

8. Spalding GJ, Hartrumpf M, Sierig T, Oesberg N, Kirschke CG, Albes JM. Cost reduction of perioperative coagulation management in cardiac surgery: value of 'bedside' thrombelastography (ROTEM). *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 31: 1052-1057.
9. McCrath DJ, Cerboni E, Frumento RJ, Hirsh AL, Bennett-Guerrero E. Thromboelastography maximum amplitude predicts postoperative thrombotic complications including myocardial infarction. *Anesth Analg* 2005; 100: 1576-1583.
10. Sorensen B, Ingerslev J. Tailoring haemostatic treatment to patient requirements - an update on monitoring haemostatic response using thrombelastography. *Haemophilia* 2005; 11: 1-6.
11. Sorensen B, Johansen P, Christiansen K, Woelke M, Ingerslev J. Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. *J Thromb Haemost* 2002; 1: 551-558.
12. Rawley JTB. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 95-101.
13. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 249-253.
14. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test. The application in Haemophilia and Thrombocytopenia. *J Clin Pathol* 1953; 6: 3-8.
15. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 219-226.
16. Hemker HC, Wienders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 1993; 70: 617-624.
17. Hemker HC, Giesen P, Dieri RA, Regnault V, Smet E de, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 4-15.
18. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation test, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006; 96: 553-561.
19. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol* 2005; 130: 653-661.
20. Aledort LM. Why thrombin Generation? From bench to bedside. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 2-3.
21. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, Oerle R van, Hamulyák K, Cate H ten, Rosing J. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 125-131.
22. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost* 2008; 99: 767-773.
23. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elamlamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thromboscope assay. *Thrombosis J* 2005; 3: 16.
24. Ofuso FA. Review: Laboratory markers quantifying prothrombin activation and actions of thrombin in venous and arterial thrombosis do not accurately assess disease severity or the effectiveness of treatment. *Thromb Haemost* 2006; 96: 586-577.

Summary

Stroobants AK, Oerle R van, Berends F, Sturk A, Spronk H, Henskens YMC. Old techniques newly fashioned. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 260-265.

Here, two old tests are presented that gain a new interest: thromboelastography and the thrombin generation test. The use of both tests for the investigation of the coagulation status of a patient seems promising, but the use of these techniques in daily practice remains dependent on proper standardisation of the (pre-)analysis and the results of well-diagnosed prospective studies.

Keywords: thromboelastography; thromboelastometry; thrombin generation test

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 265-270

Clpidogrel-ongevoeligheid: to test or not to test?

S. POSTMA, E.H.A.M. ELSEMBERG, J.W. van WERKUM, J.M. ten BERG en C.M. HACKENG

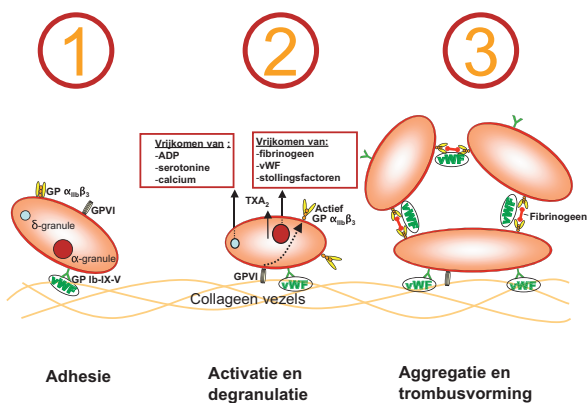
Duale anti-plaatjetherapie met de ADP-receptor-antagonist clopidogrel en aspirine is een bewezen effectieve profylaxe bij cardiologische patiënten. Echter, na percutane coronaire interventie (PCI) presenteert een klein percentage patiënten met trombotische complicaties. Een logisch target voor het zoeken naar mogelijke oorzaken is de ongevoeligheid van de patiënt voor clopidogrel. Dit artikel beschrijft hoe we deze ongevoeligheid kunnen definiëren, en op welke wijze het klinisch-chemisch laboratorium de cardioloog in de toekomst mogelijk zou kunnen ondersteunen bij het voorspellen van negatieve klinische uitkomsten.

Klinisch Chemisch Laboratorium, St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein en Mesos Medisch Centrum, Utrecht

E-mail: c.hackeng@antoniushuis.nl

De gevolgen van deze voorspelling zouden een alternatief antistollingsregime voor de patiënt kunnen betekenen.

Bloedplaatjes spelen een essentiële rol bij het ontstaan van het acuut coronair syndroom (ACS) (1). Wanneer de arteriële vaatwand beschadigd raakt (door een ruptuur van een atherosclerotische plaque of coronaire-stentplaatsing), komen de bloedplaatjes in contact met bestanddelen van de subendotheliale lagen van de vaatwand (bindweefselmatrix met o.a. collageen, weefselfactor, vonwillebrandfactor). Hierdoor worden ze geactiveerd zodat er een trombus ('platelet plug') ontstaat die het bloedvat kan afsluiten. Bij de totstandkoming van een arteriële trombus worden drie fases onderscheiden: adhesie, activatie, aggregatie (figuur 1). De standaardantitrombotische therapie rondom een



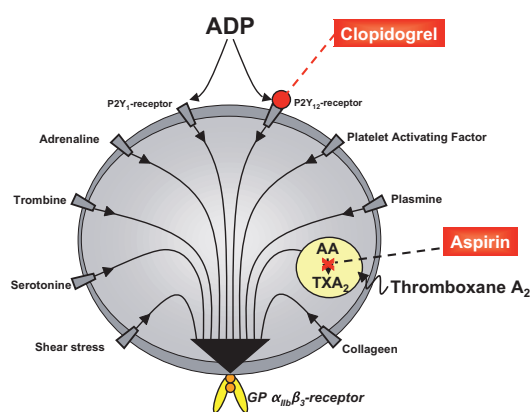
Figuur 1. Als initiële respons op vaatwandschade hechten de bloedplaatjes aan het beschadigde gedeelte van de vaatwand (adhesie) waarna ze worden geactiveerd via verschillende receptoren. Dit leidt tot productie en secretie van verschillende mediators (ADP, tromboxaan A₂, serotonine) waardoor naburige trombocyten ook gestimuleerd zullen worden. Primair eindpunt van deze cascade is activatie van glycoproteïne IIb-IIIa (GP IIb-IIIa, integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$) en binding van fibrinogeen waardoor een plaatjesaggregaat ontstaat.

percutane coronaire interventie (PCI) met stentplaatsing bestaat heden ten dage uit aspirine, clopidogrel en heparine (2, 3). Voor de lange termijn worden aspirine en clopidogrel als secundaire preventie toegepast om het risico op cardiovasculaire gebeurtenissen te reduceren (figuur 2).

Ondanks de aanzienlijke reductie in cardiovasculaire gebeurtenissen die de ADP-receptorantagonist clopidogrel 'on top of' aspirine teweeg brengt, heeft een bepaalde groep van patiënten een verhoogd risico op het krijgen van trombotische gebeurtenissen (4). Ondanks het feit dat de arteriële tromboseneiging een multifactorieel proces is, lijkt het optimaliseren van de plaatjesaggregatieremming in deze groep van patiënten van groot belang. De recent gepubliceerde 'TRial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel' (TRITON-studie) levert de 'proof of principle' voor deze strategie (5).

Diverse recent gepubliceerde studies hebben aangetoond dat er een grote mate van variatie in de respons op het geneesmiddel clopidogrel bestaat (4-7). En, belangrijker nog, een verminderde respons (en/of een hogere 'post-treatment'-aggregatie) is geassocieerd met het frequenter optreden van atherotrombotische 'events' na een geslaagde PCI-procedure (8-10).

De laatste jaren is er een scala aan nieuwe bloedplaatjesfunctietesten op de markt verschenen om de effecten van bloedplaatjesaggregatieremmende therapie te meten. Sommige van deze testen (o.a. de VerifyNow®-test en de Plateletworks™-assay) vereisen minimale monstervoorbehandeling en zijn eenvoudig te bedienen ('point-of-care') waardoor ze geschikt lijken voor gebruik buiten het klinisch-chemisch laboratorium. Echter, voorzichtigheid is hierbij geboden omdat tot op heden in de medische literatuur weinig informatie te vinden is over de reproduceerbaarheid van deze testen. Bovendien heeft een verminderde respons op clopidogreltherapie weliswaar een prognostische betekenis, maar zolang er geen bewijs bestaat dat het aan-



Figuur 2. Plaatjesactivatoren en aangrijpingspunten van de verschillende soorten trombocytenaggregatieremmende therapie.

passen van de antitrombotische medicatie op basis van de resultaten van deze bloedplaatjesfunctietesten ook daadwerkelijk tot betere uitkomsten leidt, is er nog geen reden om routinematig de bloedplaatjesfunctie te meten.

Is 'clopidogrelresistentie' wel de meest geschikte term?

Het aantal artikelen met als onderwerp 'aspirineresistentie' en 'clopidogrelresistentie' is in de afgelopen drie jaar exponentieel toegenomen. Desondanks is het begrip 'resistentie' in deze context niet erg gelukkig gekozen. In het algemeen wordt er over geneesmiddel 'resistentie' gesproken als een geneesmiddel niet in staat blijkt te zijn om zijn farmacologische substraat te bereiken (11). Voor de prodrug clopidogrel betekent dit dat de actieve metaboliet van clopidogrel (die moet worden gevormd in de lever) de P2Y₁₂-receptor niet kan bereiken of daaraan niet kan binden. De volgende oorzaken kunnen hieraan ten grondslag liggen: 1) malabsorptie van clopidogrel in het gastro-intestinale stelsel, 2) een omzettingsprobleem in de lever waardoor de prodrug niet kan worden omgezet in de actieve metaboliet, 3) in-vivo-inactivatie van de actieve metaboliet en 4) veranderingen binnen de P2Y₁₂-receptor waardoor de actieve metaboliet niet of verminderd kan binden (12).

Uit diverse onderzoeken is echter onlangs gebleken dat er met de huidige standaarddosering clopidogrel (75 mg/dag) een zeer grote interindividuele variabiliteit wordt waargenomen. Bij slechts een enkeling (<1%) is er echt sprake van ware 'resistentie' terwijl bij de overgrote meerderheid van de patiënten eerder sprake is van een standaardnormale spreiding (Gauss-distributie) (4, 13). Om deze reden is de term 'clopidogrelresistentie' vervangen door twee andere, Engelse termen (11, 14) die zeker een nadere toelichting behoeven (figuur 3).

On-treatment platelet reactivity

Dit is de absolute mate van bloedplaatjesreactiviteit die blijft bestaan na behandeling met clopidogrel. Het is belangrijk om hier te vermelden dat er slechts 1 meting (met de geschikte test) noodzakelijk is om deze parameter te verkrijgen. Ook in de 'on-treatment platelet reactivity' blijkt een grote interindividuele spreiding

te bestaan en recent onderzoek heeft aangetoond dat patiënten met een relatief hoge baseline ('off-drug')-intrinsieke-trombocytenreactiviteit ook een hogere 'on-treatment platelet reactivity' laten zien. Bovendien blijkt een hoge 'on-treatment platelet reactivity' de beste voorspeller te zijn voor toekomstige atherotrombotische 'events' (8).

Clodidogrel-'responsiveness'

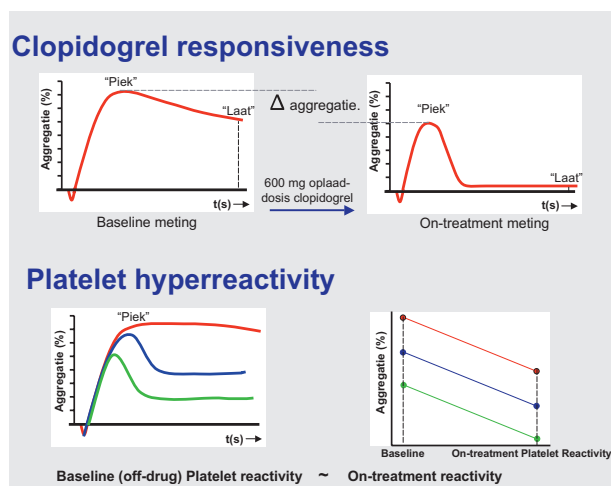
Deze term wordt gedefinieerd als het absolute verschil tussen een clodidogrel-naïeve baselinemeting van de bloedplaatjesreactiviteit en een meting van de 'on-treatment platelet reactivity' nadat de clodidogrel-therapie haar maximale effect bereikt heeft (bij een oplaaddosis van 300 mg of 600 mg clodidogrel is dit maximale effect respectievelijk 24 uur en 6 uur na toediening bereikt) (15). Er zijn dus 2 metingen noodzakelijk om deze parameter te kunnen bepalen. Clodidogrel-'responsiveness' lijkt ook een voorspeller voor toekomstige atherotrombotische events, zij het minder uitgesproken dan 'on-treatment platelet reactivity'.

De verschillende beschikbare methoden om het effect van clodidogrel op bloedplaatjesfunctie te meten

Verschillende methoden zijn heden ten dage beschikbaar om het effect van clodidogrel op de bloedplaatjesfunctie te meten (16).

Lichttransmissie-aggregometrie

Lichttransmissie-aggregometrie (LTA) wordt al decennia lang beschouwd als de 'gouden standaard'-methode voor het meten van de bloedplaatjesfunctie. Voor het uitvoeren van de methode worden buizen volbloed met 3,2% citraat gecentrifugeerd op lage snelheid (200 g) gedurende 10 minuten om bloedplaatjesrijk plasma (PRP) te verkrijgen. Vervolgens worden de buizen na afpitteren van het PRP, nogmaals 15 minuten afge-



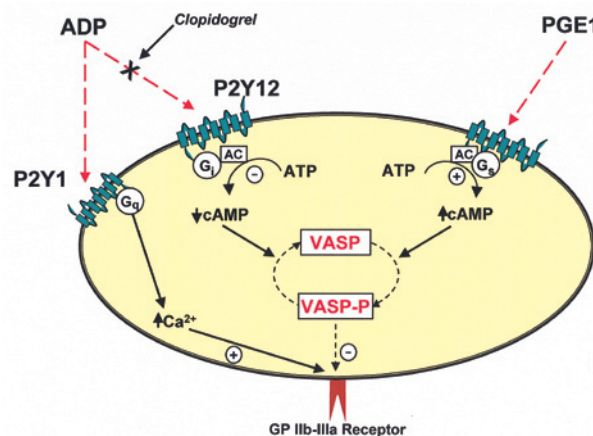
Figuur 3. De agonist adenosinedifosfaat (ADP) activeert de P2Y1-receptor en de P2Y12-receptor. Activatie van de P2Y1-receptor speelt een rol bij de initiatie van de bloedplaatjesaggregatievorming. Deze reactie komt tot uiting als 'piek' aggregatie bij de lichttransmissie-aggregatie (LTA). Activatie van de P2Y12-receptor resulteert in de vorming van een stabiel bloedplaatjesaggregaat. Deze reactie is te zien als 'late' aggregatie bij de LTA. ADP: adenosinedifosfaat; LTA: lichttransmissie-aggregatie.

draaid op hoge snelheid (3000 g) om bloedplaatjes-armplasma (PPP) te verkrijgen.

Om de aggregatie van de bloedplaatjes te meten wordt een aggregometer gebruikt, welke gebaseerd is op lichttransmissie. Hierbij wordt de lichttransmissie van een sample met PPP geijkt op 100% aggregatie en die van samples met PRP op 0% aggregatie.

Om het effect van clodidogrel te meten wordt adenosinedifosfaat (ADP) als agonist gebruikt. Na toevoeging van ADP vindt er aggregaatvorming van bloedplaatjes plaats, wat een verandering van lichttransmissie door de cuvet tot gevolg heeft.

In de literatuur is er momenteel een discussie gaande over het interpreteren van de resultaten van de ADP-geïnduceerde aggregatie bij patiënten die behandeld zijn met clodidogrel. Sommige onderzoekers beweren dat het effect van clodidogreltherapie het beste tot uiting komt in de late (reversibele) aggregatiewaarden (17) (figuur 3), terwijl anderen stellen dat het niet uitmaakt welke van de twee parameters (piek- of late aggregatie) wordt gekozen (18). Bij de totstandkoming van de piekaggregatie zijn hoofdzakelijk twee ADP-receptoren gelijktijdig betrokken: de P2Y1-receptor (initiatie van aggregatie) en de P2Y12-receptor (stabilisatie van aggregatie) (figuur 3). Echter, voor het verdere verloop van de 'late' aggregatiecurve (de stabilisatiefase) is de P2Y12-receptor grotendeels verantwoordelijk.



Figuur 4. Adenosinedifosfaat (ADP) activeert de P2Y1-receptor en de P2Y12-receptor. Als de P2Y1-receptor wordt geactiveerd dan stijgt de concentratie calcium in het cytoplasma van het bloedplaatje en wordt de glycoproteïne(GP)-IIb-IIIa-receptor geactiveerd. Activatie van de P2Y12-receptor resulteert in een verlaging van de concentratie cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP) in het cytoplasma van het bloedplaatje en dit heeft defosforilering van 'vasodilator stimulated phosphoprotein' (VASP) tot gevolg. Defosforylering van VASP leidt tot activatie van de GP-IIb-IIIa-receptor.

Clodidogrel blokkeert de binding van ADP aan de P2Y12-receptor, waardoor de concentratie cAMP stijgt. Er vindt fosforylering plaats van VASP, waardoor de GP-IIb-IIIa-receptor wordt geblokkeerd.

Prostaglandine E1 (PGE1) heeft ook een stijging van de concentratie cAMP tot gevolg, wat uiteindelijk leidt tot deactivatie van de GP-IIb-IIIa-receptor.

AC: adenylaatcyclase; ADP: adenosinedifosfaat; ATP: adenosinetrifosfaat; cAMP: cyclisch adenosinemonofosfaat; GP: glycoproteïne; PGE1: prostaglandine E1; VASP: 'vasodilator stimulated phosphoprotein'.

VASP-fosforylering

Het 'vasodilator stimulated phosphoprotein' (VASP) is een actine-regulerend eiwit dat zich bevindt in het cytoplasma van de bloedplaatjes. Bij activatie van de P2Y₁₂-receptor door ADP wordt de productie van cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP) onderdrukt waardoor het VASP-eiwit wordt gedefosforyleerd en vervolgens de GPIIb-IIIa-receptor geactiveerd wordt (figuur 4). De P2Y₁₂-receptorantagonist clopidogrel zorgt voor blokkade van de P2Y₁₂-receptor waardoor de intrinsieke fosforylering van VASP (VASP-P) niet geantagoneerd wordt en GPIIb-IIIa in rustende status blijft. De fosforyleringsstatus van VASP is daarom een P2Y₁₂-receptorspecifieke methode om een indicatie te geven over de respons van patiënten die behandeld zijn met clopidogrel. Deze methode wordt dan ook gezien als de nieuwe en biochemische 'gouden standaard' om clopidogrelrespons te meten (19, 20).

VASP-P wordt gemeten met een flowcytometrische methode (een commerciële assay van de firma Bio-Cytex, Marseille, France), welke is afgeleid van de methode die is beschreven door Schwarz et al. (21). Middels PGE₁-gemedieerde cAMP-verhoging wordt de maximale VASP-P bereikt. In een tweede, onafhankelijk monster wordt geanalyseerd in hoeverre ADP de VASP-P door PGE₁ kan antagoneren.

Na incubatie van 3,2%-citraat-volbloed van de twee monsters met óf PGE, óf PGE₁ + ADP, worden de bloedplaatjes gefixeerd met paraformaldehyde en gepermeabiliseerd met Triton X-100. Vervolgens vindt incubatie plaats met antilichamen gericht tegen VASP-P (FITC) en CD61 (bloedplaatjesidentificatie). Tot slot wordt het gemiddelde van de fluorescentie-intensiteit (MFI) van de samples bepaald met de flowcytometer, waarmee de 'platelet reactivity index' (PRI) kan worden vastgesteld volgens de volgende formule:

$$\text{PRI} (\%) = [\text{MFI}_{\text{c(PGE}_1\text{)}} - \text{MFI}_{\text{c(PGE}_1\text{} + \text{ADP})}) / \text{MFI}_{\text{c(PGE}_1\text{)}}] \times 100$$

Een PRI van 100 % betekent dat ADP de VASP-P volledig kan onderdrukken en er een inadequate respons op clopidogrel is. Een PRI van 0 % impliceert een optimale respons op clopidogrel.

Nadelen van de flowcytometrische VASP-assay zijn de arbeidsintensiviteit en de lange tijdsduur.

De VerifyNow P2Y₁₂-assay

De recent geïntroduceerde VerifyNow P2Y₁₂-assay (Accumetrics, San Diego, VS) is de snelste en enige echte 'point-of-care'-test die momenteel beschikbaar is om clopidogreltherapie te monitoren. De VerifyNow-methode hanteert hetzelfde principe als LTA, namelijk de mate van aggregatie wordt gemeten als verandering van lichttransmissie door een monster. Het VerifyNow-systeem maakt daarbij echter gebruik van infrarood licht met als voordeel dat volbloed gebruikt kan worden. De P2Y₁₂-cartridge bestaat uit een kamertje met daarin: 1) minuscuul kleine plastic bolletjes die gecoat zijn met fibrinogeen, 2) ADP (in een eindconcentratie van 20 μmol/l) en 3) PGE₁ (in een eindconcentratie van 22 nmol/l). Vóór het gebruik wordt de cartridge in het instrument gestoken en de software van het instrument herkent automatisch de cartridge. Vervolgens kan een citraatbuis van de merken BD[®] of Vacuette[®]

in de cartridge worden gestoken. Het volbloed stroomt dan in het kamertje en vermengt zich met de plastic bolletjes en de agonisten. Indien de bloedplaatjes van de betreffende patiënt onvoldoende worden geremd door de clopidogrel, dan is de aanwezige ADP in staat om de bloedplaatjes te activeren. De geactiveerde bloedplaatjes binden vervolgens aan de balletjes met fibrinogeencoating en de gevormde complexen vallen naar beneden. De infrarode lichtstraal door het kamertje neemt daardoor in intensiteit toe en dit wordt vertaald naar een bepaalde mate van aggregatie.

Recent onderzoek heeft laten zien dat de resultaten van de VerifyNow P2Y₁₂-cartridge goed overeenkomen met de resultaten die worden verkregen met 'klassieke' lichttransmissie-aggregatie. Een nadeel van de VerifyNow P2Y₁₂ blijft echter de relatief hoge prijs per cartridge (7).

De Plateletworks-assay

Het principe van de Plateletworks-methode (Helena Laboratories, Beaumont, VS) is gebaseerd op het tellen van de individuele bloedplaatjes voor en na het blootstelling aan een specifieke stimulus. Om de effecten van clopidogreltherapie te meten wordt het aantal niet-geaggregeerde bloedplaatjes in volbloed gemeten m.b.v. een routinecellcounter, vóór en na toevoeging van ADP (20 μmol/l ADP). Indien de bloedplaatjes van de betreffende patiënt onvoldoende worden geremd door clopidogrel, dan zal door toedoen van ADP aggregaatvorming plaatsvinden wat ervoor zorgt dat het aantal vrije bloedplaatjes daalt. Door het aantal bloedplaatjes gemeten na ADP-stimulatie te vergelijken met een K₃-EDTA-controlemonster (zonder ADP-prestimulatie), kan de inhibitie van de aggregatie berekend worden.

Een nadeel van de Plateletworks-methode is dat het ADP-gestimuleerde bloed binnen 15 minuten gemeten moet worden. Na deze periode dissociëren de gevormde aggregaten weer, wat zorgt voor een overschatting van het inhibitoire effect (Van Werkum, niet gepubliceerde data).

Discussie

Het vraagstuk van clopidogrelongevoeligheid is een veelbesproken maar nog steeds onbeantwoord probleem. In de afgelopen paar jaren zijn diverse bloedplaatjesfunctietesten op de markt verschenen die alle tenminste enige sensitiviteit voor de effecten van clopidogreltherapie laten zien. Echter, slechts een beperkte hoeveelheid studies koppelt deze plaatjesfunctie aan klinische uitkomsten. De beschikbare studies die hieraan wel voldoen betreffen veelal relatief kleine patiëntpopulaties.

De evaluatie van verschillende plaatjesfunctietesten voor clopidogrelgevoeligheid beoogt met name één doel: is het gerechtvaardigd en kosteneffectief om patiënten te screenen op plaatjesinhibitie onder clopidogrel? Hierbij dient primair één test aangewezen te worden met een hoge gevoeligheid, die weinig arbeidsintensief is en bij voorkeur een redelijke prijs heeft. De consequentie dient hierbij te zijn dat de patiënt met een verminderde clopidogrelgevoeligheid op een hogere dosering of een alternatief antitrombotisch regime wordt ingesteld.

Momenteel zijn binnen het St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein twee studies afgerond die het vraagstuk mede dienen op te lossen.

- De POPular-studie ('Do Point-of-care Platelet Function Assays Predict Clinical Outcomes in clopidogrel pretreated patients undergoing elective PCI') heeft in twee jaar 1100 patiënten voor electieve PCI geïnccludeerd. Patiënten werden voor de dotterbehandeling adequaat ingesteld op clopidogrel en aspirine, waarna een scala aan plaatjesfunctietesten is uitgevoerd. De patiënten worden momenteel gedurende een jaar vervolgd.
- In de MAPCAT-studie zijn patiënten (n=55) geïnccludeerd die een stenttrombose hebben doorgemaakt ondanks adequate clopidogrel-aspirinetherapie. Bloedplaatjes van deze patiënten werden getest voor en na een oplaaddosering clopidogrel (600 mg) met verschillende testen. Als controlegroep diende een gematcht cohort van patiënten die wel een PCI hadden ondergaan zonder een stenttrombose te hebben doorgemaakt.

Bij het screenen van patiënten op clopidogrelongevoeligheid dient steeds in acht genomen te worden dat trombose (zowel veneus als arterieel) te allen tijde moet worden gezien als een multifactorieel verschijnsel. Naast een adequate plaatjesremming zijn hier het periprocedureel risico, de vasculaire status en de klassieke risicofactoren belangrijke spelers in de totstandkoming van een atherotrombotisch 'event'. Totdat de voorspellende waarde van de verschillende laboratoriumtesten voldoende is geëvalueerd, is het nog niet zinvol om op routinebasis patiënten te testen op clopidogrel-ongevoeligheid.

Referenties

1. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 1984; 310: 1137-1140.
2. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358: 527-533.
3. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, III, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 2411-2420.
4. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 246-251.
5. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357: 2001-2015.
6. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002; 252: 233-238.
7. Werkum JW van, Stelt CA van der, Seesing TH, Hackeng CM, Ten Berg JM. A head-to-head comparison between the VerifyNowP2Y12-assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective PCI. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2516-2518.
8. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Panicia R, Moschi G et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2312-2317.
9. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Bienart R, Goldenberg I, Novikov I et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 3171-3175.
10. Geisler T, Langer H, Wydymus M, Gohring K, Zurn C, Bigalke B, Stellos K, et al. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 2006; 27: 2420-2425.
11. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007; 5 Suppl 1: 230-237.
12. Werkum JW van, Heestermans AACM, Deneer VHM, Hackeng CM, Ten Berg JM. Clopidogrel resistance: Fact and Fiction. *Future Cardiology* 2006; 2: 215-228.
13. Heestermans AA, Werkum JW van, Schomig E, Ten Berg JM, Taubert D. Clopidogrel resistance caused by a failure to metabolize clopidogrel into its metabolites. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1143-1145.
14. Samara WM, Bliden KP, Tantry US, Gurbel PA. The difference between clopidogrel responsiveness and posttreatment platelet reactivity. *Thromb Res* 2005; 115: 89-94.
15. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908-2913.
16. Werkum JW van, Hackeng CM, Smit AC, van't Hof AW, Verheugt F, Ten Berg JM. Monitoring antiplatelet therapy with point-of-care platelet function assays: a review of the evidence. *Future Cardiology* 2008; 8: 33-55.
17. Labarthe B, Theroux P, Angioi M, Ghitescu M. Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 638-645.
18. Werkum JW van, Kleibeuker M, Mieremet N, Ten Berg JM, Hackeng CM. Evaluation of the platelet response to clopidogrel with light transmittance aggregometry: peak aggregation or late aggregation? *J Thromb Haemost* 2007; 5: 884-886.
19. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 85-92.
20. Werkum JW van, Stelt CA van der, Seesing TH, Ten Berg JM, Hackeng CM. The flow cytometric VASP assay can be used to determine the effectiveness of clopidogrel in patients treated with abciximab. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 881-883.
21. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1145-1152.

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 (β -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