

## Summary

Postma S, Elsenberg EHAM, Werkum JW van, Berg JM ten, Hackeng CM. Unresponsiveness to clopidogrel: To test or not to test? *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 265-270.

Dual antiplatelet therapy with the ADP-receptor antagonist clopidogrel and aspirin has proven to be an effective prophylactic treatment in cardiologic patients. However, after percutane-

ous coronary intervention (PCI) a small percentage of patients presents with thrombotic events. A logical target in the search for this phenomenon is unresponsiveness to clopidogrel. This paper describes the different definitions for non-responsiveness, as well as possible ways in which the clinical laboratory might be able to support the cardiologist in the prediction of adverse events. The consequences of this prediction might lead to a different and tailored prophylactic regimen.

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 270-272

## Bepaling van lupus-anticoagulans in Nederland: een inventarisatie

P. VERHEZEN en Y. M.C. HENSKENS\*

De bepaling van lupus-anticoagulans is complex. Enerzijds door de beschikbaarheid van veel verschillende laboratoriumtesten (en reagentia), anderzijds door de vele preanalytische- en analytische variabelen. Door gebruik te maken van internationale richtlijnen moet getracht worden om de bepaling te standaardiseren om zodoende een correcte diagnose te stellen. Uit een enquête (18 deelnemers) blijkt dat in Nederland ondanks de aanwezigheid van richtlijnen de lupus-anticoagulansbepaling nog zeer divers wordt uitgevoerd. Met name de preanalyse en het confirmeren van de op APTT of diluted-PT gebaseerde testen kunnen nog verbeterd worden.

*Trefwoorden:* lupus-anticoagulans; lupus-screeningstest; lupus-confirmatietest; preanalyse lupus-bepaling

LAC wordt gedefinieerd als antistoffen die in vitro interfereren met de binding van stollingsfactoren op een fosfolipidenoppervlak (1). Tijdens de preanalyse en de diagnostiek van LAC kunnen problemen optreden waardoor het lastig is om een correcte diagnose te stellen op basis van laboratoriumuitslagen (2). Een eenduidige test om LAC te diagnosticeren is nog niet ontwikkeld, waardoor het noodzakelijk is om meerdere testen te gebruiken.

Een onderdeel van de WHD ('Werkgroep Hemostase Diagnostiek')-themadag in 2008 was een inventarisatie van de door de deelnemers uitgevoerde stollingstesten voor de LAC-bepaling. Hiervoor werd een enquête samengesteld, die door 18 deelnemers werd ingevuld. Aangezien de bepaling van LAC een complexe test is en veel van de deelnemers de immunologische testen ( $\beta$ -2-glycoproteïne-I en anticardiolipine-antistoffen) op een ander laboratorium in hun instelling uitvoerden, was alleen de LAC-stolbepaling in de enquête opgenomen.

*Hematologisch Laboratorium, academisch ziekenhuis Maastricht*

\* Namens de NVTH Werkgroep Hemostase Diagnostiek (WHD)

## Enquête

Door de ISTH werden in 1995 richtlijnen vastgesteld voor het bepalen van LAC om te proberen een standaardisatie van de bepaling te verkrijgen (3). Deze richtlijnen dienden als rode draad in de enquête.

De meest belangrijke items uit deze richtlijn werden verwerkt tot vragen in de enquête.

De volgende vragen worden uitgewerkt in deze publicatie.

1. Welke specifieke preanalytische procedures worden door uw laboratorium voor LAC uitgevoerd?
2. Welk reagens of reagentia worden gebruikt voor de screening op LAC?
3. Gebruikt u mengproeven om aan te tonen of een eventueel verlengde screeningstest veroorzaakt wordt door een factordeficiëntie?
4. Welk reagens of reagentia worden gebruikt voor de confirmatie van een verlengde screeningstest (bevestiging van fosfolipidenafhankelijke antistoffen)?
5. Wordt de aanwezigheid van een factorspecifieke remmer uitgesloten bij een positieve confirmatietest?

## Resultaten

### Preanalyse

Voordat de LAC-analyse wordt uitgevoerd, zal het afgenomen volbloed verwerkt worden tot plaatjesarm plasma (PPP). Deze verwerking dient nauwkeurig te worden uitgevoerd. Indien het plasma niet plaatjesarm bereid wordt, bevat het nog fosfolipiden en bestaat de kans op vals-negatieve uitslagen in de screeningstest. Dit geldt ook voor vroegtijdige activatie van de trombocyten bijvoorbeeld door koude activatie (centrifugeren bij 4 °C). De oorzaak hiervoor ligt bij de fosfolipiden in de trombocyten die reageren met de, eventueel, in het plasma aanwezig lupus-antistoffen, waardoor deze antistoffen uit het plasma worden verwijderd tijdens de preanalyse. Om plaatjesarm plasma te verkrijgen wordt aanbevolen om bij voorkeur een dubbele centrifugestap (minimaal 2500 g gedurende

15 minuten) uit te voeren (4). Een andere optie is filtreren, dit heeft echter als nadeel dat de grotere eiwitten (VWF, factor VIII) (gedeeltelijk) verwijderd worden, waardoor het plasma alleen gebruikt kan worden voor de LAC-bepaling (5).

Uit de enquête bleek dat 12 deelnemers 2 centrifugestappen uitvoeren, 2 deelnemers filtreren en 4 deelnemers slechts 1 centrifugestap uitvoeren. Opmerkelijk is dat de gebruikte centrifuge-instellingen (duur en g-kracht) zeer variëren per ziekenhuislaboratorium. Daarnaast is het opmerkelijk dat 3 deelnemers aangeven bij 4 °C te centrifugeren, waardoor trombocyten-activatie kan optreden.

### Screening

De eerste analysestap in de LAC-diagnostiek is het screenen met behulp van een lupus-anticoagulans-gevoelige screeningstest, waarbij de internationale consensus aangeeft om minimaal 2 verschillende testen te gebruiken (3). Van de 18 deelnemers voeren 15 laboratoria 2 screeningstesten uit en 3 laboratoria voeren zelfs 3 screeningstesten uit. Aan het criterium van minimaal 2 screeningstesten wordt door alle deelnemers voldaan. Tabel 1 geeft een overzicht weer van de gebruikte reagentia. De reagentia zijn ingedeeld in 3 categorieën, nl. dRVVT-gebaseerd, APTT-gebaseerd en diluted-PT-gebaseerde testen. De kaoline- en silica-stollingstijden zijn i.v.m. ruimtebesparing opgenomen in de categorie APTT-based.

### Uitsluiten factordeficiëntie

Volgens de ISTH-richtlijn is de volgende belangrijke stap het uitvoeren van mengproeven om uit te sluiten

**Tabel 1.** Overzicht van de gebruikte reagentia voor de screening op lupus-anticoagulans (18 deelnemende ziekenhuislaboratoria in Nederland)

	aantal
<i>dRVVT</i>	
Gradipore	5
Life / diagnostics	2
Dade LA	7
Roche DRVVT	1
American Diagnostica	1
<b>Totaal</b>	<b>16</b>
<i>APTT</i>	
Roche PTTA	1
Roche PTTLA	8
Biomerieux APTT	1
Biomerieux platelin APTT	1
Actin FSL	2
Actin dAPTT	1
APTT KCT	1
SCT	1
<b>Totaal</b>	<b>16</b>
<i>dPT</i>	
Innovin	4
Nycoplastin	1
<b>Totaal</b>	<b>5</b>

Afkortingen: dRVVT = 'diluted Russell's viper venom time', APTT = 'activated partial thromboplastin time', dPT = 'diluted prothrombin time'.

of de gevonden verlenging van de screeningstest veroorzaakt wordt door een factordeficiëntie. Dit wordt door 16 deelnemers in hun dagelijkse praktijk uitgevoerd, echter 2 van deze 16 laboratoria voeren dit enkel uit indien de reguliere APTT verlengd is en niet bij een verlengde LAC-screeningstest.

### Confirmatie

Nadat uitgesloten is dat een factordeficiëntie de oorzaak is van de verlenging van de screeningstest, dient aangetoond te worden dat deze verlenging veroorzaakt wordt door fosfolipide-afhankelijke antistoffen (2, 6). In de enquête valt op, dat maar de helft van de deelnemers bij alle screeningstesten een bijbehorende confirmatietest uitvoert. (zie tabel 2).

Als de gegevens nader geanalyseerd worden, wordt duidelijk dat voor de dRVVT-testen door iedereen een confirmatietest wordt uitgevoerd, echter in de APTT-groep en de dPT-groep vindt niet altijd een confirmatie plaats (zie tabel 1 en 3). Een mogelijke oorzaak hiervan is dat de dRVVT-gebaseerde testen als complete

**Tabel 2.** Overzicht aantal uitgevoerde screeningstesten met bijbehorende aantal confirmatietesten (18 deelnemende ziekenhuislaboratoria in Nederland)

Screenings-testen	Deelnemers	Confirmatie-testen	Deelnemers
2	15	1	7
2	15	2	8
3	3	1	2
3	3	2	0
3	3	3	1

**Tabel 3.** Overzicht van de gebruikte reagentia voor de bevestiging (confirmatie) van lupus-anticoagulans (18 deelnemende ziekenhuislaboratoria in Nederland)

	aantal
<i>dRVVT</i>	
Gradipore	5
Life / diagnostics	2
Dade LA	7
Roche DRVVT	1
American Diagnostica	1
<b>Totaal</b>	<b>16</b>
<i>APTT</i>	
Diluted Roche PTTA	1
Roche Staclot	4
Diluted Biomerieux APTT	1
Biomerieux platelin APTT	1
Actin FS	2
Actin dAPTT + fosfolipiden	1
SCT	1
<b>Totaal</b>	<b>11</b>
<i>dPT</i>	
Innovin + fosfolipiden	2
Nycoplastin + fosfolipiden	1
<b>Totaal</b>	<b>3</b>

Afkortingen: dRVVT = 'diluted Russell's viper venom time', APTT = 'activated partial thromboplastin time', dPT = 'diluted prothrombin time'.

testkits worden aangeboden door de diverse firma's voor het bepalen van LAC. Deze kits bevatten zowel een screenings- als een confirmatiereagens. Voor de APTT-gebaseerde testen wordt een lupus-gevoelig APTT-reagens gekozen, er zijn echter maar weinig volledige APTT-gebaseerde LAC-testkits beschikbaar. Gebruikte alternatieven voor confirmatie in deze enquête waren een (ander) lupus-ongevoelig APTT-reagens of het toevoegen van fosfolipiden.

#### *Uitsluiten factorremmer*

De laatste stap in de ISTH-richtlijn is het uitsluiten van een mogelijke specifieke factorremmer. Dit wordt door slechts 6 deelnemers uitgevoerd. Echter 1 deelnemer bepaalt daadwerkelijk de factoren middels meerdere verdunningen ('multidilution'), de overige 5 deelnemers beoordelen aan de hand van andere uitslagen en klinische gegevens, of er sprake kan zijn van een mogelijke specifieke factorremmer. De overige 12 deelnemers bepalen geen aanwezigheid van een specifieke factorremmer.

#### **Conclusie**

Ondanks de aanwezigheid van internationale richtlijnen (ISTH) wordt de LAC-bepaling in Nederland nog zeer divers uitgevoerd. Alle deelnemende laboratoria gebruiken 2 screeningstesten voor het laboratoriumonderzoek naar LAC. Echter, het confirmeren van de op APTT- of dPT-gebaseerde lupus-testen kan nog verbeterd worden. Daarnaast wordt niet in alle laboratoria aandacht besteed aan het uitsluiten van een specifieke factorremmer. Ook de preanalyse vraagt nog de nodige aandacht voor standaardisatie.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 272-276

## **Casus stollingsonderzoek en externe kwaliteitsbewaking**

T. van den BESSELAAR<sup>1</sup> en A. CASTEL<sup>2</sup>

De Sectie Stolling van de SKML is in 2006 begonnen met het rondzenden van een casus. Tot nu toe zijn twee rondzendingen uitgewerkt. In de eerste casus was sprake van een sterk positief lupus-anticoagulans en in de tweede casus betrof het een factor-V-deficiëntie. Uit de resultaten is gebleken dat zowel deelnemers als organisatoren hiervan kunnen leren.

Traditionele externe kwaliteitsbewaking van stollingsbepalingen is beperkt tot de analytische juistheid en precisie. Er is hierbij eigenlijk vrijwel geen aandacht voor het pre- en postanalytische proces. De laborato-

*Afdeling Trombose en Hemostase/RELAC, LUMC, Leiden<sup>1</sup> en Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Ziekenhuis Bronovo, Den Haag<sup>2</sup>*

#### **Referenties**

1. Derksen R, Groot Ph de. Het antifosfolipidensyndroom. *Ned Tijdschr Hematol* 2008; 1: 16-21.
2. Tripodi A. Laboratory testing for Lupus Anticoagulants: A review of issues affecting results. *Clin Chem* 2007; 53: 1629-1635.
3. Brandt J, Triplett D, Alving B, et al. On behalf of the Subcommittee on lupus Anticoagulant / Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-1190.
4. Triplett D. Lupus Anticoagulant: Laboratory techniques in thrombosis a manual, 2<sup>nd</sup> revised edition of ECAT assay procedures 1999.
5. Favaloro E. Preanalytical variables in coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinol* 2007; 18: 86-89.
6. Derksen R, Groot Ph de. Test for lupus anticoagulant revisited. *Trombosis Res* 2004; 114: 521- 526.

#### **Summary**

*Verhezen P, Henskens YMC. Determination of lupus anticoagulant in the Netherlands: an inventarisation. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 270-272.

The analysis of lupus anticoagulant is complex. On the one hand very many assays (and reagents) are available, on the other hand many pre-analytical and analytical variables are present which make a correct diagnosis difficult. By using international guidelines, standardization of the analysis should be possible. From the results of a survey (18 participants) we conclude that, despite the availability of international guidelines, the analysis of lupus anticoagulant is performed very diversely in The Netherlands. Especially, the pre-analysis and the confirmation of the APTT and diluted-PT based lupus assays can be improved.

*Keywords: Lupus anticoagulant; lupus screening test; lupus confirmation test; pre-analysis lupus assay*

riumbeneeskunde is echter breder dan alleen de analyse van het testmonster. Wezenlijke onderdelen van het vak zijn de indicatie tot en de interpretatie van laboratoriumonderzoek. Om ook deze onderdelen in de externe kwaliteitsbewaking te betrekken heeft het bestuur van de Sectie Stolling van de SKML besloten om regelmatig een casus aan te bieden aan alle deelnemers van de Sectie.

Bij iedere casusbeschrijving is een bijbehorend gevriesdroomd plasmamonster gevoegd. De deelnemers kunnen het monster analyseren met de laboratoriummethoden die zij goed dunksen om de vraagstelling te beantwoorden.

Na ontvangst van de ingevulde formulieren van de deelnemers, maakt een commissie van de Sectie Stolling een verslag van en een commentaar op de resultaten