

De toepasbaarheid van de Protein C Pathway screeningstest op de ACL-9000 en de KC-4

R.W.L.M. NIESSEN, I. BRASPENNING en C. CLEMENT

Proteïne C (PC) kan in de aanwezigheid van proteïne S (PS) geactiveerd worden tot APC door PC-activatoren (PCA) zoals het trombine/trombomoduline-complex, of door bepaalde fracties van slangengiften (bijv. Protac uit *Agkistrodon contortrix*). Omdat PCA stabiel is en makkelijker te bereiden en te stabiliseren is dan APC zijn er testsystemen ontwikkeld die op deze manier als screenende test gebruikt kunnen worden voor APC-resistentie en afwijkingen in PC en PS (1-3).

Bij een aanvraag voor trombofilieonderzoek wordt er in het Rijnland Ziekenhuis onderzoek verstuurd voor een PC (act), PS (ag), antitrombine (act), FII-mutatie (G20210A), APC-resistentie / FV-Leiden. Daar slechts een klein gedeelte van deze onderzoeken een afwijkend resultaat oplevert is onderzocht of hier een screenende test als filter gebruikt kan worden voor het laten uitvoeren van dit speciale stollingsonderzoek. De Protein C Pathway (PCP-) screeningstest (gradithrom, Kordia) is goed inzetbaar voor het opsporen van afwijkingen in het PC/PS-systeem of een APC-resistentie (3). Deze PCP-screeningstest is geëvalueerd op de stollingsautomaat ACL-9000 (Instrumentation Laboratory) en de KC-4 (Kordia Life Sciences).

Methode

Onderzocht zijn in totaal 31 patiëntenmonsters met een bewezen F-V-Leiden-mutatie (28 heterozygoot en 3 homozygoot), 22 patiëntenmonsters met een verlaagd proteïne C/S (2 prot.-C-def., 1 verdenking PS-def. en 19 onder OAC) en 43 patiëntenmonsters waarbij trombofiliescreening is aangevraagd en geen afwijkingen gevonden zijn.

De PCP-screeningstest wordt uitgevoerd als een gemodificeerde APTT, waarbij het Russell Viper Venom direct factor X activeert en er met en zonder toevoeging van Protac (PCA) een stoltijd gemeten wordt. De PCP-screeningstest wordt uitgedrukt als een ratio en is zowel uitgevoerd op de ACL-9000 (Instrumentation Laboratory) als de KC-4 delta (Kordia Life Sciences). De ACL-9000 is een stolautomaat, in tegenstelling tot de KC-4 waar plasma en reagens met de hand gepipetteerd dienen te worden.

Rijnland Ziekenhuis, Klinisch Chemisch Laboratorium, Leiderdorp

Resultaat

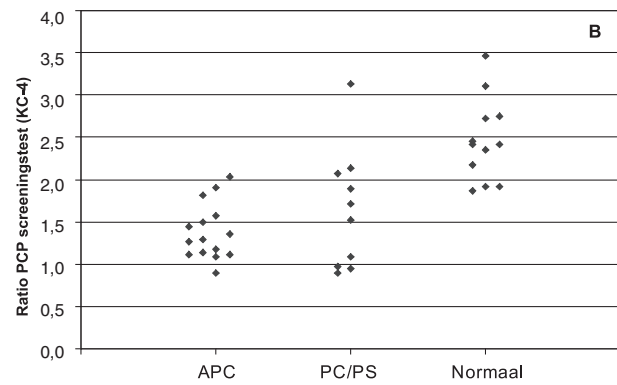
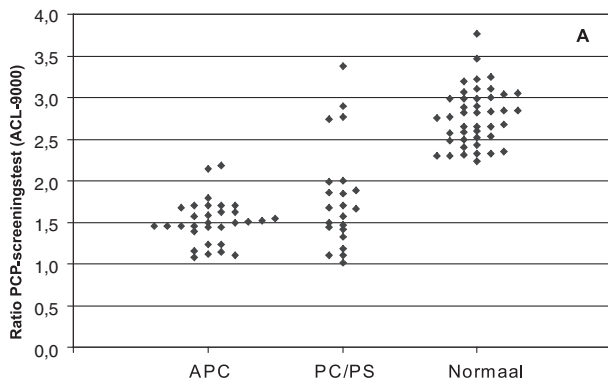
De verkregen ratio's van de 3 patiëntencategorieën voor de PCP-screeningstest staan weergegeven in figuur 1. Bij een cut-off-ratio van 2,2 worden op de ACL-9000 en de KC-4 alle patiëntenmonsters met een bewezen F-V-Leiden geïdentificeerd. Echter in de groep PC/PS liggen 4 en 1 bij respectievelijk de ACL-9000 en de KC-4 boven deze cut-off. Door de stoltijden zonder PCA erbij te betrekken kunnen bij de ACL-9000 3 van deze 4 punten bij de groep PC/PS, op basis van langere stoltijden ($> 26,4$ s) alsnog als afwijkend geïdentificeerd worden (tabel 1). Bij beide apparaten blijft één patiëntenmonster over met een proteïne S van 61% (ref. $> 67%$) waarbij een niet afwijkende ratio wordt verkregen (3,38 bij ACL-9000 en 3,13 bij KC-4). Op de ACL-9000 wordt geen van de 43 patiëntenmonsters, waarbij trombofiliescreening is aangevraagd en in het speciaal stollingsonderzoek geen afwijkingen gevonden zijn, een afwijkende PCP-screeningstest gevonden. Op de KC-4 wordt bij 4 van 14 van deze monsters een afwijkende PCP-screeningstest gevonden (figuur 1). Met deze testresultaten worden bij een cut-off van 2,2 bij de ACL-9000 en de KC-4 sensitiviteiten van respectievelijk 98% en 96% behaald en specificiteiten van respectievelijk 100% en 71%.

Conclusie

De hier beschreven PCP-screeningstest (gradithrom, Kordia) leent zich goed als screenende test in het trombofilieonderzoek voor het uitsluiten van afwijkingen in het PC/PS-systeem of een APC-resistentie zowel bij gebruik van de stollingsautomaat ACL-9000 als op de KC-4. Op beide systemen worden voldoende hoge sensitiviteiten behaald. Het is beschreven dat deze PCP-screeningstest iets minder gevoelig is voor afwijkingen in het PC/PS-systeem (3). Tijdens deze evaluatie wordt er op beide systemen een PS-

Tabel 1. Range van de stoltijden in seconden zonder PCA in de 3 patiëntencategorieën bij de ACL-9000 en de KC-4; tussen haakjes staat het aantal patiëntenmonsters dat geanalyseerd is

Patiëntengroep	ACL-9000	KC-4
APC	19,2 – 31,6 (31)	33,5 – 66,2 (16)
PC/PS	23,0 – 84,4 (22)	32,4 – 74,5 (11)
Normaal	19,6 – 26,4 (43)	32,7 – 42,6 (14)



Figuur 1. Weergave van de ratio's van de PCP screeningstest voor de 3 patiëntencategorieën. APC; patiëntenmonsters met een aangetoonde F-V-Leiden mutatie, PC/PS; patiëntenmonsters met een verlaagd PC/PS, Normaal; patiëntenmonsters waarbij trombofilie-screening is aangevraagd en geen afwijkingen gevonden zijn.

niveau van 61% niet als afwijkend geduid. Het is echter de vraag wat de klinische relevantie van zulke PS-niveau's is en of het detecteren van een afwijkend PS, gedefinieerd als < 50%, als controle meegenomen zou dienen te worden om hiermee een uitgevoerde run van patiëntenmonsters goed dan wel af te keuren. Binnen het Rijnland Ziekenhuis is ervoor gekozen om daarom bij elke run een PC- en PS-deficiënt plasma 1:1 verdund met normaalplasma mee te nemen, waarbij de PC- en PS-niveaus tussen de 50 - 55% liggen.

Literatuur

1. Denson KWE, Haddon ME, Reed SV, Davidson S, Littlewood TJ. A more discriminating test for APC resistance and a possible screening test to include protein C and protein S. *Thromb Res* 1996; 81: 151-156.
2. Kraus M, Noah M, Fickenscher K. The PCAT - A simple screening assay for assessing the functionality of the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Res* 1995; 79: 217-222.
3. Haas FJLM, Sterkenburg-Kamp BM van, Scheepers HAMM. A protein C Pathway (PCP) screening test for the detection of APC resistance and protein C or S deficiencies. *Sem Thromb Hemost* 1998; 24: 355-362.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 228-230

Detection of the 1173C>T polymorphism of the human Vitamin K epoxide reductase complex (VKORC1) gene by LightCycler real-time PCR

J.F.M. ROIJERS^{1,*}, C.W.G.G. WILGERS-ELESEN^{1,*}, B.P. BRASSÉ², R.H. TRIEPELS¹ and E.M. van WIJK¹

Recently it has been demonstrated that polymorphisms in the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (VKORC1) is associated with inter-individual differences in the response to coumarin anticoagulants (1-4). The human VKORC1 gene encodes a 163 amino-acid enzyme located in the endoplasmic reticulum (GenBank, AY587020) (4). A recent study demonstrated that genetic polymorphisms in VKORC1 are responsible for about 37% of the variability in the anticoagulant pharmacological response. The VKORC1 1173C>T polymorphism accounts for a low dose requirement and therefore genotyping for VKORC1 can predict a high risk for overdose before initiation of anticoagulation (2).

The aim of this study was to develop a real-time PCR followed by melting curve analysis, using hybridization probes with a highly sensitive, rapid and efficient approach to mutation detection. The LightCycler instrument (LC) was used for the detection of the single nucleotide polymorphism 1173C>T of the human VKORC1 gene. To evaluate the reliability of genotyping with the LightCycler the samples were also analyzed for the VKORC1 1173C>T polymorphism by digestion with a restriction enzyme.

Material and methods

DNA was extracted from 400 µl EDTA blood and eluted in 200 µl elution buffer according to the manufacturer's protocol with a MagNaPure Compact (Roche Diagnostics). Anonymous DNA samples with a known VKORC1 genotype were received from an external laboratory. For the detection of the 1173C>T polymorphism, PCR primers amplified a 138 bp fragment of the VKORC1 gene. During PCR the amplicon was detected using two specific hybridization probes,

KCHL, Department of Clinical Chemistry, TweeSteden Hospital and St. Elisabeth Hospital, Tilburg¹, Hospital Pharmacy Midden-Brabant, TweeSteden Hospital and St. Elisabeth Hospital, Tilburg²

* Both authors contributed equally