

Gemodificeerde APC-R; een betere discriminatie tussen wild-type en heterozygoot/homozygoot factor V Leiden

J.J.J. HULSTEIN¹*, E.F.A. GEMEN¹*, M.A. KARIMAN¹, A.H.W. HILBINK-SMOLDERS^{2,3} en N.C.V. PÉQUÉRIAUX¹

Actief proteïne C (APC) speelt een belangrijke rol in de regulatie van de hemostase doordat het actief factor V (FVa) inactieveert. Een defect in factor V, zoals gevonden bij Factor V Leiden (FVL), resulteert in een resistentie voor APC, waardoor factor V minder efficiënt wordt geïnactiveerd (1). De bekendste mutatie die leidt tot APC resistentie (APC-R) is de mutatie van arginine 506 naar glutamine (2). Patiënten die heterozygoot (het) zijn voor deze FVL mutatie hebben een zeven maal verhoogde kans op het krijgen van veneuze trombose. Homozygotie (hom) geeft zelfs een tachtig maal verhoogde kans op veneuze trombose ten opzichte van niet dragers (wt) (3). Oorspronkelijk werd de mate van APC resistentie bepaald met behulp van testen die gebaseerd waren op de APTT. De nieuwe generatie testen, waaronder de op protrombine gebaseerde APC-R test van Pentapharm (Pefakit, Pentapharm Ltd., Zwitserland), vertoont een betere discriminatie tussen FVL-wt en FVL-het en is minder gevoelig voor bijvoorbeeld lupus anticoagulans (4). Echter, uit eerder onderzoek is gebleken dat de bepaling nog altijd gevoelig is voor externe factoren (5), wat resulteert in een minder goed discriminerend vermogen voor FVL-wt versus FVL-het en FVL-het versus FVL-hom. In deze studie hebben wij onderzocht of verlenging van de incubatie met APC het discriminerend vermogen van de APC-R test (Pefakit, Pentapharm, Zwitserland) vergroot, waardoor het resultaat betrouwbaarder wordt.

Materialen en methode

Voor deze studie zijn 65 citraatplasma's verzameld van patiënten waarbij een APC-R was aangevraagd. Van elk van deze monsters werd de APC-R bepaald volgens voorschrift (Pefakit, Pentapharm, Zwitserland) en volgens de gemodificeerde procedure waarbij de incubatie met APC verlengd werd van 180 s naar 240 s. Zowel de normale APC-R test als de gemodificeerde procedure werd uitgevoerd op de STA-R Evolution analyser (Stago, Frankrijk). Bij alle patiënten met een APC-R $\leq 2,0$ (cut-off bijsluiter Pefakit) en bij patiënten met een APC-R $> 2,0$ (indien specifiek aangevraagd door behandelend arts) is een PCR voor Factor V Leiden uitgevoerd. Het effect van factor V

deficiëntie op het resultaat van de APC-R analyse is onderzocht door middel van mengproeven, waarbij plasma van een bekende FVL-het patiënt in verschillende verhoudingen gemengd is met factor V deficiënt plasma. Van deze monsters werd de APC-R bepaald met de gemodificeerde APC-R test. De APC-R ratio is berekend volgens de formule: stoltijd APC-R meting met toevoeging APC / Stoltijd APC-R meting zonder toevoeging APC.

Statistische analyses van de data zijn uitgevoerd met PASW Statistics versie 18 voor Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Resultaten

Van de 65 plasma's zijn er 9 gegenotypeerd als FVL-hom en 19 als FVL-het. Deze plasma's werden met zowel de normale als de gemodificeerde APC-R test correct geclassificeerd. Een deel van de overige plasma's (FVL-wt, n=37) is bevestigd met PCR (tabel 1). Het verschil tussen FVL-wt en FVL-het alsmede tussen FVL-het en FVL-hom, is getoetst met behulp van de Wilcoxon rank sum test. Met zowel de normale als de gemodificeerde APC-R test bleek dit verschil significant ($p < 0,001$) (figuur 1). Bij verlenging van de incubatietijd van 180 naar 240 seconden is de gemiddelde toename van de ratio voor de FVL-het significant groter dan de gemiddelde toename van de ratio gevonden bij FVL-hom ($p < 0,001$) (figuur 1). Dit geldt ook voor de toename van de ratio bij FVL-wt vs. FVL-het ($p < 0,001$) (figuur 1). De incubatietijd met APC bepaalt hoeveel actief factor V geïnactiveerd wordt. Verlenging van de incubatietijd zou bij factor V deficiënties kunnen leiden tot meer inactivatie van FVa, resulterend in een verlengde stoltijd ten gevolge van een verlaagde co-factor activiteit. Hierdoor zou een heterozygote FVL patiënt met factor V deficiëntie, ten onrechte geclassificeerd kunnen worden als FVL-wt. Om dit effect uit te sluiten is een mengproef uitgevoerd waarbij plasma van een FVL-het patiënt gemengd is met verschillende hoeveelheden factor V deficiënt plasma. Bij 106 % factor V is de gemeten APC-R ratio 1,48. Wanneer door verdunning het factor V gehalte daalt tot 21%, wat kan voorkomen bij een zeer zeldzame ernstige deficiëntie,

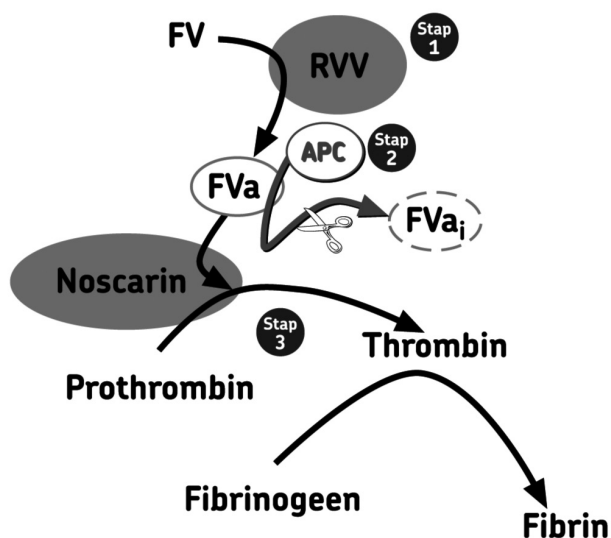
Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie¹ en Jeroen Bosch Academie², Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch; Universitair Medisch Centrum St Radboud, IQ healthcare³, Nijmegen
*Gelijkwaardige bijdrage

E-mail: j.hulstein@jzbz.nl

Tabel 1. Gemiddelde APC-R ratio (95% betrouwbaarheidsinterval)

Patiënt (n)	Incubatietijd 180 s	Incubatietijd 240 s
FVL-wt (n=37)	2,50 (2,42 - 2,58)	4,05 (3,89 - 4,20)
FVL-het (n=19)	1,39 (1,37 - 1,41)	1,47 (1,44 - 1,50)
FVL-hom (n=9)	1,01 (1,00 - 1,02)	1,03 (1,01 - 1,04)

Stollingsmechanisme APC-R bepaling



STAP 1: Activatiestap

Incubatie patiëntplasma met slangengif RVV: factor V (FV) in patiënt plasma wordt omgezet in geactiveerd factor V (FVa).

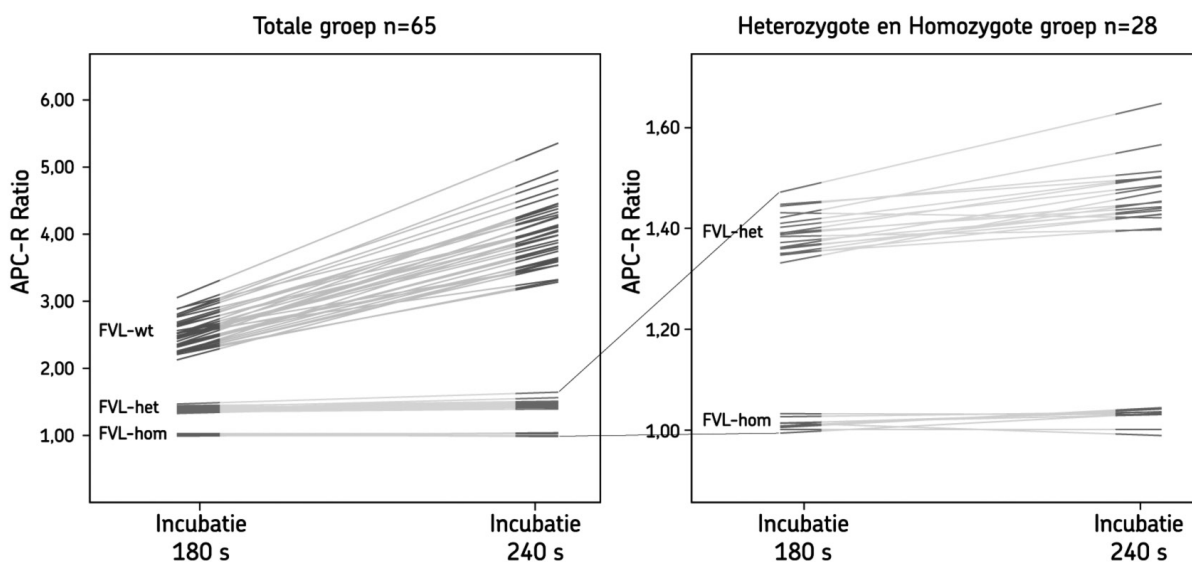
STAP 2: Inactiviestap

Toevoeging van en incubatie met geactiveerd proteïne (APC); In deze studie 180 versus 240 seconden. Hieruit volgt inactivatie van een relatief groot deel van het FVa (genotype afhankelijk). Het residueel FVa dient als co-factor in stap 3.

STAP 3: Detectiestap

Door toevoeging van Noscargin, met het residueel FVa als co-factor, wordt protrombine omgezet in trombine. Trombine zet fibrinogeen om in fibrine. Gemeten wordt de stoltijd vanaf toevoeging Noscargin tot de vorming van fibrine.

Discriminerend vermogen APC-R bepaling bij incubatietijd 180 en 240 seconden



Figuur 1. APC-R bepaling: schematische voorstelling stollingsmechanisme en ratio's (incubatietijd 180 en 240 sec).

wordt een APC-R ratio van 1,77 gemeten. De APC-R ratio is < 2,0 en past derhalve bij een FVL-het.

Conclusie

In het verleden is aangetoond dat externe factoren invloed kunnen hebben op het discriminerend effect van de pefakit APC-R test (5). Met name het kleine verschil tussen FVL-het en FVL-hom is hiervoor zeer gevoelig. Verlenging van de incubatietijd van 180 s naar 240 s resulteert in een significante toename van de ratio en een significante toename van het verschil tussen de verschillende groepen. Daardoor hebben externe factoren minder effect op het eindresultaat. De gemodificeerde APC-R test is een stabielere test. In het geval van factor V deficiëntie in combinatie met FVL blijft de gemodificeerde test voldoende sensitief en worden de patiënten juist geclassificeerd. Verder onderzoek moet uitwijzen of deze verbetering het mogelijk maakt het aantal PCR testen te verminderen.

Referenties

- Bertina RM, Koeleman BP, Kester T, Rosendaal FR, Dirven RI, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994; 369: 64-67.
- Wilmer M, Stocker C, Bühler B, Conell B, Calatzis A. Improved distinction of factor V wild-type and factor V Leiden using a novel prothrombin-based activated protein C resistance assay. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122: 836-842.
- Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*. 1995; 85: 1504-1508.
- Galli M, Duca F, Ruggeri L, Finazzi G, Negri B, Moia M. Congenital resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants: evaluation of two functional assays. *Thromb Haemost*. 1998; 80: 246-249.
- Schöni R, Quehenberger P, Wu JR, Wilmer M. Clinical evaluation of a new functional test for detection of activated protein C resistance (Pefakit APC-R Factor V Leiden) at two centers in Europe and the USA. *Thromb Res*. 2007; 119: 17-26.