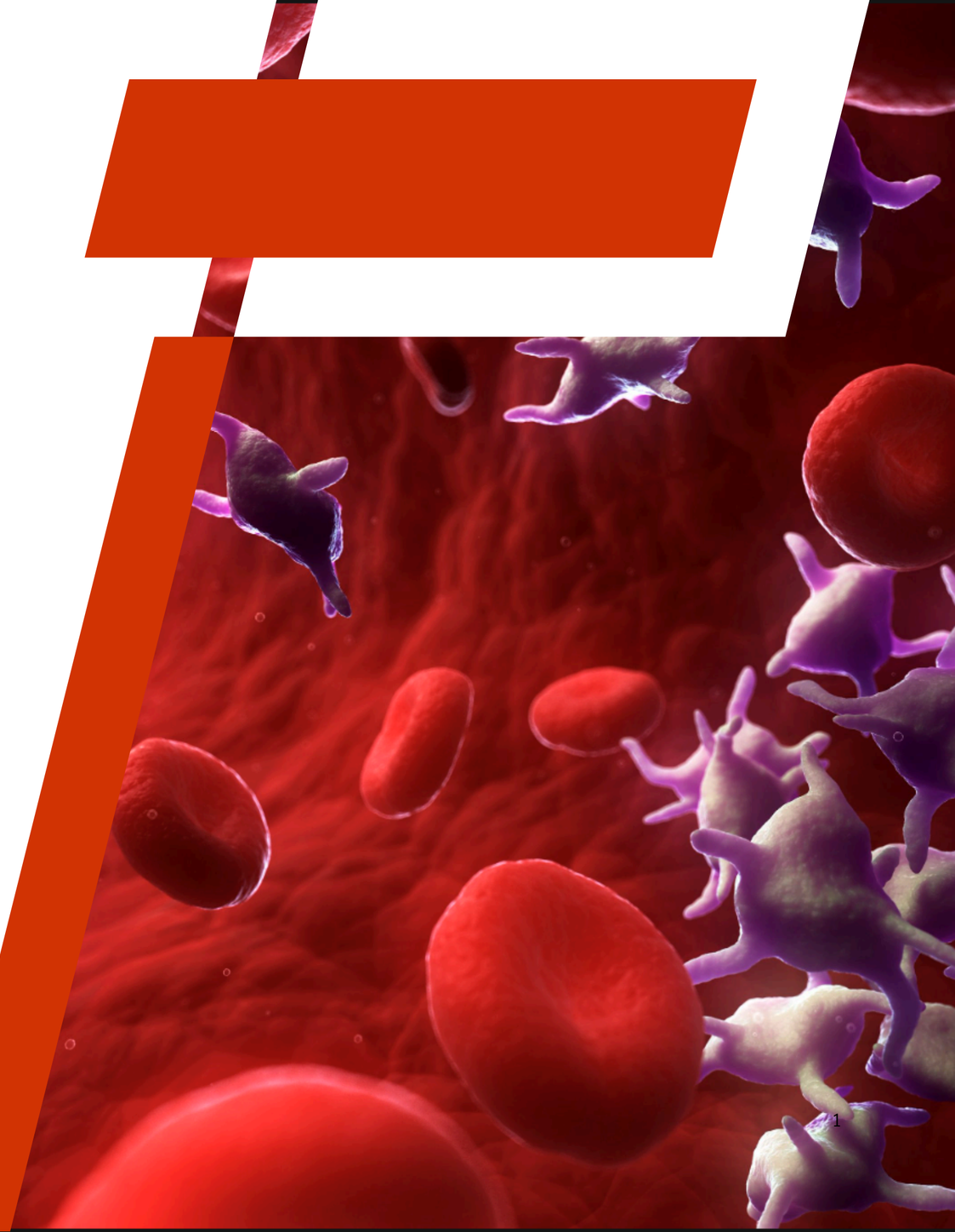
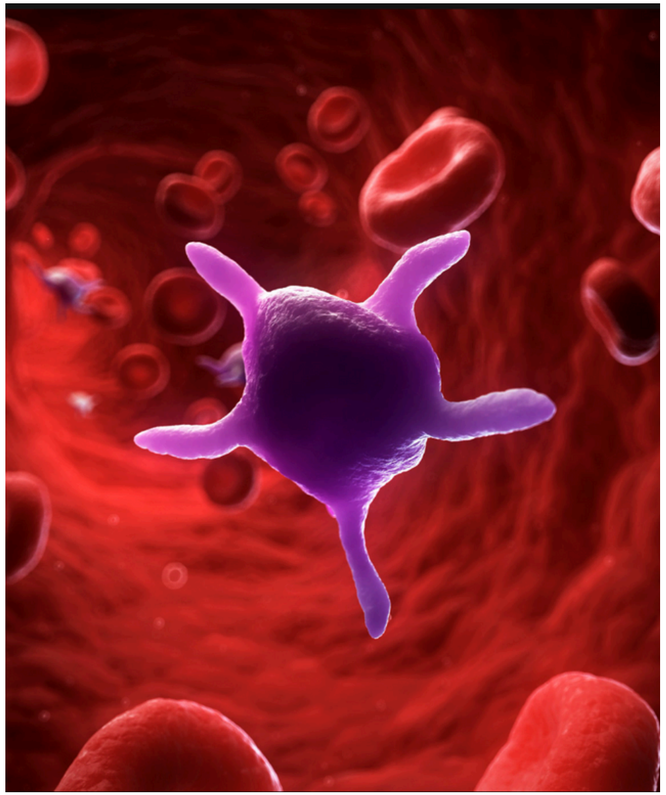
Platelet aggregation test:
propose, procedures and interpretation



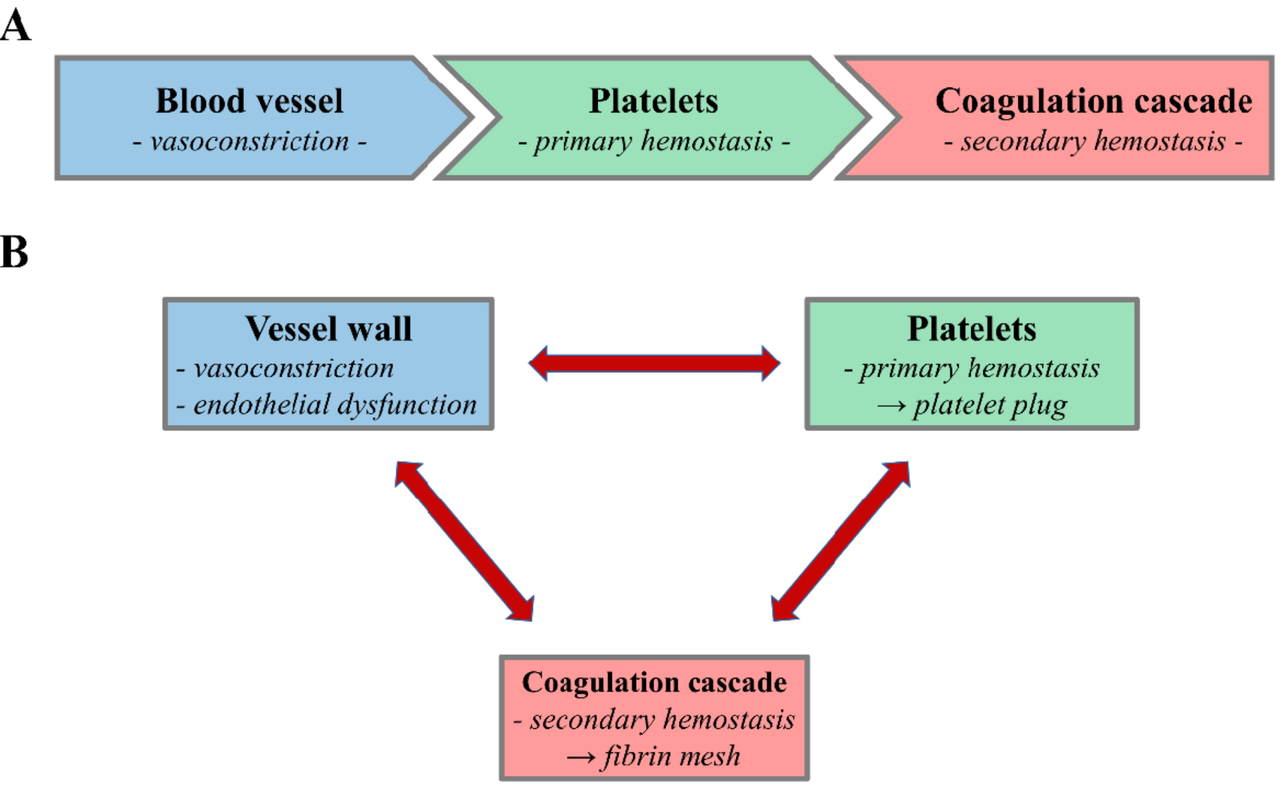
รองศาสตราจารย์ ดร. ทนพญ.นันทรัตน์ โฆมานะสิน
Senior Fellow of the Higher Education Academy, UK-PSF
Scholarly Teacher, Thai-PSF

Outlines

- Platelet function and haemostasis overview
- Methodologies for platelet function assessment
- Light transmission aggregometry (LTA)
- Pre-analytical variables
- LTA procedure
- Evaluation and reporting results
- Interpreting test results
- Quality control and establishent of reference intervals



Platelet function and haemostasis overview



Platelets and coagulation

A: Classic view of hemostasis as a three-step process involving vasoconstriction and primary and secondary hemostasis as independent and sequential events.

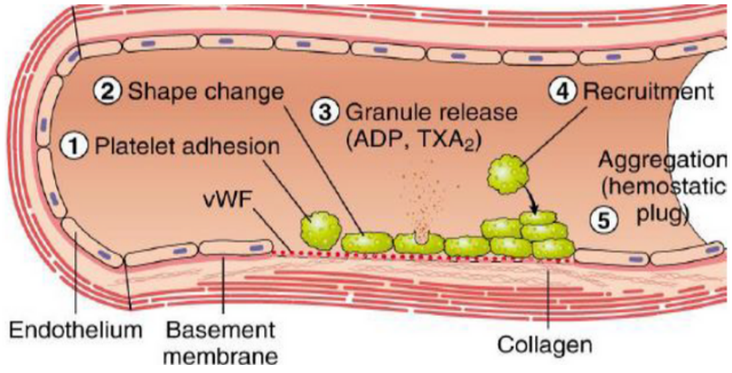
B: Current view of hemostasis as a complex process in which the vessel wall, the platelets, and the coagulation system collaborate and continuously influence one another

Platelet function and haemostasis overview

primary hemostasis → platelet plug formation

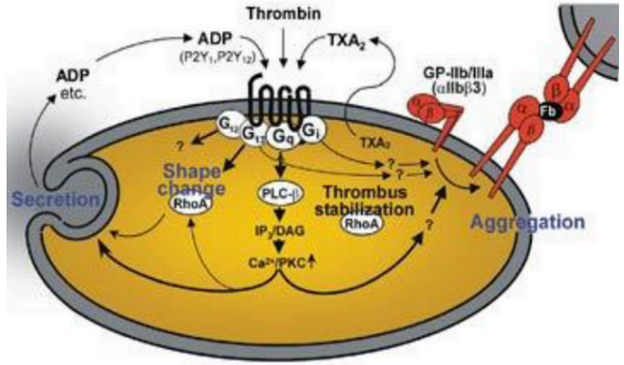
Adhesion

เกล็ดเลือดเกาะยึดกับผนังของหลอดเลือดที่มีการฉีกขาด



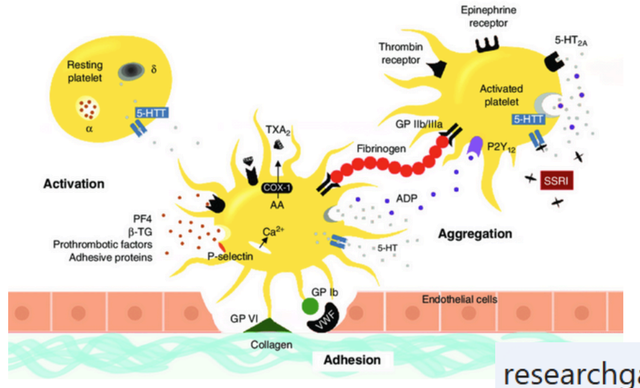
Activation

เกิดขึ้นหลังจากที่ receptor บน membrane ของเกล็ดเลือดถูกจับด้วย ligands ที่จำเพาะ แล้วทำให้เกิดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และเริ่มเกิด signal transduction



Aggregation

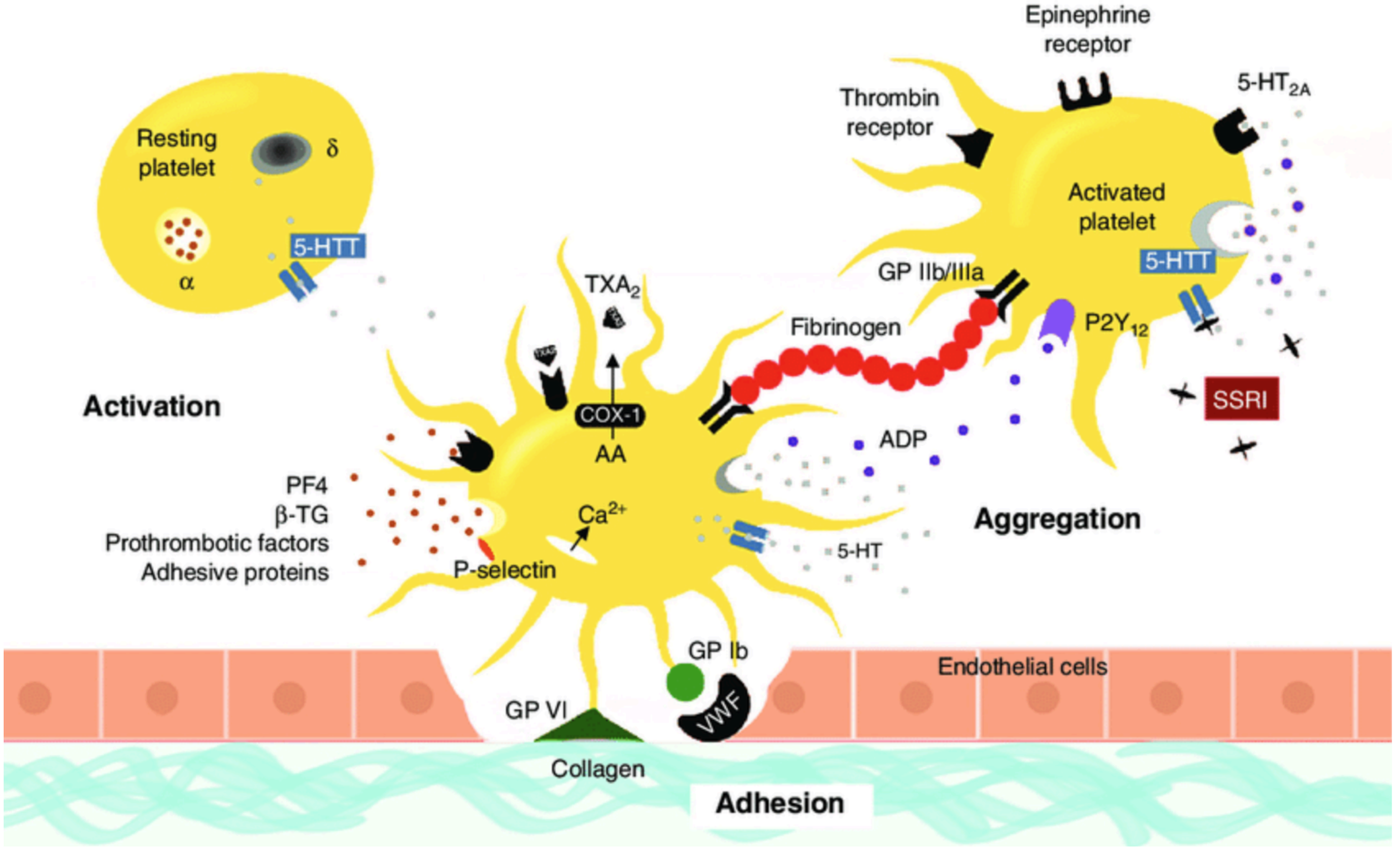
การเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นหลังจากเกิด adhesion โดย มี fibrinogen หรือ vWF ที่จับอยู่กับ GPIIbIIIa เป็นตัวเชื่อมระหว่างเกล็ดเลือด



researchgate.net



Periayah, et al. IJHOSCR 2017;11:319-27


Epinephrine receptor
Thrombin receptor
5-HT2A
Resting platelet
δ
α
5-HTT
Activated platelet
5-HTT
GP IIb/IIIa
TXA2
Fibrinogen
P2Y12
Activation
COX-1
AA
SSRI
ADP
PF4
β-TG
Prothrombotic factors
Adhesive proteins
Ca2+
Aggregation
P-selectin
5-HT
GP Ib
Endothelial cells
GP VI
VWF
Collagen
Adhesion

Platelet receptors critical for the hemostatic function

Platelet adhesion to thevessel wall

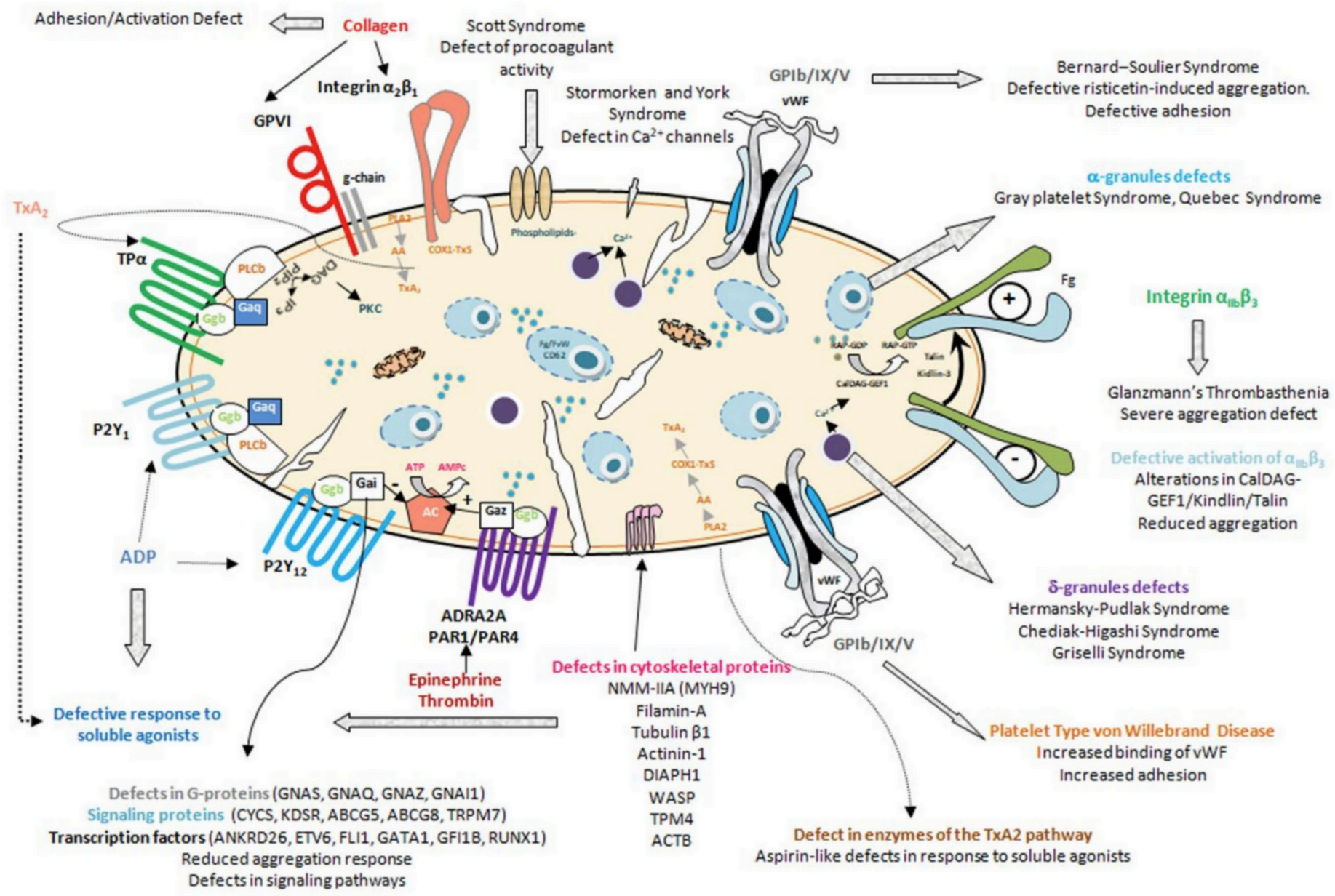
Receptors	Main ligands
GPIb-IX-V *	vWF, thrombospondin-1, thrombin,factors XI, XII, P-selectin
GPVI	Collagen, laminin
a2b1	Collagen, laminin
a6b1	Laminin
a5b1	Fibronectin
aVb3	Vitronectin, vWF, fibronectin, fibrinogen
aIIbb3 (i.e., GPIIb/IIIa)	Fibrinogen

Platelet activation

Receptors	Main ligands
PAR-1, PAR-4	Thrombin
P2Y1, P2Y12	ADP
TPa, TPb	TxA2
PGE2 receptor	PGE2
5-HT2A	Serotonin
P2 □ 1	ATP

Platelet aggregation

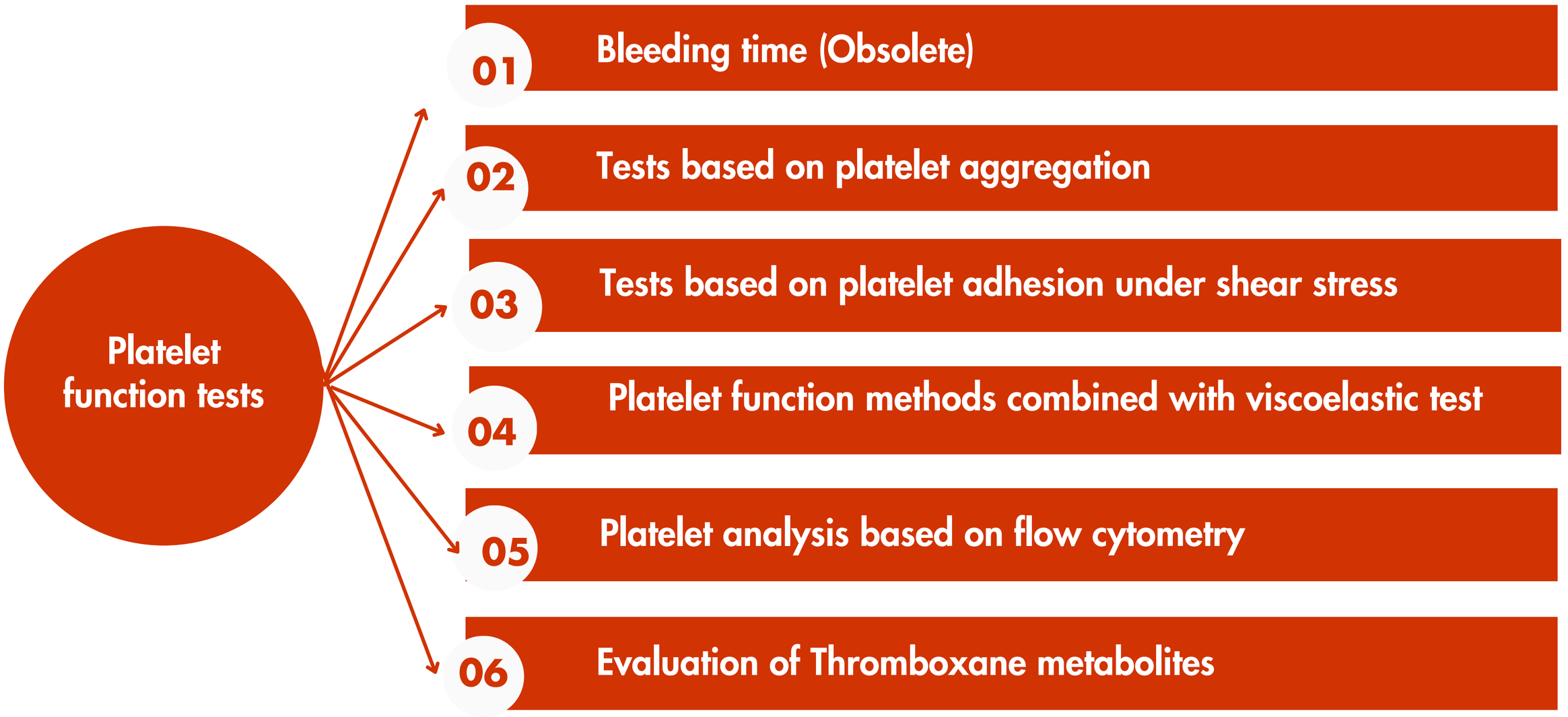
Receptors	Main Ligands
Activated aIIbb3 (i.e., GPIIb/IIIa)	Fibrinogen, vWF, thrombospondin-1, fibronectin



Inherited Platelet Disorders

Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 4521. https://doi.org/10.3390/ijms22094521

Methodologies for platelet function assessment



Tests based on platelet aggregation

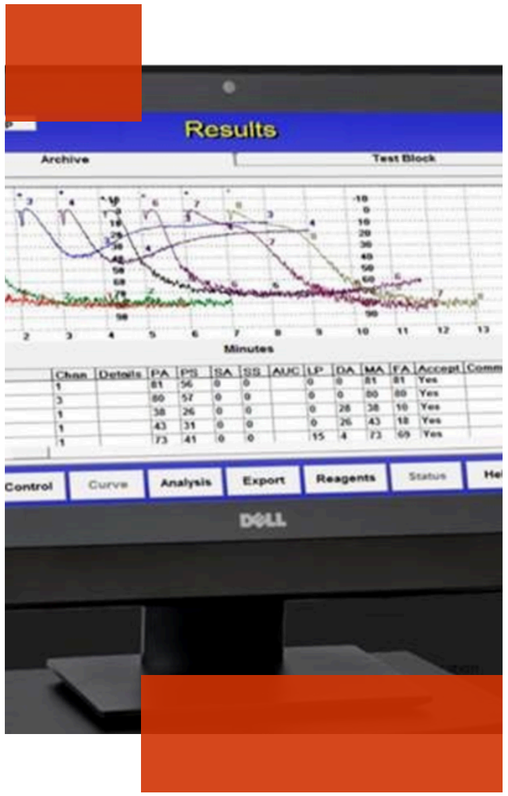
Light transmission aggregometry (LTA)

Sample: Citrated platelet rich plasma (PRP)

Method application:

- Screening test for bleeding tendency
- Diagnostic for platelet defects
- Monitoring antiplatelet treatment effect

Method principle: Photo-optical measurement of light transmission increase in relation to agonist-induced platelet aggregation



Lumiaggregometry

Sample: Citrated whole blood

Method application:

Detection of storage/release disorders

Method principle: LTA or WB aggregometry combined with luminescence

Impedance aggrgometry

Sample: Citrated whole blood

Method application:

- Screening test for bleeding tendency
- Diagnostic for platelet defects
- Monitoring antiplatelet treatment effect

Method principle: Measurement of electrical impedance increase in relation to agonist-induced platelet aggregation

Plateletworks

Sample: Citrated whole blood

Method application: Monitoring of the platelet response to antiplatelet agents

Method principle: Platelet counting pre- and post activation in whole blood

Tests based on platelet adhesion under shear stress

PFA-100; Innovance PFA-200

Sample: Citrated whole blood (WB)

Method application:

- Assessment of bleeding risk and drug effects
- Searching severe platelet dysfunctions, revealing of VWD

Method principle: Time evaluation of high shear WB flow blocked by platelet plug into a hole in activated surface



Impact; Cone and Plate(let) Analyzer

Sample: Citrated whole blood

Method application:

- Screening of primary hemostasis

Method principle: Shear-induced platelet adhesion–aggregation upon specific surface

Global thrombosis test (GTT)

Sample: Native whole blood

Method application: Evaluation of platelet function and thrombolysis

Method principle: Measurement of time cessation of WB flow by high shear-dependent platelet plug formation

Platelet function methods combined with viscoelastic test

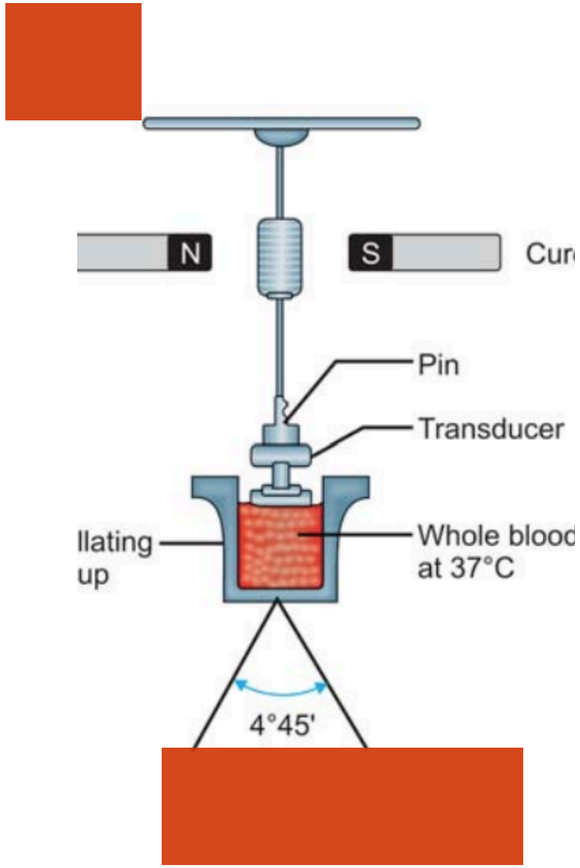
TEG/platelet mapping system

Sample: Citrated whole blood (WB)

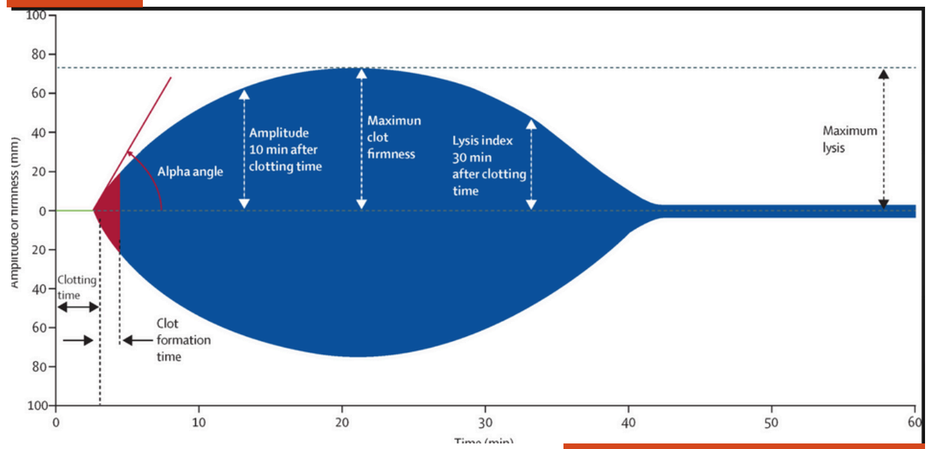
Method application:

- Assessment of global hemostasis plus monitoring antiplatelet treatments effect

Method principle: Evaluation of rate of clot formation based on low shear-induced and agonist addition



www.thelancet.com/infection Vol 19 August 2019



ROTEM platelet

Sample: Citrated whole blood

Method application:

- Assessment of global hemostasis plus
- diagnostic of platelet defects plus
- monitoring antiplatelet treatments effect

Method principle: Measurement of electrical impedance increase in relation to agonist-induced platelet aggregation

Platelet analysis based on flow cytometry

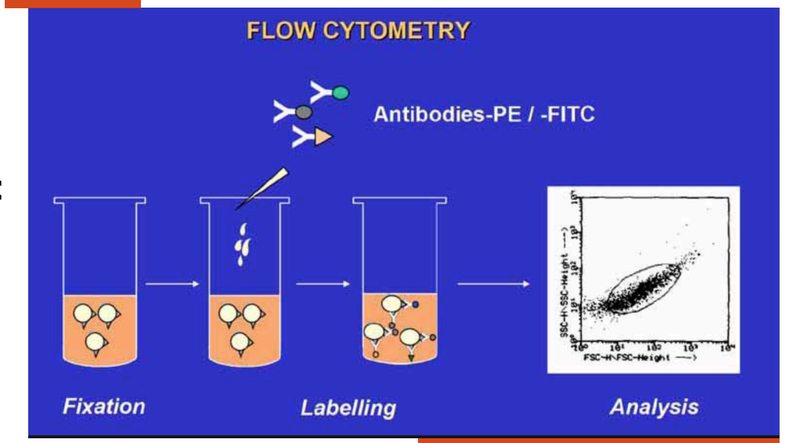
Flow cytometry

Sample: Citrated WB, PRP, washed-platelts

Method application:

- Cell counting, detection platelet activation by extent of expression of surface and/or cytoplasmic biomarkers

Method principle: Engineering laser-based detection of suspending fluorescent label platelets in a flowing solution



platelet-research.org/techniques-available/flow-cytometry/

Evaluation of Thromboxane metabolites

Radio- or enzyme-linked immune assays

Sample: Serum, urine, citrated platelets

Method application:

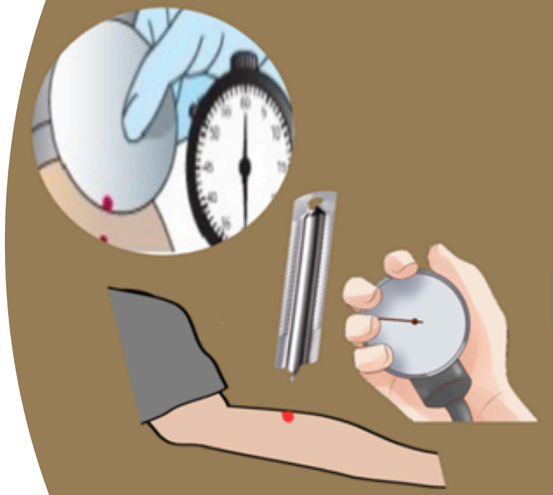
- Assessment of global hemostasis plus diagnostic of platelet defects plus monitoring antiplatelet treatments effect

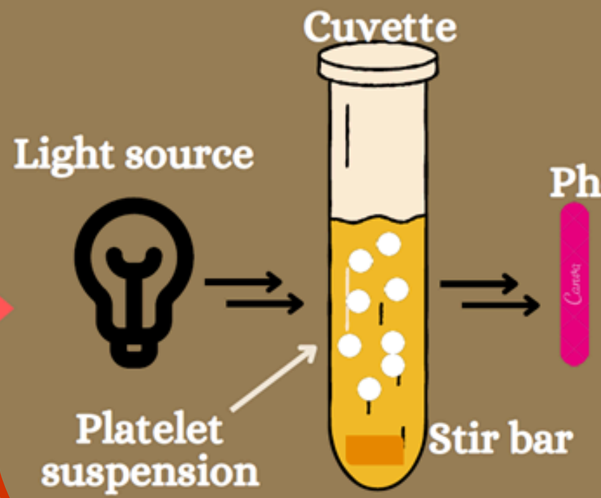
Method principle: Ligand-binding assays



Evolution of platelet function test

Platelet function testing







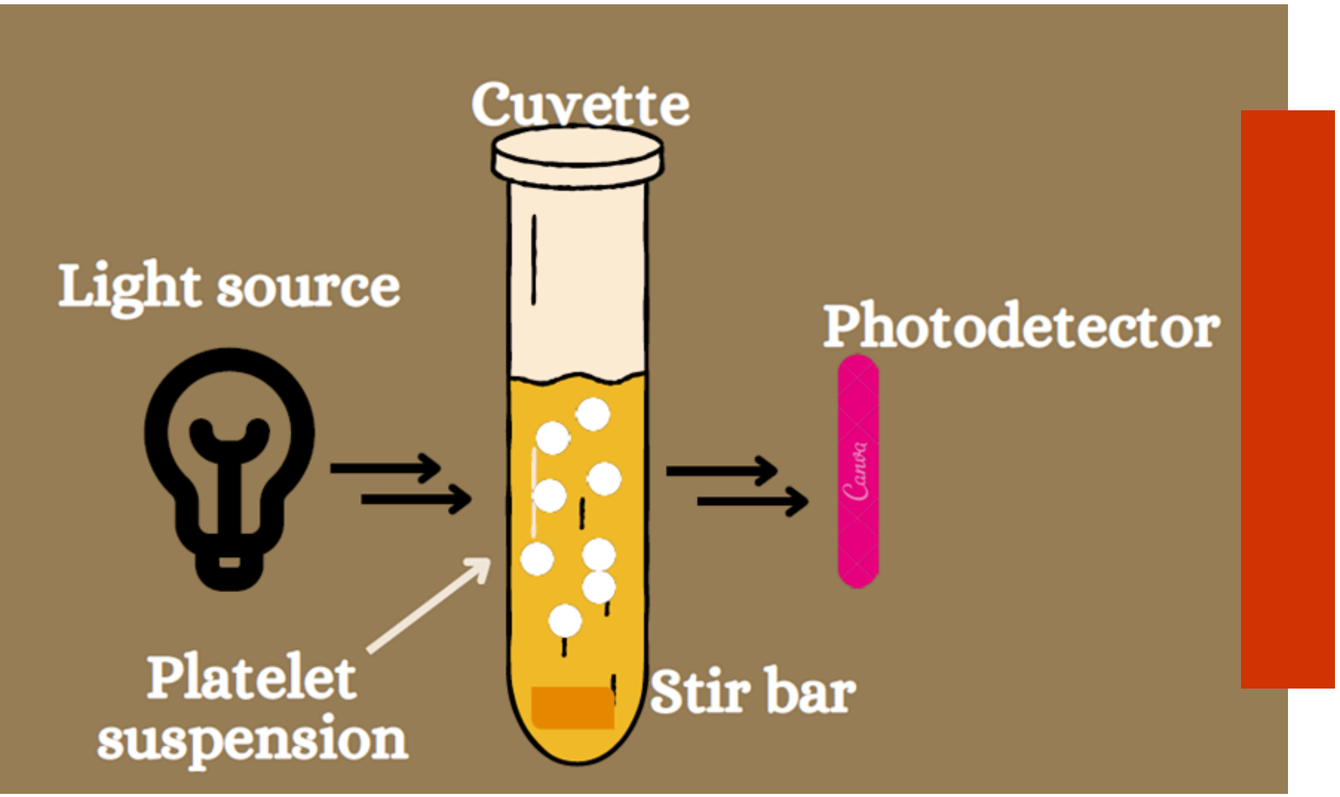
Waksman RPR. Cardiovasc Revasc Med 2011; 12: 312-22.

y bleeding time

Light transmission aggregometry (LTA)

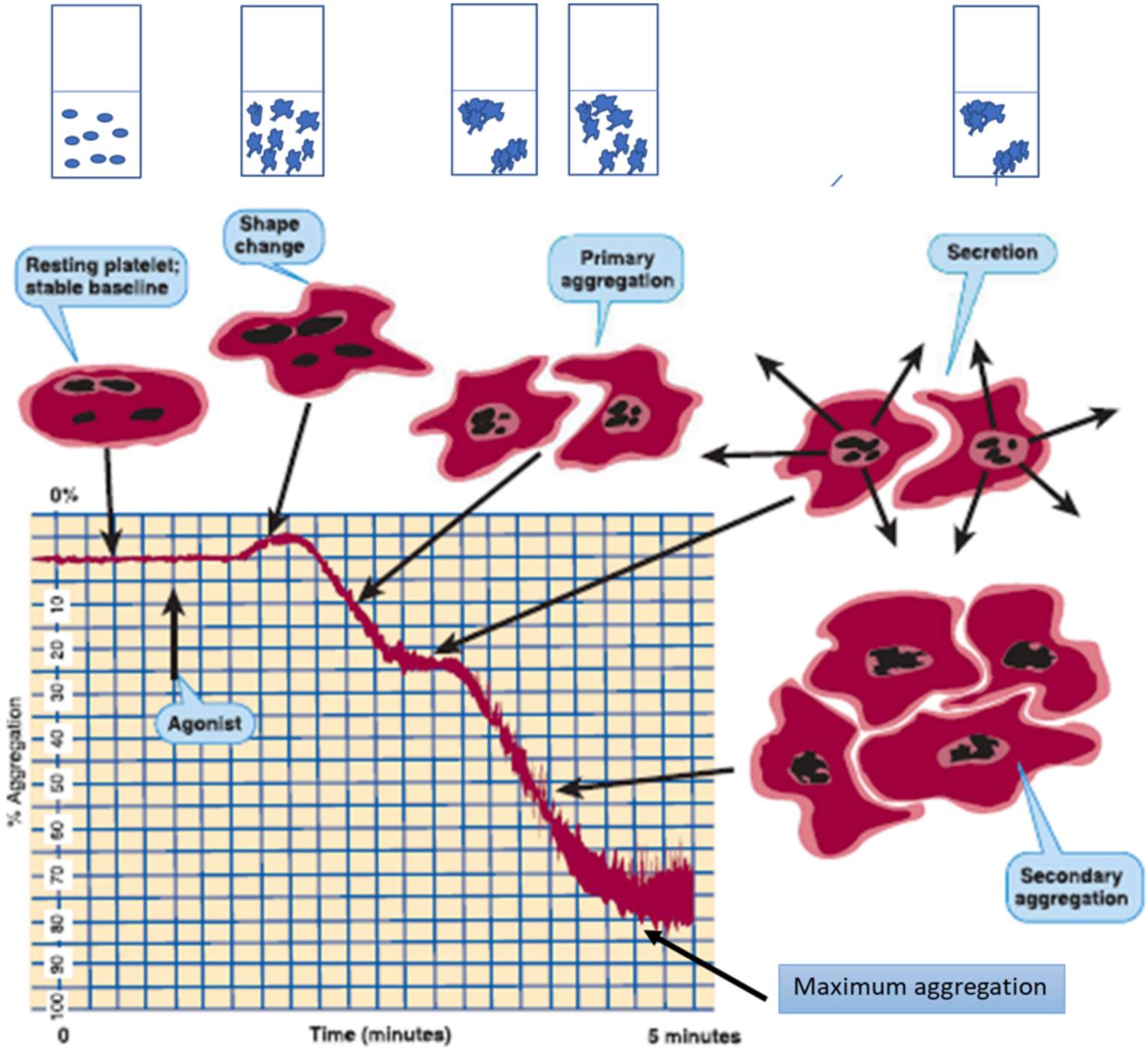
Newer platelet function testings

Light transmission platelet aggregometry (LTA)



LTA

- A classical Born aggregometry
- A gold standard method
- Analysis of platelet functions in platelet rich plasma
- Using various agonist to activate platelets



Principle of LTA

เมื่อเติมสารกระตุ้นเกล็ดเลือดลงใน PRP

↓

สารกระตุ้นเกล็ดเลือดจับกับ receptor บน membrane ของเกล็ดเลือด

↓

เกล็ดเลือดถูกกระตุ้น

↓

เกล็ดเลือดเกิดการเกาะกลุ่ม

↓

มีการเพิ่มขึ้นของ light transmission ซึ่งแปรตามปริมาณการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

- Platelet rich plasma (PRP): 0% light transmission
- Platelet poor plasma (PPP): 100% light transmission

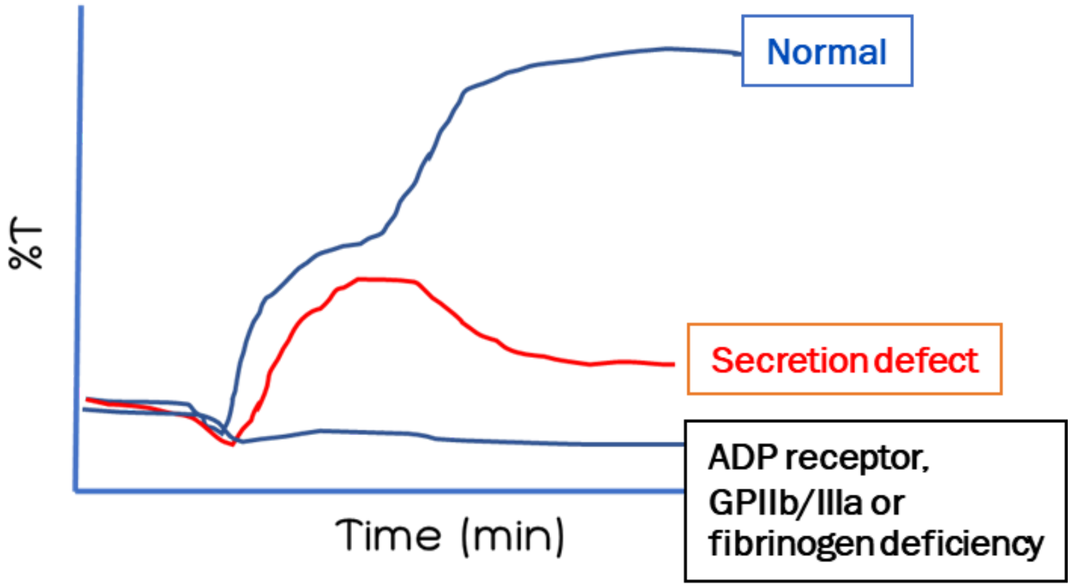
Aggregating agent (agonist)

Standard agonists for platelet function test in the clinical laboratory

- **ADP**
- **Epinephrine**
- **Collagen**
- **Ristocetin**

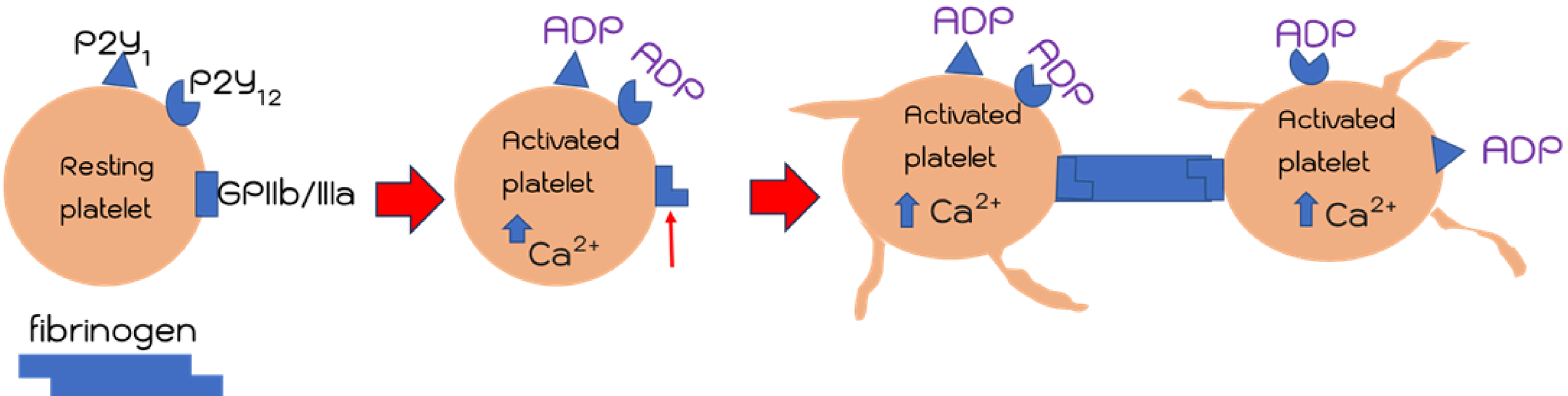
Arachidonic acid is added to test platelet prostaglandin pathways or the effect of aspirin on these pathways

Aggregating agents (agonists)

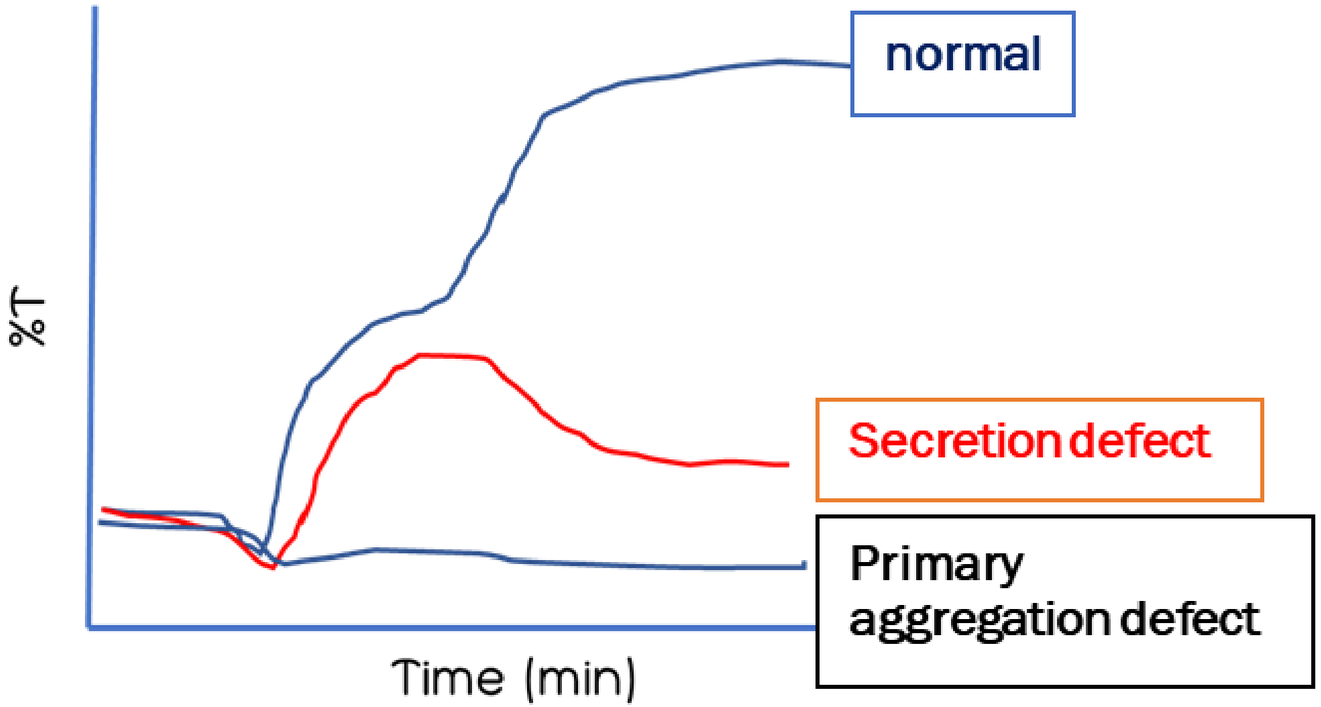


ADP (weak agonist) causes

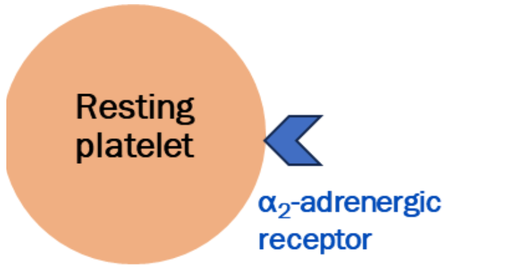
- primary aggregation
- secondary aggregation
- platelet shape change
- secretion from storage granules
- influx and intracellular mobilization of Ca2+
- Aggregation-dependent secretion

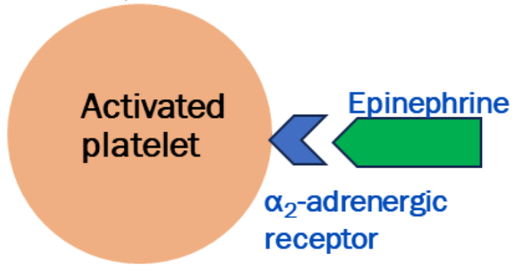


Aggregating agents (agonists)



Epinephrine



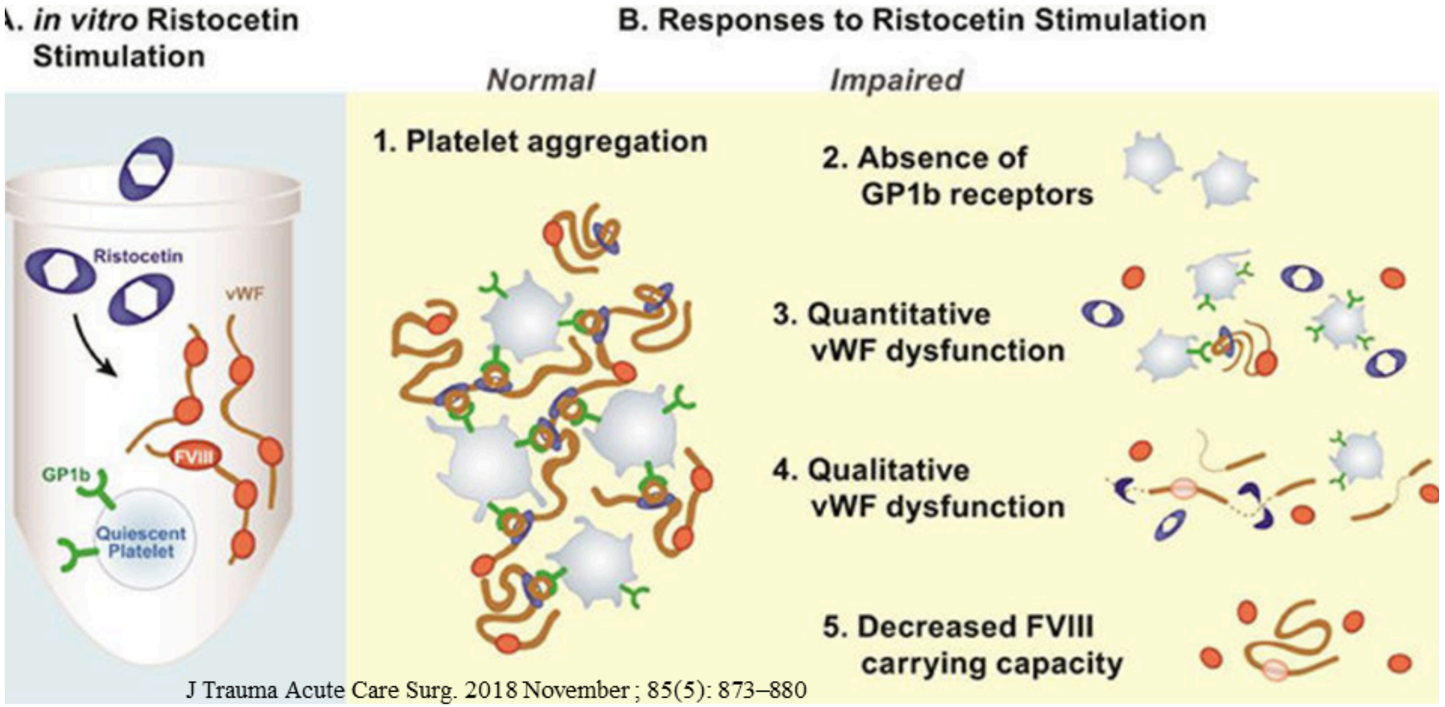


Inhibition of adenyl cyclase

Releases calcium ions from endoplasmic reticulum

Aggregation-dependent secretion

Aggregating agents (agonists)



J Trauma Acute Care Surg. 2018 November ; 85(5): 873–880

Ristocetin

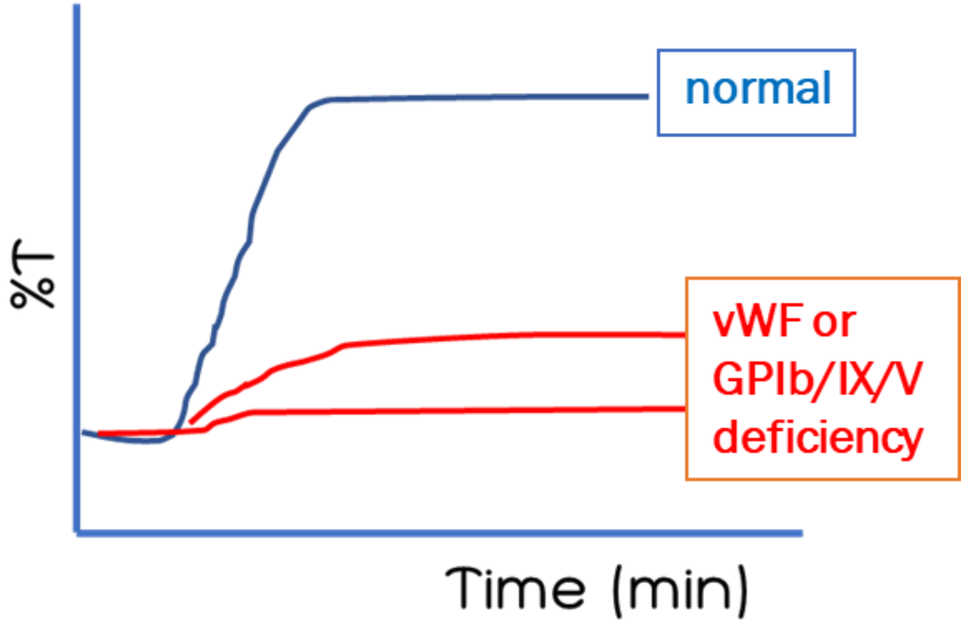
Ristocetin forms complexes with vWF

↓

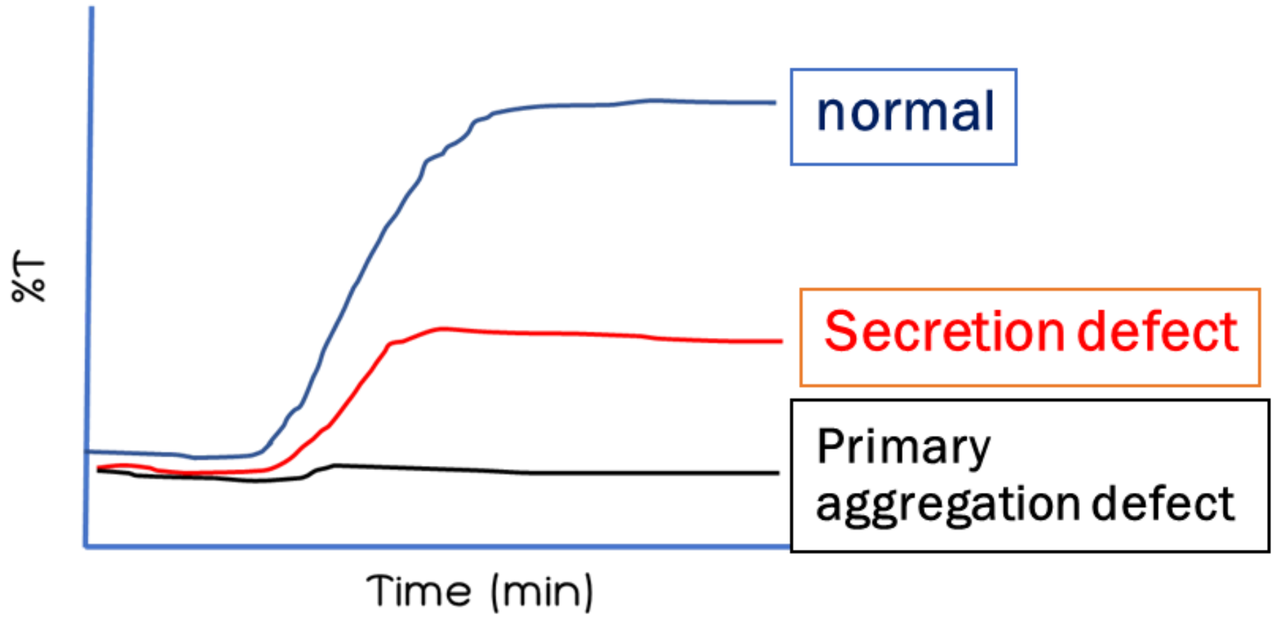
Conformational change in vWF

↓

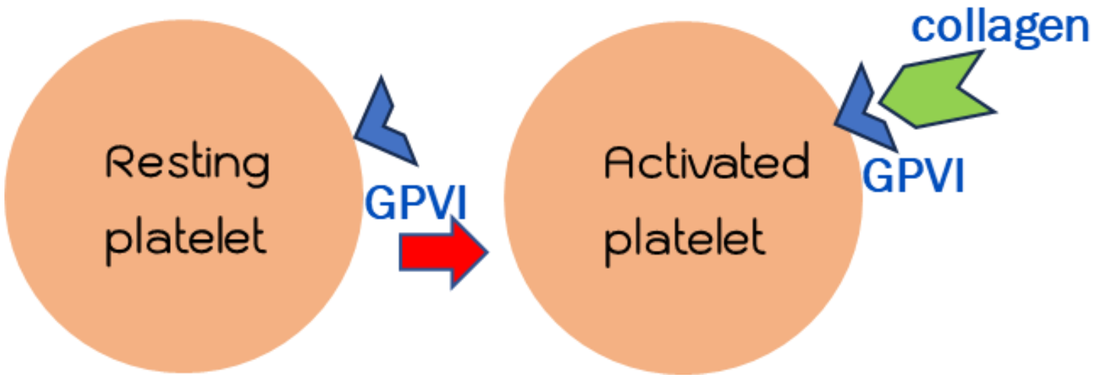
vWF binds to GPIbIXV & inducing platelet agglutination



Aggregating agents (agonists)



Collagen



Platelet signaling

Activation leading to TxA2 formation

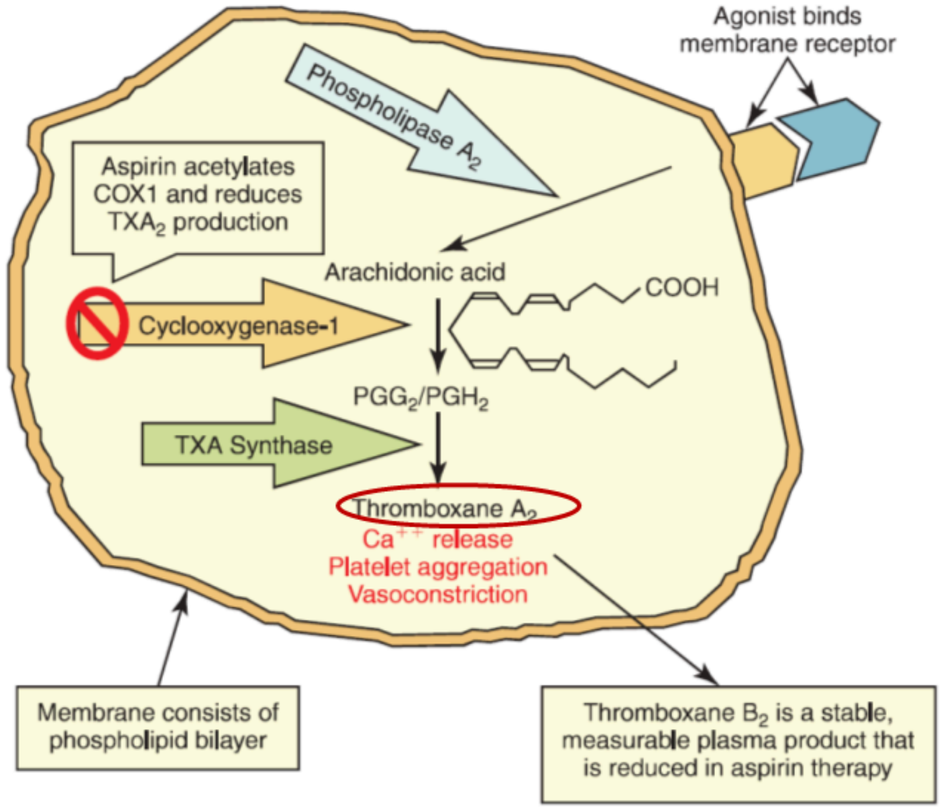
Secondary aggregation

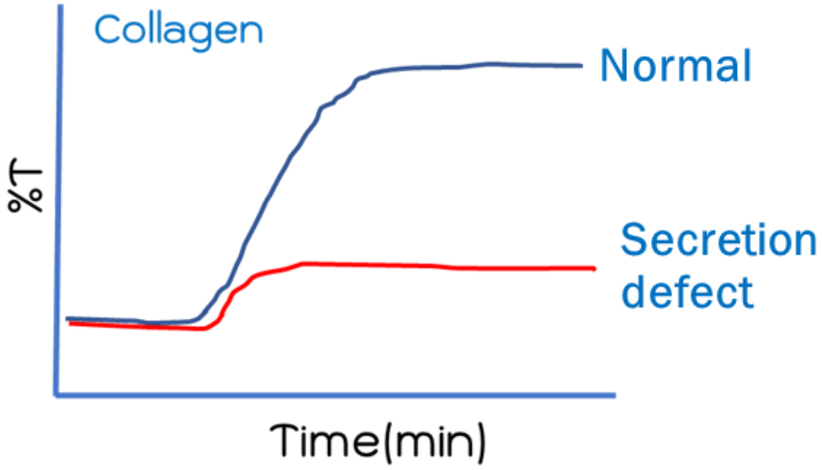
Aggregating agents (agonists)

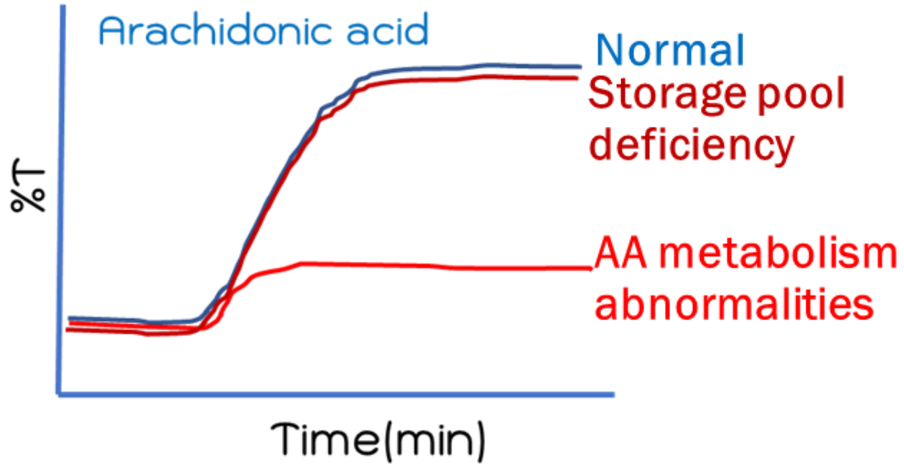
Arachidonic acid (AA)

Arachidonic acid = precursor of thromboxane A2 (TxA2) formation

Secondary platelet aggregation







Recommended concentrations of agonists for LTA in different guidelines

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ agonist มีความสำคัญต่อการแปลผลการทดสอบ และ interindividual variatuon

Int. J. Mol. Sci. **2017**, *18*, 1803

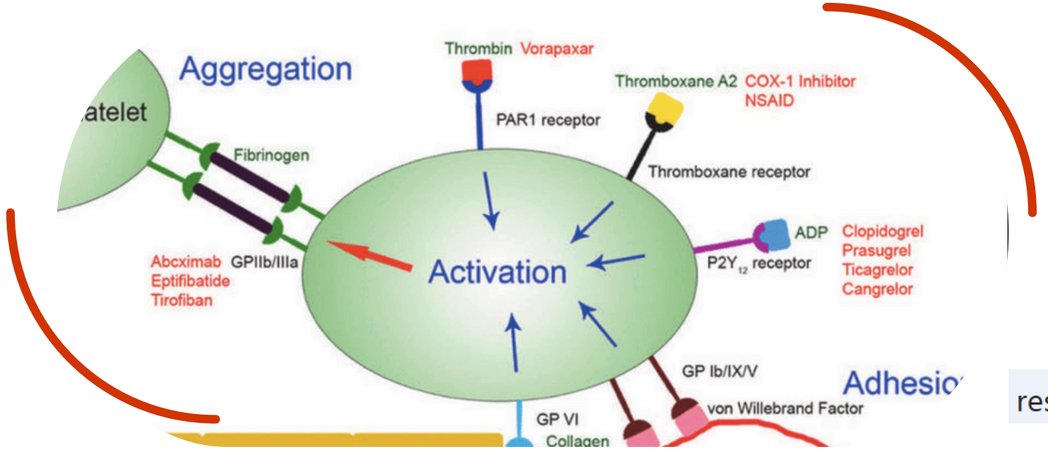
Agonist	Cattaneo et al. [46]	Hayward et al. [38]	Harrison et al. [48]		Christie et al. [47]
		Final Concentrations of the Agonists	Recommended Starting Concentrations in PRP	Range of Final Concentrations in PRP	Final Concentrations of the Agonists
Collagen	Use a low concentration of collagen, which is sufficient to cause the aggregation of normal platelets (e.g., 2 µg/mL Horm collagen). —Higher concentrations of collagen should be used if abnormal results with 2 µg/mL	A low concentration that is verified to detect impaired platelet function from aspirin and other cyclo-oxygenase 1 inhibitors is recommended Testing with a higher concentration should be performed when there is reduced maximal aggregation with the low concentration	1.25 µg/mL (type I tendon)	1.0–5.0 µg/mL	1–5 µg/mL type 1 fibrillary tipically 2 µg/mL to start
Epinephrine	5 µM Higher concentrations of epinephrine should be used if abnormal results with 5 µM	5–10 µmol/L A higher concentration of epinephrine does not have diagnostic utility and should not be included in the panel for LTA	5 µmol/L	0.5–10 µmol/L	0.5–10 µmol/L typically 5 µmol/L
ADP	2 µM Higher concentrations of ADP should be used if abnormal results with 2 µM	2.0–10 µmol/L Higher concentrations should be tested if aggregation is impaired with 2.0–2.5 µmol/L	2.5 µmol/L	0.5–20 µmol/L	0.5-10 µmol/L, typically 5 µmol/L
Ristocetin	1.2 mg/mL If platelet agglutination induced by ristocetin 1.2 mg/mL is normal, testing should be repeated using ristocetin 0.5–0.7 mg/mL If platelet agglutination induced by ristocetin 1.2 mg/mL is absent, testing should be repeated using ristocetin 2 mg/mL	Low: 0.5–0.6 mg/mL High: 1.2–1.5 mg/mL	1.2–1.5 mg/mL	1.2–1.5 and 0.5–0.7 mg/mL (single doses)	Low: ≤0.6 mg/mL High: 0.8–1.5 mg/mL
Thromboxane A2 Analogue U46619	1 µM Higher concentrations of U46619 should be used if abnormal results with 1 µM	1.0 µmol/L	-	1.0 µmol/L (single dose)	1–2 µmol/L
Arachidonic Acid	1 mM Higher concentrations of arachidonic acid should be used if abnormal results with 1 mM	0.5–1.64 mmol/L	0.5–1.0 mmol/L (single dose)	0.5–1.0 mmol/L (single dose)	single concentration between 0.5 and 1.6 mmol/L

Appropriate concentrations of agonists must be chosen

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ **agonist** มีความสำคัญต่อการแปลผลการทดสอบ และ **interindividual variation**

Hayward et al, 2010 (Am J Clin Pathol 2010, 134, 955–63)

- **60 healthy volunteers, using the concentrations recommended by the ISTH guideline**
- **Inter–individual coefficients of variation (CV) for maximal aggregation 6.7-11.4%**
- **Low ADP concentration (2 μM) is associated with higher variability (CV = 17.4%)**



researchgate.net

Pre-analytical variables

Proper patient preparation is essential

Accurate sample collection is critical

Minimize variability and ensure reliability





Patient preparation

คำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยและมีผลต่อการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือดก่อนการเจาะเก็บเลือด

Sample collection

ปฏิบัติตามขั้นตอนการเจาะเก็บเลือดอย่างถูกต้อง

Sample preparation

ปฏิบัติตามขั้นตอนการเตรียมอย่างอย่างถูกต้อง

Patient preparation

ปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยและมีผลต่อการตรวจวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยวิธี **LTA**

Exercise

การหลั่งอะดรีนาลีนจากการออกกำลังกายมีผลเพิ่มการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

ควรเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับการตรวจ LTA หลังผู้ป่วยพักเป็นระยะเวลาสั้น ๆ เพื่อลดผลกระทบจากอะดรีนาลีน

Smoking

สารนิโคตินในบุหรี่มีผลกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด

ควรเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่งดสูบบุหรี่อย่างน้อย 30 นาที ก่อนการตรวจ LTA เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่แม่นยำ

Cafeine

Cafeine มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด

ควรเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่งดดื่มเครื่องดื่มที่มี Cafeine อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนการตรวจ LTA เพื่อป้องกันผลกระทบต่อผลการตรวจ

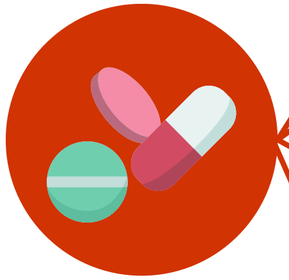
Cattaneo M, et al. J Thromb Haemost 2013; 11: 1183–9

Drug-induced effects on platelet function

Harrison P, et al. Br J Haematol 2011; 155: 30–44

- Cyclo-oxygenase (COX)-1 inhibitors (irreversible)
  - Aspirin and all proprietary or over-the-counter preparations containing acetylsalicylic acid
- COX-1 and COX-2 inhibitors (reversible) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)
  - Ibuprofen
  - Indomethacin, naproxen
  - Mefenamic acid
- Inhibitors of Platelet Receptors
  - Abciximab, tirofiban, eptifibatide ($\alpha IIb\beta 3$)
  - Ticlopidine, clopidogrel, prasugrel (irreversible), cangrelor (reversible), ticagrelor (reversible) ($P2Y_{12}$)
- Phosphodiesterase Inhibitors
  - Dipyridamole
  - Cilostazole
- Anticoagulants
  - Heparinoids, vitamin K antagonists and direct thrombin inhibitors may indirectly influence platelet function due to inhibition of thrombin.
- Cardiovascular Agents
  - β-adrenergic blockers (propranolol)
  - Vasodilators (nitroprusside, nitroglycerin)
  - Diuretics (furosemide)
  - Calcium channel blockers
- Antimicrobials
  - β-lactams (penicillins, cephalosporins)
  - Amphotericin (antifungal)
  - Hydroxychloroquine (antimalarial)
  - Nitrofurantoin
- Chemotherapeutic agents
  - Asparaginase
  - Plicamycin
  - Vincristine
- Psychotropics and Anaesthetics
  - Tricyclic antidepressants (imipramine)
  - Phenothiazines (chloropromazine)
  - Local and general anaesthesia (halothane)
- Thrombolytic Agents
  - Streptokinase
  - Urokinase
  - Tissue Plasminogen Activator (TPA)
- Miscellaneous
  - Clofibrate
  - Dextrans
  - Guaifenesin (expectorant)
  - Radiographic contrast media
- Food/Herbs (at high concentrations)
  - Alcohol
  - Caffeine (methylxanthine)
  - Cumin
  - Dong quai
  - Fenugreek
  - Garlic, onion, ginger
  - Ginseng

ยาที่มีผลต่อการทำงานของเกล็ดเลือด



01 ควรเก็บรวบรวมประวัติยาที่ผู้ป่วยได้รับทั้งหมดในสัปดาห์ก่อนการตรวจ

02 ควรหยุดยาที่มีฤทธิ์ยาที่ทราบว่ายับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดแบบผันกลับได้ (เช่น NSAIDs) ควรหยุดอย่างน้อย 3 วันก่อนการเก็บตัวอย่าง

03 ควรหยุดยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดแบบไม่ผันกลับ (เช่น aspirin) อย่างน้อย 10 วันก่อนการเก็บตัวอย่าง

04 เมื่อไม่สามารถหยุดการรักษาด้วยยาที่ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดก่อนการเก็บตัวอย่างได้ ควรพิจารณาผลกระทบของยาต่อการทำงานของเกล็ดเลือดเมื่อแปลผล LTA

Lipidemia





- Lipemia มีผลต่อการปรับ baseline turbidity
- ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าควรเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับการตรวจ LTA จากผู้ป่วยที่งดอาหารหรือไม่
- ผลกระทบจาก light meal อาจมีน้อยมาก
- ผู้ป่วยไม่ควรรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงก่อนการเจาะเลือดเพื่อการตรวจ LTA เพื่อหลีกเลี่ยงการก่อตัวของไคโลไมครอนในพลาสมา ซึ่งจะรบกวนการส่งผ่านแสง

Blood collection

CLSI recommendation

- ควรเจาะเลือดโดยเกิด venostasis น้อยที่สุด

หากจำเป็นต้องใช้สายรัดแขน ควรคลายสายรัดทันทีที่เริ่มเก็บเลือด

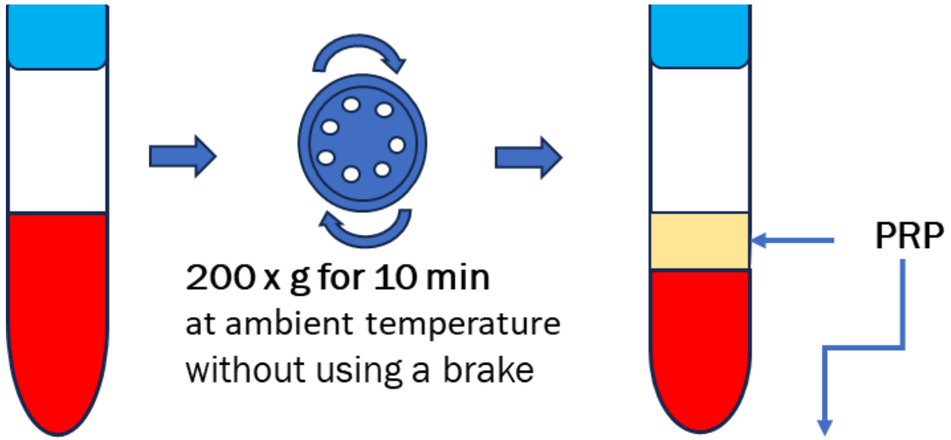
- ควรเจาะเลือดโดยใช้เข็มขนาด 19-21 gauge
- ควรเจาะเลือดและเก็บลงในหลอดพลาสติก (polypropylene) หรือหลอดแก้วที่เคลือบซิลิโคน
- สารกันเลือดแข็งที่มีบัฟเฟอร์ เพื่อช่วยรักษาระดับ pH ให้คงที่ระหว่างการเตรียมและทดสอบ trisodium citrate ที่มีความเข้มข้น 105-109 mM หรือ 3.2% trisodium citrate
- ควรทิ้งเลือด 3-4 มิลลิลิตรแรกที่เจาะได้ หรือใช้สำหรับการทดสอบอื่นที่ไม่ใช่ LTA
- ผสมเลือดให้เข้ากับสารกันเลือดแข็งแบบ invert เบา ๆ 3-6 ครั้ง
- นำส่งเลือดที่เจาะได้ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งหลอดตรงปิดจุก และไม่ส่งหลอดเก็บเลือดทางระบบ pneumatic
- ทำการทดสอบภายใน 4 ชั่วโมง



การเตรียมตัวอย่าง PRP สำหรับการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (LTA)

Cattaneo M, et al. J Thromb Haemost 2013; 11: 1183–9

Preparation of platelet rich plasma (PRP)



ควรวางตัวอย่างเลือด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

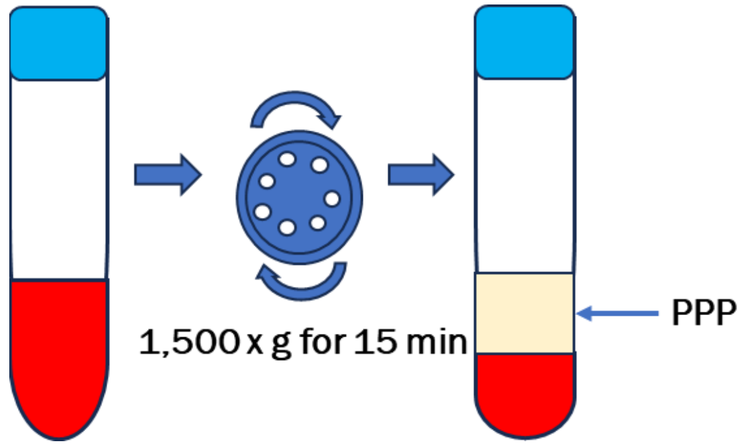
เกล็ดเลือดกลับคืนสู่สภาพปกติหลังจากการเจาะเลือด

- ไม่ทำการทดสอบใน PRP ที่มี haemolysis แบบมองเห็นด้วยตาเปล่า (grossly haemolysis)
- ไม่จำเป็นต้องปรับจำนวนเกล็ดเลือดด้วย PPP เพื่อให้มีจำนวนตามที่เกณฑ์กำหนด
- ควรนับจำนวนเกล็ดลือดใน PRP ก่อนการทดสอบ

ผลการทดสอบอาจไม่ถูกต้องเมื่อจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP < 150,000 /µL

CLSI recommendation: ถ้าจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP > 400,000/µL ให้ปรับจำนวนเกล็ดเลือดด้วย PPP ให้อยู่ที่ 200,000-250,000/µL

Preparation of platelet poor plasma (PPP)



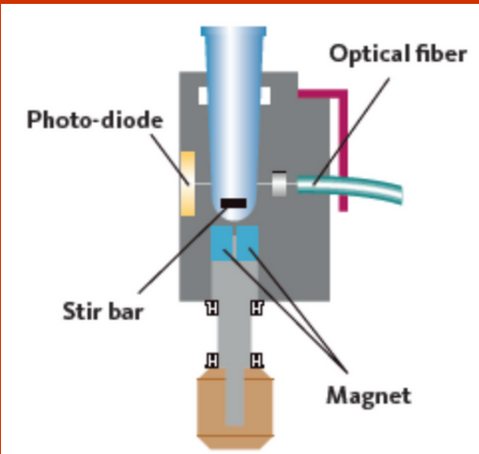
Procedure of platelet aggregation test LTA)

Platelet aggregometer



Automated coagulometer





Procedure

- อุ่น Aggregometer block ให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- เตรียม Cuvette โดยใส่ magnetic stirbar ลงใน cuvette
- กำหนด Baseline ของ aggregation curve โดยใช้ PPP กำหนด 100%T และใช้ PRP กำหนด 0%T
- ทำการทดสอบ PRP ของผู้ป่วยและคนปกติ ซึ่งควรทำพร้อมกัน ถ้าเครื่องมี 2 blocks โดยใช้ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับ stir เป็นเวลา 3 นาที
- กระตุ้นเกล็ดเลือด โดยเติม agonist 50 ไมโครลิตร*
- จับเวลาทันทีที่เติม agonist แล้วปล่อยให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มกัน ประมาณ 5-8 นาที
- ทำซ้ำกับ agonist ตัวอื่นจนครบ
- แสดงผลลัพธ์เป็น aggregation curve

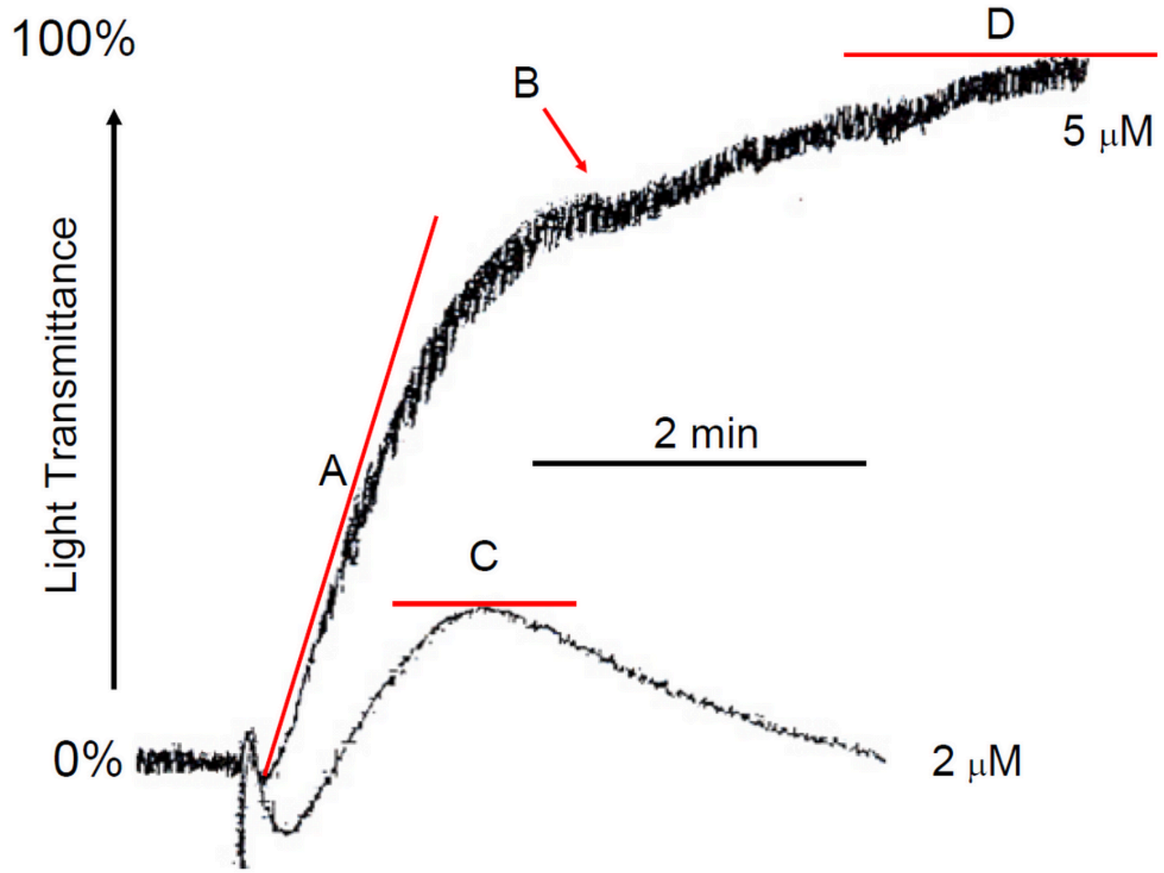


*: ปริมาณ **agonist** ที่เติมใน **PRP** เป็น **5-10** ไมโครลิตร ได้ แต่ต้องเป็นสัดส่วนเดียวกันสำหรับ **agonist** แต่ละชนิดที่ใช้

Evaluation and reporting of results

The platelet aggregation tracing should be evaluated based on

- presence of shape change
- length of the lag phase
- slope of aggregation **(A)**
- Maximal amplitude or % aggregation **(C, D)**
- Amplitude or % aggregation at the end of the monitoring period
- Deaggregation **(B)**
- Visual examination of the aggregation tracings
- presence of a ‘secondary wave’ induced by epinephrine



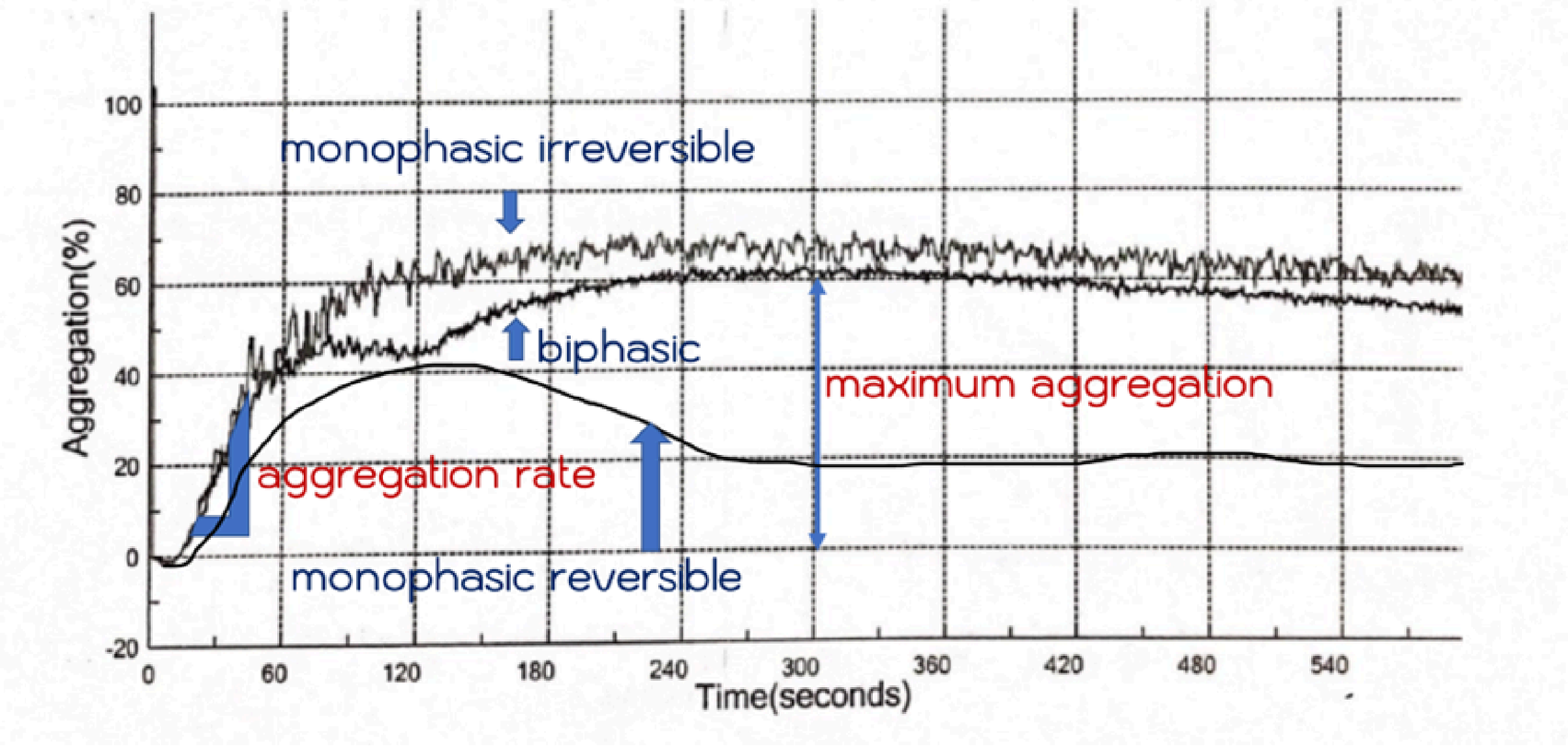
Example of ADP induced platelet aggregation by LTA at 2 concentrations; 2 and 5 ไมโครโมลาร์

CLSI

Evaluation and reporting of results

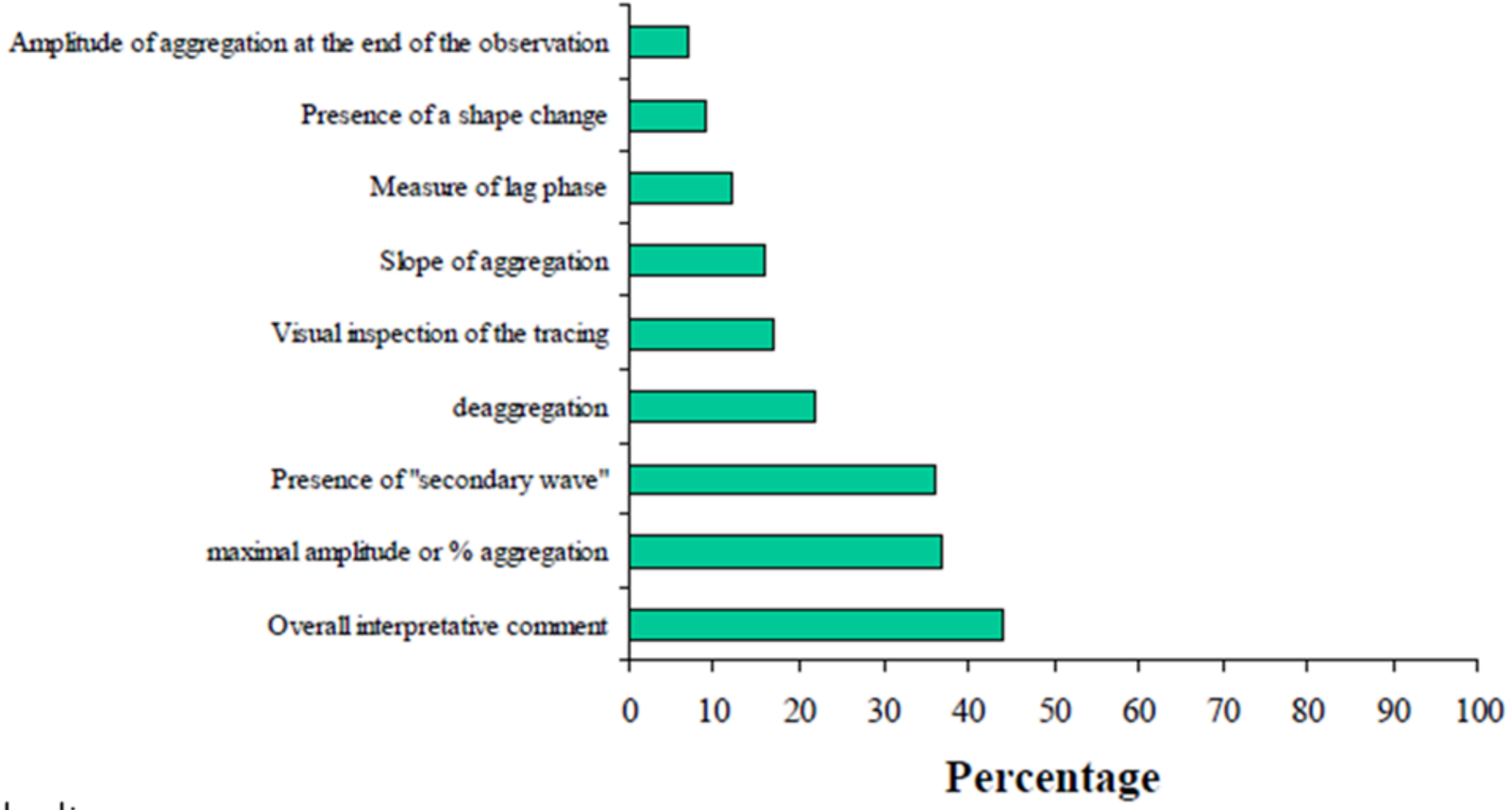
Platelet aggregation pattern

- Monophasic reversible
- Biphasic
- Monophasic irreversible



- Studies completed more than 4 h after blood collection should be reported
- Clinical laboratories must establish appropriate reference intervals and validate test performance with each lot of reagents

Parameters Included in Report



Standardisation of platelet function testing

CLSI guideline H58-P

Interpretation of platelet aggregation test

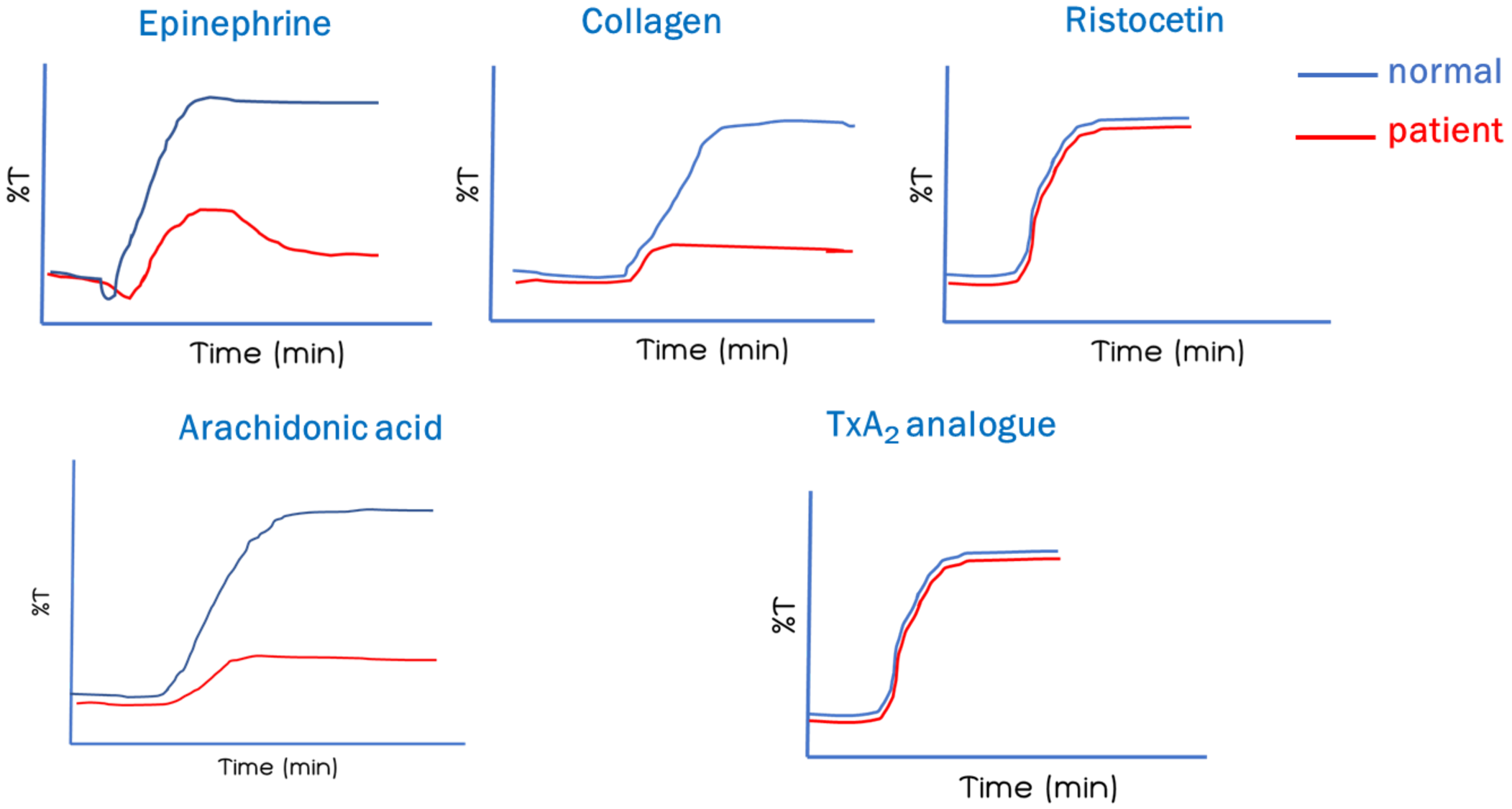
Am J Clin Pathol 2010;134:955-963

Level of Agreement With Recommendation Statements on the Interpretation of LTA and Follow-up Investigations to Consider for Different Types of Abnormalities*

LTA Finding	Recommended Interpretation	Follow-up Investigations to Consider
Aggregation is absent or markedly reduced with arachidonic acid, normal with thromboxane analogue, and reduced with low concentrations of collagen. There is absent secondary aggregation with epinephrine.	Aspirin-like defect (drug induced or inherited); drug history should be reviewed.	Repeat testing when subject is not taking aspirin or other nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Aggregation is present only with ristocetin.	Possible Glanzmann thrombasthenia (inherited or acquired)	Glycoprotein analysis to assess the platelet fibrinogen receptor αIIbβ3
Aggregation is absent with high concentrations of ristocetin, and the patient has thrombocytopenia with very large platelets (can be normal if the defect is acquired).	Possible Bernard Soulier syndrome (inherited or acquired); von Willebrand factor deficiency should be excluded.	Glycoprotein analysis to assess glycoprotein IbIXV, the platelet von Willebrand factor receptor
Aggregation is reduced with high concentrations of ristocetin, and the patient does not have thrombocytopenia.	Interpretation should consider the possibility of von Willebrand disease.	von Willebrand factor levels
Aggregation is abnormally increased with low concentrations of ristocetin.	Possible type 2B or platelet-type von Willebrand disease	von Willebrand factor levels; consider genetic testing for type 2B or platelet-type von Willebrand disease
Aggregation is abnormal with a number of agonists but markedly impaired with ADP, with significant deaggregation.	The possibility of a platelet ADP receptor defect (P2Y12) should be considered. A drug-induced defect should be excluded as the cause.	Repeat aggregation testing
Other abnormalities with ≥2 agonists	The findings suggest that a platelet function disorder is present. The findings should be confirmed on another sample, if clinically indicated.	Platelet ATP release and/or electron microscopy for dense granule deficiency
Abnormalities seen with only 1 agonist (excluding collagen or ristocetin)	Aggregation responses indicate a single agonist abnormality that is nondiagnostic and could represent a false-positive.	Repeat aggregation testing, platelet ATP release, and/or electron microscopy for dense granule deficiency

ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; LTA, light transmission platelet aggregometry; NASCOLA, North American Specialized Coagulation Laboratory Association; QMP-LS, Quality Management Program–Laboratory Services.

* Data are given as number (percentage) unless otherwise indicated. The level of agreement for the combined group was corrected for overlap of 5 participants. Grades indicate if recommendations were accepted or rejected.



- **Aspirin liked defect (drug induced or inherited)**
- **Drug history should be reviewed**

Interpretation of platelet aggregation test

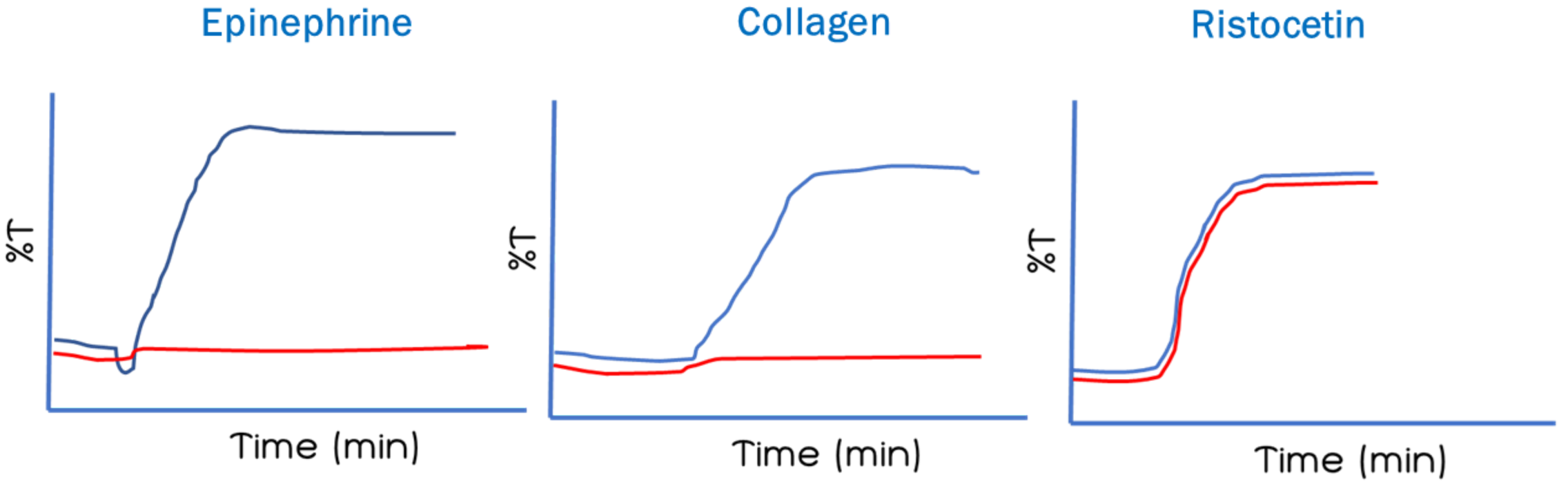
Am J Clin Pathol 2010;134:955-963

Level of Agreement With Recommendation Statements on the Interpretation of LTA and Follow-up Investigations to Consider for Different Types of Abnormalities*

LTA Finding	Recommended Interpretation	Follow-up Investigations to Consider
Aggregation is absent or markedly reduced with arachidonic acid, normal with thromboxane analogue, and reduced with low concentrations of collagen. There is absent secondary aggregation with epinephrine.	Aspirin-like defect (drug induced or inherited); drug history should be reviewed.	Repeat testing when subject is not taking aspirin or other nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Aggregation is present only with ristocetin.	Possible Glanzmann thrombasthenia (inherited or acquired)	Glycoprotein analysis to assess the platelet fibrinogen receptor αIIbβ3
Aggregation is absent with high concentrations of ristocetin, and the patient has thrombocytopenia with very large platelets (can be normal if the defect is acquired).	Possible Bernard Soulier syndrome (inherited or acquired); von Willebrand factor deficiency should be excluded.	Glycoprotein analysis to assess glycoprotein IbIXV, the platelet von Willebrand factor receptor
Aggregation is reduced with high concentrations of ristocetin, and the patient does not have thrombocytopenia.	Interpretation should consider the possibility of von Willebrand disease.	von Willebrand factor levels
Aggregation is abnormally increased with low concentrations of ristocetin.	Possible type 2B or platelet-type von Willebrand disease	von Willebrand factor levels; consider genetic testing for type 2B or platelet-type von Willebrand disease
Aggregation is abnormal with a number of agonists but markedly impaired with ADP, with significant deaggregation.	The possibility of a platelet ADP receptor defect (P2Y12) should be considered. A drug-induced defect should be excluded as the cause.	Repeat aggregation testing
Other abnormalities with ≥2 agonists	The findings suggest that a platelet function disorder is present. The findings should be confirmed on another sample, if clinically indicated.	Platelet ATP release and/or electron microscopy for dense granule deficiency
Abnormalities seen with only 1 agonist (excluding collagen or ristocetin)	Aggregation responses indicate a single agonist abnormality that is nondiagnostic and could represent a false-positive.	Repeat aggregation testing, platelet ATP release, and/or electron microscopy for dense granule deficiency

ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; LTA, light transmission platelet aggregometry; NASCOLA, North American Specialized Coagulation Laboratory Association; QMP-LS, Quality Management Program–Laboratory Services.

* Data are given as number (percentage) unless otherwise indicated. The level of agreement for the combined group was corrected for overlap of 5 participants. Grades indicate if recommendations were accepted or rejected.



GPIIb/IIIa deficiency: possible Glanzmann thrombasthenia (inherited or acquired)
or ADP receptor deficiency
or fibrinogen deficiency

glycoprotein analysis to assess platelet fibrinogen receptor (αIIbβ3 or GPIIb/IIIa)

Interpretation of platelet aggregation test

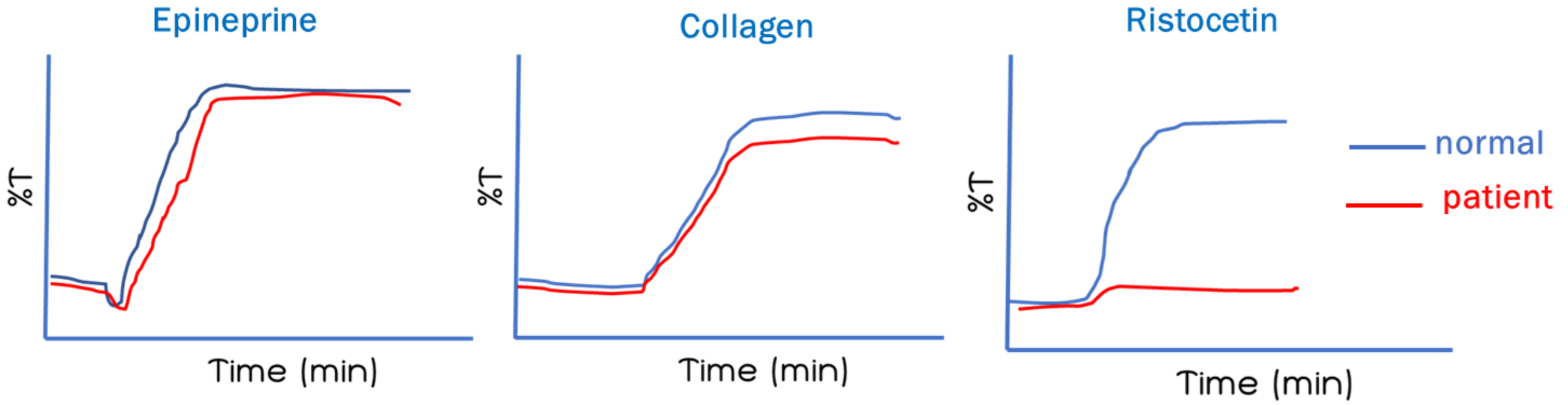
Am J Clin Pathol 2010;134:955-963

Level of Agreement With Recommendation Statements on the Interpretation of LTA and Follow-up Investigations to Consider for Different Types of Abnormalities*

LTA Finding	Recommended Interpretation	Follow-up Investigations to Consider
Aggregation is absent or markedly reduced with arachidonic acid, normal with thromboxane analogue, and reduced with low concentrations of collagen. There is absent secondary aggregation with epinephrine.	Aspirin-like defect (drug induced or inherited); drug history should be reviewed.	Repeat testing when subject is not taking aspirin or other nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Aggregation is present only with ristocetin.	Possible Glanzmann thrombasthenia (inherited or acquired)	Glycoprotein analysis to assess the platelet fibrinogen receptor αIIbβ3
Aggregation is absent with high concentrations of ristocetin, and the patient has thrombocytopenia with very large platelets (can be normal if the defect is acquired).	Possible Bernard Soulier syndrome (inherited or acquired); von Willebrand factor deficiency should be excluded.	Glycoprotein analysis to assess glycoprotein IbIXV, the platelet von Willebrand factor receptor
Aggregation is reduced with high concentrations of ristocetin, and the patient does not have thrombocytopenia.	Interpretation should consider the possibility of von Willebrand disease.	von Willebrand factor levels
Aggregation is abnormally increased with low concentrations of ristocetin.	Possible type 2B or platelet-type von Willebrand disease	von Willebrand factor levels; consider genetic testing for type 2B or platelet-type von Willebrand disease
Aggregation is abnormal with a number of agonists but markedly impaired with ADP, with significant deaggregation.	The possibility of a platelet ADP receptor defect (P2Y12) should be considered. A drug-induced defect should be excluded as the cause.	Repeat aggregation testing
Other abnormalities with ≥2 agonists	The findings suggest that a platelet function disorder is present. The findings should be confirmed on another sample, if clinically indicated.	Platelet ATP release and/or electron microscopy for dense granule deficiency
Abnormalities seen with only 1 agonist (excluding collagen or ristocetin)	Aggregation responses indicate a single agonist abnormality that is nondiagnostic and could represent a false-positive.	Repeat aggregation testing, platelet ATP release, and/or electron microscopy for dense granule deficiency

ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; LTA, light transmission platelet aggregometry; NASCOLA, North American Specialized Coagulation Laboratory Association; QMP-LS, Quality Management Program–Laboratory Services.

* Data are given as number (percentage) unless otherwise indicated. The level of agreement for the combined group was corrected for overlap of 5 participants. Grades indicate if recommendations were accepted or rejected.



GPIb/IX/V deficiency + macrothrombocytopenia: Possible Bernard Soulier syndrome (inherited or acquired)

glycoprotein analysis to assess GPIb/IX/V

No thrombocytopenia: Possible vWD

Determination of vWF levels

Quality control of LTA

ทำการทดสอบกับพลาสมาของคนปกติในทุกครั้งที่มีการทดสอบพลาสมาผู้ป่วย

ทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนน้ำยาที่เป็นตัวกระตุ้น ควรทดสอบน้ำยากับเกล็ดเลือดปกติ

แต่ละห้องปฏิบัติการควรมีค่าอ้างอิงและรายงานพร้อมผลการทดสอบพลาสมาของผู้ป่วย

กรณีที่ aggregometer มีมากกว่า 1 เครื่อง หรือมากกว่า 1 channel ควรมีการตรวจสอบว่าทุกเครื่องหรือทุก channel ให้ผลตรงกัน

ทดสอบความแม่นยำโดยทำการทดสอบพลาสมาคนปกติอย่างน้อย 10 รายแบบ duplicate แล้วคำนวณ %CV

มีการทวนสอบรอบของ mechanical stirrer ของเครื่อง aggregometer

Establishment of reference intervals

แต่ละห้องแฏิบัติการควรมีการทำค่าอ้างอิงเป็นของตนเอง



- ทำการทดสอบในคนปกติอย่างน้อย 20 ราย
- กลุ่มอาสาามัครต้องมีทั้งเพศหญิงปละเพศชาย
- อาสาสมัครต้องไม่มี hamatologic disorders ไม่ตั้งครรภ์ และไม่ได้อยู่ในระหว่างการรักษาด้วยยา



Thank you for your attention

