

Vergelijking tussen factor VIII gemeten met een activiteitsassay en met massaspectrometrie bij patiënten met hemofilie A

Anouk Donners ^{a*}, Erik van Maarseveen ^a, Yrea Weetink ^a, Mohsin El Amrani ^{ab}, Kathelijnn Fischer ^c, Karin Rademaker ^a, Toine Egberts ^{ad}, Albert Huisman ^b en Ruben Musson ^b

^a Afdeling Apotheek, Divisie Laboratoria, Apotheek en Biomedische Genetica, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

^b Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie, Divisie Laboratoria, Apotheek en Biomedische Genetica, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

^c Van Creveldkliniek, Divisie Interne Geneeskunde en Dermatologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

^d Discipliniegroep Farmaco-epidemiologie & Klinische Farmacologie, Departement Farmaceutische Wetenschappen, Universiteit Utrecht.

* Correspondentie: a.a.m.donners@umcutrecht.nl.

Geen belangenverstrengeling gemeld.

Gebaseerd op het registratieonderzoek van Anouk Donners.

Met dank aan: prof. dr. Roger Schutgens, hematoloog in de Van Creveldkliniek, UMCU.

Citeer als: Donners A, van Maarseveen E, Weetink Y, El Amrani M, Fischer K, Rademaker K, Egberts T, Huisman A, Musson R. Vergelijking tussen factor VIII gemeten met een activiteitsassay en met massaspectrometrie bij patiënten met hemofilie A. Nederlands Platform voor Farmaceutisch Onderzoek. 2020;5:a1716.

KERNPUNTEN

- Dit onderzoek toont voor het eerst een goede associatie met grote spreiding aan tussen de factor VIII (FVIII)-activiteit gemeten met de *one-stage clotting assay* (OSA) en de FVIII-plasmaconcentratie gemeten met LC-MS/MS.
- De aanwezigheid van anti-FVIII-antistoffen of het gebruik van exogene FVIII-producten lijkt de verschillen tussen de twee methoden te verklaren.
- De potentieel additionele waarde van de FVIII-plasmaconcentratie met LC-MS/MS ten opzichte van FVIII-activiteit met OSA moet verder worden onderzocht.

INLEIDING

Hemofilie A is een erfelijke bloedingsziekte veroorzaakt door een tekort aan de functionele coagulatiefactor VIII (FVIII). De aandoening manifesteert zich vrijwel uitsluitend bij mannen, al kunnen vrouwen draagster zijn. De aandoening wordt op basis van de endogene FVIII-

ABSTRACT

Comparison between coagulation factor VIII quantified with one-stage activity assay and mass spectrometry in haemophilia A patients

Background

Haemophilia A is a hereditary bleeding disorder caused by a factor VIII (FVIII) deficiency. As biomarker, FVIII activity is used to classify disease severity and to monitor treatment. The one-stage clotting assay (OSA) is used to measure FVIII activity but OSA's limitations may result in misclassification of disease severity or suboptimal monitoring of treatment. Measurement of FVIII plasma concentration with LC-MS/MS might overcome these challenges.

Objective

To investigate the association between FVIII activity and concentration as well as determinants for discrepancies.

Design and methods

In this cross-sectional study, all haemophilia A patients receiving standard of care were eligible for inclusion. Within the activity categories of < 1%, 1-5%, > 5-40%, > 40-150%, and > 150-600% we randomly selected 15 to 20 plasma samples, and compared FVIII concentration (LC-MS/MS) to FVIII activity (OSA) with linear regression and Bland-Altman analysis. Potential determinants were analysed with linear regression.

Results

87 samples were included. Bland-Altman analysis demonstrated an overall mean difference of -1% with a standard deviation (SD) of 64% between the two methods. Discrepancies were associated with the presence of anti-FVIII antibodies (133%, 95% confidence interval [95%CI] = 81-185, n = 5) and exogenous FVIII products (-37%, 95%CI = -65- -9, n = 58), e.g. plasma-derived and B-domain modified FVIII.

Conclusion

Despite almost no discrepancy overall, the variability between FVIII activity and FVIII concentration was large. Anti-FVIII antibodies or use of exogenous FVIII products might result in differences of potential clinical impact. More research is needed to determine the value of FVIII concentration in addition to activity.

activiteit geclassificeerd als ernstig (< 1%), matig ernstig (1 tot 5%) of mild (> 5 tot 40%) uitgedrukt in een percentage ten opzichte van de referentiewaarde. Patiënten met ernstige hemofilie vertonen frequente bloedingen in weke delen en gewrichten dat op termijn resulteert in artropathie met een verlaagde levenskwaliteit. Daarnaast hebben ze een verhoogd risico op intracranieële bloedingen en mortaliteit. Patiënten met matig ernstige hemofilie zijn minder aangedaan en lijden aan het snel optreden van hematomen. Patiënten met milde hemofilie ondervinden enkel bij grote trauma's of operaties stollingsproblematiek [1,2].

De FVIII-activiteit wordt als biomarker voor diagnosestelling en ziekte-ernst gebruikt, maar wordt ook ingezet voor het monitoren van de substitutietherapie met exogene FVIII-producten. De FVIII-activiteit wordt momenteel met de *one-stage clotting assay* (OSA) gemeten, omdat het snel – 30 minuten –, relatief goedkoop en eenvoudig in gebruik is. De OSA-resultaten kunnen echter worden beïnvloed door storende anti-FVIII-antistoffen, gemodificeerde FVIII-producten (bijvoorbeeld door verkorte eiwitsequenties of polyethyleenglycolstaarten), het gebruik van verschillende reagentia in de methode, interfererende comedatie, et cetera. Het resulteert in sommige gevallen tot misclassificatie van de ziekte-ernst of suboptimale monitoring van de therapie met FVIII-producten [1-4].

Ons centrum heeft met behulp van massaspectrometrie een methode ontwikkeld om de plasmaconcentratie – in plaats van activiteit – van FVIII te kwantificeren [5]. Deze nieuwe methode biedt hoge sensitiviteit en specificiteit, waardoor de tekortkomingen van OSA mogelijk worden voorkomen. De associatie tussen deze twee methoden is niet eerder onderzocht. Het doel van dit onderzoek is daarom het onderzoeken van de relatie tussen FVIII-activiteit gemeten met OSA en de FVIII-plasmaconcentratie gemeten met *liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) bij patiënten met hemofilie A, evenals de invloed van determinanten voor discrepanties tussen de twee methodes.

METHODEN

Dit dwarsdoorsnedeonderzoek is uitgevoerd bij de Van Creveldkliniek, een hemofiliebehandelcentrum, en bij het Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie en

de Apotheek die alle onderdeel uitmaken van het Universitair Medisch Centrum Utrecht. De medisch ethische toetsingscommissie heeft het onderzoek als niet-WMO-plichtig beoordeeld (protocolnummer 18-295C).

Alle patiënten met hemofilie A of hemofiliedraagsters kwamen in aanmerking voor inclusie. Als onderdeel van de standaardzorg werden FVIII-activiteitsbepalingen uitgevoerd en werd restmateriaal opgeslagen conform het lokale opt-outsysteem. Uit iedere, klinisch gebruikelijke, FVIII-activiteitscategorie (< 1%, 1-5%, > 5-40%, > 40-150%, > 150-600%) werden 15 tot en met 20 monsters willekeurig geselecteerd in de periode augustus 2017 tot april 2018. Per patiënt kon maximaal één monster per categorie worden geïncludeerd.

De FVIII-activiteit werd gemeten met OSA, een eenstapsstollingstest gebaseerd op de geactiveerde partiële tromboplastinetijd. De FVIII-plasmaconcentratie werd in hetzelfde monster gemeten met een door het apotheeklaboratorium ontwikkelde LC-MS/MS-methode. De monsters ondergingen een opwerking waarin FVIII werd gedissocieerd van Von Willebrandfactor en omgezet naar vrij FVIII, waarna selectieve extractie plaatsvond met immunoaffiniteit. Vervolgens werd een specifiek peptide afkomstig van het actieve A3-domein gemeten met de TSQ Altis, Thermo Fisher (Waltham, MA) en gekwantificeerd tegen een octocog alfa-standaardenreeks [5].

De associatie tussen de FVIII-activiteit en FVIII-plasmaconcentratie werd geëvalueerd met lineaire regressie en Bland-Altmananalyse. Om een adequate statistische vergelijking uit te voeren op monsteruitslagen uitgedrukt in verschillende eenheden en bovendien op categorieën van verschillende intervallen, werden de verschillen tussen de twee methodes omgezet van absoluut naar relatief:

$$\text{relatief verschil van het monster} = \frac{(\text{plasmaconcentratie} - \text{activiteit})}{((\text{plasmaconcentratie} + \text{activiteit}) / 2)} \times 100$$

De associatie tussen de verschillen van de twee methodes én de diverse patiënt-, ziekte-, en behandelkarakteristieken uit de medische status (zoals type FVIII-product, anti-FVIII-antistoffen, comedatie, et cetera.) werden geëvalueerd met lineaire regressie. Hierbij werden de subgroepen met exogene FVIII-producten vergeleken met de subgroep zonder exogeen product.

Antistoffen werden met de Nijmegen-Bethesda-assay gemeten (klinisch relevante afkapwaarde $\geq 0,6$ BU/mL) [6].

RESULTATEN

In totaal werden 87 monsters geïncludeerd afkomstig van 70 afzonderlijke patiënten. De patiënten waren voornamelijk mannen en hadden een gemiddelde leeftijd van 37 jaar en *body mass index* van 23 kg/m². Van alle monsters bevatten 6% anti-FVIII-antistoffen en 67% exogene FVIII-producten (waarvan meestal één specifiek product in gebruik, vier keer twee producten en twee keer een ongedefinieerd product). Verdere patiëntkarakteristieken staan in tabel 1.

De associatie tussen de plasmaconcentratie en activiteit van FVIII heeft een R² van 0,8 en is weergegeven in figuur 1.

De Bland-Altmananalyse (figuur 2) toont ondanks een totaal gemiddeld verschil van -1% een grote spreiding van ongeveer 64% en meer spreiding in het lage meetgebied.

Het gemiddelde verschil tussen de methoden is -13% in het meetgebied < 40 (hoogste activiteitslimiet van hemofiliediagnose) en 20% in het meetgebied > 40.

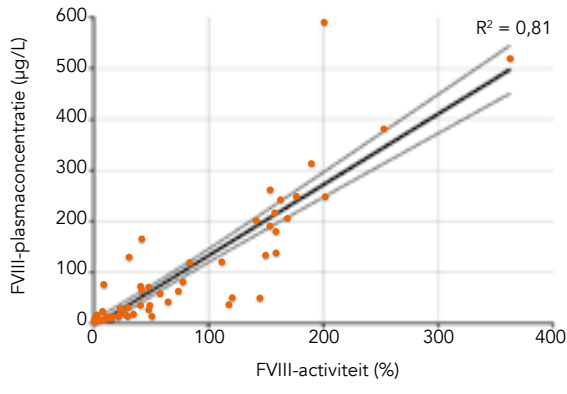
De lineaire regressie gaf de associatie tussen determinanten en de discrepanties (relatieve verschillen) van de twee methodes. Relevante resultaten staan in tabel 2 en de belangrijkste significante resultaten worden weergegeven in de boxplots van figuur 3. De relatieve verschillen in de monsters met anti-FVIII-antistoffen lagen gemiddeld genomen 133% hoger dan in de monsters zonder anti-FVIII-antistoffen (95%-betrouwbaarheidsinterval [95%-BI] = 81-185%). De relatieve verschillen van monsters met exogene FVIII-producten lagen gemiddeld genomen 37% lager dan de relatieve verschillen van de monsters zonder exogeen FVIII-product erin (95%-BI = -65-9%). Tevens werden significante waarden gevonden voor de subgroepen 'uit plasma verkregen' (pd)FVIII-producten en B-domein gemodificeerde FVIII-producten, wanneer deze werden vergeleken met de subgroep zonder exogeen FVIII-product aanwezig. Over het algemeen verto-

TABEL 1 PATIËNTKARAKTERISTIEKEN

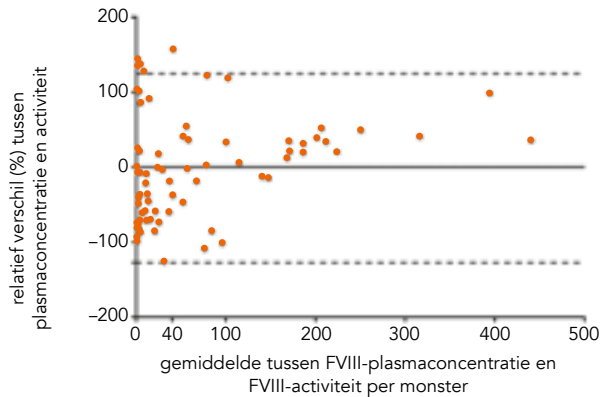
	Aantal (n)	Percentage van totaal (%)
Totaal	87	100
Geslacht, man	85	98
Anti-FVIII-antistoffen ($\geq 0,6$ BU/mL)	5	6 (0,8-5,3 BU/mL)
Monsters met exogeen FVIII-product	58	67
Monsters zonder exogeen FVIII-product	29	33
pdFVIII, volledige lengte (Aafact) *	7	8
Volledige lengte rFVIII	26	30
• octocog alfa (Advate) *	• 8	• 9
• octocog alfa (Helixate/Kogenate) *	• 18	• 21
B-domein gemodificeerde rFVIII-producten	27	31
• turoctocog alfa (NovoEight) *	• 22	• 25
• efmoroctocog alfa (Elocta) *	• 5	• 6
	Gemiddelde	Standaarddeviatie
Leeftijd (jaren)	37	22
Lengte (cm), n = 72	167	33
Lichaamsgewicht (kg), n = 75	69	31
Body mass index (kg/m ²), n = 72	23	6

* Merknaam product staat tussen haakjes erachter genoemd.
(pd/r)FVIII: (uit plasma verkregen/recombinante) factor VIII.

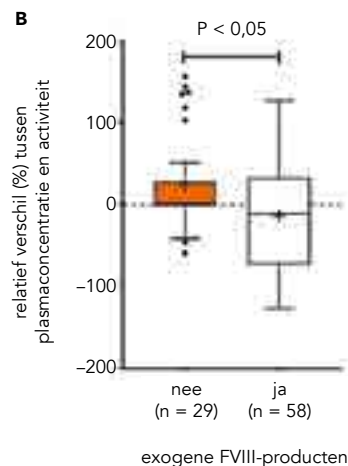
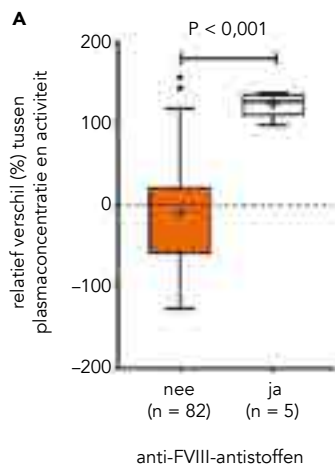
FIGUUR 1 SPREIDINGSDIAGRAM



FIGUUR 2 BLAND-ALTMANPLOT



FIGUUR 3 BOXPLOTS BELANGRIJKSTE DETERMINANTEN



nen alle exogene FVIII-producten een negatief verschil, wat in deze subgroepen een consistent lagere plasmaconcentratie dan activiteit suggereert. De overige resultaten staan in tabel 2.

BESCHOUWING

Ondanks de algeheel sterke associatie tonen wij een grote spreiding aan tussen de FVIII-activiteit (OSA) en de FVIII-plasmaconcentratie (LC-MS/MS). Tevens blijken anti-FVIII-antistoffen en exogene FVIII-producten onafhankelijk van elkaar geassocieerd met grote verschillen tussen de twee methoden.

ASSOCIATIE EN SPREIDING

Naar ons inzicht is dit de eerste vergelijking van FVIII gemeten met zowel OSA als LC-MS/MS, en hoewel de sterke associatie werd verwacht, was de grote variabiliteit onverwacht. Mogelijke verklaringen voor de grote variabiliteit zijn de invloed van determinanten en de resultaatvariabiliteit van OSA. Daarnaast vonden we een evident hogere plasmaconcentratie dan de activiteit in het meetgebied > 40. Indien de LC-MS/MS-methode de werkelijke FVIII-waarde weergeeft, zou het klinisch kunnen betekenen dat de activiteitsmeting een onderschatting geeft voor de dure FVIII-producten die daardoor te hoog worden gedoseerd [7]. In het lage meetgebied (< 40) tonen we

TABEL 2 LINEAIRE REGRESSIEANALYSE VAN DE RELATIEVE VERSCHILLEN ALS FUNCTIE VAN DE DETERMINANT

Determinanten in univariabele lineaire regressie	Aantal ‡ (met/zonder)	B% (95%-BI)	P-waarde
Leeftijd (jaren)	87	-0,3 (-0,9-0,3)	0,372
Gewicht (kg)	75	-0,2 (-0,7-0,3)	0,498
Anti-FVIII-antistoffen (≥ 0,6 BU/mL)	5/82	133 (81-185)	< 0,001
Exogeen FVIII-product †	58/29	-37 (-65- -9)	0,011
Volledige lengte FVIII-producten †, zowel pdFVIII als rFVIII	32/29	-29 (-60-1)	0,06
pdFVIII (Aafact) †*	7/29	-64 (-114- -15)	0,013
Volledige lengte rFVIII, octocog alfa (Advate/Helixate/Kogenate) †*	26/29	-21 (-53-11)	0,194
B-domein gemodificeerde rFVIII-producten † • efmorotocog alfa (Elocta) †* • turoctocog alfa (NovoEight) †*	27/29 • 5/29 • 22/29	-58 (-89- -26) • -77 (-136- -17) • -53 (-86- -20)	< 0,001 • 0,013 • 0,002
Comedicatie • desmopressine • tranexaminezuur • heparine	• 6/81 • 10/67 • 16/71	• 9 (-45-64) • -9 (-52-34) • 25 (-10-60)	• 0,735 • 0,683 • 0,163
Comorbiditeit • hartaandoening • hepatitis B of C	• 6/81 • 19/68	• 25 (-29-79) • -9 (-42-24)	• 0,363 • 0,597
Determinanten in multivariabele lineaire regressie			
Exogene FVIII-producten subgroep *	58 vs 29	-34 (-59- -10)	0,007
Anti-FVIII-antistoffen subgroep vergeleken met de subgroep zonder anti-FVIII-antistoffen	5 vs 82	130 (80-180)	< 0,001

* Merknaam product staat tussen haakjes erachter genoemd.

† Deze determinanten zijn vergeleken met de subgroep zonder exogeen FVIII-product.

‡ totaal aantal patiënten = 87.

B: richtingscoëfficiënt van lineaire regressie, 95%-BI: 95%-betrouwbaarheidsinterval, (pd/r)FVIII: (uit plasma verkregen/recombinante) factor VIII.

juist een mogelijke overschatting van de activiteit aan ten opzichte van de plasmaconcentratie. Dit zou misclassificatie, maar vooral onderschatting van het bloedingsrisico tot gevolg kunnen hebben. Meerdere studies bevestigen de overschatting van OSA in dit meetgebied [8-10].

DETERMINANTEN

Voor de monsters met anti-FVIII-antistoffen vinden we een excessief hogere plasmaconcentratie dan activiteit. Dit kan waarschijnlijk worden verklaard doordat de antistoffen de werking (activiteit) van het FVIII-molecuul verminderen (remmen). Maar ook door de dissociatiestap in de opwerking van de LC-MS/MS-methode, waardoor de antistoffen

mogelijk losraken van het FVIII-molecuul en meer vrij FVIII beschikbaar is om te meten; dit moet verder worden onderzocht. Te lage activiteitswaarden zijn ook beschreven door aanwezigheid van lupus anticoagulans, specifieke factorinhibitoren, of anticoagulante medicatie waarvoor zoveel mogelijk is gecorrigeerd [10].

Een duidelijke trend van een hogere activiteit dan plasmaconcentratie voor de exogene FVIII-producten werd gevonden. In de literatuur wordt grote variabiliteit bij gemodificeerde FVIII-producten beschreven, omdat OSA daarvoor vaak niet is gevalideerd [5,11,12]. De LC-MS/MS-methode maakt echter geen onderscheid tussen endogeen of exogeen FVIII.

Vervolgonderzoek met een vergelijking tussen het fenotype en de twee methodes is geïndiceerd, zodat klinische implementatie van de LC-MS/MS-methode kan worden onderbouwd. Een groot voordeel van de LC-MS/MS-methode is namelijk de mogelijkheid van een patiëntvriendelijke *dried blood spot*-methode welke inzetbaar is in de thuissituatie.

CONCLUSIE

Een goede associatie tussen twee methoden is gevonden, hoewel de aanwezigheid van anti-FVIII-antistoffen en het gebruik van exogene FVIII-producten kan leiden tot verschil in uitslagen met een klinische impact. De potentieel additionele waarde van de FVIII-plasmaconcentratie bepaald met LC-MS/MS ten opzichte van FVIII-activiteit gemeten met OSA moet verder worden onderzocht. ■

Zie voor literatuurreferenties: NPFO.nl.