

CAT
Critically Appraised Topic**Evaluatie van trombocytengranulen in het laboratorium**

Auteur: Lien Gruwier
Supervisor: Prof. Dr. Marc Jacquemin
Datum: 01/06/2021

SAMENVATTING

Aan de hand van een literatuurnazicht hebben we het veelvoud aan testen beschikbaar voor de diagnostiek naar 'Inherited Platelet Secretion Disorders' (IPSDs) in kaart gebracht. De ernstige vormen van IPSD kunnen hiermee goed en redelijk eenvoudig worden vastgesteld. Bij een aanzienlijk deel van de patiënten met een milde vorm van IPSD kan echter geen diagnose gesteld worden. Dit is te verklaren door de matige sensitiviteit van lichttransmissieaggregometrie (LTA) en het feit dat veel van de andere testen slecht gestandaardiseerd, technisch ingewikkeld en slecht reproduceerbaar zijn. Moleculaire diagnostiek is veelbelovend, maar het genetisch defect van vele IPSDs is nog ongekend en dus niet geïncludeerd in de meeste panels. Bij gebruik van whole genome/exome sequencing is het een grote uitdaging om de oorzakelijke mutaties te onderscheiden van andere aanwezige mutaties. Een goede screening naar afwijkingen van de trombocytenfunctie in combinatie met moleculaire diagnostiek is dus essentieel.

We hebben geprobeerd om de diagnostiek naar IPSDs in ons laboratorium op verschillende niveaus te optimaliseren:

- 1) Nazicht van de tekortkomingen in ons laboratorium aan de hand van het literatuurnazicht:
Deze situeren zich voornamelijk ter hoogte van de diagnostiek van α -granulenstoornissen en bij de differentiatie tussen aandoeningen die gepaard gaan met een verminderde ATP secretie.
- 2) Nazicht en optimalisatie van de referentiewaarden voor de ATP secretietest:
De onderste referentielimiet ligt op dit moment voor de algemene populatie te hoog, waardoor vermoedelijk te veel patiënten als pathologisch bestempeld worden. Voor de kinderen jonger dan 5 jaar zouden specifieke leeftijdsgebonden referentiewaarden moeten gehanteerd worden, deze zijn echter met de huidige dataset niet accuraat te bepalen.
- 3) Door het bereiden van een nucleotide-extract uit PRP kunnen we ook de ATP inhoud van de bloedplaatjes meten op het toestel dat momenteel reeds gebruikt wordt voor de ATP secretie assay. We zien echter dat de analytische variatie met de vooropgestelde testprocedure te hoog is voor adequaat gebruik in de kliniek.

INTRODUCTIE

I. Trombocytengranulen

Trombocyten zijn kleine kernloze celfragmenten die ontstaan uit megakaryocyten in het beenmerg. De primaire rol van circulerende trombocyten is het vormen van aggregaten wanneer beschadiging van de bloedvatwand optreedt ('primaire hemostase'). De exocytose van plaatjesgranulen is in dit proces cruciaal. Trombocyten bevatten 3 types granulen: dense granulen (ook δ -granulen genoemd), α -granulen en lysosomen. Na een initiële trigger, wordt de verdere activatie en aggregatie van trombocyten grotendeels gemedieerd door de moleculen die in deze granulen opgeslagen zitten. Terwijl in α -granulen honderden eiwitten opgeslagen worden (vnl. stollingsfactoren, groeifactoren, angiogene mediators, ...), bevatten de δ granulen slechts enkele kleinere moleculen (serotonine, ADP, ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} en fosfaten). Zowel serotonine als ADP spelen na exocytose een belangrijke rol als plaatjesagonisten: op een autocriene en paracriene manier zorgen ze voor verdere activatie en rekrutering van circulerende trombocyten.¹ Vanuit de lysosomen worden glycohydrolase, cathepsine en heparinase vrijgezet, deze dragen bij aan de afbraak van de extracellulaire matrix en migratie van de trombocyten.²

2. IPFDs en IPSDs

Wanneer in dit complex proces iets verkeerd loopt, spreekt men van een plaatjesfunctiestoornis of trombocytopathie. Meestal gaat het om congenitale bloedingsziektes ('inherited platelet function disorders', IPFDs), gekenmerkt door milde tot ernstige mucocutane bloedingen en een zeer heterogene genetische achtergrond. De exacte prevalentie van IPFDs is ongekend en wordt vermoedelijk onderschat door onderdiagnostiek. Zeker voor milde vormen is de huidige diagnostiek vaak ontoereikend. Men vermoedt dat de prevalentie varieert van 2 per miljoen voor sommige autosomaal recessieve vormen tot 1 op 100 voor sommige milde plaatjessecretiedefecten. Gresele et al stelden in 2018 een classificatiesysteem voor waarbij IPFDs ingedeeld worden in 9 categorieën naargelang de functie van het (vermoedelijk) aangetaste eiwit: zie bijlage 1. In categorie 3 'defects of platelet granules (isolated/syndromic)' situeren zich de aandoeningen die ontstaan door deficiënte productie van α -granulen (Gray Platelet Syndrome, ARC syndrome, ...), δ -granulen (Hermansky-Pudlak Syndrome, Chediak-Higashi Syndrome, ...) of beide ($\alpha\delta$ storage pool disease).³ De vrijzetting van plaatjesgranulen is echter niet alleen afhankelijk van een normale aanmaak van granulen, maar ook van een activatie-pathway die uiteindelijk het signaal geeft voor de secretie van de granule-inhoud. Het proces ziet er samengevat als volgt uit:

- 1) Interactie van een agonist met receptoren op het oppervlak van de trombocyt.
- 2) Intracellulaire signaaltransductie.
- 3) Veranderingen in de intracellulaire concentraties van vrij Ca^{2+} , inositol fosfaat en kinases.
- 4) Remodellering van het cytoskelet.
- 5) Fusie van granulen met het plaatjesoppervlak waardoor vrijzetting van de granule-inhoud.

Op elk punt in dit proces kunnen defecten optreden die aanleiding geven tot een IPFD: bv. deficiëntie van Fosfolipase A_2 / C , Cyclo-oxygenase 1, Thromboxane synthase, Gezien de complexiteit van dit proces geven defecten die zorgen voor verminderde granule-vrijzetting, dikwijls ook aanleiding tot andere stoornissen in de plaatjesaggregatie.^{4,5} Als we teruggaan naar de classificatie van IPFDs voorgesteld door Gresele et al, zijn er dus ook in de andere categorieën aandoeningen terug te vinden die gerelateerd zijn aan defecten van de plaatjesgranulen. Om het extra ingewikkeld te maken, worden bovenstaande categorieën in sommige wetenschappelijke publicaties gegroepeerd tot 'erfelijke plaatjessecretie aandoeningen' (inherited platelet secretion disorders, IPSDs), waarin dus zowel ziektebeelden vallen die gekenmerkt worden door deficiënte aanmaak als door deficiënte secretie van plaatjesgranulen. In dit Critically Appraised Topic (CAT) worden de verschillende analytische technieken aan bod gebracht die de inhoud en/of secretie van plaatjesgranulen kunnen evalueren. De term IPSD zal dan ook verder gebruikt worden om alle plaatjesgranulen-gemedieerde aandoeningen te groeperen.

3. Diagnostiek van IPSDs

Men vermoedt dat IPSDs meer dan 90% van alle erfelijke plaatjesaandoeningen omvatten (en dus frequenter zijn dan de ziekte van Von Willebrand), maar deze aandoeningen zijn klinisch heterogeen, in het labo moeilijker te diagnosticeren en blijven dan ook dikwijls onder de radar.^{4,5} Om uit te maken welk granule subtype deficiënt is en om te bepalen of er een abnormale productie of een abnormale vrijzetting aan de basis ligt van het probleem, werden de voorbij 50 jaar verschillende analyses ontwikkeld. Toch blijkt uit een wereldwijde rondvraag van de International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) in 2014, dat er in meer dan de helft van de ondervraagde laboratoria geen specifieke assay ter detectie van trombocytengranulen inhoud en/of vrijzetting ingezet wordt bij patiënten met vermoeden van een plaatjesfunctiedefect. Bij de laboratoria die wel dergelijke analyses routinematig uitvoerden, zag de ISTH een grote verscheidenheid aan geïmplementeerde assays met gebrek aan standaardisatie, zie ook bijlage 2.⁶ Door de ondervraagde laboratoria werden enkele redenen aangegeven voor het gebrek aan implementatie / standaardisatie van deze assay, o.a. financiële restricties, gebrek aan voldoende wetenschappelijk ondersteunde testmethodes en hoge analytische en intra-individuele variabiliteit.^{6,7}

Men vermoedt dan ook dat de prevalentie van IPSDs sterk onderschat wordt door onderdiagnostiek. Ernstige vormen (zoals Hermansky-Pudlak syndroom) worden meestal vroeg gediagnosticeerd door de suggestieve kliniek (o.a. albinisme), de sterker afwijkende functietesten en de gekende genetische achtergrond. Bij mildere vormen treden de klachten dikwijls pas op volwassen leeftijd of na belasting (operatie, bevalling, ...) op, zijn de routine plaatjesfunctietesten vaak ontoereikend om tot een diagnose

te komen en is de genetische achtergrond ongekend. Een goede diagnostiek is echter ook hier van belang zodat bijvoorbeeld profylaxe opgestart kan worden voorafgaand aan een operatie of zodat onnodige en mogelijk schadelijke behandelingen ten gevolge van een verkeerde diagnose voorkomen kunnen worden.⁸

In dit Critically Appraised Topic (CAT) komt eerst een literatuurstudie omtrent de verschillende analytische technieken voor de detectie van IPSDs aan bod. Nadien wordt nagekeken of er een optimalisatie in ons laboratorium mogelijk is. Op dit moment steunt de diagnostiek van IPSDs in ons laboratorium grotendeels op de ATP secretietest. We stellen onszelf hierbij drie vragen: 1) welke tekortkomingen zijn er voor de diagnostiek van IPSDs; 2) voldoen de ATP secretietest referentiewaarden die we momenteel hanteren; 3) kunnen we deze test (mits enkele aanpassingen) ook gebruiken om de inhoud van de trombocytengranulen te controleren?

ONDERZOEKSVRAGEN

- 1) Welke methodes worden in de literatuur beschreven om defecten in plaatjesgranulen op te sporen?
- 2) Is een optimalisatie van de diagnostiek naar IPSDs mogelijk in ons laboratorium?
 - *Welke tekortkomingen zijn er op dit moment voor de diagnostiek van IPSDs?*
 - *Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden die we momenteel hanteren?*
 - *Kunnen we de ATP secretietest (mits enkele aanpassingen) ook gebruiken om de inhoud van de trombocytengranulen te controleren?*

REFERENTIES

1. Chen Y, Yuan Y, Li W. Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from α -granules. *Bioscience Reports* 2018;38(5):BSR20180458.
2. Jurk K. Platelet granules – secretory and secretive. *Hamostaseologie* 2017;37(3):208–10.
3. Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *International Journal of Laboratory Hematology* 2018;40(S1):34–45.
4. Mumford AD, Frelinger AL, Gachet C, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost* 2015;114(7):14–25.
5. Gresele P, Bury L, Falcinelli E. Inherited Platelet Function Disorders: Algorithms for Phenotypic and Genetic Investigation. *Semin Thromb Hemost* 2016;42(3):292–305.
6. 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.
7. Hayward CPM, Moffat KA, Brunet J, et al. Update on diagnostic testing for platelet function disorders: What is practical and useful? *Int J Lab Hematol* 2019;41(S1):26–32.
8. M.W. Blaauwgeers, I. van Asten, A. Huisman, R.T. Urbanus, R.E.G. Schutgens. Congenitale trombocytopathie: huidige diagnostiek en toekomstperspectief. *Ned Tijdschr Hematol* 2016;13:332–40.
9. Hayward CPM, 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. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7(4):676–84.
10. Brunet JG, Iyer JK, Badin MS, et al. Electron microscopy examination of platelet whole mount preparations to quantitate platelet dense granule numbers: Implications for diagnosing suspected platelet function disorders due to dense granule deficiency. *Int J Lab Hem* 2018;40(4):400–7.
11. Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *IJMS* 2017;18(8):1803.
12. Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK, Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006;4(2):312–9.
13. Kerényi A, Schlammadinger Á, Ajzner É, et al. Comparison of PFA-100 Closure Time and Template Bleeding Time of Patients with Inherited Disorders Causing Defective Platelet Function. *Thrombosis Research* 1999;96(6):487–92.
14. Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in Platelet Function Testing—Light Transmission Aggregometry and Beyond. *JCM* 2020;9(8):2636.
15. Dupuis A, Bordet J-C, Eckly A, Gachet C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *JCM* 2020;9(8):2508.
16. Freson K. Implementatie van een gen-panel test voor erfelijke bloeding, trombozes en bloedplaatjesaandoeningen. Presentatie UZ Leuven 17/11/2020.

17. Downes K, Megy K, Duarte D, et al. Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood* 2019;134(23):2082–91.
18. Van Laer C., Jacquemin M., Peerlinck K., Freson K. Thrombogenomics implementation in Belgium. *Belg J Hematol* 2020;12(3):99–105.
19. van Asten I, Blaauwgeers M, Granneman L, et al. Flow cytometric mepacrine fluorescence can be used for the exclusion of platelet dense granule deficiency. *J Thromb Haemost* 2020;18(3):706–13.
20. Harrison P, Mackie I, Mumford A, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *British Journal of Haematology* 2011;155(1):30–44.
21. Badin MS, Graf L, Iyer JK, Moffat KA, Seecharan JL, Hayward CPM. Variability in platelet dense granule adenosine triphosphate release findings amongst patients tested multiple times as part of an assessment for a bleeding disorder. *International Journal of Laboratory Hematology* 2016;38(6):648–57.
22. von Papen M, Gambaryan S, Schütz C, Geiger J. Determination of ATP and ADP Secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfus Med Hemother* 2013;40(2):109–16.
23. Gresele P, the Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015;13(2):314–22.
24. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). 2021; Available from: <https://omim.org/>
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP28-A3c. 2008.
26. Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *Journal of Clinical Pathology* 1986;39(7):701–12.
27. Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, et al. Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2019;57(1):20–9.
28. Hoffmann JJML, van den Broek NMA, Curvers J. Reference Intervals of Reticulated Platelets and Other Platelet Parameters and Their Associations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2013;137(11):1635–40.
29. Lahti A. Partitioning biochemical reference data into subgroups: comparison of existing methods. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(7):725–33.
30. Holmsen H, Storm E, Day HJ. Determination of ATP and ADP in blood platelets: a modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal Biochem* 1972;46(2):489–501.
31. Holmsen H, Dangelmaier CA. Measurement of secretion of adenine nucleotides. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press; 1989,p.195–205. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668798969060X>
32. Gunning WT, Raghavan M, Calomeni EP, et al. A Morphometric Analysis of Platelet Dense Granules of Patients with Unexplained Bleeding: A New Entity of Delta-Microgranular Storage Pool Deficiency. *JCM* 2020;9(6):1734.
33. Wojenski CM, Schick PK. Development of storage granules during megakaryocyte maturation: accumulation of adenine nucleotides and the capacity for serotonin sequestration. *J Lab Clin Med* 1993;121(3):479–85.
34. White MM, Foust JT, Mauer AM, Robertson JT, Jennings LK. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories. *Thromb Haemost* 1992;67(5):572–7.
35. Soslau G., Parker J. The Bioluminescent Detection of Platelet Released ATP: Collagen-induced Release and Potential Errors. *Thrombosis Research* 1992;66:15–21.

APPRAISAL**I. Welke methodes worden in de literatuur beschreven om defecten in plaatjesgranulen op te sporen?**

Er zijn veel verschillende analyses die een beoordeling toelaten van de opslag en/of secretie van plaatjesgranulen, vaak zijn ze echter specifiek voor één subtype van plaatjesgranulen. Er zijn dus dikwijls meerdere testen nodig om een plaatjessecretiedefect volledig uit te sluiten. Over het algemeen is het voldoende om aan te tonen dat er een verminderde vrijzetting is van één type granule om een IPSD te diagnosticeren. Het is ook interessant om een onderscheid te maken tussen een probleem bij de vrijzetting van granulen en een probleem dat voortkomt uit een afwijkende aanmaak van granulen, hoewel er op dit moment weinig tot geen therapeutische consequenties zijn.⁴

I.1 Algemeen**A. Trombocytentelling**

Bij δ -SPD is de plaatjestelling meestal normaal, maar (macro)trombocytopenie wordt beschreven bij α -SPD en bij meerdere andere aandoeningen (zie ook bijlage 3).³

B. Lichtmicroscopie

Geen waarde voor de beoordeling van δ -granulen. De volledige afwezigheid van α -granulen (GPS, ARC syndroom) resulteert in grote, bleke bloedplaatjes op May-Grunwald-Giemsa kleuring van een perifere bloeduitstrijkje.⁵

C. Lichttransmissieaggregometrie (LTA)

LTA meet de aggregatiecapaciteit van trombocyten na toevoeging van verschillende agonisten in verschillende concentraties. Bij deze techniek wordt de lichtdoorlaatbaarheid van plaatjesrijk plasma (PRP) gemeten, waarna een agonist aan het PRP wordt toegevoegd. Wanneer de trombocyten geactiveerd worden, treedt een vormverandering op die te zien is als een lichte afname in de lichtdoorlaatbaarheid van het PRP. Hierna treedt bloedplaatjesaggregatie op, waardoor de lichtdoorlaatbaarheid toeneemt. Door gebruik van verschillende agonisten, kunnen verschillende plaatjesreceptoren onderzocht worden. Meerdere studies duiden erop dat de sensitiviteit van LTA voor pathologie van trombocytengranulen zeer variabel is, waardoor de diagnose gemist kan worden indien enkel voort wordt gegaan op LTA. Een derde tot de helft van de patiënten met een defect in de trombocytengranulen vertonen een normale LTA bij gebruik van standaard agonisten. Dit wordt geïllustreerd in bijlage 4 waarin Brunet et al de resultaten van LTA en ATP secretie bij patiënten met bewezen deficiëntie van δ -granulen op elektronenmicroscopie weergeven.^{4,8-10} Indien bij IPSDs afwijkingen op LTA worden vastgesteld, gaat het meestal om een verminderde of afwezige secundaire golf of een verminderde maximale aggregatie op één of meer agonisten, zie ook bijlage 3.^{3,8}

D. Platelet Function Analyzer (PFA)

Bij deze methode wordt citraat-volbloed onder hoge druk doorheen een capillair gestuurd die eindigt op een membraan gecoat met collageen en ADP of epinephrine (afhankelijk van de gebruikte cartridge, C-ADP/C-EPI). In het membraan is een kleine opening aangebracht die na verloop van tijd wordt afgesloten door de ontwikkeling van een 'trombocytenplug'. De PFA meet hoelang het duurt vooraleer deze opening sluit en de bloedstroom onderbroken wordt ('closure time', CT). Het is een simpele, snelle methode die op volbloed kan worden uitgevoerd en weinig staalvolume of staalvoorbereiding vraagt.¹¹ Hayward et al voerden in 2006 een literatuurnazicht uit (zie bijlage 5) naar het gebruik van de PFA-100 bij plaatjesfunctiestoornissen.¹² Ze concludeerden dat bij δ -SPD en primaire secretiedefecten de resultaten zeer variabel zijn, maar dat de kans om ze op te pikken groter is met de C-EPI cartridge dan met de C-ADP cartridge. Dit zou verklaard kunnen worden doordat in de C-ADP cartridge het membraan van de cartridge een externe bron van ADP vormt, waardoor toch normale plaatjesactivatie optreedt.¹³ Ook bij het Wiskott-Aldrich syndroom waren de resultaten variabel, in tegenstelling tot het Gray Platelet Syndroom waarbij wel steeds een verlengde CT gemeten werd op de beide cartridges. Gezien de beperkte sensitiviteit wordt de PFA dus niet aanbevolen als screeningstool voor patiënten met vermoeden van IPSD.^{12,14,15}

E. *Moleculaire diagnostiek*

Moleculaire diagnostiek wordt meer en meer gebruikt bij patiënten met bloedingsziektes, zeker indien er familiale argumenten zijn. Wanneer er sprake is van een zeer typisch fenotype (bv. Hermansky-Pudlak of Chediak-Higashi syndroom) kan er gebruik worden gemaakt van een gericht genonderzoek. Erfelijke plaatjesafwijkingen zijn echter dikwijls klinisch heterogeen waardoor er te veel kandidaatgenen voor gericht onderzoek beschikbaar zijn. Vandaag de dag wordt dan ook frequent gebruik gemaakt van high-throughput sequencing technologieën (HTS), dikwijls onder de naam van Next Generation Sequencing (NGS). Hierbij wordt ofwel een panel van relevante genen ('targeted sequencing', TS), het volledige exoom ('whole exome sequencing', WES) of het volledige genoom ('whole genome sequencing', WGS) gesequenced. Sinds 2019 wordt in het UZ Leuven gebruik gemaakt van een techniek die het midden houdt tussen TS en WES en 'virtual whole exome sequencing' (vWES) wordt genoemd. Dit houdt in dat het volledige exoom wordt gesequenced, maar slechts een panel van een 100-tal relevante genen in detail wordt bekeken.¹⁶ Dit panel werd ontwikkeld in de internationale 'ThromboGenomics' studie en wordt jaarlijks geüpdatet.¹⁷ In tabel 1 worden de 96 genen weergegeven die momenteel geïnccludeerd zijn in het UZ Leuven panel.¹⁸ In het 'platelet disorder panel' worden 63 genen opgespoord waarvan 27 relevant zijn voor de diagnostiek van IPSDs. In bijlage 3 staan de genen die niet opgepikt worden met het UZ Leuven panel cursief gedrukt.

Tabel 1: genpanel UZ Leuven (vanuit Van Laer et al, 2021)¹⁸

Coagulation/anticoagulation panel
ADAMTS13, HRG, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2, F5, F7 F8, F9, FGA, FGB, FGG, GGCX, KNG1, LMAN1, MCFD2, PIGA, PLG, PROC, PROS1, SERPINE1, SERPINC1, SERPIND1, SERPINF2, THBD, VKORC1, VWF
Platelet disorder panel
ABCG5, ABCG8, ACTB, ACTN1, ANKRD26, ANO6, AP3B1, AP3D1, ARPC1B, BLOC1S3, BLOC1S6, CDC42, CYCS, DIAPH1, DTNBP1, ETV6, FERMT3, FLI1, FLNA, FYB1, GATA1, GFI1B, GNE, GP1BA, GP1BB, GP6 GP9, HOXA11, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, IKZF5, ITGA2B, ITGB3, KDSR, LYST, MECOM, MPIG6B, MPL, MYH9, NBEA, NBEAL2, P2RY12, PLA2G4A, PLAU, RASGRP2, RBM8A, RNU4ATAC, RUNX1, SLFN14, SRC, STIM1, STXB2, TBXA2R, TBXAS1, THPO, TUBB1, VIPAS39, VPS33B, VWF, WAS
Bleeding of unknown aetiology panel
ACVRL1, CHST14, COL1A1, COL3A1, COL5A1, COL5A2, ENG, SMAD4

vWES heeft als grootste voordeel dat je geen varianten oppikt die irrelevant zijn voor de pathologie die je wilt bestuderen (bv. mutaties in dementie-, parkinson- of oncogenen). Het nadeel van deze techniek is dat minder nieuwe genetische defecten opgespoord kunnen worden gezien enkel gekeken wordt naar reeds gekende ziekte-geassocieerde genen. In de toekomst zal waarschijnlijk dus toch meer en meer overgeschakeld worden op whole exome of zelfs genome sequencing. De grootste uitdaging van WES/WGS is om de oorzakelijke variant (die bijdraagt aan het klinisch fenotype) te onderscheiden van andere aanwezige (mogelijk ook pathogene) varianten die geen invloed hebben op het fenotype.¹⁶ De vrijzetting van plaatjesgranulen wordt strikt gereguleerd in een complex systeem (zie inleiding) waarin de functie van verschillende eiwitten nog niet volledig uitgeklaard is. Niet alle gedetecteerde varianten zijn bijgevolg makkelijk in te delen in 'pathogeen' of 'niet-pathogeen'. Het is dus noodzakelijk om het resultaat van WES/WGS steeds te kaderen binnen de kliniek en de verdere laboratoriumdiagnostiek. De routine plaatjesfunctietesten zullen dus nog niet meteen verdwijnen.^{5,14}

F. *Elektronenmicroscopie*

Met behulp van whole mount of transmissie elektronenmicroscopie (EM) kunnen de α - en δ -granulen gevisualiseerd en zowel kwalitatief als (semi-)kwantitatief worden beoordeeld. Normaal bevat elke trombocyt 5 tot 9 δ -granulen (gemiddelde 6,6) met een diameter van 200 – 300nm en 50 tot 80 α -granulen met een diameter van 200 – 500nm.^{1,10} De dense granulen danken hun naam aan hun elektrondensiteit, te wijten aan de aanwezigheid van calcium.^{5,14} De α -granulen zien eruit als ronde tot ovale structuren met variabele elektrondensiteit, een densere nucleoid en een perifere cluster van tubuli.¹

EM is een zeer gevoelige en reproduceerbare techniek en wordt dikwijls gezien als de gouden standaard, zeker voor de detectie van dense granule deficiënties. Een verlaagd aantal dense granulen is typisch voor geïsoleerde δ - en $\alpha\delta$ -SPD, maar ook voor een aantal syndromale aandoeningen met bloedplaatjesdysfunctie (Hermansky-Pudlak syndroom, Chediak-Higashi, Wiskott-Aldrich, ...).⁵ Niet alleen de telling, maar ook de beoordeling van de diameter van de δ -granulen lijkt belangrijk. Bij bijna 30% van de patiënten met bloedingsstoornissen en een normaal aantal dense granulen zijn de aanwezige granulen kleiner, waardoor toch sprake is van een gereduceerd storage pool volume. De intra-individuele CV voor normale patiënten is met 12% acceptabel, maar ligt lager (rond 28%) bij patiënten met een verlaagd aantal δ -granulen.^{7,10} In het geval van GPS zijn de normale α -granulen vervangen door lege vacuooltjes. Abnormaal grote α -granulen worden gezien bij patiënten met het Paris-Trousseau syndroom en bij een FLII-gerelateerd δ granule defect. In het geval van filaminopathie gerelateerde macrotrombocytopenie vertonen sommige plaatjes reuze α -granulen terwijl andere plaatjes weinig α -granulen bevatten.⁵

Een groot voordeel van EM is dat de volledige ultrastructuur van de trombocyt bekeken kan worden (cytoskelet, andere granulen, ...) en andere bloedplaatjesaandoeningen tegelijk uitgesloten kunnen worden. De grootste nadelen van EM zijn de nood aan expertise en tijd voor accurate beoordeling en de lage beschikbaarheid (enkel aanwezig in zeer gespecialiseerde centra).¹⁴ Bovendien geeft dit onderzoek geen informatie over de adequate vrijzetting van de granulen.⁴

1.2 δ -granulen

A. *Flowcytometrie*

Flowcytometrie maakt gebruik van fluorescerende antistoffen die specifieke eiwitten op de plaatjesmembraan of binnenin de trombocyt (na lysis) kunnen binden. Wanneer het geconjugeerde fluorescerend molecuul wordt geëxciteerd door een lichtbron in de flowcytometer, wordt fluorescerend licht uitgestuurd en opgevangen door detectoren in de flowcytometer.

- *Mepacrine assay:*

Bij deze test worden de bloedplaatjes geïncubeerd met mepacrine, een fluorescerend derivaat van acridine dat bindt aan adenosine nucleotiden, hierdoor treedt incorporatie van mepacrine in de δ -granulen op. Door stimulatie van de bloedplaatjes wordt mepacrine opnieuw gesecreteerd. Het mepacrine fluorescentie signaal wordt gemeten m.b.v. flowcytometrie in een staal mét en een staal zonder plaatjes-agonist. Hierdoor is het mogelijk om zowel de incorporatie van mepacrine (maat voor inhoud δ -granulen) als de secretie van mepacrine (maat voor de vrijzetting δ -granulen) te meten. De voordelen van deze assay zijn het kleinere staalvolume, de uitvoering op volbloed (geen nood aan PRP), de gelijktijdige meting van zowel opslag als vrijzetting, en de hoge negatieve predictieve waarde voor δ -SPD (97%). De in de literatuur beschreven positieve predictieve waarde (35%, t.o.v. diagnose van δ -SPD met ATP/ADP meting) zorgt er echter voor dat deze test enkel gebruikt kan worden als screeningsassay en dus steeds bevestigd moet worden indien positief.^{14,19}

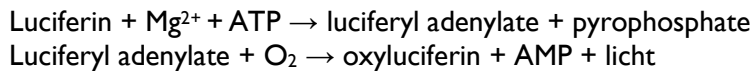
- *CD63:*

Dit eiwit is van nature aanwezig op het membraan van δ -granulen en komt na plaatjesactivatie ook tot expressie op het trombocytenmembraan. Het belangrijkste nadeel van deze assay is dat er geen onderscheid mogelijk is tussen een opslagprobleem en een primair secretie defect.¹⁴

B. *ATP/ADP meting met lumino(aggrego)metrie*

Ongeveer 40 – 60 nmol ATP en 20 – 40 nmol ADP is aanwezig in 10^9 trombocyten. De ATP/ADP inhoud in de bloedplaatjes is onderverdeeld in een 'metabole', cytoplasmatische pool (+/- 1/3^e van de totale inhoud) en een 'storage' δ -granule pool (+/- 2/3^e van de totale inhoud). ATP en ADP zijn echter niet evenwichtig verdeeld over de metabole en de storage pool: het grootste deel van de ADP voorraad is aanwezig in de δ -granulen, het grootste deel van de ATP voorraad in de cytoplasmatische pool. Door te kijken naar de ATP/ADP verhouding in het supernatans

van gestimuleerde trombocyten kan dus een indruk worden gekregen van de inhoud van de δ -granulen. Een ATP/ADP ratio >2 in het releasaat is een teken van een reductie van de δ -granule inhoud en ondersteunt de diagnose van δ -storage pool disease. Een verminderde ATP en ADP secretie met een normale ATP/ADP ratio in het releasaat wijst eerder op een secretiedefect.²⁰ De meest gebruikte methode om ATP en ADP te meten is gebaseerd op bioluminescentie, in een reactie gekatalyseerd door firefly luciferase:



Eerst wordt de volledige ATP trombocyteninhoud (metabole en storage pools) gemeten in een trombocytenlysaat. Nadien wordt de totale ADP inhoud gemeten door omzetting van ADP in ATP m.b.v. de fosfoenolpyruvaat - pyruvaat kinase reactie en achtereenvolgens de luciferase assay. Door de totale ATP inhoud af te trekken van de totale ADP-meting (= ATP + ADP) bekomt men de ADP inhoud. Eenzelfde benadering kan gebruikt worden om de secretie van ATP en ADP te meten in PRP na stimulatie van trombocyten met verschillende agonisten.⁴ Indien gebruik wordt gemaakt van een lumi-aggregometer i.p.v. een luminometer, kan na toevoeging van een agonist tegelijkertijd de ATP secretie en de plaatjesaggregatie (m.b.v. klassieke LTA) gemeten worden.¹⁴

Het grootste nadeel van lumino(aggrego)metrie is zijn variabiliteit: de concentratie van luciferine/luciferase, concentratie van de ATP standaard, concentratie en type van de agonisten, duur van incubatie en meting, temperatuur, al dan niet gecorrigeerde bloedplaatjestelling en volume van PRP, ... beïnvloeden allemaal de lichtrespons en aldus de kwantificatie van ATP.¹⁴ Hierbovenop komt vermoedelijk ook een factor intra-individuele variabiliteit. De Hamilton Regional Laboratory Medicine Program (HRLMP) analyseerde 3 of meer stalen op verschillende tijdstippen van 26 gezonde vrijwilligers. In bijlage 6 wordt in een grafiek de variatiecoëfficiënt (CV) voor zowel LTA als lumino-aggregometrie voor verschillende agonisten geïllustreerd. Deze hoge CV-waarden (mediaan 19-33%) beperken de bruikbaarheid van deze assay.⁷

Voor de klinische bruikbaarheid is het ook cruciaal dat een abnormale lumino-aggregometrie test geassocieerd is met een bloedingsziekte. Uit de studie van Badin et al komt slechts een odds ratio van 1.5 (95% CI 0.6 -3.9) voor bloedingsziekten, wat dus zou betekenen dat een afwijkende ATP secretie geen voorspellende waarde heeft in de diagnostiek.²¹ Niet alleen de positieve predictieve waarde van de ATP secretietest, maar ook de negatieve predictieve waarde zou te wensen overlaten. Bij tien patiënten met een bewezen δ -granule tekort op elektronenmicroscopie, hadden 2 patiënten een normale ATP secretietest bij gebruik van collageen als agonist (cfr. bijlage 4).¹⁰

C. ADP/ATP meting met high-pressure liquid chromatography (HPLC)

ADP en ATP granule inhoud en vrijzetting kunnen in PRP of gewassen plaatjes gemeten worden m.b.v. HPLC, meestal met fluorescentie detectie of UV absorptiemeting. HPLC is een zeer gevoelige, specifieke en precieze methode die toelaat om ADP en ATP gemakkelijk van elkaar te onderscheiden. Nadelen van deze methode zijn de hoge aankoop prijs en de nood aan specifiek hoogopgeleid laboratoriumpersoneel.^{4,22}

1.3 α -granulen

A. Flowcytometrie

De meest gebruikte merker voor het detecteren van de secretie van α -granulen is P-selectin (CD62p). Dit eiwit is van nature aanwezig op het membraan van α -granulen en komt na plaatjesactivatie ook tot expressie op het trombocytenmembraan. Door P-selectin flowcytometrisch te meten voor en na activatie met een bloedplaatjesagonist kunnen secretiedefecten opgespoord worden.^{5,11,14} Voordelen van deze techniek zijn het kleiner staalvolume en de uitvoering op volbloed (geen nood aan PRP). Nadelen van deze techniek zijn de lagere sensitiviteit (negatieve predictieve waarde van 87%) voor sommige afwijkingen van de α -granulen en het gebrek aan standaardisatie tussen verschillende laboratoria.^{4,14}

B. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

α -granulen kunnen eveneens beoordeeld worden door platelet factor-4 of fibrinogeen aan te tonen d.m.v. ELISA. Indien deze test zowel wordt uitgevoerd op plaatjeslysaat als op PRP supernatans na toevoeging van een agonist, kan een uitspraak worden gedaan over de respectievelijke inhoud en vrijzetting van α -granulen.⁵

C. Immunofluorescentie-microscopie

Door immunofluorescente labeling van thrombospondin-I, vWF, fibrinogeen, P-selectin, ... op perifeer bloeditstrijkjes of PRP uitstrijkjes kunnen α -granulen zowel kwantitatief als kwalitatief beoordeeld worden. Voordelen van deze techniek zijn het kleine staalvolume (<100 μ L volbloed) en de mogelijkheid voor kleinere centra om de uitstrijkjes te verzenden naar meer gespecialiseerde centra.^{5,14} Nadeel is dat enkel de inhoud van de α -granulen beoordeeld kan worden.

1.4 Conclusie analysemethodes

Er is een verscheidenheid aan testen beschikbaar voor de diagnostiek naar IPSDs. De ernstige vormen kunnen hiermee goed en redelijk eenvoudig worden vastgesteld. De diagnostiek voor de milde vormen is met de huidig beschikbare testen vaak ontoereikend. Zelfs na uitgebreide diagnostiek is bij een aanzienlijk deel van de patiënten met een verdenking op IPSD geen duidelijke diagnose te stellen. Dit is 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. Moleculaire diagnostiek is veelbelovend, maar het genetisch defect van vele IPSDs is nog ongekend en dus niet geïnccludeerd in vWES panels. Voor WES/WGS blijft het een grote uitdaging om de oorzakelijke mutaties te onderscheiden van andere aanwezige mutaties. Een goede screening naar afwijkingen van de trombocytenfunctie in combinatie met moleculaire diagnostiek is dus essentieel.⁸

Zie bijlage 3 voor een overzicht van de diagnostiek voor de meest voorkomende IPSDs.^{3-5,23,24}

2. Optimalisatie van IPSD diagnostiek in ons laboratorium:**Welke tekortkomingen zijn er op dit moment voor de diagnostiek van IPSDs?**

Momenteel zijn er in het UZ Leuven zes analyses beschikbaar voor de diagnostiek van patiënten met een mogelijke IPSD. In de eerste lijn gaat het over het microscopisch nazicht van een perifeer bloeditstrijkje, lichttransmissieaggregometrie, de Platelet Function Analyzer en de ATP secretie meting. In tweede lijn kan er op specifieke vraag van de clinicus ook elektronenmicroscopie of virtual whole exome sequencing ingezet worden. Als we naar bijlage 3 kijken zien we dat de eerste lijnsscreening voornamelijk tekort schiet op twee vlakken: 1) de diagnostiek van patiënten met een α -granulenstoornis; 2) de differentiatie tussen de verschillende aandoeningen die gepaard gaan met een verminderde ATP secretie (enkel verminderde secretie of ook verminderde inhoud van de δ -granulen).

Voor de eerste tekortkoming is er nood aan een test die de vrijzetting van α -granulen kan meten. Het gebruik van elektronenmicroscopie volstaat in principe niet, gezien deze test enkel de α -granule inhoud en niet de vrijzetting beoordeelt. Idealiter wordt er dus geïnvesteerd in een flowcytometrische of op ELISA gebaseerde assay. In de praktijk zien we echter dat de meest courante secretiestoornissen gepaard gaan met een verminderde vrijzetting van de inhoud van zowel α - als δ -granulen (zie bijlage 3), waardoor deze mee opgepikt kunnen worden met de ATP secretie assay. Het is belangrijk dat de clinicus op de hoogte is van de lage sensitiviteit van lichtmicroscopie, PFA en LTA voor de diagnostiek van α -granulenstoornissen zodat gericht de ATP secretietest, elektronenmicroscopie en/of genetische diagnostiek aangevraagd kan worden bij verdachte patiënten.

Ook aan de tweede tekortkoming kan voldaan worden door breder gebruik van elektronenmicroscopie, maar dit is een techniek die veel expertise en tijd vergt. Met de huidige ATP secretie assay zou het in principe mogelijk moeten zijn om ook de inhoud van de δ -granulen (o.v.v. ATP en ADP inhoud) te meten, mits enkele aanpassingen (zie onderdeel 4 van deze CAT). Ook met een op HPLC gebaseerde assay zou de inhoud van de δ -granulen kunnen worden geëvalueerd, zonder gebruik van EM.

3. Optimalisatie van IPSD diagnostiek in ons laboratorium: Voldoen de ATP secretietest referentiewaarden die we momenteel hanteren?

Het referentiewaarden-interval wordt gedefinieerd als het interval tussen een onderste en een bovenste referentiewaarde. In dit interval zou een specifiek percentage (meestal 95%) van de algemene populatie moeten liggen. Voor de meeste analyses worden de 2,5^e en 97,5^e percentiel van de waarden bekomen in een studiep populatie, gebruikt als de respectievelijk onderste en bovenste referentiewaarden in de algemene populatie. Soms is slechts één van de twee referentielimieten van medisch belang, bij de ATP secretie assay is dit de onderste referentielimiet.

Het vastleggen van referentiewaarden voor een bepaalde analyse is een uitdaging voor elk laboratorium, maar in het geval van plaatjesfunctietesten wordt dit verder bemoeilijkt door de beperkte stabiliteit van het patiëntenstaal en de beperkte standaardisering en reproduceerbaarheid van veel van de gebruikte technieken (zie onderdeel 1). Bovendien wordt de ATP secretietest relatief vaak aangevraagd bij kinderen, terwijl het net in deze groep zeer moeilijk is om voldoende gegevens (uit literatuur of eigen studies) te bekomen. De onderste referentiewaarde voor de ATP secretietest die momenteel wordt gehanteerd in het UZ Leuven is 1.5 $\mu\text{mol/L}$, gebaseerd op de percentiel 10-waarde van een historisch nazicht van patiëntenresultaten. In de praktijk blijken echter veel kinderen onder deze referentiewaarde te vallen. In dit onderdeel willen we een poging doen om de referentiewaarden voor de ATP secretietest te optimaliseren, specifiek voor kinderen. In 1993 werden vanuit het Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) richtlijnen voor de bepaling van referentiewaarden gepubliceerd: 'Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory', waarvan de laatste update in 2010 verscheen (EP28-A3C).²⁵ We zullen deze verder als leidraad gebruiken.

3.1. Directe methode

Bij de directe methode worden referentiewaarden bepaald door een studie op gezonde vrijwilligers, waarbij de studiep populatie representatief moet zijn voor de algemene populatie waarin de test wordt uitgevoerd. Indien een laboratorium eigen referentiewaarden wil opstellen (volledige 'validatie'), dient men 120 gezonde vrijwilligers te includeren. Gezien dit een grote investering vraagt van tijd en middelen, wordt in de meeste laboratoria enkel een 'verificatie' uitgevoerd van reeds vastgelegde referentiewaarden (gepubliceerde studie of fabrikant-referentiewaarden). Voor een verificatie volstaan 20 gezonde vrijwilligers die de eigen populatie voldoende vertegenwoordigen.

Zeker voor plaatjesfunctietesten is het enorm belangrijk om exclusiecriteria te formuleren (bv. voorgeschiedenis van bloedingen, medicatiegebruik, ...) en rigoureuze de pre-analytische verwerking van de stalen op te volgen (correcte staalafname, transporttijd, centrifugatie, opslag, ...). Verder dient er nagedacht te worden of het nuttig is om de studiep populatie in te delen in subgroepen volgens geslacht, leeftijd, etniciteit, ... ('partitioning'). Indien uit de wetenschappelijke literatuur onvoldoende informatie beschikbaar is over de invloed van bovenstaande factoren, kan beslist worden om pas achteraf ('a posteriori') de subgroepen te formuleren. Indien een volledige validatie wordt uitgevoerd kan er volgens CLSI voor de statistische analyse van de 120 referentieresultaten gekozen worden uit 3 methodes:

1. *Parametrische methode*

Het belangrijkste criterium voor deze methode is dat de resultaten van de studiep populatie (of de mathematische transformatie van deze waarden) normaal verdeeld moeten zijn. Het referentiewaardengebied komt dan overeen met het gemiddelde $\pm$ 2SD.

2. *Non-parametrische methode*

Dit is de aanbevolen methode volgens CLSI in laboratoria met weinig statistische ondersteuning. Het referentiewaardengebied ligt dan tussen het 2.5^e en 97.5^e percentiel. Om op een betrouwbare manier onderscheid te kunnen maken tussen kleine percentielen (bv. 2.5^e versus 5^e percentiel) zijn minimaal 120 resultaten nodig per subgroep. Indien kleinere groepen op een non-parametrische manier geanalyseerd worden, moeten de percentielen aangepast worden naar het aantal geïnccludeerde resultaten.

3. *Robuuste methode*

Deze methode houdt ergens het midden tussen de twee voorgaande en heeft als voordeel dat het kan gebruikt worden bij een niet-normale verdeling én minder dan 120 studiepersonen.

Door de CLSI wordt geen minimum aantal gedefinieerd, maar te weinig gegevens zorgen voor zeer brede betrouwbaarheidsintervallen (CI).

Vaker wordt dus geopteerd voor een verificatie, waarbij men de referentiewaarden van bijvoorbeeld de fabrikant wenst over te nemen en in de eigen laboratoriumomgeving 'verifieert' aan de hand van 20 gezonde vrijwilligers. In het geval van plaatjesfunctietesten is het dikwijls moeilijk om publicaties te vinden met een grondige referentiewaardenstudie én exact dezelfde analysemethode (staalvoorbereiding, reagentia, opstelling toestellen, ...). Van de 20 vrijwilligers mogen er maximum 2 een resultaat opleveren dat zich buiten de referentielimieten bevindt, na exclusie van outliers. Zoniet, moeten andere referentiewaarden uit de literatuur worden gekozen (en geverifieerd) of moeten eigen referentiewaarden worden bekomen (en gevalideerd).

In publicaties omtrent de trombocyten ATP secretie assay, wordt steeds beschreven dat referentiewaarden lokaal bepaald moeten worden. Enkele auteurs vermelden wel de referentiewaarden voor studies die in hun laboratoria werden uitgevoerd, deze zijn van toepassing op een volwassen populatie, er wordt geen verdere onderverdeling gemaakt volgens geslacht of leeftijd.

Harrison et al (2011):²⁰

- ATP inhoud: 41 – 61 nmol/10⁹ trombocyten
- ADP inhoud: 19 – 38 nmol/10⁹ trombocyten
- ATP secretie: **8 – 20 nmol/10⁹ trombocyten**
- ADP secretie: 18 – 28 nmol/10⁹ trombocyten
- ATP/ADP ratio (totaal): 1.24 – 2.56
- ATP/ADP ratio (in releasaat): 0.43 – 0.79

Yardumian et al (1986):²⁶

- ATP secretie: **10.8 – 16.2 nmol/10⁹ trombocyten**
- ADP secretie: 18.6 – 24.8 nmol/10⁹ trombocyten (na stimulatie met 20 µg/mL collageen)

Bijsluiter fabrikant Chrono-log toestel: Figuur 1

In deze tabel wordt de ATP secretie na toevoegen van verschillende agonisten vermeld. In het UZ Leuven wordt voor de routine test enkel collageen (een sterke agonist) gebruikt. 0.74 – 1.92 nmol ATP per 450µL PRP (aan 250 000 bloedplaatjes per µL) komt neer op **6.6 – 17.1 nmol/10⁹ trombocyten**.

Normal Ranges in Platelet Rich Plasma (Mean ± 1 SD) [Guideline only]			
Reagent	Conc.	Agg. (%)	ATP (nmole)
Thrombin	1 Unit	N/A	>0.5
Collagen	2µg/mL	70 - 94	0.74 - 1.92
Arachidonic Acid	0.5 mM	74 - 99**	0.56 - 1.40
ADP	5µM	69 - 88	0.41 - 0.63
	10µM	71 - 88	0.5 - 1.06
Epinephrine	5µM	78 - 88	0.40 - 0.52
Ristocetin	1.25 mg/mL	87-102	N/A

Reference Ranges:

NOTE: The following Normal Ranges were obtained from various laboratories and publications. They should be used as a guideline only. Normal ranges should be established for aggregation and ATP release in each and every laboratory.

(** ± 2 SD)

De onderste referentiewaarde voor de ATP secretietest die momenteel wordt gehanteerd in het UZ Leuven is 1.5 µmol/L. Omgerekend naar 10⁹ bloedplaatjes komt dit neer op **6 nmol/10⁹ bloedplaatjes**, wat dus grotendeels in lijn ligt met de referentiewaarden die in de literatuur worden beschreven.

We besluiten dat een 'validatie' met staalafnames bij 120 gezonde kinderen praktisch niet haalbaar is. Gezien er geen referentiewaarden voor kinderen in de literatuur worden teruggevonden, is het ook niet mogelijk om een kleinere 'verificatie' uit te voeren op stalen van 20 gezonde kinderen.

3.2. Indirecte methode

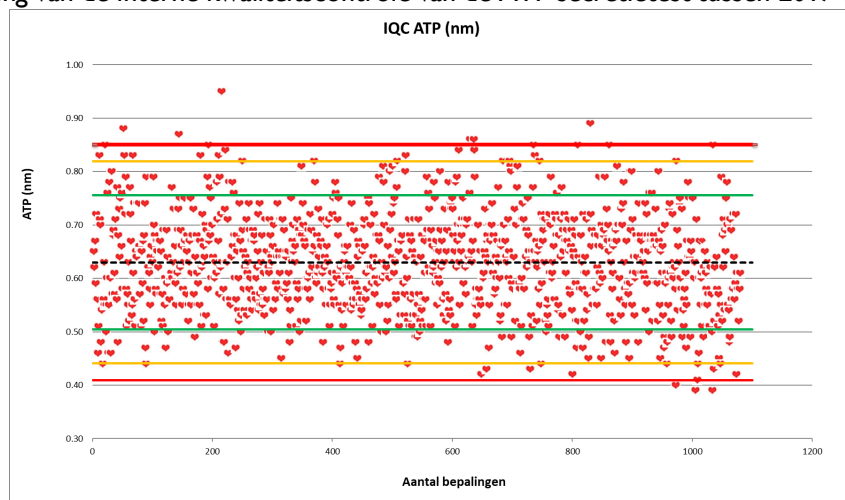
Bij indirecte methodes wordt gebruik gemaakt van 'data mining' waarbij men probeert om met behulp van statistische methodes de referentiewaarden uit een algemene database (bv. het laboratorium informatica systeem (LIS)) te filteren. Het gaat uit van de veronderstelling dat de meeste resultaten (zelfs in een ziekenhuisomgeving) normaal zijn. De CLSI raadt deze methode niet aan als primaire methode voor het bepalen van referentiewaarden, maar het erkent wel de voordelen wanneer het includeren van voldoende representatieve gezonde vrijwilligers moeilijk is, zoals bij kinderen. Sommige studies gebruiken de volledige 'ongefiltreerde' ziekenhuisdatabase als basis voor de statistische analyse. De CLSI geeft de voorkeur aan het gebruik van een 'gefilterde', relatief gezonde populatie, bijvoorbeeld door enkel resultaten van niet-gehospitaliseerde patiënten te includeren zodat zo weinig mogelijk pathogene resultaten de uiteindelijke statistische analyse contamineren. Verder is het belangrijk dat de methode en de patiëntenpopulatie stabiel gebleven zijn over het verloop van de dataverzameling. Na toepassing van exclusie- en subgroepcriteria, raadt de CLSI aan om de statistische technieken beschreven onder punt 3.1. op deze database toe te passen.

Voordelen van de indirecte methodes zijn de lage kostprijs en de relatieve eenvoud. Bovendien zouden de referentiewaarden meer 'waarheidsgetrouw' zijn, gezien ze niet in een gestandaardiseerde experimentele setting werden bekomen, maar over verschillende loten, kalibraties en operators heen. Nadelen zijn de minder goede pre-analytische controle, hoewel ook dit waarschijnlijk beter aansluit bij de dagelijkse realiteit.

3.2.4. Beoordeling stabiliteit analysemethode

Uit nazicht van de methodevalidatie bleken in 2016 nog kleine wijzigingen doorgevoerd te zijn. Er werd dan ook beslist om de dataverzameling te starten vanaf 1 januari 2017 t.e.m. 31 december 2020. De iQC resultaten over het verloop van deze periode zijn vrij stabiel (zie figuur 2). De mediaan was 0.63 in 2017, 0.62 in 2018, 0.64 in 2019 en 0.61 in 2020. De CV over deze periode is 14.8%.

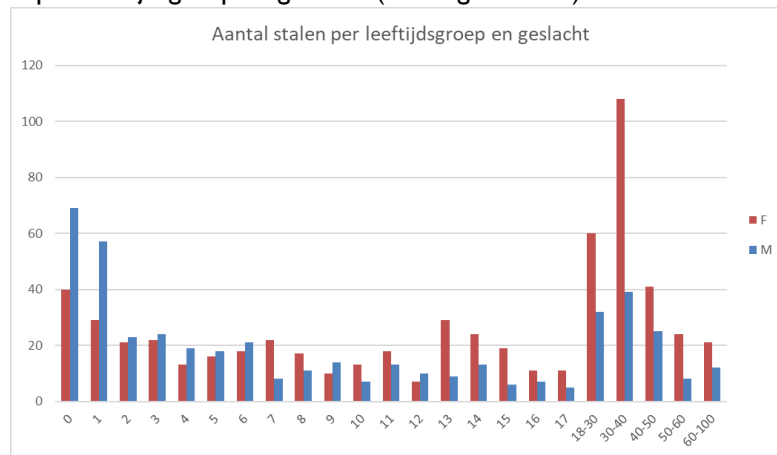
Figuur 2: opvolging van de interne kwaliteitscontrole van de ATP secretietest tussen 2017 en 2020



3.2.5. Beschrijving volledige dataset en beoordeling stabiliteit

Tussen 1 januari 2017 en 31 december 2020 werden 1044 stalen geanalyseerd. 594 stalen (57%) waren afkomstig van vrouwen, 450 (43%) van mannen. De leeftijdsverdeling wordt weergegeven in figuur 3. Het gaat in totaal om 674 kinderen (<18 jaar) en 397 volwassenen. Omdat we specifiek benieuwd zijn naar leeftijdsgebonden verschillen worden kleinere subgroepen getoond in de <18 jaar groep.

Figuur 3: aantal stalen per leeftijdsgroep en geslacht (volledige dataset)

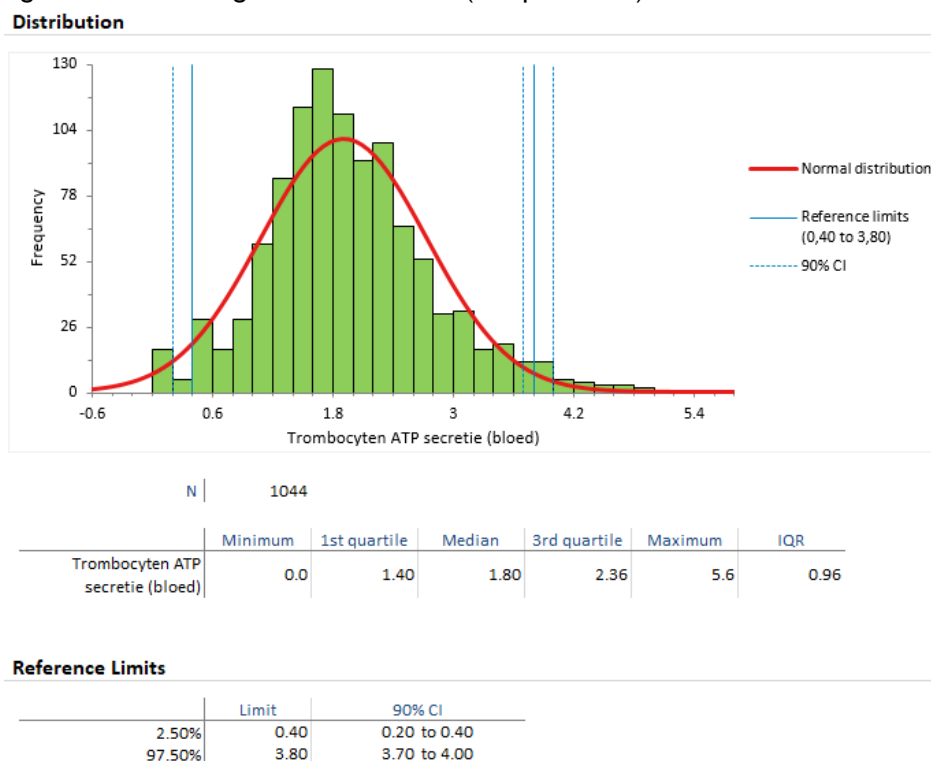


Net zoals de iQC resultaten blijven de mediaan en percentielen van de ATP secretie bij patiëntenstalen over verloop van de dataverzameling vrij constant (tabel 2). Wel valt op dat 1/4^e van de resultaten net op of onder de referentielimiet van het UZ Leuven ligt (1.5 $\mu\text{mol/L}$).

Tabel 2: mediaan en percentielen van de patiëntenresultaten per jaar van 2017 tot 2020 (volledige dataset)

	aantal	minimum	Q1	mediaan	Q3	maximum
2017	265	0.0	1.50	2.00	2.60	5.6
2018	276	0.0	1.40	1.70	2.10	5.2
2019	264	0.1	1.50	1.90	2.40	4.5
2020	239	0.0	1.30	1.80	2.30	4.6

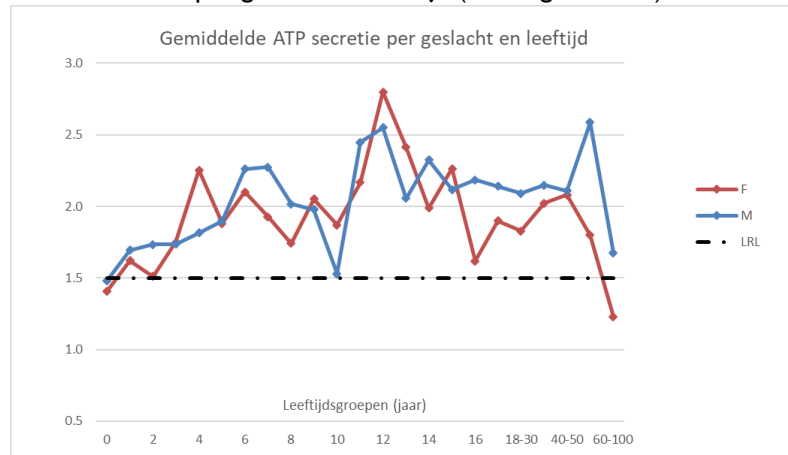
Dit zien we ook als we kijken naar het histogram van de volledige dataset (zie figuur 4). Er is geen normale verdeling (Shapiro-Wilk test), als we dus hierop de referentiewaarden non-parametrisch berekenen komt de onderste referentiewaarde (2.5^e percentiel) op 0.40 $\mu\text{mol/L}$ PRP te liggen (90% CI 0.20 -0.40). Ook de 10^e percentiel (1.0 $\mu\text{mol/L}$) ligt in deze dataset een stuk lager dan de referentielimiet die momenteel wordt gehanteerd. We weerhouden twee hypothesen om dit te verklaren: 1) er zijn te veel pathologische resultaten geïnccludeerd in de dataset; 2) de huidige referentiewaarden zijn niet van toepassing op de volledige populatie (invloed van leeftijd of geslacht).

Figuur 4: histogram en berekening referentielimieten (2.5^e percentiel)

3.2.6. Subgroep analyse

Als we kijken naar de gemiddelde ATP secretie per geslacht en leeftijdscategorie over de volledige dataset zien we lagere gemiddeldes bij patiënten onder de 3 jaar (90 meisjes, 149 jongens) en boven de 60 jaar (21 vrouwen, 12 mannen), cfr. figuur 5. Geslacht heeft over het algemeen geen duidelijke invloed op de gemiddelde ATP secretie. Indien de lagere gemiddeldes ook in de 'gefilterde' data naar boven komen, kan het interessant zijn om aparte referentiewaarden te berekenen voor de jongere kinderen.

Figuur 5: Gemiddelde ATP secretie per geslacht en leeftijd (volledige dataset)



3.2.7. Exclusie strategie

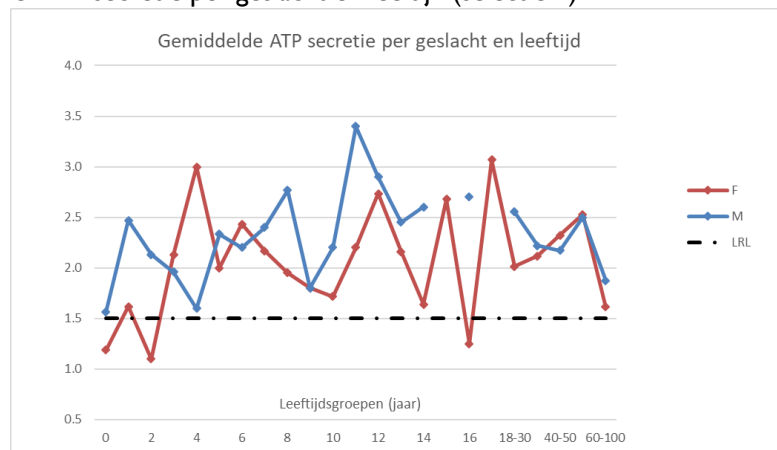
In de literatuur worden verschillende exclusie-strategieën beschreven om uit een dataset de meest 'normale' resultaten te filteren.^{27,28} Enkele hiervan zullen we toepassen op onze dataset.

Selectie I (meest strikte exclusiecriteria)

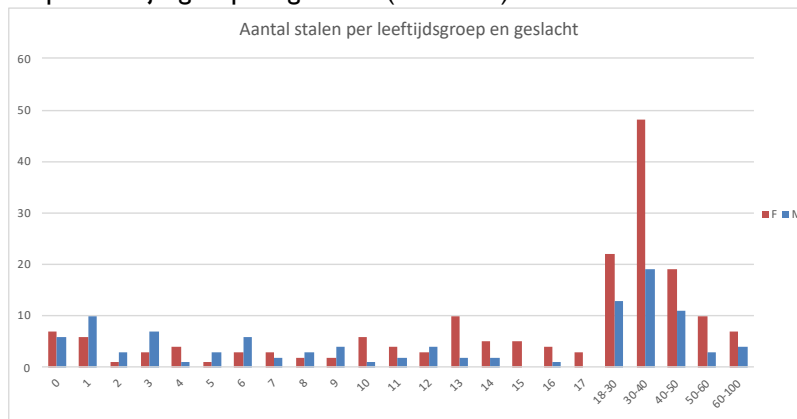
overgebleven stalen

Exclusie patiënten met >1 staalafname	760
Exclusie patiënten met afwijkende LTA	508
Exclusie patiënten met afwijkend aantal bloedplaatjes	484
Exclusie verlengde PFA	427
Exclusie verlengde aPTT	393
Exclusie verlengde PT	286
Exclusie ATP secretie < 0.15	285

Figuur 6: Gemiddelde ATP secretie per geslacht en leeftijd (selectie I)



Figuur 7: aantal stalen per leeftijdsgroep en geslacht (selectie 1)



Bij gebruik van zeer strikte exclusiecriteria, vallen veel stalen af (zeker bij de groep < 18 jaar). De gemiddeldes zijn dus berekend op een veel lager aantal patiënten. Wel zien we in deze 'gezonde' populatie ongeveer hetzelfde patroon terugkomen als we kijken naar de gemiddelde ATP secretie per leeftijdsgroep.

Selectie 2

overgebleven stalen

Enkel laatste staal van patiënten met meerdere staalafnames

891

Exclusie patiënten met afwijkende LTA

594

Exclusie patiënten met afwijkend aantal bloedplaatjes

564

Exclusie verlengde PFA

507

Exclusie verlengde aPTT

469

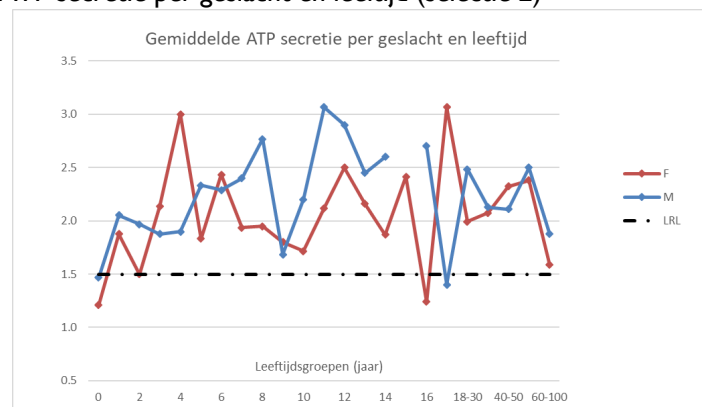
Exclusie verlengde PT

349

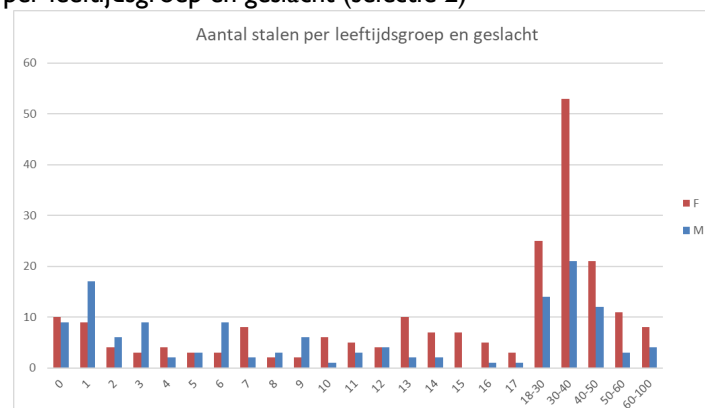
Exclusie ATP secretie < 0.15

347

Figuur 8: Gemiddelde ATP secretie per geslacht en leeftijd (selectie 2)



Figuur 9: aantal stalen per leeftijdsgroep en geslacht (selectie 2)



Selectie 3

Enkel laatste staal van patiënten met meerdere staalafnames

Exclusie patiënten met afwijkende LTA

Exclusie verlengde PFA

Exclusie ATP secretie < 0.15

overgebleven stalen

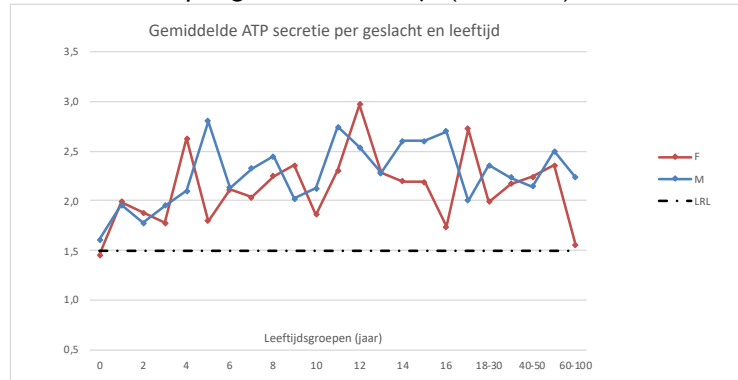
891

594

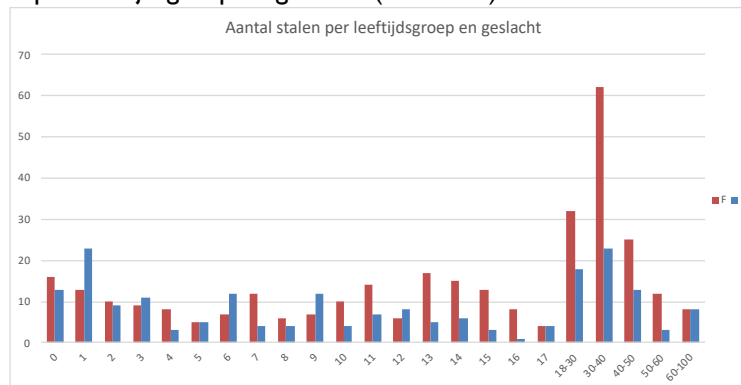
519

518

Figuur 10: Gemiddelde ATP secretie per geslacht en leeftijd (selectie 3)

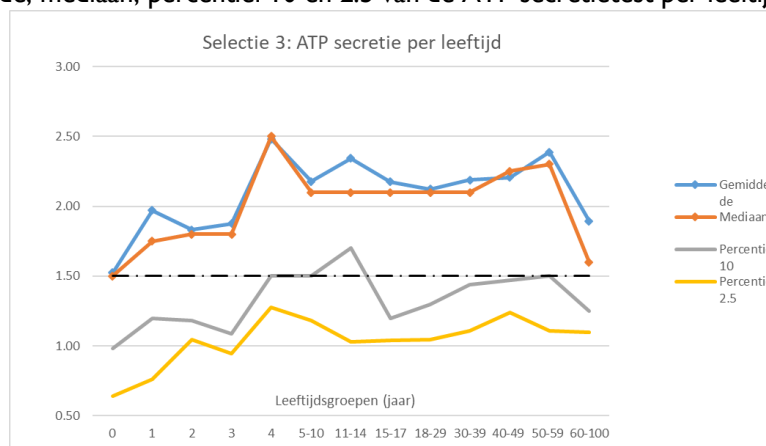


Figuur 11: aantal stalen per leeftijdsgroep en geslacht (selectie 3)



Ook bij gebruik van minder strikte exclusiecriteria (dataset wordt theoretisch meer gecontamineerd door 'zieken', zie selectie 2 en 3) blijft hetzelfde patroon terugkomen. Als we de stalen uit selectie 3 (518 stalen) verdelen in iets grotere leeftijdsgroepen en hierop de mediaan en percentielen bereken komen we op volgende grafiek uit.

Figuur 12: gemiddelde, mediaan, percentiel 10 en 2.5 van de ATP secretietest per leeftijdsgroep (selectie 3)



Als we de formule van Harris en Boyd toepassen op de subcategorieën 0, 1, 2 en 3 jaar in vergelijking met de subcategorie 18-29 jaar, moet er volgens de 'partition criteria' van Harris en Boyd op leeftijd gedifferentieerd worden.²⁹ Daarnaast merken we op dat de huidige onderste referentielimiet (stippellijn)

voor meer dan de helft van de geïncludeerde dataset (288 van de 518 patiënten) te hoog ligt, zelfs indien met de percentiel 10 rekening wordt gehouden.

3.3. Conclusie referentiewaarden

Op basis van bovenstaande data kunnen we twee conclusies trekken:

- Momenteel worden vermoedelijk over het algemeen te veel patiënten als pathologisch bestempeld, terwijl de ATP secretie volgens onze analyses nog binnen de te verwachten waarden ligt. Vanaf de leeftijd van 5 jaar zou op basis van onze dataset de onderste referentielimiet (percentiel 2.5) van de ATP secretietest op $1.10 \mu\text{mol/L}$ moeten liggen.
- De referentiewaarden moeten aangepast worden voor kinderen jonger dan 5 jaar. Onze database bevat echter te weinig ('gezonde') stalen om per leeftijdscategorie op een correcte manier referentiewaarden te bepalen. We zullen dus in overleg gaan met de pediaters om tot een duidelijke manier van rapportering te komen: extra toelichting op het rapport, standaard advies voor opvolgstaal en confirmatietest indien persisterend laag,?

4. Optimalisatie van IPSD diagnostiek in ons laboratorium:

Kunnen we de ATP secretietest (mits enkele aanpassingen) ook gebruiken om de inhoud van de trombocytengranulen te controleren?

4.1 Materiaal en methodes

4.1.1 *Toestel en reagens*

Er wordt gebruik gemaakt van een lumino-aggregometer ontwikkeld door Chrono-log (model 700), de basisprincipes van deze test staan beschreven in deel I (punt 1.2, B). Het bijgeleverde Chrono-lume reagens bestaat uit een gelyofyliseerd mengsel van 0.2mg luciferine, 22000 units d-luciferase, magnesiumsulfaat, humaan serumalbumine, stabilisator en buffer dat dient opgelost te worden in 1.25 mL water. Het zwakke lichtsignaal dat geproduceerd wordt in de luciferin-luciferase reactie, wordt in een fotomultiplicator in het toestel geamplificeerd, waardoor een zeer gevoelige meting mogelijk is. Met behulp van de 'gain' functie op het toestel kan de gevoeligheid van de meting aangepast worden. Standaard staat de gain voor meting in PRP ingesteld op de laagste gevoeligheid (instructies fabrikant): namelijk $\times 0.005$, maar deze kan verhoogd worden tot $\times 2$.

4.1.2 *Voorbereiding PRP en PPP*

De citraat-tube wordt gecentrifugeerd aan 150g gedurende 15 minuten. Het supernatans (plaatjesrijk plasma, PRP) wordt overgepipetteerd en het trombocytenaantal wordt geteld m.b.v. de Sysmex celteller (XN-9100). Het resterende sediment wordt opnieuw gecentrifugeerd, deze maal aan 2000g gedurende 15 minuten. Het supernatans (= plaatjesarm plasma, PPP) wordt voor de verdere experimenten gebruikt als blanco (al dan niet na extractie) én om het PRP te verdunnen tot een gestandaardiseerd trombocytenaantal van $250\,000/\mu\text{L}$ (indien nodig).

4.1.3 *ATP secretietest (procedure UZ Leuven)*

- Incubatie:
In drie glazen testcuvetten met rotor-magneetje wordt telkens $450\mu\text{L}$ PRP gepipetteerd. Eén testcuvet (zonder magneet) wordt gevuld met $500\mu\text{L}$ PPP. Alle testcuvetten worden geïncubeerd op 37°C gedurende minimaal 3 minuten in de incubatieposities op het toestel.
- PPP cuvet wordt in blancopositie gezet.
- Opmaak standaardcurve:
 $50\mu\text{L}$ Chrono-Lume wordt toegevoegd aan de testcuvet met PRP. Vervolgens wordt de testcuvet in het donker geïncubeerd en wordt de meting gestart. Er wordt gedurende 1 minuut geobserveerd of een stabiele basismeting ('baseline') wordt bekomen. Na 1 minuut wordt $5\mu\text{L}$ ATP standaard ($0.4 \mu\text{mol/mL}$) in de testcuvet gepipetteerd. De bekomen amplitude moet tussen de 20% en 60% liggen en wordt gelijkgesteld aan 2 nmol. Indien de amplitude lager dan 20% is, kan m.b.v. de gain functie op het toestel de gevoeligheid van de meting aangepast worden. Dit dient te gebeuren wanneer de piek van de reactie net bereikt is, juist voor deze opnieuw begint te zakken. Belangrijk is dat de ingestelde gain ook verder gebruikt wordt voor de meting van kwaliteitscontrole en patiëntenstalen.

- **iQC meting:**
Het ATP controlemateriaal wordt gemaakt door het 1/3 verdunnen van de ATP standaard in een 0.9% NaCl oplossing tot een concentratie van 0.13 $\mu\text{mol/mL}$. Het verdere verloop is gelijkaardig aan de opmaak van de standaardcurve, alleen wordt 5 μL ATP controle toegevoegd in plaats van de ATP standaard. De bekomen amplitude zou theoretisch moeten overeenkomen met +/- 0.65 nmol. Voor opvolging wordt als Xref 0.63 nmol ingesteld, de onderste en bovenste 3.5 SD limieten liggen op respectievelijk 0.41 en 0.85 nmol.
- **Analyse patiëntenstaal:**
50 μL Chrono-lume wordt toegevoegd aan de testcuvet met PRP. Vervolgens wordt de testcuvet in het donker geïncubeerd en wordt de meting gestart. Er wordt gedurende 1 minuut geobserveerd of een stabiele basismeting ('baseline') wordt bekomen. Na 1 minuut wordt 5 μL collageen (200 $\mu\text{g} / \text{mL}$) in de testcuvet gepipetteerd. De bekomen amplitude wordt afgelezen in nmol ten opzichte van de standaardcurve. Nadien volgt een omzetting naar aantal μmol per liter PRP. De meting wordt herhaald indien het resultaat kleiner is dan 1.5 $\mu\text{mol/L}$ (komt ongeveer overeen met meting van 0.75 nmol).

4.1.4 Meting van ATP inhoud (nieuwe procedure)

- **Verwacht meetbereik volgens literatuur:** zie onderdeel 3 van deze CAT.
- **Bereiding nucleotide-extract:**
Op basis van een literatuurnazicht en instructies aangeleverd door de firma werd een procedure opgesteld voor extractie van ADP en ATP uit PRP.^{19,30-33} Dezelfde procedure werd gevolgd met PPP om als blanco te dienen.
 - 500 μL PRP/PPP + 450 μL 96% ethanol + 50 μL 0,1 mol/L EDTA pH 7.4 (ijskoud)
 - 10 seconden mengen
 - centrifugeren op 17000g gedurende 10 minuten op 4°C
 - supernatans afgieten en op ijs plaatsen of invriezen (-25°C) tot analyse
- **Optimalisatie testprocedure:**
Opnieuw werd op zoek gegaan in de literatuur naar testprocedures die haalbaar waren om uit te voeren met de lumino-aggregometer van Chrono-log.^{19,30-34} Om de testprocedure te optimaliseren werden enkele experimenten opgezet waarbij gebruik wordt gemaakt van (gespiket) PPP extract of PRP extract, onverdund of verdund in PBS / Tris-HCl buffer in glazen testcuvetten met rotormagneet. De testprocedure is gelijkaardig aan deze van de ATP secretietest:
 - Alle testcuvetten worden geïncubeerd op 37°C gedurende minimaal 3 minuten in de incubatieposities op het toestel.
 - De testcuvet wordt in het toestel in het donker geïncubeerd en de meting wordt gestart.
 - Er wordt gedurende 1 minuut geobserveerd of een stabiele basismeting wordt bekomen.
 - Na 1 minuut wordt 50 μL Chrono-lume in de testcuvet gepipetteerd.
- **Bepaling reproduceerbaarheid.**
De ontwikkelde analyse werd onderworpen aan een reproduceerbaarheidsexperiment. Door PPP extract aliquots te spiken met verschillende concentraties ATP en vervolgens de analyse minimaal 3 keer te herhalen op elk ATP-niveau krijgen we een indruk van de reproduceerbaarheid over het volledige meetbereik. Ook PRP extracten werden minimaal 3 keer achtereenvolgens geanalyseerd om eventuele variatie eigen aan de PRP matrix te identificeren. Door de testcondities aan te passen werd vervolgens geprobeerd om de reproduceerbaarheid van de test te verhogen zodat deze geschikt zou zijn voor klinisch gebruik.

4.2 Resultaten en discussie

4.2.1. Optimalisatie testprocedure

Experiment 1:

In een piloot experiment waarin ATP toegevoegd werd aan een PPP extract was ATP bijna ondetecteerbaar, zelfs met het verhogen van de gain. Verdunningen van zowel extract PRP als gespiket extract PPP in PBS (1/2 tot 1/64) zorgen voor steeds hogere amplitudes tot zelfs boven het meetbereik.

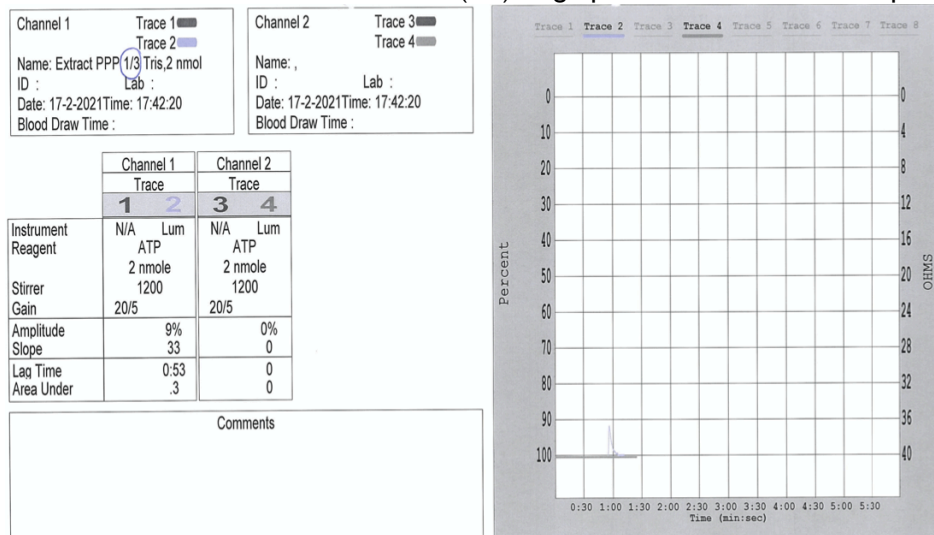
Twee hypothesen werden weerhouden om deze resultaten te verklaren:

- 1) Aanwezige EDTA capteert Mg^{2+} nodig voor luciferin-luciferase reactie.
- 2) Turbiditeit van extract zorgt voor interferentie zodat het geproduceerde licht onvoldoende geamplificeerd kan worden in de fotomultiplicator.

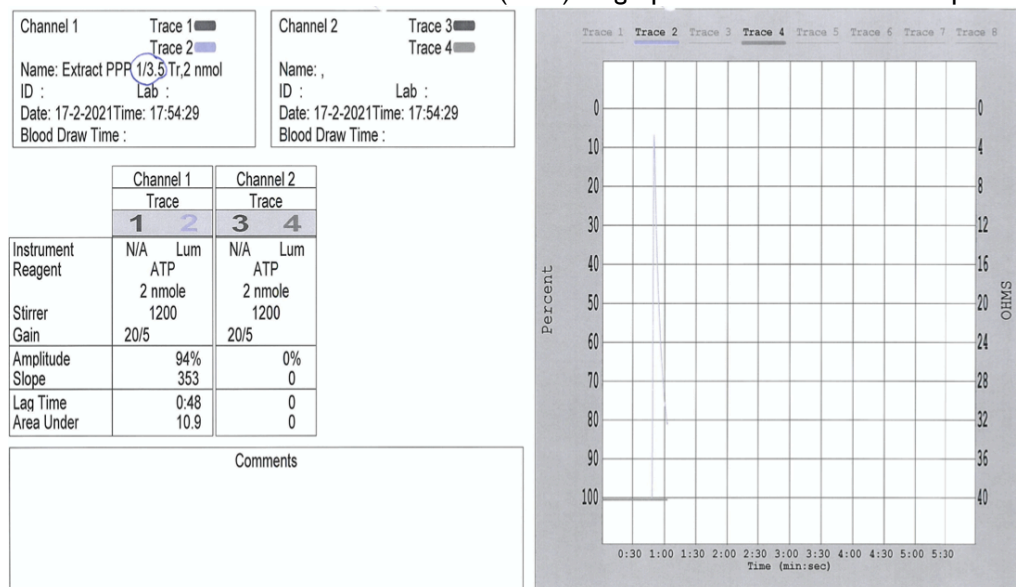
Experiment 2:

In dit experiment werd PPP extract verdund met Tris-HCl buffer met $MgCl_2$ (1/2 tot 1/8) en gespiket met 2 nmol ATP. Bij een 1/2 verdunning kon geen ATP gedetecteerd worden. Zoals bij experiment 1 zorgen verdere verdunningen voor steeds hogere amplitudes tot (ver) boven het meetbereik. Het is opvallend dat er grote sprongen zijn in de ATP meting met kleine verschillen in verdunning, zie figuur 13 en 14.

Figuur 13: PPP extract verdund met Tris-HCl buffer (1/3) en gespiket met 2 nmol ATP: amplitude 9%



Figuur 14: PPP extract verdund met Tris-HCl buffer (1/3.5) en gespiket met 2 nmol ATP: amplitude 94%



We zien dus gelijkaardige resultaten als bij gebruik van PBS voor verdunningen: vermoedelijk ligt een factor turbiditeit aan de basis van de interferentie. De 'ideale' verdunning voor het beoogde meetbereik lijkt tussen 1/3 en 1/4 te liggen. Gezien voor de omzetting van ADP in ATP m.b.v. de phosphoenolpyruvaat - pyruvaatkinase reactie ook gebruik wordt gemaakt van een Tris-HCl buffer met $MgCl_2$ (en KCl), wordt er voor de bepaling van de reproduceerbaarheid verder gegaan met deze buffer in een 1/3.5 verhouding (130 μ L extract PPP/PRP verdund met 320 μ L Tris-HCl buffer). Het verwacht meetbereik ATP in 130 μ L extract PRP (20.31×10^6 trombocyten) is 0.833 – 1.239 nmol ATP.

4.2.2. Reproduceerbaarheid

Experiment 1:

Blanco PPP extract, 1 pool met 2 nmol ATP gespiket PPP extract en 1 pool PRP extract worden in 3 x 3 testcuvetten 1/3.5 verdund in Tris-HCl buffer achtereenvolgens geanalyseerd volgens de procedure beschreven onder punt 4.1.4. In het blanco PPP extract werd geen ATP gemeten. Voor het met 2 nmol ATP gespiket PPP extract was de gemiddelde amplitude 63% met een variatiecoëfficiënt (CV) van 76%. Het PRP extract gaf een gemiddelde amplitude van 21% met een CV van 80%.

Drie hypothesen werden weerhouden om deze slechte reproduceerbaarheid te verklaren:

1) Pipetteerfouten

Bij het spiken worden zeer kleine volumes aan ATP toegevoegd, dus is er een grote marge voor fouten. Ook het pipetteren van Chrono-lume in de testcuvet is delicaat gezien dit moet gebeuren op het moment dat de cuvet reeds in het toestel staat en de zichtbaarheid van het vloeistofniveau en de rotor-magneet beperkt is.

2) Krasjes en vingerafdrukken op de testcuvetten kunnen het geproduceerde licht in die mate verstrooien dat er een sterke variatie optreedt in de gemeten lichtintensiteit.

Bij de volgende experimenten wordt er extra aandacht besteed aan het afvegen van de testcuvetten vooraleer ze in het toestel worden geplaatst.

3) Temperatuurvariatie

- Chrono-lume wordt op een koelelement geplaatst tijdens analyse: hoe langer op het koelelement en hoe leger het flesje hoe lager de temperatuur van het reagens vermoedelijk wordt. De optimale temperatuur voor de luciferin-luciferase reactie is lager dan 37°C, wat dus zou resulteren in een grotere lichtproductie bij dezelfde ATP concentratie.
- De PPP en PRP extracten wordt bewaard op ijs en worden net voor analyse 3 minuten geïncubeerd op 37°C. Indien iets langer of iets korter geïncubeerd wordt, kunnen grote temperatuurverschillen ontstaan.

Bij de volgende experimenten wordt er extra aandacht besteed aan het systematisch op dezelfde manier pipetteren (afvegen pipetpunt, tot aan 1^e stop pipetteren en tegen rand van testcuvet laten afglijden, zo weinig mogelijk luchtbelletjes, ...), het schoonvegen van de testcuvetten en het standaardiseren van de temperatuur (op ijs / op kamertemperatuur / op 37°C / volgorde van pipetteren / ...).

Experiment 2:

Een pool met 2 nmol gespiket PPP extract wordt op ijs gezet. Chrono-lume wordt op kamertemperatuur gebracht. De testcuvet wordt gevuld met Tris-HCl buffer en Chrono-lume. Direct nadien wordt deze in het donker gedurende 2 minuten op 37°C in het toestel geïncubeerd en wordt de meting gestart. Na 2 minuten wordt het (ijskoude) extract toegevoegd. Deze meting werd 4 maal herhaald met een gemiddelde amplitude van 41% en CV van 13%.

We weerhouden een betere reproduceerbaarheid, maar merken wel op dat de gemiddelde amplitude lager ligt dan bij experiment 1. Mogelijk is dit nog te wijten aan een dag tot dag variatie van het toestel, maar een temperatuur effect behoort ook tot de mogelijkheden.

Experiment 3:

Idem als experiment 2, maar het gespiket PPP extract wordt gedurende 2 minuten in warmwaterbad op 37°C geplaatst vooraleer toe te voegen aan de testcuvet. Als controle analyse wordt een aliquot na opwarming tot 37°C gedurende 2 minuten opnieuw afgekoeld door op ijs te plaatsen vooraleer toe te voegen aan testcuvet. De meting met het PPP extract op 37°C werd 4 maal herhaald en gaf een

gemiddelde amplitude van 4% met een CV van 108%. Het aliquot dat als controle na opwarming opnieuw werd afgekoeld in ijs gaf een amplitude van 105%.

We weerhouden dat de analyse zeer sterk beïnvloed wordt door de temperatuur in de testcuvet. Dit wordt ook bevestigd in de literatuur.³⁵ Vermoedelijk speelt er ook een factor toestelgebonden, analytische variabiliteit mee gezien de amplitude van de meting na afkoeling op ijs (105%) meer dan dubbel zo hoog ligt als de gemiddelde amplitude bij experiment 2 (onder dezelfde temperaturomstandigheden).

Experiment 4:

Idem als experiment 2, maar met vier verschillende pools gespiket PPP extract (0,32 / 0,65 / 1 / 1,5 nmol ATP). We zien dat de CV over de verschillende niveaus heen varieert tussen de 17% en 40%.

	niveau 0.32 nmol		niveau 0.65 nmol		niveau 1 nmol		niveau 1.5 nmol	
meting 1	25%	0,48	30%	0,57	61%	1,16	85%	1,62
meting 2	12%	0,23	42%	0,80	48%	0,91	78%	1,49
meting 3	15%	0,29	38%	0,72	25%	0,48	39%	0,74
mean	18%	0,33	37%	0,70	45%	0,85	67%	1,28
SD	0,07		0,06		0,18		0,25	
CV	39%		17%		40%		37%	

Er wordt nog een laatste poging gedaan om de reproduceerbaarheid te verbeteren door eerst Tris-HCl buffer met het gespiket PPP extract te incuberen en na 2 minuten (ijskoude) Chrono-lume toe te voegen. Door op het moment van meting een kleiner volume (50µL in plaats van 130µL) toe te voegen, hopen we een stabielere meting te krijgen.

Experiment 5:

Vier verschillende pools gespiket PPP extract (0,32 / 0,65 / 1 / 1,5 nmol ATP) worden op ijs gezet. Chrono-lume wordt bij dit experiment ook op ijs gezet. De testcuvet wordt gevuld met Tris-HCl buffer en PPP extract. Direct nadien wordt deze in het donker gedurende 2 minuten op 37°C in het toestel geïncubeerd en wordt de meting gestart. Na 2 minuten wordt de (ijskoude) Chrono-lume toegevoegd. We zien dat de CV over de verschillende niveaus heen varieert tussen de 8% en 29%.

	niveau 0.32 nmol		niveau 0.65 nmol		niveau 1 nmol		niveau 1.5 nmol	
meting 1	14%	0,25	49%	0,87	70%	1,24	98%	1,73
meting 2	20%	0,35	46%	0,81	41%	0,73	113%	2
meting 3	13%	0,23	42%	0,74	74%	1,31	> 113%	N.B.
mean	16%	0,28	46%	0,81	62%	1,09	N.B.	N.B.
SD	0,04		0,04		0,18		N.B.	
CV	23%		8%		29%		N.B.	

4.3 Conclusie ATP-inhoud test:

Door het bereiden van een nucleotide-extract uit PRP is het mogelijk om de ATP-inhoud van de bloedplaatjes te meten op het Chrono-log toestel, dat momenteel reeds gebruikt wordt voor de ATP secretie assay. Het PRP extract heeft een andere consistentie en lichtdoorlaatbaarheid in vergelijking met onbehandeld PRP waardoor de testprocedure aangepast moest worden. Er werd geopteerd om te werken met een verdunning in Tris-HCl buffer. Door in te grijpen op de temperatuur van extract / reagens en de volgorde van pipetteren, kon de variabiliteit van onze testprocedure naar beneden worden gehaald. We zien echter dat de analytische variatie met de vooropgestelde testprocedure, zelfs onder ideale experimentele omstandigheden, te hoog blijft voor adequaat gebruik in de kliniek. Er zal overlegd worden met de firma of verdere op puntstelling mogelijk is, indien niet kan geopteerd worden voor overschakeling naar een op HPLC gebaseerde methode of breder gebruik van elektronenmicroscopie.

To do/ACTIES

- 1) Informeren van de clinici (bijvoorbeeld via de labogids) over de lage sensitiviteit van lichtmicroscopie, PFA en LTA bij de diagnostiek van IPSDs, zodat zij gericht de ATP secretietest, elektronenmicroscopie en/of genetische diagnostiek kunnen aanvragen bij verdachte patiënten.
- 2) Aanpassing van de referentiewaarden van de ATP secretietest bij patiënten vanaf 5 jaar. Bij voorkeur worden de in deze CAT berekende referentiewaarden nog getoetst bij een 20-tal gezonde vrijwilligers.
- 3) In overleg gaan met de pediaters omtrent de ATP secretietest bij kinderen onder de 5 jaar zodat de rapportering geoptimaliseerd kan worden.
- 4) Verdere oppuntstelling van de ATP inhoud test op het Chrono-log toestel. Indien geen verdere optimalisatie mogelijk is, moet een op HPLC gebaseerde methode of breder gebruik van elektronenmicroscopie overwogen worden.

BIJLAGENBijlage 1: vanuit Gresele et al, 2018.³**TABLE 2** Inherited platelet function disorders (IPFDs): a revised classification

	Structural defect	Mutated gene
1- Abnormalities of adhesive protein receptors		
Glanzmann thrombasthenia	$\alpha_{IIb}\beta_3$	ITGA2B, ITGB3
Bernard Soulier syndrome	GP1b/IX/V	GP1BA, GP1BB, GP9
Platelet-type VWD	GP1b/IX/V	GP1BA
22q11.2 deletion syndrome	GP1b/IX/V	del22q11.2
Defects of collagen receptors	$\alpha_2\beta_1$, GPVI	ND, GP6
2- Abnormalities of G protein-coupled receptors		
Defect of the TP receptor	TxA2 receptor	TBXA2R
Defect of the P2 Purinergic Receptors	P2Y ₁₂ receptor	P2RY12
3- Defects of platelet granules (isolated/syndromic)		
α -granules		
Gray platelet syndrome (GPS)	Primary protein abnormality unknown	NBEAL2
Arthrogryposis, renal dysfunction, and Cholestasis (ARC) syndrome	Protein required for vesicle trafficking and fusion and for platelet α -granule biogenesis	VPS33B, VIPAS39
Paris-Trousseau syndrome	Primary protein abnormality unknown	Del11q23 (FLI1)
δ -granules		
Hermansky-Pudlak syndrome	Proteins involved in vesicle formation and trafficking	HPS1, AP32B1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DTNBP1, BLOC1S3, PLDN, HPS10
Chediak-Higashi syndrome		LYST
Isolated δ -storage pool deficiency	Deficiency of δ -granules	ND
SLFN14 related thrombocytopenia	Primary protein abnormality unknown	SLFN14
α / δ storage pool deficiency	Deficiency of platelet α - and δ -granules	ND
4- Signal transduction proteins defects		
Cytosolic phospholipase A _{2a} defect	PLA2 enzyme	PLA2G4A
Cyclo-oxygenase 1 deficiency	COX-1 enzyme	ND
Thromboxane synthase deficiency	Tx synthase enzyme	TBXAS1
Phospholipase C deficiency	PLC- β 2	ND
PKA defect	cAMP-dependent protein kinase A	PRKAGG
G proteins defects	G α s protein	GNAS/ RGS2
Leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III)	Kindlin-3	FERMT3
CalDAG-GEFI defect	Guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rap1	RASGRP2
Src defect	Tyrosine kinase Src	SRC
5- Defects of transcription factors		
Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (FPD/AML)	Haematopoietic transcription factor	RUNX1
FLI1-related δ granule defect	Haematopoietic transcription factor	FLI1 (SVNs)
GATA1-defect	Haematopoietic transcription factor	GATA1
GFI1B-related defect	Haematopoietic transcription factor	GFI1B
6- Defects of cytoskeletal proteins		
Wiskott-Aldrich Syndrome/XLT	WASP	WAS
ADAP defect	Adhesion and degranulation-promoting adaptor protein	FYB
Filamin A defects	Filamin A	FLNA

(Continues)

Bijlage 1: vervolg**TABLE 2** (Continued)

	Structural defect	Mutated gene
7- Defects of membrane phospholipids		
Scott's syndrome	Transmembrane protein 16F (Ca ²⁺ -activated chloride channel)	TMEM16F
Stormorken syndrome	Ca ²⁺ sensor in the endoplasmic reticulum	STIM1, ORAI1
8- Enhanced platelet fibrinolytic activity		
Quebec platelet disorder	Urokinase-type activator	PLAU (duplication)
9- Unclassified		
Primary secretion defect	Primary protein abnormality unknown	ND

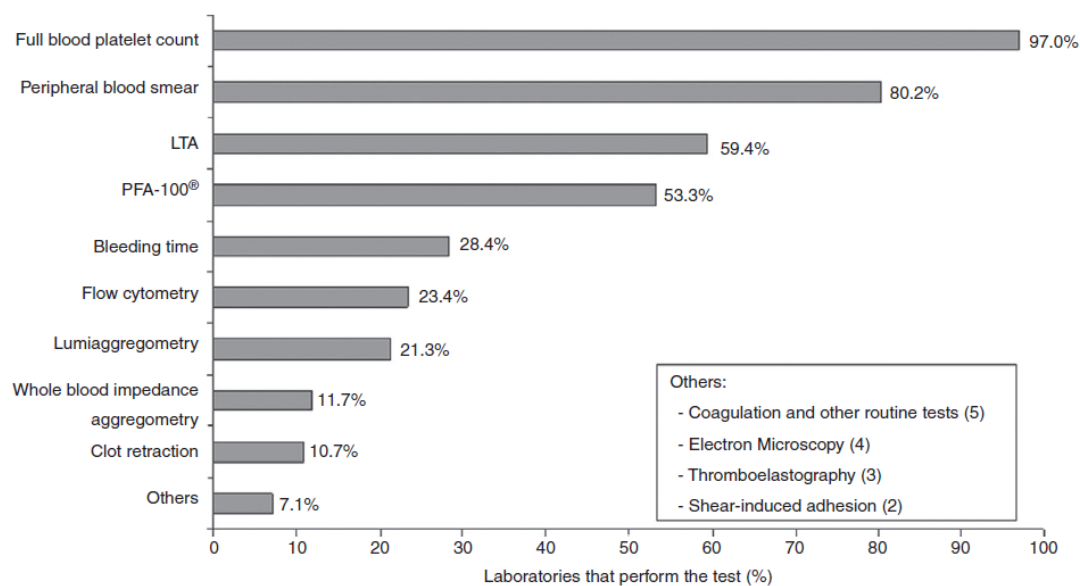
Bijlage 2: vanuit Gresele et al, 2014.⁶

Fig. 3. First-step laboratory tests used in the approach to patients with a suspected inherited platelet function disorder (IPFD), in order of frequency (No. of respondents: 197/202, 97.5%). Others (i.e. first-step laboratory tests used by < 5% of respondents) are reported in the inset indicating the number of respondents. LTA, light transmission aggregometer; PFA-100®, Platelet Function Analyzer-100®.

Bijlage 3: Overzicht van kliniek en diagnostiek voor de meest voorkomende IPSDs.^{3-5,23,24}

	Structureel defect	Bloeding	Andere symptomen	Bloedplaatjestelling	Morfologie (LM)	Morfologie (TEM)	Granule-inhoud	Granule-secretie	LTA	Flowcytometrie	Genetica
Defecten van receptoren die instaan voor adhesie											
Defect van de collageen receptoren	$\alpha 2\beta 1$ of GPVI	variabel	geen	normaal of milde trombocytopenie	normaal of macrothrombocyten	normaal	normaal	verminderd bij gebruik collageen	verminderde aggregatie op collageen, CRP en convulxine	Gpla/IIa ($\alpha 2\beta 1$) of GPVI deficiëntie	AD; ongekend / AR; GP6
Defecten van G-proteïne gekoppelde receptoren											
Defect van de tromboxaan receptor	TxA2 receptor	mild	geen	normaal	normaal	normaal	normaal	verminderd bij gebruik agonisten LTA	afwezige of ernstig verstoorde respons op arachidonzuur en TxA2 analogen (bv. U46619); verminderde aggregatie op collageen en afwezige secundaire golf na stimulatie met ADP of epinephrine; normale respons op thrombine	normaal	AD; TBXA2R gen
Deficiëntie van plaatjesgranulen											
α -SPD (storage pool disease)											
Gray Platelet Syndrome (GPS)	neurobeachin-like 2 (NBEAL-2) proteïne: belangrijk bij vesikel transport	mild tot matig	splenomegalie	milde trombocytopenie	macrothrombocyten, grijze of bleke plaatjes ('ghost-like'), hypogranulatie van de neutrofielen, dyserythropoïese	sterk verlaagd aantal / afwezige α granulen	afwezige α granulen	geen vrijzetting van inhoud α granulen	variabel; kan normaal zijn, maar verminderde aggregatie op thrombine, collageen en TRAP-6 wordt beschreven	P-selectine kan verlaagd zijn (maar niet altijd)	AR/AD; NBEAL2 of GF11B
Arthrogryposis, renal dysfunction and cholestasis (ARC) syndrome	eiwit die instaat voor transport/fusie van vesikels en biogenese van α granulen.	ernstig	multisysteemziekte: neonatale cholestase, nierfalen en arthrogryposis, failure to thrive, meestal overlijden <1j.	verlaagd	macrothrombocyten grijze of bleke plaatjes hypogranulatie van de neutrofielen	afwezige α granulen	afwezige α granulen	geen vrijzetting van inhoud α granulen	meestal normaal; verminderde aggregatie op ADP beschreven	P-selectine meestal sterk verlaagd (maar niet altijd)	AR; VPS33B of VIPAS39
Paris-Trousseau syndroom	primair eiwit defect ongekend	mild	soms verstandelijke beperking, dysmorfismen en cardiale / renale / gastro-intestinale afwijkingen	matige tot ernstige trombocytopenie	macrothrombocyten	reuze α granulen	normaal	geen vrijzetting van inhoud α granulen na stimulatie met thrombine	normaal	normaal	FLU1 gen (del11q23)

Bijlage 3: vervolg

	Structureel defect	Bloeding	Andere symptomen	Bloedplaatjestelling	Morfologie (LM)	Morfologie (TEM)	Granule-inhoud	Granule-secretie	LTA	Flowcytometrie	Genetica
δ-SPD											
Hermansky-Pudlak syndroom (HPS)	eiwitten die instaan voor de vorming en transport van vesikels	matig tot ernstig	multisysteemziekte: oculocutaan albinisme, nystagmus en visusverlies, soms ook pulmonaire fibrose, granulomateuze colitis en immuundeficiëntie.	normaal	normaal	verlaagd aantal / afwezige δ granulen	verlaagd aantal δ granulen: verlaagde ADP inhoud (ATP/ADP ratio gestegen)	verminderde vrijzetting inhoud δ granulen na stimulatie	variabel; kan normaal zijn, maar verminderde / afwezige secundaire golf op ADP en epinephrine en verminderde aggregatie op collageen worden beschreven	normaal	AR; HPS1, AP3B1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1, BLOC1S3, PLDN, HPS10
Chediak-Higashi syndroom (CHS)	eiwitten die instaan voor de vorming en transport van vesikels	mild	multisysteemziekte: oculocutaan albinisme, ernstige immuundeficiëntie en progressieve neuronale dysfunctie.	normaal	normale bloedplaatjes, inclusiegranulen in leukocyten	verlaagd aantal δ granulen, soms reuze δ granulen					AR; LYST
SLFN14 gerelateerde trombocytopenie	primair eiwit defect ongekend	mild tot ernstig	geen	verlaagd	macrotrombocyten	verlaagd aantal / afwezige δ granulen					SLFN14
Geïsoleerde δ-SPD	primair eiwit defect ongekend	mild tot ernstig	geen	normaal	normaal	verlaagd aantal / afwezige δ granulen					ongekend
αδ-SPD											
αδ-SPD	primair eiwit defect ongekend	geen info	geen info	normaal	normaal, soms grijze of bleke plaatjes	verlaagd aantal α granulen en δ granulen	verlaagd aantal α en δ granulen	verminderde vrijzetting inhoud α en δ granulen	normaal	normaal	meestal AD; ongekend

Bijlage 3: vervolg

	Structureel defect	Bloeding	Andere symptomen	Bloedplaatjestelling	Morfologie (LM)	Morfologie (TEM)	Granule-inhoud	Granule-secretie	LTA	Flowcytometrie	Genetica
Defecten in eiwitten die instaan voor signaaltransductie											
Deficiëntie van cytosol fosfolipase A _{2α} (cPLA _{2α})	PLA2 enzyme	mild tot matig	recidiverende gastro-intestinale ulcera	normaal	normaal	normaal	normaal	verminderde vrijzetting inhoud α en δ granulen	variabel; kan normaal zijn, maar afwezige secundaire golf en verminderde aggregatie op zwakke agonisten worden beschreven	normaal	AR; PLA2G4A
Cyclo-oxygenase (COX) 1 deficiëntie	COX-1 enzyme	geen info	geen info	geen info							onbekend
Thromboxane synthase deficiëntie	Tx synthase enzyme	mild tot matig	botdysmorfisme, anemie	normaal							TBXAS1
Fosfolipase C deficiëntie	PLC-β2	geen info	geen info	geen info							onbekend
PKA defect	cAMP-dependent protein kinase A	matig tot ernstig	anemie	matige tot ernstige trombocytopenie	macrotrombocyten	normaal	normaal	verminderde vrijzetting inhoud α en δ granulen	variabel; kan normaal zijn, maar afwezige secundaire golf en verminderde aggregatie op zwakke agonisten worden beschreven	normaal	AR; PRKACG
G proteïne defect	Gαs protein	geen info	geen info	geen info	GNAS/RGS2						
Leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III)	Kindlin-3	matig tot ernstig	immuundeficiëntie, splenomegalie, anemie, osteopetrose, slechte wondheling	normaal of milde trombocytopenie	AR; FERMT3						
CalDAG-GEFI defect	calcium- and DAG-regulated guanine exchange factor-1	ernstig	geen	normaal	RASGRP2						
Tyrosine kinase Src defect	Tyrosine kinase Src	ernstig	botdefecten (edentulisme en botdysmorfisme)	verlaagd	gelijkaardig aan GPS	gelijkaardig aan GPS	verlaagd aantal /afwezige α granulen	geen vrijzetting van inhoud α granulen			SRC
Defecten in transcriptiefactoren											
GATA-1 related syndrome	Hematopoïetische transcriptiefactoren	matig	geassocieerd met dyserythropoïetische anemie, beta-thalassemie en congenitale erythropoïetische porfyrie	verlaagd	macrotrombocyten	verminderde inhoud van de α granulen	verminderde inhoud van de α granulen	verminderde vrijzetting inhoud α granulen	verminderde aggregatie in respons op collageen en ristocetine; normale aggregatie in respons op ADP en thrombine	normaal	X-gebonden; GATA1
Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (FPD/AML)		mild	geassocieerd met evolutie naar hematologische maligniteit	milde trombocytopenie	normaal	verlaagd aantal δ granulen (soms ook α granulen)	verlaagd aantal δ granulen (soms ook α granulen)	verminderde vrijzetting inhoud δ granulen (soms ook α granulen)	verminderde aggregatie in respons op meerdere agonisten	normaal	AD; RUNX1
FLI1-gerelateerd δ granule defect		matig tot ernstig	eczeem / psoriasis / alopecia	milde trombocytopenie	normaal	verlaagd aantal δ granulen, reuze α granulen	verlaagd aantal δ granulen	verminderde vrijzetting inhoud δ granulen	verminderde aggregatie in respons op collageen en PAR-1	normaal	AD; FLI1
GFI1B gerelateerd defect		matig tot ernstig	geen	matige trombocytopenie	macrotrombocyten, dyserythropoïese	verlaagd aantal of verminderde inhoud van de α granulen	verminderde inhoud van de α granulen	verminderde vrijzetting inhoud α granulen	normaal	verminderde expressie van GPIbα	AD; GFI1B

Bijlage 3: vervolg

	Structureel defect	Bloeding	Andere symptomen	Bloedplaatjestelling	Morfologie (LM)	Morfologie (TEM)	Granule-inhoud	Granule-secretie	LTA	Flowcytometrie	Genetica
Defecten in het cytoskelet											
Wiskott-Aldrich syndroom / hereditary X-linked thrombocytopenia (XLT)	Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp)	variabel	eczeem; immuundeficiëntie, verhoogde vatbaarheid voor auto-immuun ziektes en maligniteit (niet bij XLT)	ernstige trombocytopenie	microtrombocyten	meestal normaal; soms verlaagd aantal δ granules	meestal normaal; soms verlaagd aantal δ granulen	verminderde vrijzetting inhoud α en δ granulen	meestal normaal	normaal	X-gebonden; WAS
Filaminopathie gerelateerde macrothrombocytopenie	filamine A	variabel	spectrum van zeldzame aandoeningen	milde trombocytopenie	macrothrombocyten	deel trombocyten vertonen reuze α granulen, deel trombocyten hebben verlaagd aantal α granulen	normaal	verminderde vrijzetting inhoud α en δ granulen bij activatie via GPVI (collageen en convulxine)	verminderde aggregatie bij activatie via GPVI (collageen en convulxine)	normaal	X-gebonden; FLNA
Toegevoegen fibrinolytische activiteit van de trombocyten											
Quebec platelet disorder	Urokinase-type plasminogeen activator (uPA)	matig tot ernstig; beantwoordt goed op gebruik van antifibrinolytica	geen	normaal of milde trombocytopenie	normaal	abnormale inhoud van de α granulen (uPA breekt andere eiwitten in de granulen af)	abnormaal veel uPA in de α granulen	abnormaal hoge vrijzetting van uPA uit de α granulen	verminderde aggregatie in respons op epinephrine	normaal	AD; PLAU
Ongekend defect											
primair secretiedefect (PSD)	primair eiwit defect ongekend	mild	geen info	normaal	normaal	normaal	normaal	verminderd	normaal	normaal	ongekend

Bijlage 4: vanuit Brunet et al, 2018.¹⁰

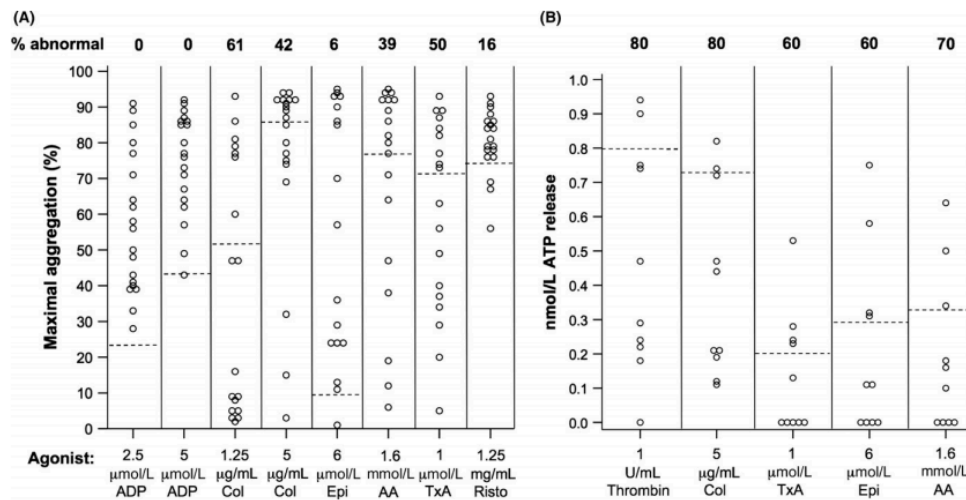


FIGURE 4 Maximal platelet aggregation responses and lumi-aggregometry dense granule ATP release findings with different agonists for individuals with confirmed dense granule deficiency. (A) Percent maximal aggregation responses are shown for DGD participants, evaluated with the following agonists: 2.5 and 5.0 μmol/L adenosine diphosphate (ADP), 1.25 and 5.0 μg/mL collagen (Col), 6 μmol/L epinephrine (Epi), 1.6 mmol/L arachidonic acid (AA), 1 μmol/L thromboxane analogue (TxA) (U46619), and 1.25 mg/mL ristocetin (Risto). (B) Lumi-aggregometry estimates of dense granule ATP release for DGD participants, evaluated with the following agonists: 1 U/mL thrombin, 5.0 μg/mL collagen (Col), 1 μmol/L thromboxane analogue (TxA) (U46619), 6 μmol/L epinephrine (Epi), and 1.6 mmol/L arachidonic acid (AA). A&B. Dotted lines show the lower limit of the RI for each agonist. The percentage of DGD patients that were abnormal with each agonist is indicated

Bijlage 5: vanuit Hayward et al, 2006.¹²

Table 1 PFA-100® closure times (CT) findings in congenital and acquired, non-drug-induced platelet disorders

	Total number of subjects reported (numbers per study)	CADP CT	CEPI CT	References
<i>Disorders with normal platelet counts</i>				
Glanzmann thrombasthenia	23 (2,6,1,8,5,1)	P	P	[7,8,16,34,49,50]
Aspirin-like defect	6	N	P	[7]
P2Y ₁₂ deficiency	4 (1*,2,1)	N or P	N or P	[16] (M. Cattaneo, unpublished; P. Nurden, unpublished)
Dense granule deficiency	30 (4,6,7,1,12)	N or P	N or P	[7,8,14,16,34]
Hermansky-Pudlak syndrome	44 (7,13,5,19)	N or P	N or P	[8,34,50,53]
Primary secretion defects	30 (10,10,10)	N	N or P	[14,34,52]
Platelet procoagulant defect	1	N	N	[16]
<i>Disorders with reduced or normal platelet counts</i>				
Bernard-Soulier syndrome	8 (2,6)	P	P	[8,34]
Platelet-type von Willebrand disease	3	P	P	[7]
Grey platelet syndrome	3 (1,2)	P	P	[16,34]
Wiskott-Aldrich syndrome	5	N or P	N or P	[34]
Hereditary macrothrombocytopenia associated with non-muscle Myosin Heavy Chain IIa syndromes	5 (3,2)	N	N or P	[16,35]
Macrothrombocytopenia of undefined cause	11	N or P	N or P	[34]
Undefined autosomal dominant thrombocytopenia	1	N	N	[16]
<i>Primary bone marrow disorders</i>				
Myelodysplastic or myeloproliferative syndromes, with or without thrombocytosis	69 (7,62)	N or P	N or P	[16,92]

Note, the data reported with CADP and CEPI cartridges, indicated as normal (N) or prolonged (P), are based on small numbers of reported cases. *Indicates a patient with an ADP receptor/signal transduction defect [16] that was later found to be P2Y₁₂ deficient (W. L. Nichols, pers. comm.). M. Cattaneo, Università di Milano, Milan, Italy; P. Nurden, Hopital Cardiologique, UMR 5533 CNRS, Pessac, France; W. L. Nichols, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

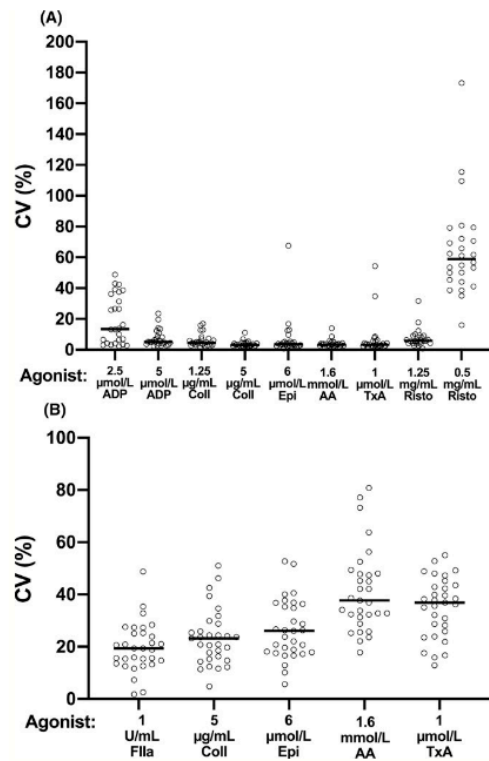
Bijlage 6: vanuit Hayward et al, 2019.⁷

FIGURE 1 Illustration of the coefficient of variation for estimating platelet maximal aggregation and platelet dense granule adenosine triphosphate release end-points. Panels compare data (A: maximal aggregation; B: ATP release) for 26 unique individuals that donated the quality control sample for platelet function tests on ≥ 3 occasions in Hamilton, Ontario. Lines indicate the median CV for the agonists adenosine triphosphate (ATP), collagen (Coll), epinephrine (Epi), arachidonic acid (AA), thromboxane analogue U46619 (TxA), ristocetin (Risto), and thrombin (Fila)