

Dr HJ (Eric) Vermeer  
specialist klinische chemie



## Hemostase & diagnostiek Deel 1: bloeden...

Onderwijsmodule analisten/lab-assistenten Result Laboratorium



## Waar gaan we het over hebben?

- Inleiding op hemostase en antistolling
  - Primaire hemostase
  - Secundaire hemostase
- Consult 1: patiënt met verhoogde bloedingsneiging
- Consult 2: patiënt met een verlengde APTT
- Consult 3: tweede patiënt met verhoogde bloedingsneiging

## Waar gaan we het *niet* over hebben?

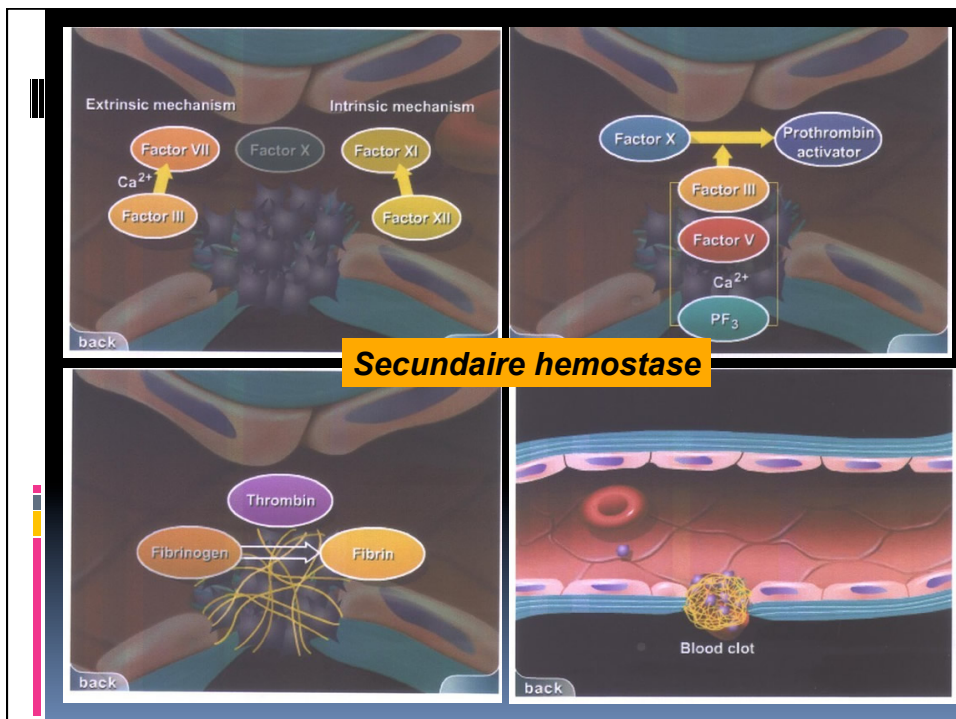
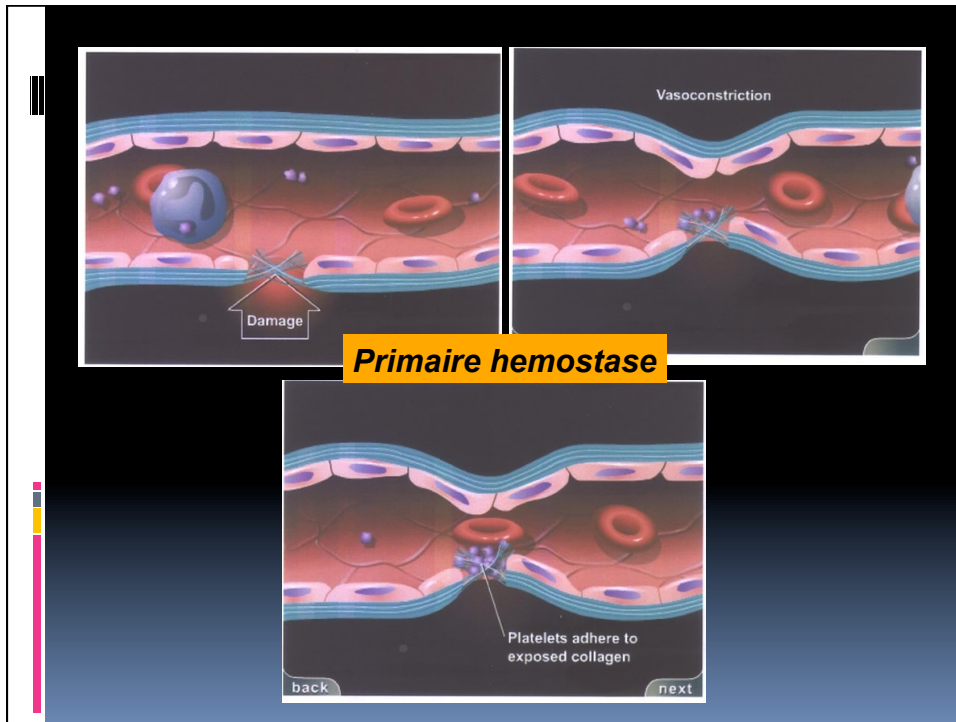
- Tromboseneiging
  - Arterieel
  - Veneus
  - Erfelijk
  - Verworven
- Antistollingsmiddelen (OAC, heparine, LMWH, NOACs, TAR)
- Bewaren we voor deel 2

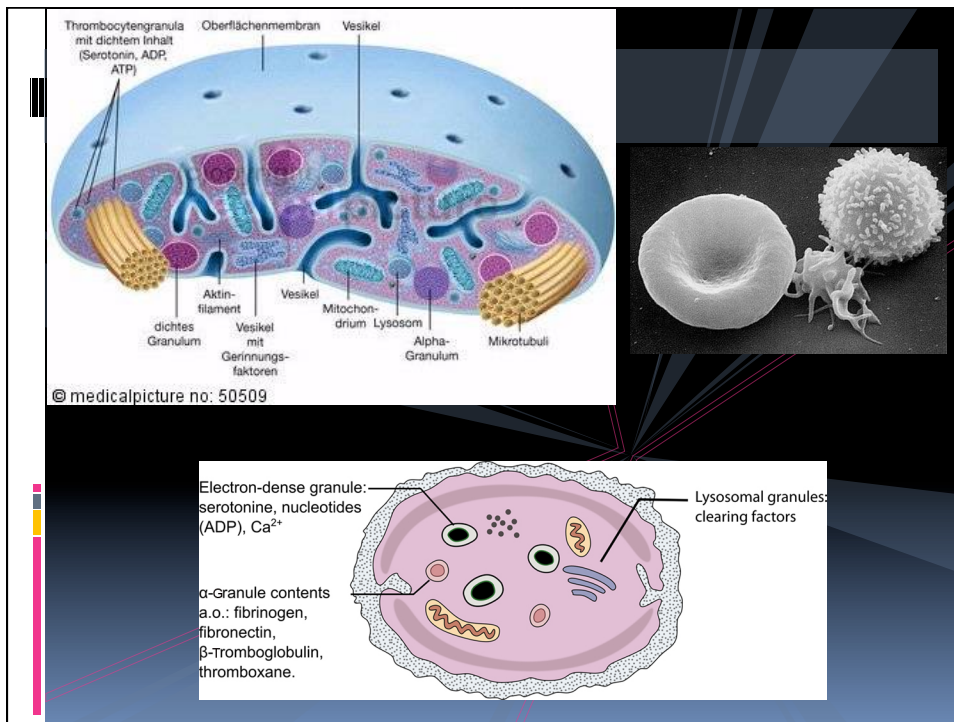
## Leerdoelen deel 1: Bloeden...

- Globaal de kenmerken kunnen benoemen van de primaire en de secundaire hemostase
- Belangrijkste stollingstests
- Mengproef
- Apparatuur: PFA-200, (Multiplate)
- Aandoeningen: Von Willebrand syndroom, Hemofilie

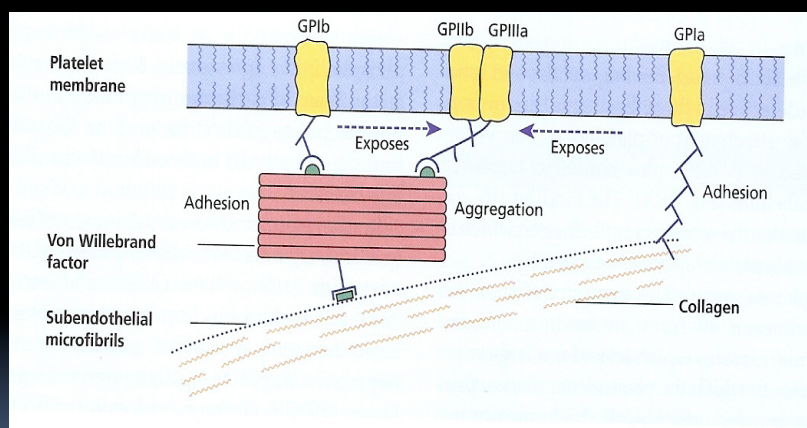
## Wat is hemostase?

- Hemostase is het proces dat er voor zorgt dat het bloedverlies wordt beperkt bij beschadiging van bloedvaten
- Samenspel tussen:
  - Bloedplaatjes (trombocyten)
  - Stollingsfactoren
  - Remmers van stollingsfactoren
  - Oplossen van het stolsel (fibrinolyse)
  - Bloedvaten
  - Stroming van het bloed (rheologie, fysische factoren)





## Vorming van een trombocyttenplug



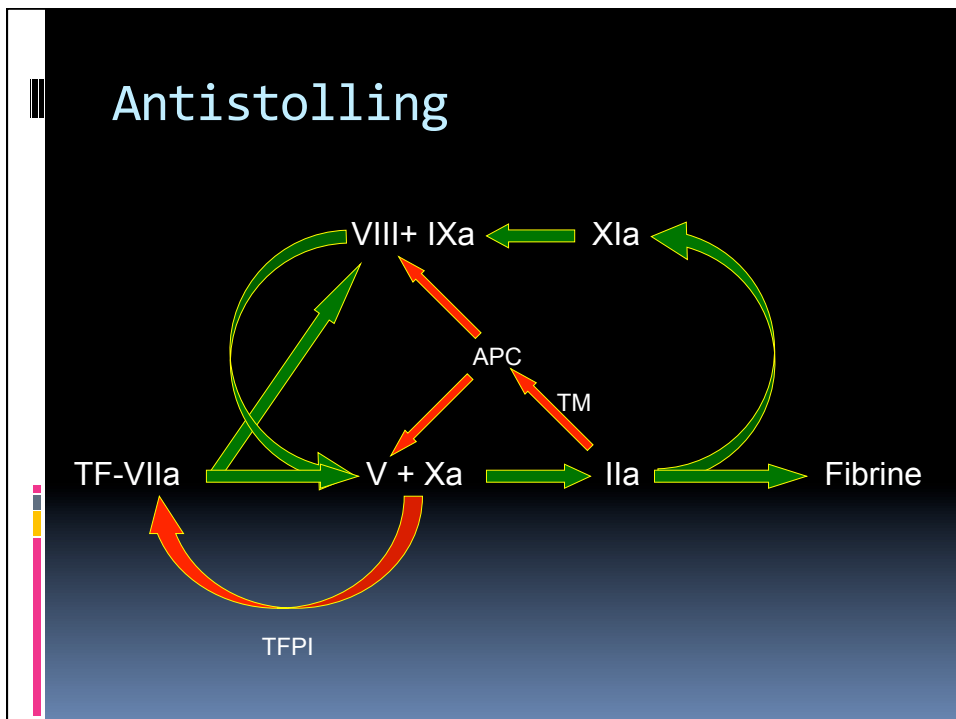
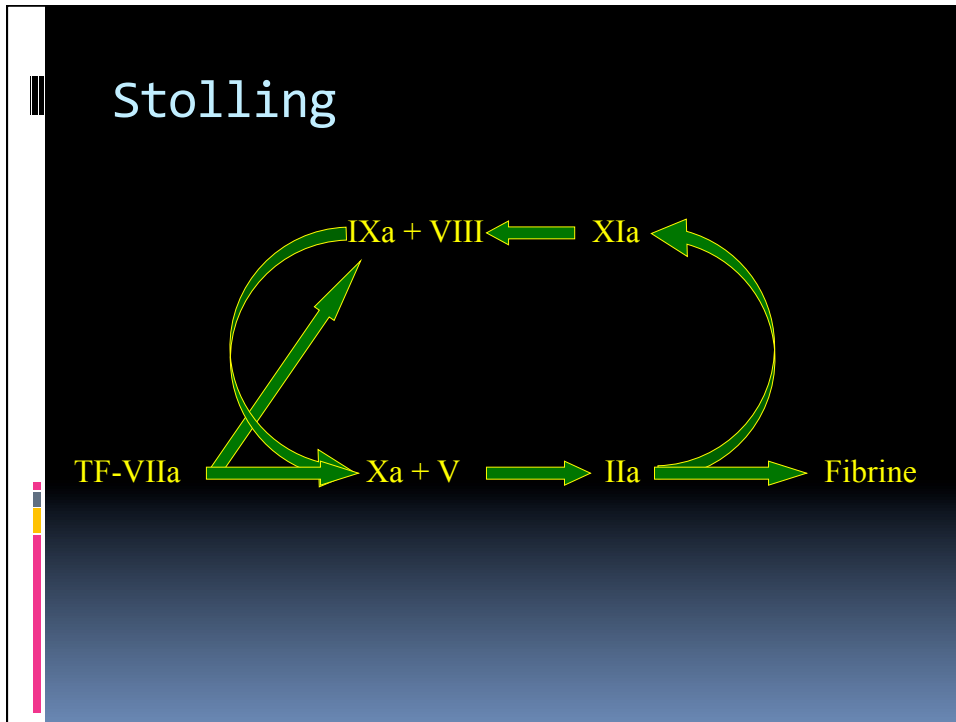
Eiwitten op oppervlak van bloedplaatje zorgen voor hechting aan beschadigde vaatwand. Rol van vWF

## Von Willebrand factor (vWF)

- Groot multimeer eiwit, aanwezig in plasma, bloedplaatjes en cellen van bloedvaten
- Functie:
  - hechting van bloedplaatje aan beschadigde vaatwand
  - Drager van factor VIII
- Te weinig/afwijkend vWF => bloedingsneiging
  - Typische patient: neusbloedingen, lang bloeden na kiesextractie, hevige menstruaties
- Te veel vWF/FVIII => neiging tot trombose

## Samenvatting: diagnostiek primaire hemostase

- Aantal bloedplaatjes
- Functie bloedplaatjes
- Vaatwand
- Von Willebrand factor



## Stoffactoren:

I: fibrinogeen  
 II: protrombine  
 III: tissuefactor  
 IV: calcium  
 V: labile factor  
 VI: *not assigned*  
 VII: stable factor  
 VIII: anti-hemophilic factor

IX: Christmas factor  
 X: Stuart-Power factor  
 XI: plasma thromboplastin  
 antecedent  
 XII: Hageman-factor  
 XIII: fibrin stabilizing factor  
 Fitzgerald factor (HMK)  
 Fletcher factor (PK)

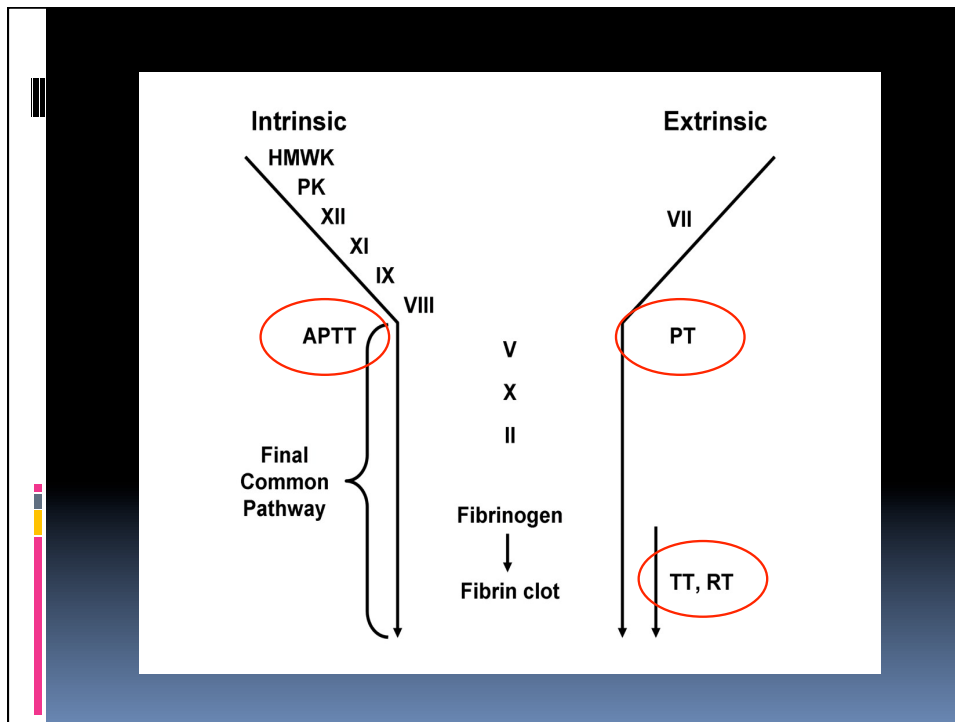
## Vorming van een fibrinenetwerk

### Belangrijkste stollingsfactoren

• F II:	T $\frac{1}{2}$ 65 uur	→ Vit K afhankelijk
• F VII:	T $\frac{1}{2}$ 5 uur	
• F IX:	T $\frac{1}{2}$ 25 uur	
• F X:	T $\frac{1}{2}$ 40 uur	

• F I:	T $\frac{1}{2}$ 90 uur	→ >> bij ontsteking, zwangerschap en OAC
• F V:	T $\frac{1}{2}$ 15 uur	
• F VIII:	T $\frac{1}{2}$ 10 uur	

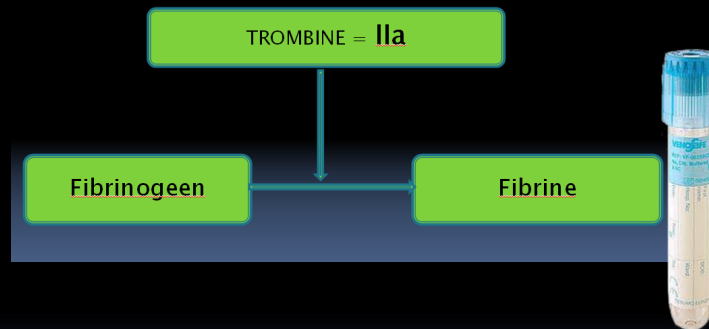




## Gevoeligheid PT en APTT

stollingsfactor	Niveau voor normale	Niveau voor normale	
	hemostase	PT	APTT
fibrinogeen	0,5 - 1,0 g/l	1 g/l	0,6 g/l
protrombine	20 - 30%	50%	15%
factor V	>20%	50%	40%
factor VII	>10%	50%	NT
factor VIII	>40%	NT	35%
factor IX	>30%	NT	20%
factor X	>20%	60%	25%
factor XI	>50%	NT	30%
factor XII	0	NT	20%

## Trombinetijd (TT)



- TT afnemen in stolbuisje met citraatplasma
- TT referentiewaarde <20 sec
- TT stijgt bij (spootje) heparine of laag fibrinogeen

## Onderzoek van de bloedstolling

- Bloedafname op anticoagulans (citraat = chelator van calcium)
  - Buis: trinitriumcitraat 0,109 mol/l; verhouding antistolling : bloed 1: 9
  - Hematocrieteffect indien Ht < 0,20 of > 0,55
- Bloedplaatjesarm plasma
- Bijmengen van lichaams- of infuusvocht (heparine!) vermijden

## Onvoldoende gevulde buis

- Verhouding bloed:  
citraat ↓
- Gevolg: APTT/PT ↑
- Er is teveel citraat aanwezig voor de (lagere) hoeveelheid plasma, dit verlengt de stoltijd



## Samenvatting: diagnostiek secundaire hemostase

- Protrombinetijd (PT)
  - gevoelig voor FII, FVII (sensitief!), FIX, FX en fib, FV, FX
  - INR: gestandaardiseerde PT-bepaling speciaal voor vitamine K-antagonisten/coumarines
    - $INR = (PT \text{ patiënt} / PT \text{ normaal})^{ISI}$
- Activated partial-thromboplastin time (APTT)
  - gevoelig voor FVIII, FIX, FXI, FXII en fib, FII, FV
  - Controle heparinetherapie
- Fibrinogeenbepaling
- Individuele factoren
- Remmers tegen stollingsfactoren

## Consult 1: Patiënt met een verhoogde bloedingsneiging

### Casus Bram

- Bram is 2 jaar en komt op de SEH
- Blijft uit de mond bloeden na val
- Wat wil je weten?
  - Geen neusbloedingen, wel nabloeden na vaccinatie
  - Geen positieve bloedingsanamnese familie
  - Geen aspirine, wel antibiotica voor recente oorinfectie

## Casus Bram (vervolg)

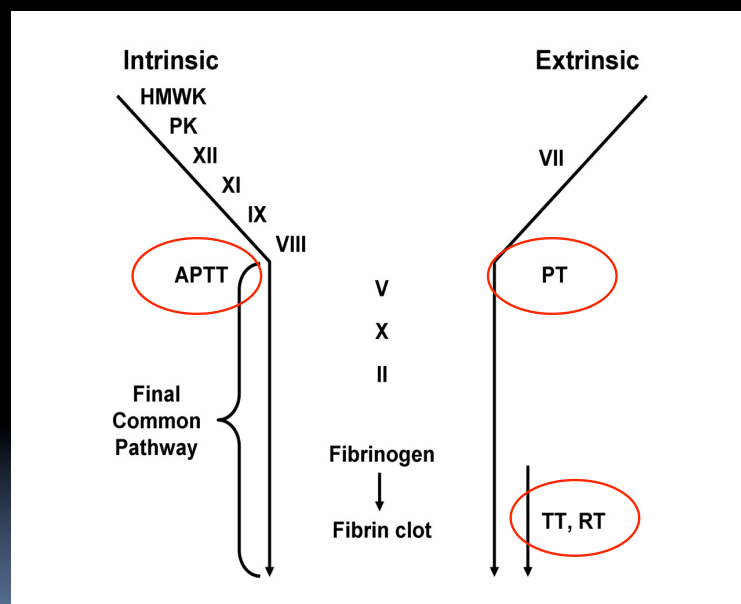
- Lichamelijk onderzoek
- Alert jongetje
- In mond twee snijwondjes aan de binnenkant van de onderste lip
- Geen puntbloedinkjes, geen blauwe plekken bij kneuzingen, geen gezwollen gewrichten

Tussendoor: wat zie je?



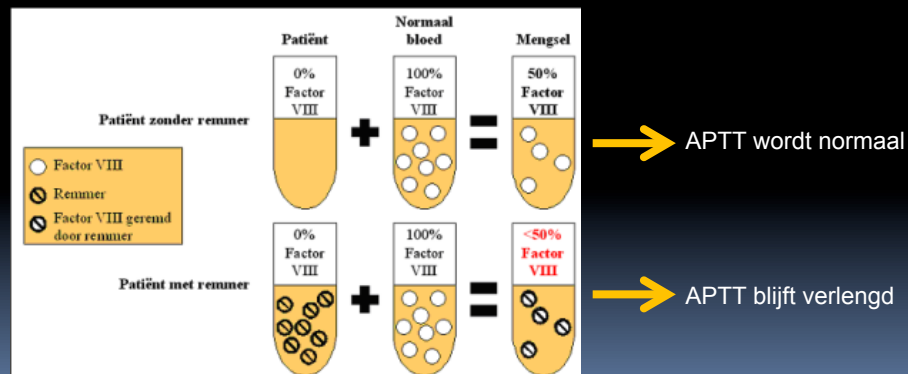
## Casus Bram (vervolg)

- Lab
- Hb 7,3 mmol/l
- Ht 0,35
- Leuko  $7,9 \times 10^9/l$
- Trombo  $368 \times 10^9/l$
- PT 11,3 sec (10-12,8)
- APTT 37,2 sec (24-33 sec)
- Wat zou er aan de hand kunnen zijn?



## Tussendoor: mengproef

- Vervolgonderzoek: alleen na overleg

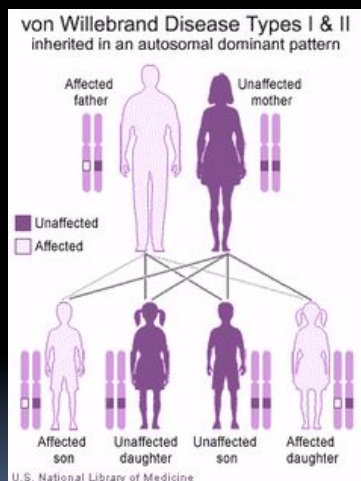


## Casus Bram (vervolg)

- Vervolgonderzoek
- APTT herhaling 49,6 sec (28-38)
- Mengproef 35,7 sec (28-38)
- Factor VIII 0,16 U/ml (0,6-1,5)
- Factor IX 0,82 U/ml (0,6-1,5)
- TT (trombinetijd) 17,3 sec (16-22)
- VWF-antigeen 0,16 sec (0,78-1,53)
- Ristocetine-Co <0,10 U/ml (0,5-1,5)

## Ziekte van Von Willebrand

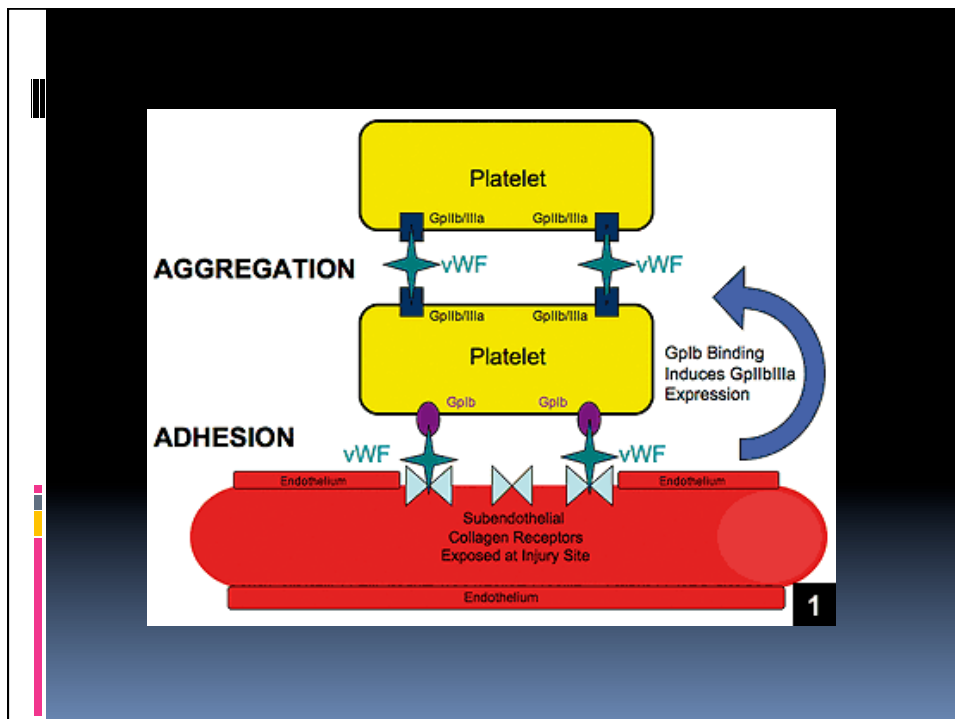
- Prevalentie (schatting) 1%, meest Type I
  - Desmopressine (DDAVP, Minrin) i.v. of intranasaal
- Anamnese: slijmvliesbloeding, oppervlakige hematomen (spontaan?), menstruatie, kiesextractie, tonsillectomie, andere operatie, partus
- Mogelijk laboratoriumonderzoek: bloedingstijd/ PFA, vWF-antigeen, ristocetine cofactor, factor VIII
  - Veel valkuilen in het onderzoek!
  - Bloedgroep O: minder VWF
  - Herhaald onderzoek is noodzakelijk!





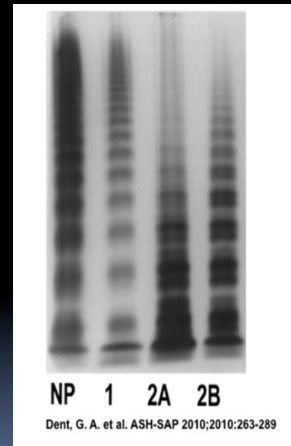
## V Willebrand

- Incidentie 2-3%, significant 1:10.000.
- Verlaagd vWF en FVIII.
- Type 1 (60-80%): Tekort vWF vaatwand.
- Type 2A,B,M,N(20-30%): Kwalitatief defect vWF
- Type 3 (5%): Geen vWF aangemaakt.



## Diagnostiek naar vWD

- Anamnese
- Screenen: PFA, APTT
- Er zijn allerlei testen voor vWF:
  - Antigeen: voldoende vWF aanwezig?
  - Ristocetine / collageen binding: functie van het vWF eiwit
  - Multimeren patroon: vWF-polymerisatie intact?
  - Anti-vWF: aanwezigheid antistoffen tegen vWF?



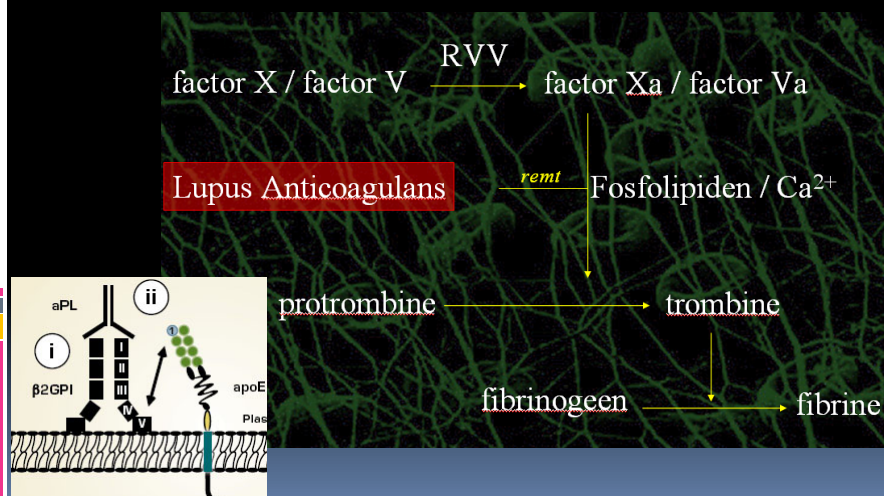
## Herhaling uitslagen

- Vervolgonderzoek
- APTT herhaling 49,6 sec (28-38)
- Mengproef 35,7 sec (28-38)
- Factor VIII 0,16 U/ml (0,6-1,5)
- Factor IX 0,82 U/ml (0,6-1,5)
- TT (trombinetijd) 17,3 sec (16-22)
- VWF-antigeen 0,16 sec (0,78-1,53)
- Ristocetine-Co <0,10 U/ml (0,5-1,5)

## Conclusie casus (slot)

- Geen stoornis in de stollingsfactoren
- Ziekte van Von Willebrand
- Milde factor VIII en IX deficiëntie
- LAC (mogelijk) of Factor VIII remmer (antistof): onwaarschijnlijk op deze leeftijd
- Factor XI en XII deficiëntie (zeldzaam)
- **Bloedgroep?**

## Lupus Anticoagulans (LAC)/ antifosfolipiden-antistoffen



- **Functie-onderzoek bloedplaatjes:**
  - **Bloedingstijd:**
    - niet geschikt voor het voorspellen van een bloedingsrisico bij een invasieve ingreep
    - Wel beoordeling primaire hemostase (vorming 'plug')
  - Platelet Function Analyzer (PFA-200)
    - Bootst beschadiging van de vaatwand na
    - Gevoelig voor aspirine (ASA)
    - Gevoelig voor ziekte van Von Willebrand mits niet al milde vorm
  - **Trombocytenaggregatie:**
    - Beoordeling onderlinge interactie bloedplaatjes
    - Als bloedingstijd normaal is => geen verder onderzoek
    - Zeldzame afwijkingen

## Bleeding Time

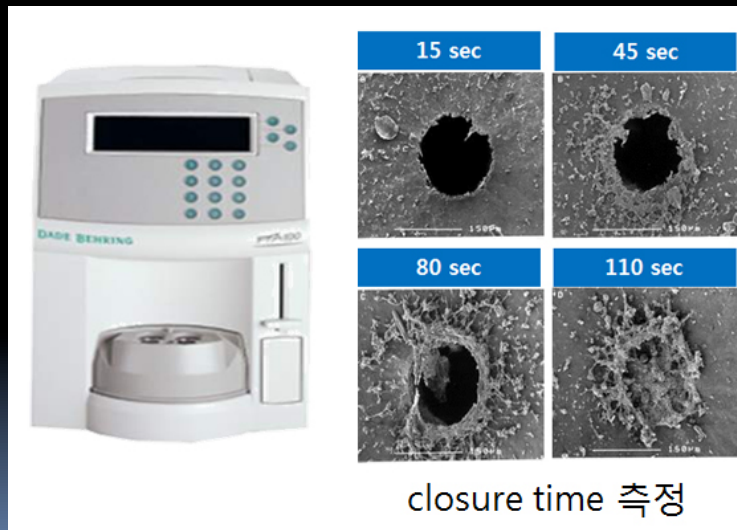
- Controversial, and mainly abandoned
- Invasive, difficult to standardize
- Requires dedicated technician to perform test over a relatively long period of time on one patient



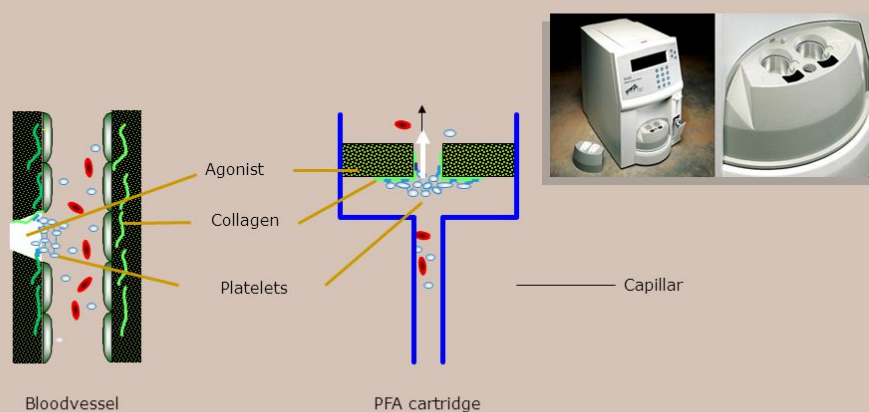
Two incisions are made and the time for clotting to occur is recorded

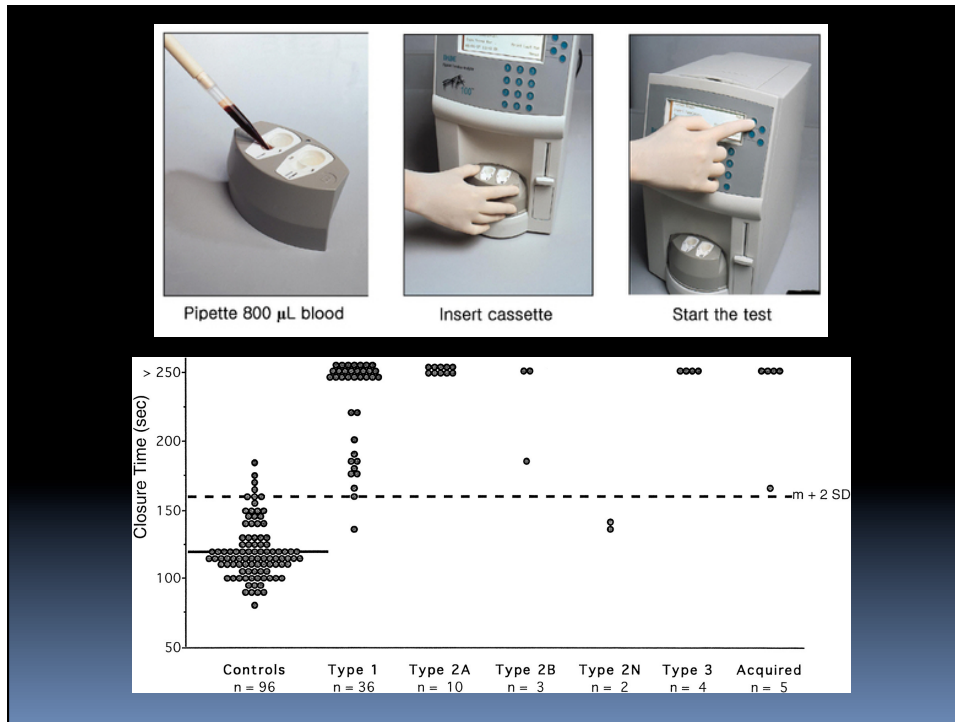
ADAM

## Platelet Function Analyzer (PFA-200)



## Platelet function analyzer (PFA-100)





## Bleeding time vs PFA-100

**Bleeding Time better**

**PFA-100 better**

Von Willebrand's Disease

Aspirin ingestion

Congenital platelet receptor disorders

Platelet secretion defects (CEPI)

Platelet secretion defects (CADP)

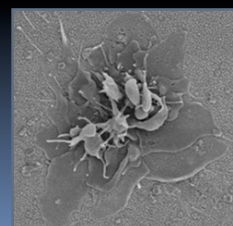
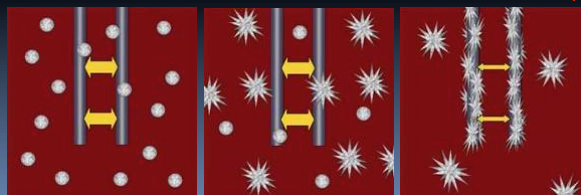
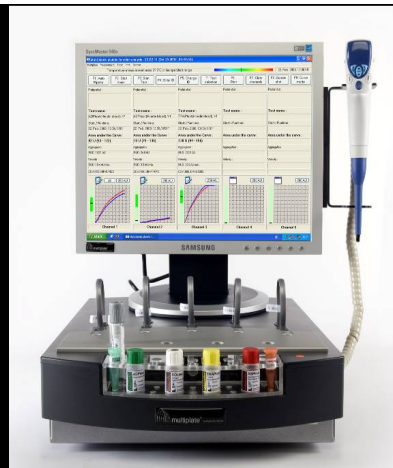
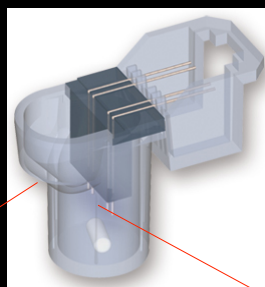
- ◆ PFA and BT 'agree' in 70-80% cases
- ◆ PFA correlates more closely with aggregometry
- ◆ PFA-100 is more useful in clinical practice



**Platelet Function analysis using  
Multiple Electrode Aggregometry (Multiplate®)**

► Multiplate®

platelet function analysis  
in whole blood  
based on  
impedance  
aggregometry



**▶ Performing the test**

put the test cell into the measuring position

attach the sensor cable

pipette 300 µl of saline + 300 µl of blood\*

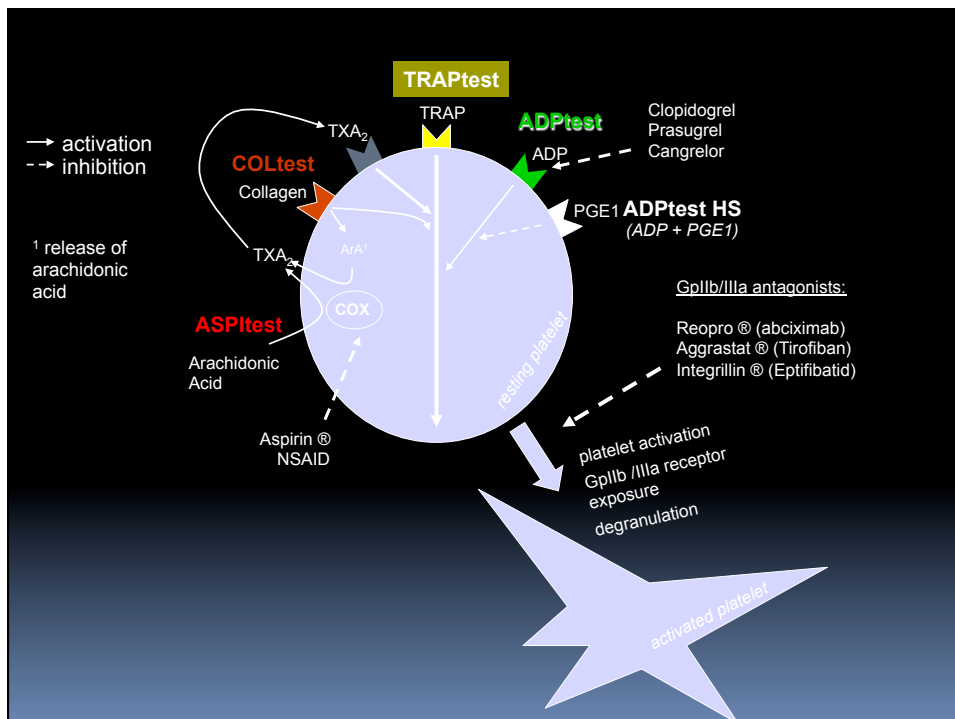
allow 3 minutes for warming and equilibration

add the activator

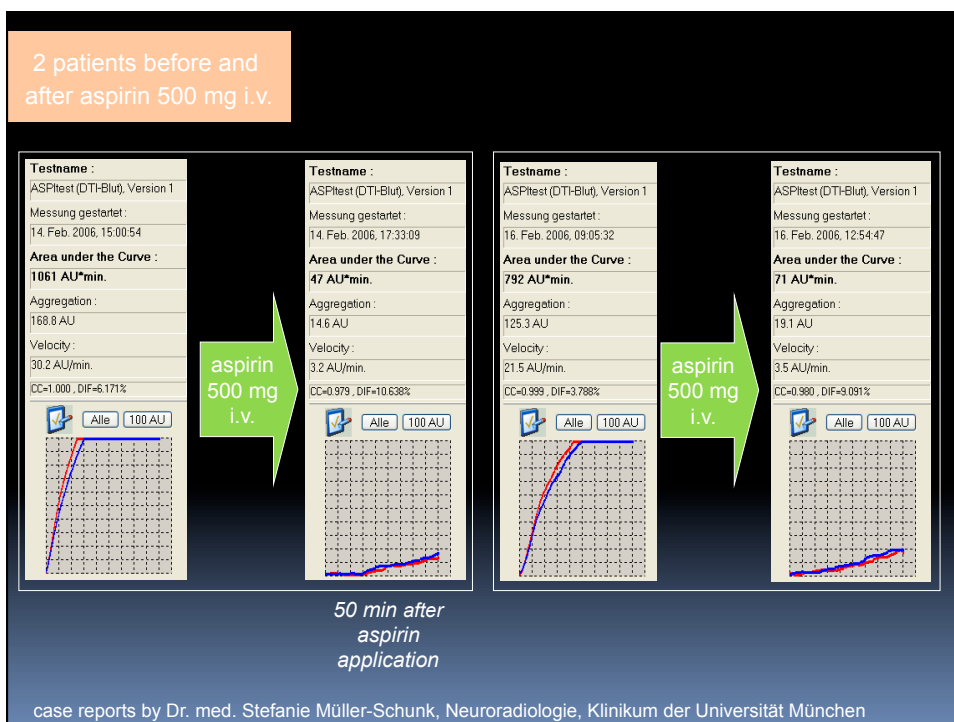
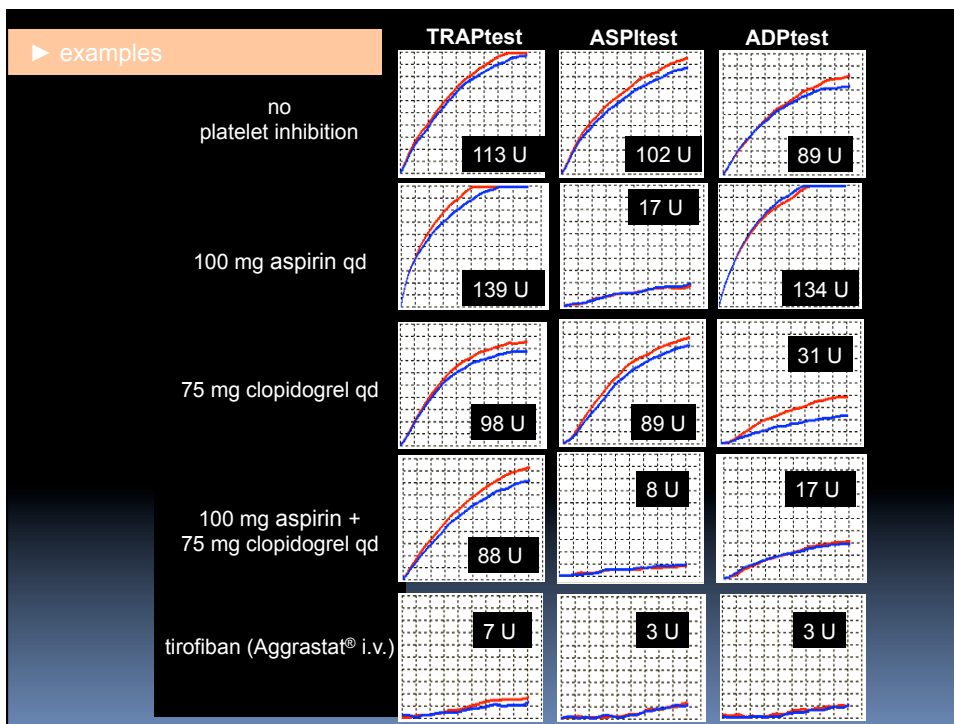
after 6 minutes:

- print the results
- discard the test cell

\* usually hirudin or heparin blood







## Consult 2: een onverwacht verlengde APTT

### Wat wil je weten?

- Anamnese
  - Gebruik antistolling
  - Spontane (slijmvlies)bloedingen?
  - Familiehistorie: mucosale bloedingen, menorrhagie, hemostaseproblematiek bij ingrepen
  - Alcoholabusus
  - Storende factoren
- Bloedafname herhalen!

## Casus

- Kind 11 maanden, ingezonden naar onze bloedafnamepoli door huisarts ivm vraagstelling ITP
- Trombo's  $340 \times 10^9/L$
- Navraag bij huisarts of er een bloedingsneiging is
  - Geen petechieën
  - Hematomen op ledematen en borstkas
  - Familieanamnese negatief

## Casus vervolg

- Advies: snel opnieuw prikken voor APTT, PT, fibrinogeen
- Lab:
  - APTT 87 sec (ref 24-32 sec), rest normaal
- Nu ook slijmvliesbloedingen → consult kinderarts
- Overleg kinderarts en labspecialist voor vervolgonderzoek → welke?

## Casus (slot)

- Mengproef: normaal
- Factor VIII: 1%
- Factor IX: 95%
- Von Willebrand Factor: normaal
- Terugkoppeling naar kinderarts: past bij **ernstige** hemofilie A
- Kind wordt verwezen naar hemofliecentrum

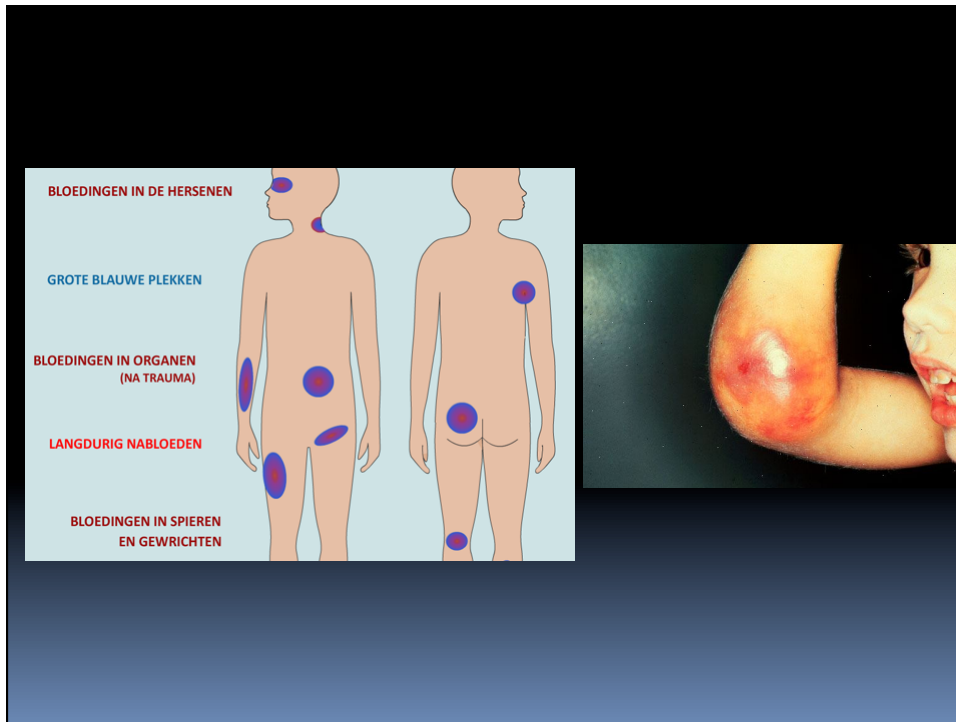


## Verhoogde bloedingsneiging (hemofilie)

- Hemofilie:
  - Een verhoogde bloedingsneiging kan ontstaan door:
    - Erfelijke afwijkingen
      - Hemofilie A
      - Hemofilie B
      - Ziekte van von Willebrand
    - Verworven afwijkingen
      - Vit K deficiëntie
      - DIS
      - leverziekten

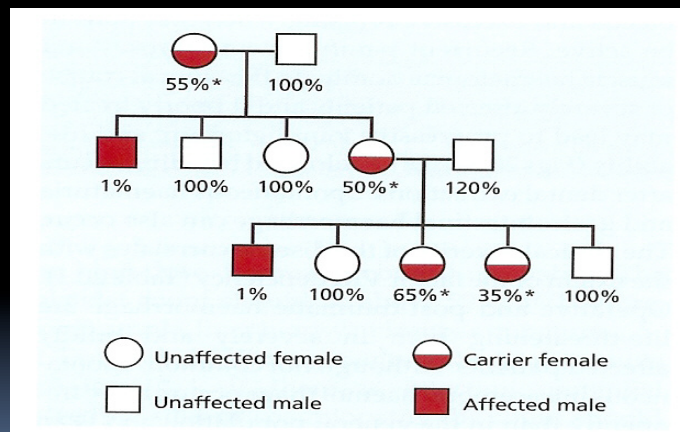
## Verhoogde bloedingsneiging (hemofilie)

- Erfelijke stollingsafwijkingen:
  - Hemofilie A en B:
    - Hemofilie A: tekort / afwezig / gemuteerd F VIII
    - Erfelijk (X-linked), maar 33% door spontane mutatie
    - Hemofilie B: zelfde overerving en klinisch beeld, tekort aan F IX
    - Klinisch beeld:
      - Weefsel/gewrichtsbloedingen
      - Verlengd bloedverlies
      - Levensbedreigende bloedingen na trauma / ingreep
      - Ernst afhankelijk van hoeveelheid F VIII die nog aanwezig is



### Verhoogde bloedingsneiging (hemofilie)

▫ Hemofilie A:



## Verhoogde bloedingsneiging (hemofilie)

- Erfelijke stollingsafwijkingen:
  - Hemofilie A en B: behandeling
    - Toedienen van F VIII resp F IX (gezuiverd of recombinant)
    - Profylactisch
    - Bij bloedingen
    - Bij ingrepen
    - Bij aanwezigheid remmer F VIII

Aad van IJperen

### Hemofilie behandeling vóór 1964

'bloedtransfusie', 'rusten' en 'immobiliseren'



hemofilie - (thuis)behandeling - complicaties - behandelnetwerk - regie!

## Verhoogde bloedingsneiging (hemofilie)

- Erfelijke stollingsafwijkingen:
  - Hemofilie A en B: behandeling
    - Profylactisch
      - Bij > 1x 2 weken spontane bloedingen
      - Recidiverende gewrichtsbloedingen
    - Bij bloedingen
      - Licht: F VIII 15 E/kg
      - Matig: F VIII 25 E/kg
      - Ernstig: F VIII 50 E/kg

## Oorzaken verlengde APTT

- Tekorten
  - Congenitaal (e.g. hemofilie)
  - Verbruik (DIC)
  - Verminderde synthese (leverlijden)
  - Vit K gebrek/OAC (FII, FVII, FIX, FX, prot C, prot S zijn vit K afhankelijk) → PT >> APTT!
  - Massale transfusie
- Of
  - Heparine (vooral UFH)
  - Inhibitor
  - Lupus anticoagulans (LAC)
  - Preatalytisch probleem bij bloedafname



## Casus zuster, 85 jaar

- Huisarts vraagt factor VIII aan
- Patiënte heeft geen klachten
- Laboratorium:
 

Trombocyten:	$330 \times 10^9/l$	$(130 - 400 \times 10^9/l)$
APTT	47,7	$(24 - 32 \text{ sec})$
PT	12,1	$(10 - 13,5 \text{ sec})$

## Casus V

- Pat V, geb 12-05-1934
- Lab:
  - Trombocyten  $306 \times 10^9/L$
  - APTT 161 sec
  - PT 11 sec (PT-INR 1,0)
  - Fibrinogeen 3,8 g/l
- Anamnese: geen verhoogde bloedingsneiging
- Wat zouden we kunnen doen?

## Casus V (vervolg)

- Mengproef: plasma patiënt wordt in 1:1 verhouding gemengd met normaal plasma → je hebt ongeveer 30% aan stollingsfactoren nodig voor normale hemostase...
- Mengproef uitgevoerd direct en na incubatie (1 uur bij 37 C)
- APTT normaliseert (22 sec)
- Waar lijkt dit op te wijzen?

## Casus V (slot)

- Past eerder bij deficiëntie van individuele stollingsfactor (FVIII, FIX, FXI, FXII, prekallikreine, HMWK)
- Kans op remmer is laag
- Lab:
  - FVIII 152 % (ref 50-150 %)
  - FIX 92 % (ref 70-120 %)
  - FXI 96 % (ref 70-120 %)
  - FXII <5 % (ref 70-150 %)
  - LAC afwezig

## Samenvatting: *geen* verhoogde bloedingsneiging

- Factor XII (Hagemanfactor) tekort
  - Homozygoten hebben een zeer lange APTT (100 tot > 180 sec)
- Deficiëntie contactfactoren (prekallikreïne, HMWK)
- Lupus anticoagulans (LAC)
- (Heparine (eventueel reptilasetijd meten of APTT met protamine correctie))

## Blinde vlekken

- Factor XIII-deficiëntie
- $\alpha_2$ -antiplasmine deficiëntie
- Vasculaire afwijkingen (e.g. Rendu Osler)
- Vitamine C deficiëntie

