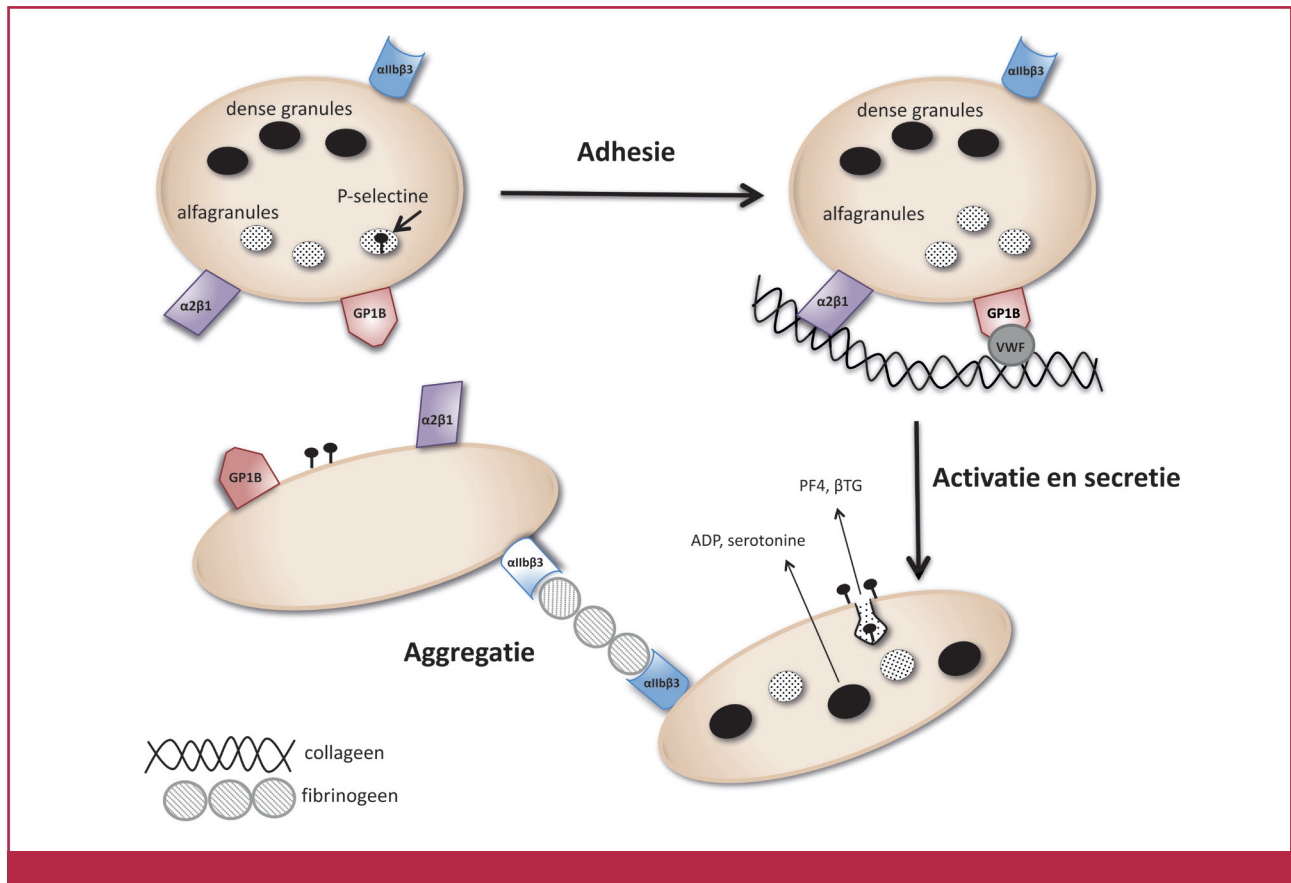
¹arts-onderzoeker, Van Crevelkliniek, UMC Utrecht, ²onderzoeker, Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie, UMC Utrecht, ³klinisch chemicus, Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie, UMC Utrecht, ⁴universitair docent, Laboratorium voor Klinische Chemie en Hematologie UMC Utrecht, ⁵hematoloog en epidemioloog, Van Crevelkliniek UMC Utrecht. Correspondentie graag richten aan mw. drs. M.W. Blaauwgeers, arts-onderzoeker, UMC Utrecht, Van Crevelkliniek, Huispost C01.425, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht, tel.: 088 75 584 50, e-mailadres: m.w.blaauwgeers@umcutrecht.nl

Belangenconflict: R.T. Urbanus heeft aandelen in een startupbedrijf dat trombocytenfunctietesten ontwikkelt (U-PACT).

Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: bloedingsneiging, diagnostiek, trombocytopathie

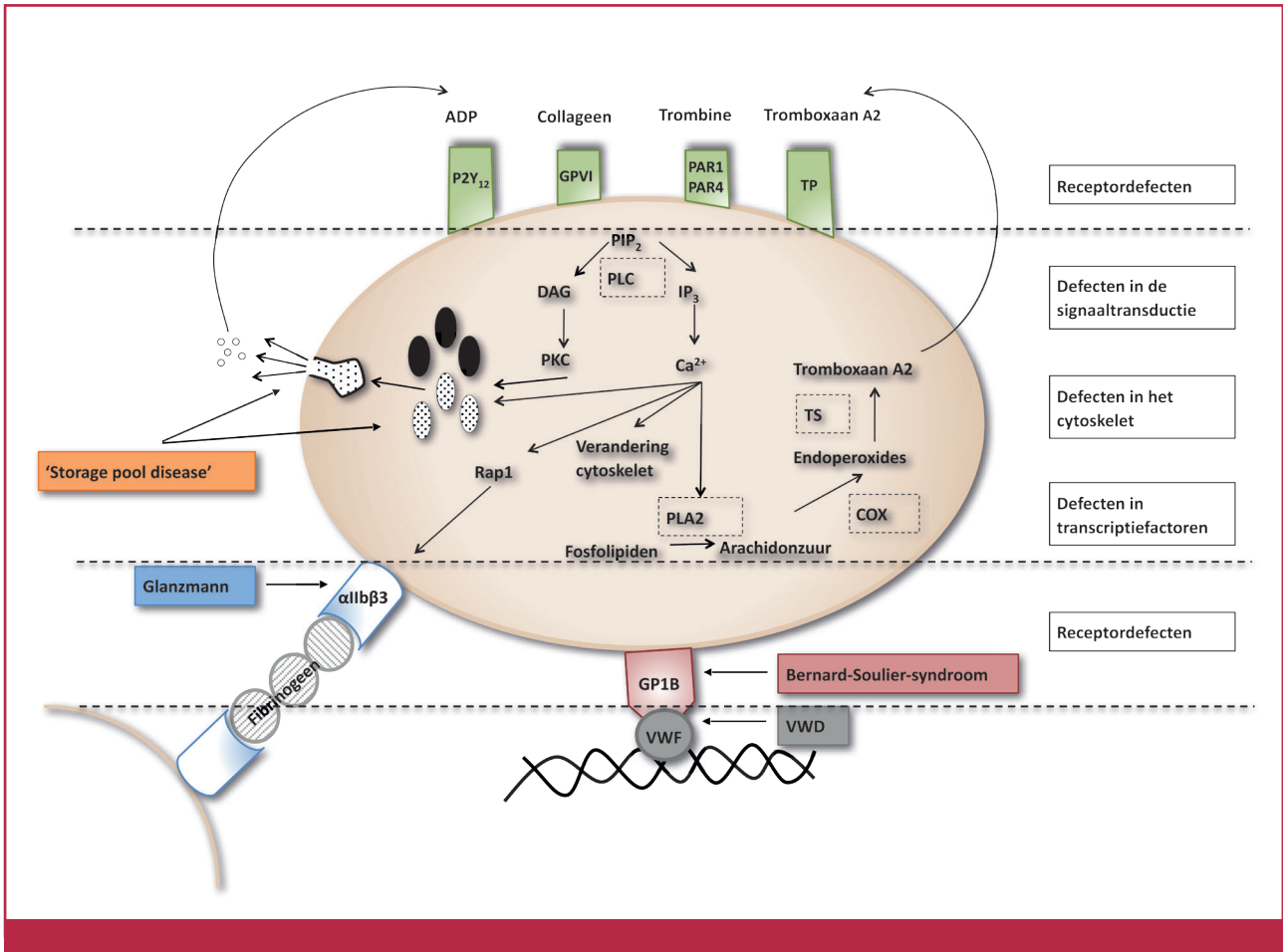
Keywords: bleeding tendency, diagnostic strategy, platelet function disorder



Figuur 1. Schematische weergave van de trombocytfunctie. Na beschadiging van de vaatwand vindt adhesie van trombocyten plaats aan vonwillebrandfactor (VWF) via de glycoproteïne-Ib/IX/V-receptor en aan collageen via de α 2 β 1-receptor. Hierdoor worden trombocyten geactiveerd, veranderen van vorm en scheiden de inhoud van de alfa- en dense granula uit. Deze granula bevatten stoffen zoals ADP en serotonine, die op hun beurt weer andere trombocyten activeren. Het aggregeren van trombocyten gebeurt met behulp van fibrinogeen via binding aan de glycoproteïne- α IIb β 3-receptor. Trombocyten kunnen worden geactiveerd door een verscheidenheid aan agonisten, waaronder collageen, ADP en trombine.

wordt gekenmerkt door een lage ADP-concentratie in trombocyten en de aanwezigheid van albinisme.¹ Trombocytopathie wordt, net als de ziekte van Von Willebrand (VWD), gekenmerkt door mucocutane bloedingen en nabloedingen na een operatie of bevalling. Congenitale trombocytopathie is zeldzaam, hoewel studies suggereren dat de prevalentie gelijk is aan die van VWD. Mogelijk wordt de prevalentie onderschat door onderdiagnostiek.² Hoewel de ernstige vormen van trombocytopathie vaak al vroeg worden gediagnosticeerd, worden de milde vormen pas op de volwassen leeftijd ontdekt, omdat de kans op bloedingen toeneemt met de leeftijd en milde vormen vaak pas klachten geven na een relatief grote belasting van het hemostase-systeem, zoals tijdens een operatie of bevalling.³ De huidige diagnostiek naar trombocytopathie bestaat uit een anamnese, gevolgd door screeningstesten en specifieke trombocytenfunctietesten. Met deze testen

worden met name de ernstige vormen van trombocytopathie (zoals M. Glanzmann) gediagnosticeerd. Voor de milde vormen van trombocytopathie is deze diagnostiek vaak ontoereikend.² Ook hier is een goede diagnose echter zeer belangrijk. Levensbedreigende of invaliderende bloedingen kunnen mogelijk worden voorkomen door goede informatieverstrekking aan de patiënt en tijdige behandeling. Denk bijvoorbeeld aan profylactische behandeling voorafgaand aan een operatie, waardoor de kans op ernstig bloedverlies afneemt. Daarnaast is een juiste diagnose van belang voor het instellen van de juiste behandeling en het voorkómen van onnodige en mogelijk schadelijke behandelingen ten gevolge van een verkeerde diagnose. In dit artikel geven wij een overzicht van de huidige diagnostische testen en hun beperkingen en beschrijven we mogelijk toekomstige aanvullende trombocytenfunctietesten.



Figuur 2. Schematische weergave van de verschillende vormen van trombocytopathie.

COX=cyclo-oxygenase, DAG=diacylglycerol, IP₃=inositoltrifosfaat, PIP₂=fosfatidylinositolbifosfaat, PLC=fosfolipase C, PKC=proteïnekinase C, TS=tromboxaansynthase, VWD=vonwillebrandziekte, VWF=vonwillebrandfactor.

Huidige diagnostiek

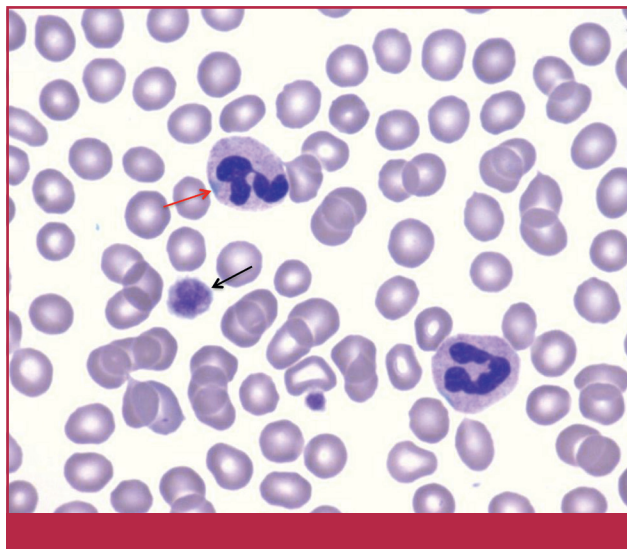
Anamnese: de ‘Bleeding Assessment Tool’

Om de bloedingssymptomen goed en systematisch in kaart te brengen, wordt geadviseerd om gebruik te maken van een vragenlijst, de ‘Bleeding Assessment Tool’ (BAT). Met deze BAT kunnen de ernst en de frequentie van de bloedingen worden uitgedrukt in een getal: de bloedingsscore. Een veelgebruikte score is de Tosetto-score.⁴ Deze score heeft een hoge negatief-voorspellende waarde (99,2%), waarbij een lage score (≤3) de aanwezigheid van VWD vrijwel volledig uitsluit. Een hoge bloedingsscore is een indicatie voor aanvullend laboratoriumonderzoek.⁵ Deze scorelijst is echter niet gevalideerd voor trombocytopathie. In 2010 is door de International Society for Thrombosis and Haemostasis de ISTH-BAT ontwikkeld, een vragenlijst die zowel voor VWD als trombocytopathie kan worden gebruikt.⁶ De normaalwaarden van deze BAT zijn gesteld op 3 of lager voor mannen en 5 of lager voor vrouwen.⁷

De BAT wordt op dit moment alleen gebruikt als screeningstool om te beoordelen of er aanvullend onderzoek moet worden verricht. Een hoge score helpt niet in de verdere specificering van de aandoening; er kan geen onderscheid worden gemaakt tussen VWD en trombocytopathie en tussen de verschillende vormen van trombocytopathie onderling.

Screeningstesten

Voordat specifieke trombocytenfunctietesten worden verricht, dienen trombocytopenie, VWD en een stoornis van de secundaire hemostase te worden uitgesloten. Met een volledig bloedbeeld kan het trombocytenaantal en het gemiddelde volume van de trombocyten (‘mean platelet volume’; MPV) worden bepaald. Bij een trombocytopenie kan de fractie ‘reticulated platelets’ (jonge trombocyten die nog een restant DNA bevatten) daarnaast een aanwijzing geven of er sprake is van een trombocytenaanmaakprobleem of van perifere destructie



Figuur 3. Bloeduitstrijk van MYH-9-gerelateerde ziekte met reuzentrombocyten (zwarte pijl) en lichaampjes van Döhle in de granulocyten (rode pijl).

van trombocyten.⁸ Daarnaast kunnen de overige beeldparameters aanwijzingen geven voor eventuele andere onderliggende pathologie (op beenmergniveau) die mede verklarend zou kunnen zijn. Een trombocytopenie sluit een trombocytopathie niet uit, aangezien enkele vormen van trombocytopathie gepaard gaan met (milde) trombocytopenie, zoals BSS en GPS.¹ Bij de diagnostische work-up van trombocytopenie heeft het de voorkeur om eveneens trombocytentesten te analyseren; de standaardfunctietesten kunnen echter vaak niet worden uitgevoerd bij een trombocytental $<100 \times 10^9/l$.

VWD dient te worden uitgesloten met de voorhanden zijnde testen, zoals bepaling van de hoeveelheid vWF-antigeen (vWF:Ag), de functionele vWF-activiteit (vWF:Rco, of vWF:Act) en FVIII-activiteit.^{9,10} De PT en APTT verschaffen informatie over stollingsfactoren en worden gebruikt om stoornissen van de secundaire hemostase uit te sluiten. Bij een hoge bloedingsscore, niet afwijkende VWD-testen en een normale PT en APTT is een bloedingneiging door trombocytopathie meer waarschijnlijk.¹¹

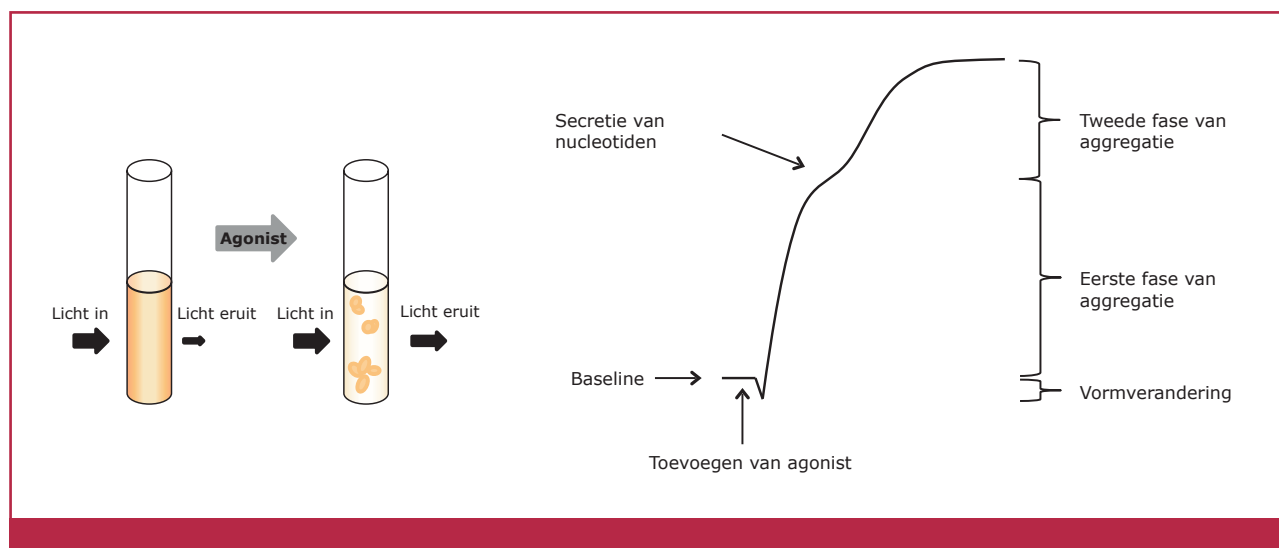
Een bloeduitstrijk wordt gebruikt om de morfologie van trombocyten te bestuderen (zie *Figuur 3*). Dit is met name van belang voor het opsporen van MYH-9-gerelateerde afwijkingen, GPS en pseudo-trombocytopenie door trombocytenuitputting.

Andere screeningstesten voor een primaire hemostasestoornis zijn de bloedingstijd en de 'Platelet Function Analyzer' (PFA-100). De bloedingstijd meet de tijd die

nodig is om het bloed tot stollen te brengen na een gestandaardiseerde snee in de arm.¹² Bij de PFA-100 wordt bloed ex vivo onder hoge snelheid door een opening in een filter dat is gecoat met verschillende trombocytenuitputters geperst, waarbij een trombus in deze opening ontstaat. De tijd totdat deze opening wordt afgesloten door de trombus wordt gemeten. Het filter kan met collageen en adrenaline of met collageen en ADP zijn gecoat.¹³ Beide testen hebben een beperkte sensitiviteit en specificiteit voor trombocytopathie en derhalve is de klinische relevantie van deze testen discutabel: een afwijkende bloedingstijd geeft geen richting aan de diagnose en een normale uitslag sluit een trombocytopathie niet uit.¹⁴ Met de introductie van een gestandaardiseerde BAT is de eerste screening voor het uitsluiten van een stoornis in de primaire hemostase al gedaan. Een aanvullende bloedingstijd of PFA-100 draagt hier ons inziens niet meer bij aan de diagnose.

Lichttransmissie- en lumiaggregometrie

Na het uitsluiten van VWD en een secundaire hemostasestoornis is de volgende stap de uitvoering van specifieke trombocytentesten. De meest gebruikte test is lichttransmissieaggregometrie (LTA). LTA meet de aggregatiecapaciteit van trombocyten na toevoeging van verschillende agonisten in verschillende concentraties. De lichtdoorlaatbaarheid van trombocytenrijk plasma wordt gemeten, waarna een agonist aan het plasma wordt toegevoegd, terwijl het plasma continu wordt geroerd. Hierdoor worden trombocyten geactiveerd. Wanneer trombocyten geactiveerd raken, veranderen ze van vorm. Deze vormverandering is te zien als een lichte afname in lichtdoorlaatbaarheid. Vervolgens vindt aggregatie plaats, waardoor de lichtdoorlaatbaarheid toeneemt. Deze lichtdoorlaatbaarheid wordt weergegeven in een curve (zie *Figuur 4*). Een gestoorde activatie of aggregatie leidt tot een afwijkende curve. De meest gebruikte agonisten zijn ADP, collageen, arachidonzuur en adrenaline. Een verschillend aantal agonisten is noodzakelijk om onderscheid te maken tussen bepaalde vormen van trombocytopathie. Met ristocetine wordt de trombocytenuitputting via vonwillebrandfactor bepaald, wat vooral van belang is voor de diagnostiek van BSS en VWD type 2B. Het grote voordeel van LTA is dat het vermogen van de trombocyten om te aggregeren na stimulatie van verschillende receptoren kan worden bestudeerd. Hierdoor geeft het de meeste richting aan de diagnostiek van trombocytopathie. LTA heeft echter een matige sensitiviteit (49%), waardoor milde vormen van trombocytopathie vaak niet worden onderkend.¹⁵ Daarnaast is



Figuur 4. Lichttransmissieaggregometrie. Toevoeging van de agonist leidt tot activatie en vormverandering van de trombocyten. De trombocyten spreiden, waardoor de lichtdoorlaatbaarheid in eerste instantie afneemt (vormverandering). Hierna aggregeren de trombocyten, waardoor de lichtdoorlaatbaarheid toeneemt (eerste fase van aggregatie). Het vrijkomen van onder andere ADP uit de dense granula zorgt voor een tweede activatie- en aggregatiegolf (tweede fase van aggregatie). De verschillende stadia van de activatie- en aggregatie worden weergegeven in een curve.

LTA slecht gestandaardiseerd, tijdrovend, niet uitvoerbaar bij trombocytopenie en vergt het een groot bloedvolume, waardoor trombocytenfunctiediagnostiek bij neonaten en kinderen vaak niet kan worden uitgevoerd.^{15,16} Een afwijkende LTA kan voorkomen bij SPD, waarbij de tweede aggregatiefase afwezig is. Een normale LTA sluit SPD echter niet uit. Kenmerkend voor SPD is een afwijkende ATP, maar met name ADP-concentratie.¹⁷ ADP- en ATP-concentratie kan worden bepaald in trombocytenlysaat. Hierbij wordt de hoeveelheid ATP in trombocytenlysaat gemeten met een luciferasereactie. Het ADP wordt vervolgens door middel van pyruvaatkinase omgezet in ATP, waarna opnieuw een luciferasereactie plaatsvindt. Het verschil tussen de eerste en de tweede luciferasereactie is de totale ADP-concentratie in trombocyten. Het bepalen van ADP en ATP in trombocytenlysaat geeft geen goed beeld van de daadwerkelijke secretie van trombocyten, maar zegt iets over de theoretische secretiecapaciteit.

SPD kan daarnaast worden bevestigd door middel van lumiaggregometrie, waarbij tegelijkertijd de aggregatie van trombocyten en de secretie van ATP wordt gemeten door toevoeging van luminol en luciferase aan het plasma. Er kan met lumiaggregometrie geen onderscheid worden gemaakt tussen een tekort aan granula of een defect in het uitscheidingsmechanisme ervan. Lumiaggregometrie heeft een hoge specificiteit (99%) en redelijk hoge sensitiviteit (78%) voor SPD.¹⁸

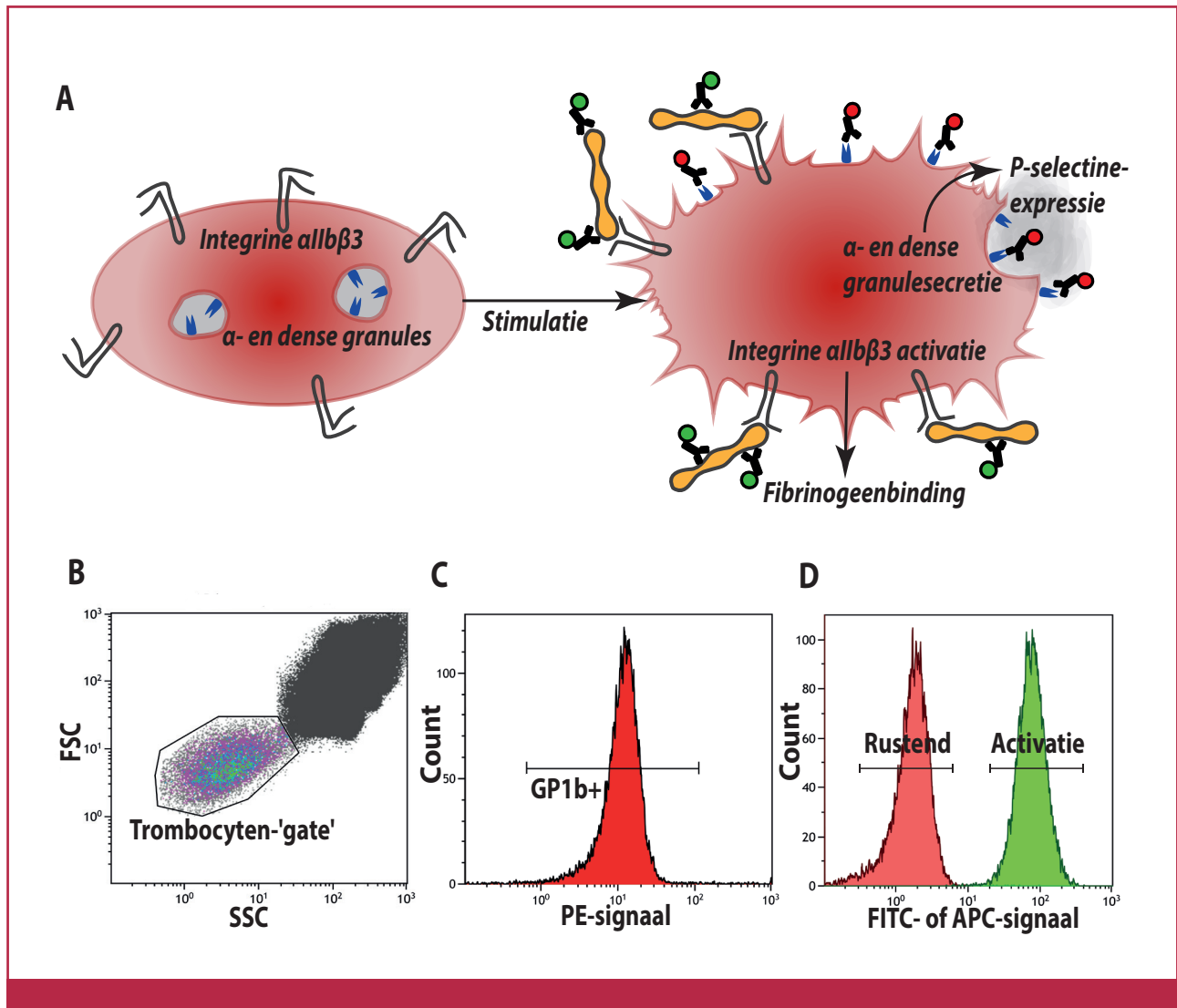
Bovengenoemde functietesten zijn vaak ontoereikend voor het diagnosticeren van een milde trombocytopathie. Uit onderzoek blijkt dat bij 50-60% van de patiënten met een hoge verdenking op trombocytopathie geen afwijkingen worden gevonden bij LTA.² In deze gevallen zullen additionele testen moeten worden verricht.

Aanvullende diagnostiek

De aanvullende diagnostiek voor functiestoornissen in de trombocyt bestaat uit verscheidene gevalideerde en experimentele technieken. Deze worden hieronder besproken.

Flowcytometrie

Flowcytometrie is een techniek voor het tellen en sorteren van cellen door middel van laserlicht. Bij flowcytometrie stroomt bloed door een smalle kamer, waardoor slechts 1 cel tegelijk de laser passeert. Het type, de grootte en de granulariteit van de cel die zich in de laserstraal bevindt, bepaalt de mate van verstrooiing van het licht. Hierdoor kunnen cellen worden gesorteerd op basis van hun morfologie. Met behulp van fluorescerende antilichamen kan de expressie van verschillende trombocytoreceptoren worden gekwantificeerd.¹⁹ Een groot voordeel van flowcytometrie is dat deze test slechts een kleine hoeveelheid bloed behoeft. Nadelen zijn de kosten van fluorescerende antilichamen en de beperkte beschikbaarheid van flowcytometers.



Figuur 5. ‘Platelet Activation Test’ (PACT). Trombocyten worden in volbloed gestimuleerd en zullen na activatie fibrinogeen binden en P-selectine tot expressie brengen. Met FITC-gelabelde antistoffen wordt de mate van fibrinogeenbinding gekwantificeerd en met APC-gelabelde antistoffen wordt de P-selectine-expressie gekwantificeerd (A). In de FACS worden trombocyten met behulp van de trombocyten-‘gate’ geselecteerd uit volbloed (B). Vervolgens worden de GP1b-positieve ‘events’ (C) geselecteerd om de mate van activatie te bepalen. Trombocytenactivatie resulteert in een rechtsverschuiving van zowel het FITC- als APC-sigitaal (D).

‘Platelet Activation Test’ (PACT)

Als aanvulling op de huidige trombocytenfunctiediagnostiek wordt in het UMC Utrecht een extra diagnostische test gebruikt: de ‘Platelet Activation Test’ (PACT). In de PACT worden trombocyten geactiveerd door het toevoegen van specifieke agonisten aan volbloed. Door middel van flowcytometrie wordt de P-selectine-expressie op de buitenmembraan van trombocyten en de fibrinogeenbinding aan membraan glycoproteïne- α IIb β 3 gekwantificeerd (zie *Figuur 5*). Door P-selectine-expressie te kwantificeren kan zowel de activatiestatus van de trombocyt als de secretie worden gemeten, terwijl de

mate van fibrinogeenbinding indicatief is voor zowel de activatie van de trombocyt als de aggregatiecapaciteit. De belangrijkste activatieroutes zijn de trombineactivatieroute via PAR-1 en PAR-4, de collageenactivatieroute via GPVI, de tromboxaan-A2-activatieroute via de tromboxaanreceptor TP en de ADP-activatieroute via P2Y₁₂. Al deze activatieroutes kunnen afzonderlijk worden onderzocht in 1 experiment.²⁰

Een groot voordeel van de PACT is de mogelijkheid om trombocytenfunctie te meten bij patiënten met trombocytopenie. Functionele testen bij trombocytopenie zijn essentieel aangezien trombocytopenie niet direct resul-

teert in een bloedingsfenotype. Met LTA is een concentratie van minimaal $100 \times 10^9/l$ trombocyten nodig voor betrouwbare analyse, terwijl met de PACT de trombocytenfunctie betrouwbaar kan worden gemeten tot $5 \times 10^9/l$ trombocyten.²¹ Daarnaast is er voor de PACT maximaal 200 μl bloed nodig, terwijl LTA minimaal 15 ml vraagt. Hierdoor is de PACT ook een aantrekkelijke test voor de diagnostiek bij neonaten en jonge kinderen. Momenteel wordt de PACT gevalideerd voor het gebruik in de diagnostiek naar trombocytopathie.²²

Elektronenmicroscopie

Met elektronenmicroscopie kunnen de grootte en morfologie van trombocyten alsmede de aanwezigheid van alfa- en dense granula in beeld worden gebracht. Hiermee kunnen bijvoorbeeld GPS en andere vormen van SPD worden gediagnosticeerd. De overeenstemming tussen experts is hoog.²³ Het gebruik van elektronenmicroscopie is echter erg duur en bovendien slechts zeer beperkt beschikbaar.

Perfusie

Met deze test kan de trombusvorming onder stromingscondities worden gemeten. Het geeft het vermogen weer van trombocyten om te aggregeren na perfusie over een glaasje dat is bedekt met collageen of andere coatings. De snelheid van adhesie en aggregatie alsmede het trombusvolume kan worden gemeten.²⁴ Adhesie-defecten, zoals een defect in de collageenreceptor $\alpha 2\beta 1$, kunnen met deze test goed in kaart worden gebracht.²⁵ Deze test wordt momenteel alleen gebruikt in experimentele setting.

'Proteomics' en massaspectrometrie

Het proteoom is de verzameling van alle eiwitten van een organisme of van een cel. Voor de analyse van het proteoom wordt doorgaans gebruikgemaakt van verschillende scheidingsmethoden om de eiwitten van elkaar te scheiden. Met behulp van massaspectrometrie kan identificatie en kwantificatie van de verschillende eiwitten plaatsvinden. Bij trombocytopathie kan massaspectrometrie worden gebruikt voor het ontrafelen van mogelijke defecten in de signaaltransductieroutes.²⁶ Deze techniek is echter nog niet gevalideerd voor routinematig gebruik in de diagnostiek naar trombocytopathie.

'Whole-exome sequencing'

Wanneer er met bovenstaande testen geen diagnose kan worden gesteld, kan worden geprobeerd het onderliggende genetische defect op te sporen. De genetische

defecten kunnen optreden in genen die betrokken zijn bij de megakaryocytontwikkeling, trombocytbouw of trombocytfunctie. Met behulp van 'whole-exome sequencing' (WES) wordt in 1 experiment het hele exoom geanalyseerd. Alle eiwitcoderende genen worden verrijkt uit het DNA, waarna de DNA-basevolgorde wordt bepaald met een sequencingsysteem. Het DNA wordt hierbij in kleine stukjes van bijvoorbeeld 2×100 basen ('reads') gelezen. Om mutaties op te sporen worden deze korte basevolgorden vervolgens geplaatst op hun positie in het humane referentiegenoom en vergeleken met deze sequentie.

Het grote voordeel van WES is dat in 1 experiment een grote hoeveelheid (kandidaat)genen kan worden onderzocht. Op deze manier zijn onder andere de onderliggende pathogene mutaties voor HPS en GPS geïdentificeerd.^{27,28} De grootste uitdaging is om de oorzakelijke mutatie, de mutatie die bijdraagt aan het klinische fenotype, te onderscheiden van andere aanwezige mutaties die geen invloed hebben op het fenotype. Door functionele testen en genetisch onderzoek te combineren, kan bij ongeveer 60% van de patiënten een functioneel defect worden aangetoond.²⁹ In het UMC Utrecht wordt routinematig DNA-onderzoek verricht. Hiervoor wordt gebruikgemaakt van WES met een geselecteerd panel aan genen.

Conclusie

Er is een verscheidenheid aan testen beschikbaar voor de diagnostiek naar trombocytopathie. De ernstige vormen van trombocytopathie kunnen hiermee goed en redelijk eenvoudig worden vastgesteld. De diagnostiek voor de milde vormen is met de huidige beschikbare testen vaak ontoereikend. Zelfs na uitgebreide diagnostiek is bij een aanzienlijk deel van de patiënten met een verdenking op trombocytopathie geen duidelijke diagnose te stellen. Enerzijds is dit te verklaren door de matige sensitiviteit van LTA en het feit dat veel van de huidige diagnostische testen slecht gestandaardiseerd, technisch ingewikkeld en slecht reproduceerbaar zijn. Anderzijds wordt de bloedingsneiging bij de milde vormen van trombocytopathie vaak veroorzaakt door een combinatie van meerdere geringe defecten in de trombocytenfunctie. Omdat bij LTA de verschillende signaaltransductieroutes afzonderlijk worden getest, worden deze geringe defecten vaak niet opgemerkt. 'Whole-exome sequencing' is veelbelovend, maar het blijft een grote uitdaging om de oorzakelijke mutatie te onderscheiden van andere aanwezige mutaties en een goede test naar trombocytenfunctie in combinatie met

Aanwijzingen voor de praktijk

- 1. Neem een goede bloedingsanamnese af met behulp van de ISTH-BAT. De normaalwaarden zijn 3 of lager voor mannen en 5 of lager voor vrouwen.**
- 2. De standaarddiagnostiek zou minimaal moeten bestaan uit screening voor de ziekte van Von Willebrand, een bloeduitstrijk, lichttransmissieaggregometrie en diagnostiek voor 'storage pool disease'.**
- 3. Indien op basis van deze testen geen diagnose kan worden gesteld en de verdenking op een trombocytopathie hoog is, kan verwijzing naar een gespecialiseerd centrum voor aanvullende testen (zoals hierboven beschreven) worden overwogen.**

WES is essentieel. Het gebruik van de PACT als aanvullende test lijkt veelbelovend; er zijn aanwijzingen voor een hogere sensitiviteit en specificiteit in vergelijking met de LTA. Daarnaast kan de PACT worden gebruikt bij patiënten met trombocytopenie. De PACT wordt momenteel gevalideerd voor het gebruik in de diagnostiek naar trombocytopathie.

'Trombocytopathie in Nederland'-studie

Ondanks dat er in toenemende mate onderzoek wordt gedaan naar trombocytopathie en er vernieuwingen plaatsvinden op het gebied van de diagnostiek, zijn de patiënten met trombocytopathie in Nederland niet goed in kaart gebracht. De Trombocytopathie in Nederland-studie is opgezet om meer inzicht te krijgen in de klinische verschijnselen en kwaliteit van leven van deze patiënten. Daarnaast onderzoeken we of de huidige diagnostiek kan worden verbeterd met aanvullende diagnostische testen zoals hierboven beschreven en pogen we een aantal van deze nieuwe testen te valideren. De TiN-studie is de eerste studie in Nederland die klinische gegevens combineert met functionele testen, massaspectrometrie en 'whole-exome sequencing', en genereert een uniek platform om meer inzicht te verkrijgen in deze ziekte. Met de uitkomsten van deze studie kan de zorg voor trombocytopathiepatiënten in Nederland worden verbeterd.

Referenties

1. Freson K, Wijgaerts A, Van Geet C. Update on the causes of platelet disorders and functional consequences. *Int J Lab Hematol* 2014;36(3):313-25.
2. Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br J Haematol* 2015;170(2):150-61.
3. Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO.

Br J Haematol 2006;135(5):603-33.

4. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Assessing bleeding in von Willebrand disease with bleeding score. *Blood Rev* 2007;21(2):89-97.
5. Tosetto A, Castaman G, Plug I, et al. Prospective evaluation of the clinical utility of quantitative bleeding severity assessment in patients referred for hemostatic evaluation. *J Thromb Haemost* 2011;9(6):1143-8.
6. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8(9):2063-5.
7. Elbatarny M, Mollah S, Grabell J, et al. Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the merging project. *Haemophilia* 2014;20(6):831-5.
8. Hoffmann JJ. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(8):1107-17.
9. Leebeek F. Diagnostiek en behandeling van de aangeboren en verworven vorm van de ziekte van von Willebrand. *Ned Tijdschr Hematol* 2004;1(1):8-16.
10. De Jong A, Eikenboom J. Developments in the diagnostic procedures for von Willebrand disease. *J Thromb Haemost* 2016;14(3):449-60.
11. Gresele P, Harrison P, Bury L, et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost* 2014;12(9):1562-9.
12. Burns ER, Lawrence C. Bleeding time. A guide to its diagnostic and clinical utility. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113(11):1219-24.
13. Akkerman J. Betekenis van de 'Platelet Function Analyzer-100®' in de dagelijkse diagnostiek. *Ned Tijdschr Hematol* 2006(3):133-7.
14. Cattaneo M. Are the bleeding time and PFA-100 useful in the initial screening of patients with mucocutaneous bleedings of hereditary nature? *J Thromb Haemost* 2004;2(6):890-1.
15. Hayward CP, Pai M, Liu Y, et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost* 2009;7(4):676-84.
16. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013, Apr 10 [Epub ahead of print].

17. Mumford AD, Frelinger Iii AL, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost* 2015; 114(20150416).
18. Pai M, Wang G, Moffat KA, et al. Diagnostic usefulness of a lumi-aggregometer adenosine triphosphate release assay for the assessment of platelet function disorders. *Am J Clin Pathol* 2011;136(3):350-8.
19. Pati HP, Jain S. Flow cytometry in hematological disorders. *Indian J Pediatr* 2013;80(9):772-8.
20. Van Bladel ER, Laarhoven AG, Van der Heijden LB, et al. Functional platelet defects in children with severe chronic ITP as tested with 2 novel assays applicable for low platelet counts. *Blood* 2014;123(10):1556-63.
21. Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 2005;123(2):172-83.
22. Van Asten IB, Zandstra J, Merx TH, et al. Diagnostic value of a flow cytometry based platelet function test compared with light transmission aggregometry in patients with unknown bleeding disorders. Abstract PP30. Presented at the 62nd Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, May 25-28 2016, Montpellier, France.
23. Clauser S, Cramer-Borde E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(2):213-23.
24. Roest M, Reininger A, Zwaginga JJ, et al. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *J Thromb Haemost* 2011;9(11):2322-4.
25. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, et al. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985;318(6045):470-2.
26. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF. Genomic and proteomic applications in diagnosis of platelet disorders and classification. *Semin Thromb Hemost* 2008;34(6):532-8.
27. Jones ML, Murden SL, Bem D, et al. Rapid genetic diagnosis of heritable platelet function disorders with next-generation sequencing: proof-of-principle with Hermansky-Pudlak syndrome. *J Thromb Haemost* 2012;10(2):306-9.
28. Albers CA, Cvejic A, Favier R, et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet* 2011;43(8):735-7.
29. Watson SP, Lowe GC, Lordkipanidze M, et al. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2013;11(Suppl 1):351-63.

Ontvangen 24 augustus 2016, geaccepteerd 24 oktober 2016.