

Artikelen

Evaluatie van een turbidimetrische vrij proteïne-S-antigeenbepaling

S. NACIRI, R. van RIJCKEVORSEL en A.A.M. ERMENS

Voorafgaand aan de introductie van een turbidimetrische vrij-proteïne-S-bepaling (Instrumentation Laboratory, Breda) op de ACL Futura zijn een aantal evaluatietesten verricht. Alle analyses zijn verricht met citraatplasmamonsters. In deze evaluatie werd de reproduceerbaarheid (precisie) van deze test geëvalueerd met behulp van het NCCLS-EP-5-protocol. De within-run-variatiëcoëfficiënten van de pool met 50% proteïne-S bedraagt 4,3% en van de 100% pool 2,3%. De over-all-variatiëcoëfficiënt van de 50% pool bedraagt 6,9% en van de 100% pool 6,4%. In een correlatiestudie zijn de uitslagen van 50 patiëntenmonsters van de turbidimetrische methode vergeleken met die van een ELISA-methode (Biopool, Kordia, Leiden). Er blijken significante verschillen (30%) te bestaan tussen de uitslagen van de beide methoden. Tevens is het effect bekeken van triglyceriden, hemolyse en bilirubine op het vrije proteïne-S-resultaat. Bij een hemoglobineconcentratie boven de 0,144 mmol/l, een bilirubineconcentratie boven de 365 µmol/l en een triglyceridenconcentratie boven de 5,75 mmol/l geeft de ACL Futura een error code. In een referentiewaardenstudie uitgevoerd met behulp van 100 vrijwilligers, 50 mannen en 50 vrouwen, blijkt dat mannen significant hogere vrij proteïne-S-waarden hebben dan de vrouwen. Mannen: 75%-128% en vrouwen: 57%-115%. Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat de geëvalueerde test bruikbaar is als routinebepaling voor vrij proteïne-S in een klinisch-chemisch laboratorium.

Trefwoorden: trombose, vrij proteïne-S, evaluatie, reproduceerbaarheid

Proteïne-S is een vitamine-K-afhankelijk eiwit en heeft de functionele activiteit van cofactor voor geactiveerd proteïne-C (APC). Door de binding met proteïne-S is het geactiveerde proteïne-C in staat de stolling te remmen door de geactiveerde stollingsfactoren V en VIII af te breken. In plasma is ongeveer 70% van proteïne-S gebonden aan het complementfactor 4

binding proteïne (C4BP), de overige 30% proteïne-S is vrij aanwezig (1). Alleen vrij proteïne-S is in staat te fungeren als cofactor voor geactiveerd proteïne-C. Een verlaagde concentratie van proteïne-S vormt een risicofactor voor trombose en longembolie (2). Aangezien er ten aanzien van de totale concentratie van proteïne-S een grote overlap bestaat tussen normale individuen en personen met een erfelijke deficiëntie wordt de bepaling van het vrij proteïne-S aanbevolen voor diagnostische doeleinden (3, 4). Op het KCHL van het Amphia Ziekenhuis werd de analyse van de vrije proteïne-S-concentratie in plasma opgezet met behulp van een latex-agglutinatiemethode van Instrumentation Laboratory. Deze methode is een kwantitatieve turbidimetrische immunoassay die uitgedrukt wordt in procenten. Voorafgaande aan de introductie is de precisie van de betreffende test geëvalueerd. Tevens is er een correlatiestudie verricht en zijn de referentiewaarden bepaald. Daarnaast is het effect van triglyceriden, hemolyse en bilirubine op het vrij proteïne-S-resultaat onderzocht.

Materiaal en Methoden

De vrij proteïne-S-bepalingen werden uitgevoerd op de ACL Futura met reagentia van de firma Instrumentation Laboratory. De betreffende stollingsapparatuur werkt met variabele incubatietijden ter bevordering van een efficiënte monsterdoorstroom. De bepaling van vrij proteïne-S geschiedt met behulp van een kwantitatieve turbidimetrische immunoassay. Tijdens deze assay gaat het eerste reagens, bestaande uit een suspensie latexdeeltjes met een uniforme grootte, die gecoat zijn met het C4BP, binding aan met het vrije proteïne-S in het monster. Deze reactiestap vindt zeer snel plaats door de hoge affiniteit van het vrije proteïne-S voor C4BP. In het tweede reagens bevinden zich latexdeeltjes welke gecoat zijn met een antistof tegen humaan proteïne-S. Toevoeging van dit reagens aan het reactiemengsel resulteert in een agglutinatiereactie met de reeds aanwezige latexdeeltjes die proteïne-S gebonden hebben. In de praktijk wordt 12 µl citraatplasma gedurende 30-150 seconden geïncubeerd bij 37 graden Celsius. Vervolgens wordt hieraan 150 µl reagens Free PS C4BP Latex toegevoegd. Na 135-155 seconden wordt 80 µl Free PS Mab Latex toegevoegd. De mate van de daaropvolgende agglutinatie wordt vastgesteld door meting van de turbiditeit bij 405 nm gedurende 120 seconden, welke correleert met de concentratie van het vrije proteïne-S.

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis locatie Langendijk, Breda

Correspondentie: dr. ir. A.A.M. Ermens, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Amphia Ziekenhuis locatie Langendijk, Langendijk 75, 4819 EV Breda
e-mail: aermens@amphia.nl

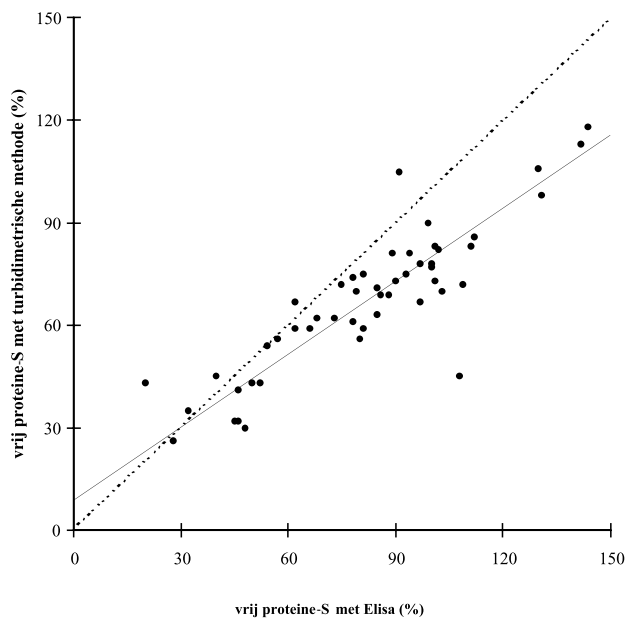
Tabel 1. Precisie van de bestudeerde vrije proteïne-S-bepaling (EP 5-protocol)

	Gemiddelde % vrij proteïne-S	Within-run VC (%)	Overall VC (%)
50% poolplasma	49,6	4,32	6,87
100% poolplasma	100,6	2,26	6,40

Tabel 2. Effect van interferentie op de bepaling van vrij proteïne-S

Hemoglobine (mmol/l)	% vrije proteïne-S
0,000	112,7
0,072	100,2
0,144	103,8
0,216	Geen resultaat
Bilirubine (µmol/l)	% vrije proteïne-S
5	107,4
116	108,0
228	104,6
365	103,1
487	Geen resultaat
Triglyceriden (mmol/l)	% vrije proteïne-S
1,38	107,4
3,84	99,23
5,75	92,87
9,59	Geen resultaat

De bepaling van de precisie is uitgevoerd d.m.v. meting van twee poolplasmaconcentraties (50% en 100%) twee keer per dag in duplo gedurende 20 dagen. De poolplasma's werden bereid door citraatplasmamonsters van enkele patiënten met respectievelijk een INR tussen de 1,5 en 4 en een INR kleiner dan 1 te mengen. Bepaling van de within-run en de totale precisie werd uitgevoerd volgens het NCCLS-EP-5-protocol. De correlatiestudie, uitgevoerd volgens het NCCLS-EP-9-protocol, is uitgevoerd m.b.v. 50 monsters afkomstig van patiënten met zeer diverse ziektebeelden waaronder trombofiliepatiënten met of zonder orale anti-stolling, patiënten met leverstoornissen en/of diffuse intravasale stolling. Hierbij zijn de uitslagen van de ACL Futura vergeleken met de uitslagen van de ELISA-methode van de firma Biopool (Kordia, Leiden). In deze ELISA worden de plasmamonsters 25 keer verdund in een buffer. Vervolgens worden deze verdunde monsters gedurende 40 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd in wells van een 96-wellsplaat welke gecoat zijn met anti-humaan proteïne-S. Na 4 maal wassen worden de wells 10 minuten geïncubeerd met polyclonaal anti-humaan proteïne-S dat geconjugeerd is met peroxidase. Na een volgende wasstap wordt een substraatoplossing toegevoegd aan de wells. De daaropvolgende kleurreactie wordt na 10 minuten gestopt. De mate van kleurontwikkeling is gerelateerd aan de concentratie vrij proteïne-S in het plasmamonster. De verkregen waarden van de twee analysemethoden werden vervolgens verwerkt volgens de methode van Passing en Bablok. Om de invloed van hemolyse, bilirubine en triglyceriden te bestuderen werden aan monsters van het 100%-poolplasma toemende hoeveelheden hemoglobine, bilirubine of triglyceriden (20% Intralipid, Fresenius Kabi, 's-Hertogen-



Figuur 1. Correlatie tussen de ELISA-methode (Biopool) en de turbidimetrische methode (IL) voor de bepaling van de vrije proteïne-S (n = 50). R = 0,88, het intercept is 8,7 (95%-betrouwbaarheidsinterval: 1,0 -16,8) en de helling 0,72 (95%-betrouwbaarheidsinterval: 0,62 - 0,80). Beide waarden waren significant afwijkend bij $\alpha = 0,05$.

bosch) toegevoegd. Vervolgens werd van deze monsters routinematig de vrij proteïne-S-concentratie bepaald. De referentiestudie werd uitgevoerd met behulp van 100 gezonde vrijwilligers: 50 mannen en 50 niet-pilgebruikende vrouwen tussen de 20 en 55 jaar. De vrijwilligers werden vooraf niet getest op aanwezigheid van andere risicofactoren voor trombofilie. Met behulp van de Kolmogorov-Smirnov-toets werd bepaald of de verzamelingen meetwaarden normaal verdeeld waren alvorens de referentiewaarden berekend werden op basis van het gemiddelde ± 2 maal de standaarddeviatie.

Resultaten

Tabel 1 geeft de within-run en overall precisie van de onderzochte vrij proteïne-S-bepaling. In figuur 1 zijn de resultaten van de correlatiestudie weergegeven. Er blijken significante verschillen te bestaan tussen de uitslagen van de beide methoden. De uitslagen van de turbidimetrische methode zijn aanzienlijk lager dan die van de ELISA-methode. Het intercept was 8,7 (95%-betrouwbaarheidsinterval: 1,0-16,8) en de helling 0,72 (95%-betrouwbaarheidsinterval: 0,62-0,80). Beide waarden waren significant afwijkend bij $\alpha = 0,05$. De correlatie tussen de twee bepalingen is 0,88. Herhaling van de testen bij drie patiëntenmonsters met duidelijk discrepante uitslagen leverde geen extra informatie op. Een relatie van deze discrepanties met een specifieke patiëntencategorie was eveneens niet aantoonbaar. Het mogelijk interfererende effect van hemoglobine, bilirubine en triglyceriden op de bepaling van het vrije proteïne-S van het 100% poolplasma op de ACL Futura is samengevat in tabel 2. De gegevens tonen aan dat bij een hemoglobineconcentratie boven de 0,144 mmol/l, bij een bilirubineconcentratie

boven de 365 $\mu\text{mol/l}$ en bij een triglyceridenconcentratie boven de 5,75 mmol/l geen resultaat wordt weergegeven. Bij de laatste gaat een toename van de lipemie eerst gepaard met een fout verlaagde uitslag. Pas bij een triglyceridenconcentratie van 9,59 mmol/l geeft de ACL Futura aan dat er geen uitslag geproduceerd kan worden. Uit de referentiewaardestudie uitgevoerd m.b.v. 50 mannen en 50 vrouwen blijkt, overeenkomstig de literatuur, dat mannen duidelijk hogere vrij proteïne-S-waarden hebben dan de vrouwen (5). De referentiewaarden voor mannen bedragen: 75%-128% en voor vrouwen: 57%-115%.

Discussie

Van alle momenteel bekende erfelijke risicofactoren voor trombofilie is de relatie tussen proteïne-S-deficiëntie en het ontstaan van trombose het minst duidelijk. De resultaten van familieonderzoeken en case-control studies bij proteïne-S-deficiënte personen zijn wisselend of soms zelfs tegenstrijdig (6). Het is al langer bekend dat proteïne-S beïnvloed wordt door vele factoren. Geslacht, zwangerschap, hormonale status en genetisch polymorfisme zijn hiervan de meest bekende voorbeelden (5).

Daarnaast blijken ook problemen bij het analyseren van proteïne-S een rol te spelen. Het feit dat dit eiwit voor een groot deel gebonden is aan het C4BP ligt hier deels aan ten grondslag. Over de wijze waarop dit complex gereguleerd wordt is tot op heden slechts weinig bekend. Momenteel wordt in de richtlijnen van de ISTH-WHO het gebruik van de vrij proteïne-S-bepaling bepleit (3). Uit onze studie blijkt dat de geëvalueerde test een zeer acceptabele reproduceerbaarheid heeft. Ook de robuustheid van de bepaling met betrekking tot interferenties door hemolyse, bilirubinemie en hyperlipidemie blijkt voldoende voor routineanalyses in een klinisch-chemisch laboratorium. Enige aandacht behoeft het effect van hyperlipidemie indien de bepaling wordt uitgevoerd op de ACL Futura aangezien er dan mogelijk fout-verlaagde waarden geproduceerd kunnen worden. Controle van het aspect van de te bepalen plasma's kan hierbij uitkomst bieden. In hoeverre ook andere stollingsautomaten gevoelig zijn voor dit fenomeen is niet onderzocht.

De correlatie tussen de nieuwe test en de ELISA-methode is redelijk. Daarnaast blijkt dat de resultaten van de ELISA-methode gemiddeld 30% hoger liggen. In een recente studie naar foutenbronnen bij de bepaling van vrij proteïne-S bleek dat de dissociatie van proteïne-S van het C4BP tijdens de analysegang resulteerde in verhoogde testuitslagen (7). Het betreffende fenomeen bleek met name veroorzaakt te worden door variaties in incubatietemperatuur, incubatieduur en de mate van monsterverdunning. Mogelijkerwijs liggen de grote verschillen in verdunning en incubatietijd van de hier vergeleken methodes dan ook ten grondslag aan de verschillende testresultaten. Samenvattend kan gesteld worden dat de onderzochte test voor vrij proteïne-S voldoet aan de vereiste analytische kwalificaties en eenvoudig te implementeren is op de huidige generatie stollingsautomaten. Er kan dan ook geconcludeerd worden dat de test bruikbaar is voor de routinematige analyse in een klinisch-chemisch

laboratorium. Een en ander wordt bevestigd in een zeer recente uitgebreide multicentrumevaluatie van Serra et al. (8). Uit rondzendingen van de ECAT Foundation blijkt dat bij de vrij proteïne-S-bepaling grote tussenlaboratoriumvariatie bestaat in de gevonden waarden (9). Standaardisatie van de analysegang op basis van bovengenoemde factoren en het gebruik van een internationale standaard voor proteïne-S kunnen wellicht bijdragen aan een betere vergelijkbaarheid tussen de laboratoria.

Literatuur

1. Dahlbäck B. Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem* 1986; 261: 12022-12027.
2. Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, et al. Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood* 2000; 95: 1935-1941.
3. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, et al. Inherited thrombophilia: Part I. *Tromb Haemost* 1996; 76: 651-662.
4. Zöller B, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* 1995; 85: 3524-3531.
5. Henkens CMA, Bom VJJ, Schaaf W van der, et al. Plasma levels of protein S, protein C, and factor Xa: effects of sex, hormonal state and age. *Tromb Haemost* 1995; 74: 1271-1275.
6. Faioni EM. Reliable estimates of plasma protein S levels: are we getting any closer? *Tromb Haemost* 2001; 86: 1139-1140.
7. Persson KEM, Hillarp A, Dahlbäck B. Analytical considerations for free protein S assays in protein S deficiency. *Tromb Haemost* 2001; 86: 1144-1147.
8. Serra J, Sales M, Chitolie A, Domenech P, Rossi E, Borelli M, Dahlbäck B. Multicentre evaluation of IL Test™ free PS: a fully automated assay to quantify free protein S. *Tromb Haemost* 2002; 88: 975-983.
9. Meijer P, Oerle R van, Weerd B de, Dool E-J de, Verbruggen B. The contribution of the type of calibrator to the variability of the total and free protein S antigen measurement. *Haemostasis* 2000; 30: 38-39.

Summary

Evaluation of a turbidimetric free protein S antigen determination. Naciri S, Rijckevorstel R van, Ermens AAM. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 28: 150-152.

In this study we investigated the analytical performance of a turbidimetric free protein S test from Instrumentation Laboratory (Breda, The Netherlands) based on specifically coated latex particles. The precision was studied by performing a NCCLS EP-5 protocol. The within-run C.V. was 4.3% and 2.3% for the 50% and 100% pool of normal plasma, respectively. The overall C.V. was 6.9% and 6.4% for the 50% and 100% pool of normal plasma, respectively. In a correlation study the free protein S level of 50 patient samples was determined by the turbidimetric method and an ELISA (Biopool, Kordia, Leiden, the Netherlands). The results of the turbidimetric method were approximately 30% lower than those from the ELISA method. Both the intercept and slope of the calculated regression curve were significantly different. Interference of hemoglobine, bilirubine and triglycerides occurred at 0.144 mmol/l, 365 mmol/l and 5.75 mmol/l, respectively. Reference values for both men and women were determined and were 75%-128% and 57%-115% respectively. Altogether it can be concluded that the studied method for the determination of protein S is adequate as a routine test in a clinical laboratory.

Key words: thrombosis, free protein S, evaluation, precision, analytical performance