

Aktivierte partielle Thromboplastinzeit-Standortbestimmung-Standardisierung der Methode, Interpretation der Befunde und Grenzen der Anwendbarkeit

Activated Partial Thromboplastin Time-Position finding – Standardization of the method, interpretation of results and limits of the applicability

M. Köhler, F. Dati, H. J. Kolde

Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik

Einleitung

Die Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung hat eine Arbeitsgruppe ins Leben gerufen, die sich mit der Standardisierung der hämostaseologischen Analytik befaßt [1]. Diesem „Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik“ gehören Vertreter interessierter Fachgesellschaften und Herstellerfirmen von Diagnostika für die Hämostaseologie an. Wichtige Ziele des Komitees sind die Erarbeitung von Konsensmethoden und von Minimalanforderungen an hämostaseologische Tests.

In der vorliegenden Publikation wird eine Standortbestimmung zur APTT gegeben. Diese Standortbestimmung berücksichtigt besonders die deutschen und mitteleuropäischen Anforderungen und Fragestellungen an dieses Testsystem. Ansonsten wurden die Empfehlungen internationaler Gremien und Komitees weitgehend berücksichtigt. Über die APTT liegen bereits nationale Empfehlungen vor, in Deutschland ist eine Norm des DIN erstellt worden [2, 3].

Die APTT ist derzeit der wichtigste Screening-Test zur Beurteilung der endogenen Aktivierung des Gerinnungssystems [4, 5, 6]. In das Meßergebnis fließen sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren der endogenen Aktivierung ein. Die APTT wird hauptsächlich zur Diagnostik angeborener und erworbener Hämostasestörungen, z.B. präoperativer Ausschluß der Hämophilien, zum Nachweis des Lupus-Antikoagulans, zur Kontrolle der Heparintherapie und als Leberfunktionstest eingesetzt [7, 8]. Dar-

über hinaus erfaßt sie auch erworbene Inhibitoren von Hämostasefaktoren, z.B. Faktor VIII-Inhibitor, und ist weiterhin Screening-Test verschiedener Therapien mit hämostaseologisch wirksamen Arzneimitteln. Verkürzte APTT-Zeiten können ein erhöhtes Thromboserisiko anzeigen, sind jedoch wegen möglicher prä-analytischer Fehler (s. u.) zurückhaltend zu interpretieren [9, 10]. Daher kann eine pathologische APTT sowohl Hinweis auf eine thrombophile als auch hämorrhagische Diathese sein.

Das Prinzip der Methode besteht in der Aktivierung der Kontaktphase des Gerinnungssystems durch Inkubation Citrat-antikoagulierten plättchenarmen Plasmas mit APTT-Reagenz, gefolgt von einer Rekalzifizierung des Ansatzes [4]. Das APTT-Reagenz besteht aus 2 Komponenten, nämlich einem Aktivator der Kontaktphase (Ellagsäure, Kaolin, Silicagel, o. a.) und gerinnungsaktiven Phospholipiden. Mittels geeigneter Technik wird nach einer genau einzuhaltenden Inkubationsperiode die Zeit von der Zugabe der Calciumlösung bis zur Fibrinbildung gemessen. Das Ergebnis kann entweder direkt als dieser Meßwert (Zeit in Sekunden) oder als „Ratio“, d. h. als Verhältnis von Meßwert der Probe zum Meßwert eines Normalplasmas, angegeben werden. Daneben ist auch die Angabe einer „individuellen Ratio“ bei der Kontrolle der Heparintherapie in Gebrauch, die aus dem Verhältnis der APTT vor Therapie zur APTT unter Heparintherapie errechnet wird.

Referenzbereich

Der Referenzbereich wird zunächst gerätespezifisch vom Hersteller des Testsystems ermittelt, wobei mindestens 100 anscheinend Gesunde herangezogen werden. Diese Gruppe von Referenzpersonen sollte eine Blutgruppenverteilung wie in Mitteleuropa besitzen, da insbesondere die Faktor VIII-Konzentration bei Personen mit Blutgruppe 0 geringer ist [11]. Weiterhin sollten keine Lebererkrankungen

Korrespondenz-Adresse:

Prof. Dr. med. Michael Köhler,
Universität Göttingen,
Abteilung für Transfusionsmedizin,
Robert-Koch-Str. 40, 37070 Göttingen

vorliegen. Daraus werden vom Hersteller als oberer Referenzbereich mit geeigneten statistischen Methoden die 2,5. und 97,5. Perzentile berechnet und angegeben; zusätzlich werden deklariert: Blutentnahmesystem, Meßgerät und Zahl der Referenzpersonen. Der Anwender prüft anhand von 40 gesunden Personen, ob 90 % der APTT-Werte innerhalb des Bereiches zwischen 2,5 und 97,5 Perzentile liegen. Ist dies der Fall, kann der Anwender den vom Hersteller angegebenen Referenzwertbereich übernehmen, andernfalls sollte er den für sein Testsystem relevanten Referenzwertbereich ermitteln.

Anforderungen an die Testsysteme

a) Faktor VIII-Sensitivität

Die APTT in Sekunden korreliert linear mit dem Logarithmus der Faktor VIII-Aktivität (FVIII) des Plasmas, allerdings ist die Faktoren-Empfindlichkeit verschiedener Reagenzien unterschiedlich [19]. Anhand einer Verdünnungsreihe von Normalplasma (DIN) mit einem FVIII-Mangelplasma (FVIII < 0,01 E/ml) ermittelt der Hersteller, ab welcher FVIII-Aktivität das Meßergebnis den oberen Referenzbereich überschreitet und gibt diesen Wert an.

Es ist weiterhin wünschenswert, daß analog dazu diese Werte auch für Faktor IX und XI ermittelt und eventuell deklariert werden. Es wird darauf hingewiesen, daß diese in vitro ermittelten Empfindlichkeitswerte nur eine Orientierung ermöglichen.

b) Heparin-Sensitivität

Die Kontrolle der Heparintherapie ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [20–26]. Bei der Behandlung und Sekundärprophylaxe von Thrombosen wird als therapeutischer Bereich eine Verlängerung der APTT auf das 1,5 bis 2,5-fache angegeben, wobei sich entweder auf den individuellen Ausgangswert des Patienten vor Heparintherapie oder auch, da dieser Wert häufig nicht vorhanden ist, auf den Referenzbereich bezogen wird [27]. In einem engen Bereich korreliert der Logarithmus der APTT-Werte mit der Heparinkonzentration, allerdings ist die Heparinsensitivität der Testsysteme verschieden. Ebenso besteht keine enge Korrelation der APTT

mit anderen Testsystemen zur Heparinbestimmung, wie z.B. mit der anti-Xa- und anti-IIa-Messung. Besonders hinzuweisen ist auf die große Variabilität des Einflusses verschiedener LMWH auf die APTT. Gegenwärtig ist eine Standardisierung der Befunde, die mit unterschiedlichen Testsystemen ermittelt werden, zur besseren Vergleichbarkeit der Meßergebnisse, ähnlich der Thromboplastinzeit mit ISI/INR, für die APTT nicht möglich.

Es wird daher empfohlen, daß der Hersteller anhand einer Heparinzugabe (Unfraktioniertes Heparin, UFH) zu einem frischen Poolplasma im Bereich 0,1 E bis 1,0 E/ml Heparin (am WHO-Standard für UFH kalibriert), in Schritten zu 0,1 E/ml, die Heparinempfindlichkeit des APTT-Testsystems ermittelt und angibt. Analog wird die Empfindlichkeit für LMWH (WHO-Standard) ermittelt. Diese Angaben sollen über die Heparinempfindlichkeit des Testsystems orientieren, und dürfen nicht als Bezugs-kurve verwendet werden.

c) Lupus Antikoagulans

Die Sensitivität der auf dem Markt befindlichen Testsysteme auf Lupus Antikoagulans (LA) ist unterschiedlich [28–31]. Allerdings ist z.Z. keine Möglichkeit zur objektiven, vergleichenden Charakterisierung dieser Kenngröße zugänglich. Nach Ausschluß aller Möglichkeiten, die eine Verlängerung der APTT hervorrufen, wie z.B. das Vorliegen einer Störung des endogenen Gerinnungssystems, spezifischer Inhibitoren, Heparin etc., weist eine Verlängerung der APTT auf das Vorliegen eines LA hin.

Kritische Schritte und Störeinflüsse

a) Präanalytik und Analytik

Die APTT ist unter den Screening-Tests der empfindlichste für Störeinflüsse und erfordert daher strenges Einhalten der Empfehlungen zur Durchführung, insbesondere die korrekte Blutentnahme und rasche Analyse [32–36]. In diesem Zusammenhang wird auf die Empfehlungen „Blutentnahme für hämostaseologische Analysen“ des Komitees zur Standardisierung hämostaseologischer Analytik verwiesen [37]. Proben, bei denen offensichtlich ein falsches Citrat/Blutverhältnis oder sichtbare Gerinnsel vorliegen, liefern keine verwertbaren Ergebnisse und sollten daher nicht analysiert werden. Lange „Standzeiten“ von Blutentnahme bis zur Analyse sind zu vermeiden, die Proben müssen bis zur Analyse bei Raumtemperatur und nicht im Kühlschrank bewahrt werden (Kälteaktivierung, Faktor VIII-Labilität).

Abkürzung

APTT	=	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
LA	=	Lupus Antikoagulans
LMWH	=	Low Molecular Weight Heparins

Zur Erhebung von Daten wird nochmals auf die Reagenzien- und Apparateabhängigkeit der Meßergebnisse hingewiesen [38, 39]. Da besonders die Voraktivierungszeit (Inkubation des Plasmas mit dem Aktivator) entscheidenden Einfluß auf das Meßergebnis hat, sind die methodenspezifischen Vorschriften des Herstellers unbedingt einzuhalten [40].

Die Sedimentation von partikelhaltigen Reagenzien während der Analysendauer ist durch geeignete Maßnahmen zu vermeiden. Ebenfalls ist die korrekte Calciumkonzentration sicherzustellen.

In Analysenautomaten müssen Proben- und Reagenz-Verschleppungen ausgeschlossen sein. Eine häufige Fehlerquelle ist die Benutzung von Glasware mit Detergentien (Spülmittel)-Rückständen.

b) Weitere Störeinflüsse

Je nach Testsystem haben im besonderen Ausmaß Aprotinin, Nitroglycerin und Dextran Einfluß auf das Meßergebnis und sollten bei der Befundinterpretation berücksichtigt werden [41–44]. Es wird auch auf die verminderte Stabilität von Proben mit erhöhter proteolytischer Aktivität hingewiesen. So kann Plasmin, z. B. bei Patienten mit einer gesteigerten Fibrinolyse, Trypsin bei einer Pankreatitis oder Elastase bei entzündlichen oder hämatologischen Erkrankungen zu einer Verlängerung der APTT führen.

Qualitätskontrolle und -sicherung

Die Unpräzision innerhalb einer Serie sollte $< 3\%$, die von Tag zu Tag (für 20 Tage) $< 5\%$ sein [45, 46].

Die interne Qualitätskontrolle muß bei jeder Meßserie durch Mitführung einer Kontrollprobe im Normalbereich und einer Kontrollprobe im pathologischen Bereich durchgeführt werden.

Die Teilnahme an einer externen Qualitätskontrolle durch Ringversuche wird dringend empfohlen.

Pathologische APTT-Werte sind hinsichtlich ihrer Plausibilität und Genese laboranalytisch bzw. klinisch abzuklären. Bei der Bewertung der Befunde ist zu berücksichtigen, daß das erhobene Meßergebnis erheblich von Testmethodik und den Randbedingungen abhängt. Die Interpretation der APTT bedarf in besonderem Ausmaß genauer Kenntnis über das angewandte Testsystem. Es ist daher sicherzustellen, daß relevante Änderungen bei der Testdurchführung den Ärzten, die aufgrund dieser Meßwerte Entscheidungen treffen, umgehend zur Kenntnis gebracht werden.

Offene Fragen und empfohlene Maßnahmen

Zum Nachweis von Inhibitoren in einer Plasmaprobe können sogenannte Plasma-Mischversuche durchgeführt werden. Eine Standardisierung dieser Plasma-Mischversuche liegt bisher nicht vor. Die Frage der Heparin- und Faktoren-Sensitivität wird z. Z. durch prospektive Multicenterstudien und Ringversuche abgeklärt [47–50].

Sehr rasch realisierbar und besonders wichtig scheint der Arbeitsgruppe die Etablierung eines Panels mit Patientenproben, an denen alle APTT-Reagenzien kalibriert werden können, zunächst bezüglich LA, im nächsten Schritt FVIII. Das „Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik“ wird ein solches Panel demnächst etablieren.

Einige Fragestellungen erfordern weitere Untersuchungen: Frage des optimalen Antikoagulans (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol, CTAD), Probenstabilität, Fibrinogen/Fibrin(ogen)-Spaltprodukte-Abhängigkeit, Einfluß von Tissue Factor Pathway Inhibitor, Nitroglycerin-Wirkung, Lipämie, etc.

Es ist vorgeschlagen worden, die APTT nicht in Sekunden, sondern als Verhältnis von Wert der Patientenprobe zu Wert der Kontrolle („Normalized Ratio“) anzugeben. Der Wert einer solchen Transformation der Einheit wird z. Z. international untersucht [49]. Da Heparin die APTT beeinflusst, kann der Plättchenfaktor 4 (PF 4), der nach Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt wird, Heparin neutralisieren. Auch beeinflusst die Konzentration des Antithrombin III, das mit Heparin einen Komplex eingeht, die APTT.

Zur Zeit werden die in diesem Zusammenhang auftretenden Probleme der Standardisierung der APTT zur Überwachung einer Heparintherapie systematisch untersucht; eine abschließende Empfehlung kann bisher noch nicht ausgesprochen werden. Schließlich ist das Ausmaß der Beeinflussung der APTT durch eine APC-Resistenz (Resistenz des Aktivierten Protein C), die kürzlich entdeckt wurde und möglicherweise bei vielen Patienten mit familiärer Thrombophilie vorliegt [51–55], noch nicht geklärt.

Literatur

1. Müller-Berghaus G, Dati F, Ammer H, Becker U, Becker H, Hellstern P, Keller F, Kienast J, Köhler M, Kolde H-J, Kühne D, Lang H, Müller-Beißenhirtz W, Patscheke H, Schramm W, Seifried E, Stötzer KE, Witt I, Witt P (1994): Komitee zur Standardisierung der hämostaseologischen Analytik: Aufgaben und Ziele. *Laboratoriumsmedizin* 18, 337–338

2. Normenausschuß Medizin (NAMed) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTZ). DIN 58908, Berlin 1989
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Activated Partial Thromboplastin Time Test (APTT). Proposed Guidelines 1982. NCCLS Document H29-P
4. Proctor RR, Rapaport SI (1961) The partial thromboplastin time with koalin: A simple screening test for first stage clotting factor deficiencies. *Am. J. Clin. Pathol.* 36, 211–219
5. Thomas L, Trobisch H (1992) Partielle Thromboplastinzeit (aPTT, PTT). In: *Labor und Diagnose*, 4. Auflage (Thomas L, ed.). Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, Germany pp. 694–698
6. Poller L, Thomson JM (1992) The activated partial thromboplastin time (APTT) In: *ECAT Assay Procedures*. (Jespersen J, Bertina RM, Havercate F, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 35–50
7. Basu D, Gallus A, Hirsh J, Cade J (1972) A prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N. Engl. J. Med.* 287, 324–327
8. Suchman AL, Griner PF (1986) Diagnostic uses of the partial thromboplastin time and prothrombin time. *Ann. Intern. Med.* 104, 810–816
9. Ho CH, Wu SY (1991) The influence of time, temperature and packed cell on activated partial thromboplastin time and prothrombin time. *Thromb. Res.* 62, 625–633
10. McKenna R, Bachmann F, Miro-Quesada M (1977) Thrombo-embolism in patients with abnormally short activated partial thromboplastin time. *Thrombos. Haemostas.* 38, 893
11. Gill JC, Endre-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR (1987) The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand Disease. *Blood* 69, 1619–1695
12. Marlara RA, Bauer PJ, Endre-Brooks JL, Montgomery RR, Miller CM, Schanen MM (1982) Comparison of the sensitivity of commercial APTT reagents in the detection of mild coagulopathies. *Am. J. Clin. Pathol.* 82, 436–439
13. Baumann L, Zimmermann TS (1985) Partial Thromboplastin Time reagents: Another Look. *Laboratory Medicine* 16, 35
14. Smith LG, Kitchens CS (1985) A comparison between two commercially available activators for determining the partial thromboplastin time. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109, 243–246
15. Hellstern P, Oberfrank K, Köhler M, Heinkel K, Wenzel E (1989) Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) als Screeningtest für leichte Gerinnungsfaktorenmängel. *Lab. med.* 13, 83–86
16. Lindhoff-Last E, Krzywanek HJ, Mosch G, Breddin HK (1992) A comparison of different APTT reagents, heparin sensitivity and detection of mild coagulopathies. *Lab. med.* 16, 423–426
17. Barna L, Triplett DA (1989) Use of the activated partial thromboplastin time for the diagnosis of congenital coagulation disorders: problems and possible solutions. *Res. Clin. Lab.* 19, 345–354
18. Mannucci PM, Italian (CISMEL) Study Group (1980) Activated partial thromboplastin time. A multicenter evaluation of 11 reagents in the screening of mild haemophilia A. *Scand. J. Haematol.* 25, 308–317
19. O'Brian PF, North WRS, Ingram CIC (1981) The diagnosis of mild haemophilia by the partial thromboplastin time test. WFH/ICTH study of the Manchester method. *Thromb. Haemostas.* 45, 162–168
20. Bain B, Forster T, Sleight B (1980) Heparin and the Activated Partial Thromboplastin Time – A difference between the in-vitro and in-vivo effects and implications for the therapeutic range. *Am. J. Clin. Pathol.* 11, 668
21. Gawoski JM, Arkin CF, Bovill T, Brandt J, Rock WA, Triplett DA (1987) The effects of heparin on the activated partial thromboplastin time of the college of American Pathologists Survey specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111, 785–790
22. Van den Besselaar AMHP, Meeuwisse-Braun J, Bertina RM (1990) Monitoring heparin therapy: relationships between the activated partial thromboplastin time and heparin assays based on ex-vivo heparin samples. *Thromb. Haemostas.* 63, 16–23
23. Scialla SJ (1985) Heparin monitoring by activated partial thromboplastin time. Comparison of ex vivo measurement and in vitro standardization. *Am. J. Clin. Pathol.* 84, 351–354
24. Bjornsson TR, Nash PV (1986) Variability in heparin sensitivity of APTT reagents. *Am. J. Clin. Pathol.* 86, 199–204
25. Shojania AM, Tetreault J, Turnbull C (1989) The variations between heparin sensitivity of different lots of activated partial thromboplastin time reagent produced by the same manufacturer. *Am. J. Clin. Pathol.* 89, 19–23
26. Poller L, Thomson JM, Taberner DA (1989) Use of the activated partial thromboplastin time for monitoring heparin therapy: problems and possible solutions. *Res. Clin. Lab.* 19, 363–370
27. Colvin BT (1993) The British Society for Haematology Guidelines on the Monitoring of Heparin 1992: Second Revision. *J. Clin. Pathol.* 46, 97–103
28. Mannucci PM, Canciani MT, Mari D, Meuycci P (1979) The varied sensitivity of partial thromboplastin and prothrombin reagents in the demonstration of lupus-like anticoagulants. *Scand. J. Haematol.* 22, 423–432
29. Barna LK, Triplett DA (1991) A report on the First international workshop for lupus anticoagulant identification. *Clin. Exp. Rheuma* 9, 557–567
30. Alving BM, Barr CF, Tang DB (1990) Correlation between lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies in patients with prolonged activated partial thromboplastin times. *Am. J. Med.* 88, 112–116
31. Adcock DM, Marlara RA (1992) Activated partial thromboplastin time reagent sensitivity to the presence of the lupus anticoagulant. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116, 837–840
32. McPhedron P, Clyne LP, Ortolini NA, Cagnon PG, Sanders FJ (1974) Prolongation of the activated partial

- thromboplastin time associated with poor venipuncture technique. *Am. J. Clin. Pathol.* 62, 16–20
33. Czapek EE (1974) Iatrogenic prolonged APTT: A non-disease state. *JAMA* 227, 1304
 34. Koepke JA, Rodgers JL, Ollivier MJ (1975) Pre-instrumental variables in coagulation testing. *Am. J. Clin. Pathol.* 64, 591–596
 35. Noren I, Blombäck M, Fridell E, Wallinder U (1978) Vacutainer sampling for blood coagulation assays. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 38, 63–68
 36. Smith LC, Kitchen CS (1983) Pseudo-prolongation of the partial thromboplastin time. *Am. J. Clin. Pathol.*
 37. Witt I, Beeser H, Müller-Berghaus C (1995) Minimalanforderungen zur Gewinnung von Citratplasma für hämostaseologische Analysen *Lab Med (im Druck)*
 38. Naghibi F, Han Y, Dodds WJ, Lawrence CE (1988) Effects of reagent and instrument on prothrombin times, activated partial thromboplastin times and patient/control ratios. *Thromb. Haemostas.* 59, 455–463
 39. D'Angelo A, Seveso MP, Viagno' S, D'Angelo A, Gilardoni F, Dettori AC, Bonini P (1990) Effect of clot-detection methods and reagents on activated partial thromboplastin time (APTT). Implications in heparin monitoring by APTT. *Am. J. Clin. Pathol.* 94, 297–306
 40. Stevenson KJ, Easton AC, Curry A, Thomson JM, Poller L (1986) The reliability of activated partial thromboplastin time methods and the relationship to lipid composition and ultrastructure. *Thromb. Haemostas.* 55, 250–258
 41. Pizzulli L, Nitsch J, Lüderitz B (1988) Hemmung der Heparinwirkung durch Glyceroltrinitrat. *Dtsch. Med. Wschr.* 113, 1837–1840
 42. Becker RC, Corrao JM, Baker SP, Bovill EG, Gore JM, Lucas FV (1989) Nitroglycerin-induced heparin resistance: a qualitative defect in Antithrombin III. *Circulation* 80 (Suppl II), 52
 43. Brack MJ, More RS, Hubner JB, Gershlick AH (1993) The effect of low dose nitroglycerine on plasma heparin concentrations and activated partial thromboplastin times. *Blood. Coagul. Fibrinol.* 4, 183–186
 44. Francis JL, Howard C (1993) The effect of aprotinin on the response of the activated partial thromboplastin time (APTT) to heparin. *Blood. Coagul. Fibrinol.* 4, 33–40
 45. Koepke JA (1986) Partial thromboplastin time test – Proposed performance guidelines. ICSH Panel on the PTT. *Thromb. Haemostas.* 55, 143–144
 46. Koepke JA (1989) Performance guidelines for the partial thromboplastin time test. *Res. Clin. Lab.* 19, 359–362
 47. Patterson BB, Puls JL (1976) Standardization of prothrombin and activated partial thromboplastin time reagents and controls. *Am. J. Clin. Pathol.* 65, 213–219
 48. Poller L (1980) Standardization of the APTT test. Current status. *Scand. J. Haematol. Suppl* 37/25, 49–63
 49. Van den Besselaar AMHP (1989) Standardization of the activated partial thromboplastin time for monitoring of heparin therapy: where should we go? *Res. Clin. Lab.* 19, 371–377
 50. Ray M, Carroll P, Smith I, Hawson G (1992) An attempt to standardize APTT reagents used to monitor heparin therapy. *Blood Coagul. Fibrinol.* 3, 743–748
 51. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ (1993) Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1004
 52. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA (1993) Anticoagulant protein C defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 82, 1989–1993
 53. Svensson PJ, Dahlbäck B (1994) Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 330, 517–522
 54. Dahlbäck B, Hildebrand B (1994) Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1396–1400
 55. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Felden PA, Reitsma PH (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369, 64–67