

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.24.023

采用稀释法评价狼疮抗凝物对凝血因子活性检测的干扰

颜楠, 韩峰, 刁艳君, 陈启颖, 刘家云

空军军医大学附属西京医院检验科, 陕西西安 710032

摘要:目的 探讨稀释法在评价狼疮抗凝物(LAC)对凝血因子活性检测的干扰中的应用。方法 选取该院健康体检者 30 例作为对照组,将这 30 例受试者的混合血浆标本分别按 1:1、1:2¹、1:2²、1:2³、1:2⁴、1:2⁵ 6 种不同稀释比例配制成不同浓度的血浆,检测标本中的凝血因子 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ、FⅡ、FⅤ、FⅦ、FⅩ 活性,将其与所对应稀释度的理论值作线性相关分析。选取于该院住院治疗的 LAC 阳性且凝血酶原时间(PT)、活化的部分凝血活酶时间(APTT)均延长的抗磷脂综合征患者 6 例作为 LAC 阳性组。将 6 例 LAC 阳性组患者的血浆标本按同样的方法进行梯度稀释并对上述 8 种凝血因子的活性进行检测。结果 对照组 8 种凝血因子活性检测值与理论值均呈直线相关($R^2 \geq 0.90, P < 0.05$)。随着稀释倍数的增加,内源性凝血因子活性随之升高,能恢复大致正常水平,且升高到一定水平时不再随着稀释倍数的增加而继续升高。结论 病理性抗凝物质如 LAC 可对内源性凝血因子活性检测造成干扰,稀释法可通过降低干扰物质的滴度来获得更加准确的凝血因子检测值。

关键词:狼疮抗凝物; 凝血因子活性; 稀释曲线法

中图分类号:R446.11

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)24-3588-04

Using dilution method to evaluate the interference of lupus anticoagulant in the detection of coagulation factor activity

YAN Nan, HAN Feng, DIAO Yanjun, CHEN Qiyang, LIU Jiayun

Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital Affiliated to Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Objective To investigate the application value of dilution method in evaluating the interference of lupus anticoagulant (LAC) in the detection of coagulation factor activity. **Methods** A total of 30 healthy people in the hospital were enrolled as the control group, and the mixed plasma sample of the 30 healthy people were prepared into different concentrations of plasma according to 6 different dilution ratios 1:1, 1:2¹, 1:2², 1:2³, 1:2⁴, 1:2⁵, detected the coagulation factors FⅧ, FⅨ, FⅪ, FⅫ, FⅡ, FⅤ, FⅦ, FⅩ activity in the plasma sample, and make a linear correlation analysis with the theoretical value of the corresponding dilution. Six patients with antiphospholipid syndrome who were hospitalized in the hospital with LAC positive and prolonged partial thromboplastin time(PT) and activated partial thromboplastin time(APTT) were enrolled as the LAC positive group. The plasma samples of the 6 patients in the LAC positive group were serially diluted in the same way and the activity of the above 8 coagulation factors were detected. **Results** In the control group, the detected activity values of the 8 coagulation factors were linearly correlated with the theoretical values ($R^2 \geq 0.90, P < 0.05$). As the dilution ratios increased, the endogenous coagulation factor activity increased and could return to roughly normal levels, and when it reached a certain level, it no longer continued to increase as the dilution factor increased. **Conclusion** Pathological anticoagulants such as LAC can interfere with the detection of endogenous coagulation factor activity. The dilution method can be used to obtain more accurate coagulation factor detection values by reducing the titer of interfering substances.

Key words: lupus anticoagulants; coagulation factor activity; dilution method

作者简介:颜楠,女,主管技师,主要从事血栓与止血的相关研究。

本文引用格式:颜楠,韩峰,刁艳君,等.采用稀释法评价狼疮抗凝物对凝血因子活性检测的干扰[J].检验医学与临床,2021,18(24):3588-3590.

狼疮抗凝物(LAC)是一种磷脂依赖的病理性循环抗凝物质,是抗磷脂抗体(APL)的一种^[1],为 IgG 或 IgM 的异质性免疫球蛋白。主要通过结合 β_2 糖蛋白 I、人凝血酶原及其他磷脂复合物来干扰磷脂依赖的凝血过程,使体外检测的凝血时间延长^[2]。持续 LAC 阳性的患者被认为有较高的血栓形成和复发风险,与不明原因习惯性流产、死胎、血栓性疾病及某些自身免疫性疾病密切相关^[3]。因 LAC 的异质性,检测试剂种类、磷脂构成和浓度、检测原理(有磁珠法与光学法、散射光与透射光)的不同,以及检测反应终点判断方式的不同等均会影响到检测结果^[4]。有部分 LAC 阳性的患者有凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血活酶时间(APTT)的延长,会使凝血因子活性的检测出现假性降低的结果。稀释法是指将原血浆标本按不同稀释比例进行稀释。由于凝血因子的促凝过程是一系列酶促反应,其反应速度与强度在一定范围内与凝血因子的活性呈线性相关^[5],故稀释后各浓度血浆的凝血因子活性通过乘以稀释倍数,可校正为与检测结果相同或相近的结果^[6]。若存在病理性的抗凝物质,如 LAC,稀释法可以通过降低干扰物质的滴度,使检测结果能更准确地反映体内凝血因子的真实水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在 2020 年 10 月至 2021 年 4 月于本院住院治疗的抗磷脂综合征(APS)患者中选取 LAC 阳性[LAC 检测采用改良的稀释蝰蛇毒时间试验(dRVVT)进行筛选和确诊试验,计算 LA 比值(LA 比值=筛选试验比值/确诊试验比值),LA 比值>1.2 为阳性]且 PT、APTT 均延长的 6 例患者作为 LAC 阳性组,男 1 例、女 5 例,年龄 14~49 岁、平均 26.33

岁。另外,选取同期于本院体检的健康者 30 例作为对照组,男、女各 15 例,排除有先天性凝血功能障碍、凝血因子缺乏、肝脏疾病、严重感染、血栓栓塞性疾病者,年龄 23~56 岁,平均 36.00 岁。

1.2 仪器与试剂 使用的检测仪器为 Sysmex 公司生产的 Sysmex CS5100 型全自动凝血分析仪。PT、APTT、凝血因子活性、LAC 检测试剂或试剂盒及质控品均为德国西门子公司产品。

1.3 方法 采集受试者清晨空腹静脉血于枸橼酸钠抗凝管中,以 $1\ 500\times g$ 离心 15 min 后分离血浆。采用全自动凝血分析仪及相应的配套试剂进行检测。对照组:将 30 例受试者的混合血浆分别按 1:1、1:2¹、1:2²、1:2³、1:2⁴、1:2⁵ 6 种不同稀释倍数配制成不同浓度的血浆,稀释液选用德国西门子公司生产的原装 OVB 缓冲液。分别检测凝血因子 FVIII、FIX、FXI、FXII、FII、FV、FVII、FX 活性,将其与所对应稀释度的理论值作线性相关分析。LAC 阳性组:用同样的方法采集 6 例 LAC 阳性组患者标本,将 6 例患者的标本分别按同样的方法进行梯度稀释并对上述 8 种凝血因子的活性进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计学软件进行数据处理和统计学分析,检验水准 $\alpha=0.05$;应用 GraphPad Prism 8 软件绘图。

2 结果

2.1 对照组凝血因子活性检测值与理论值的相关性分析 对照组 8 种凝血因子活性检测值与理论值均呈直线相关($R^2\geq 0.90$, $P<0.05$),见图 1。凝血因子活性在不存在任何干扰物质的情况下随稀释度的增加而逐渐降低。

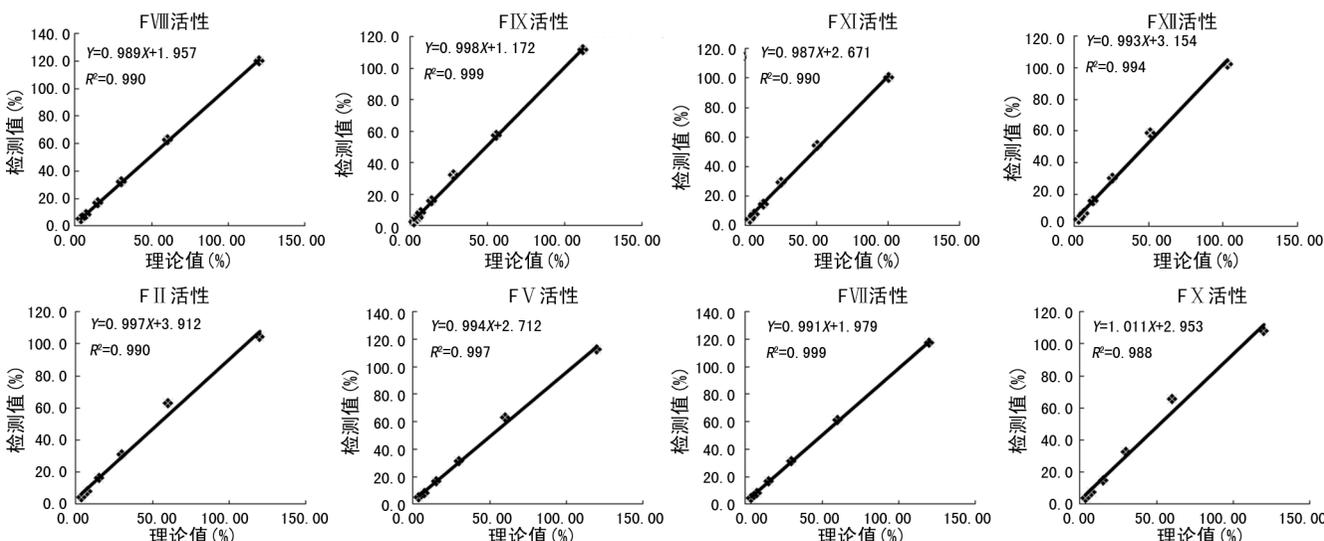


图 1 对照组凝血因子活性检测值与理论值的线性相关分析

2.2 LAC 阳性组凝血因子活性检测 随着稀释倍数的增加,内源性凝血因子(FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ)活性随之升高,能恢复到大致正常水平,且升高到一定水平时不再随着稀释倍数的增加而继续升高。此处列举 LAC 比值最高患者的检测结果,见表 2。

表 2 LAC 比值最高患者的 8 种凝血因子不同稀释倍数的检测结果(%)

凝血因子	1:1	1:2 ¹	1:2 ²	1:2 ³	1:2 ⁴	1:2 ⁵
FⅡ	29.4	30.0	31.2	30.6	30.7	32.0
FⅤ	96.9	101.9	107.2	106.9	107.2	107.9
FⅦ	56.0	57.9	58.0	60.2	60.8	63.1
FⅩ	60.2	58.5	62.8	63.1	67.4	66.9
FⅧ	17.5	71.4	111.4	120.2	155.4	160.2
FⅨ	6.2	34.8	44.5	45.6	76.0	77.4
FⅪ	5.4	30.2	46.3	55.2	80.1	82.3
FⅫ	4.8	29.6	42.9	59.8	92.3	95.1

3 讨 论

APTT 检测是一项针对内源性凝血途径的筛查试验,参与内源性凝血的因子主要有 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ。APTT 的检测方法为凝固法。当 APTT 延长时通常提示内源性凝血功能障碍^[7],与血液不凝和出血有关。LAC 阳性患者体内的 LAC 可直接与凝血酶原上的抗原决定簇结合,抗原抗体复合物与阴离子磷脂相结合,抑制凝血酶原、FⅧ、FⅨ、FⅩ等与磷脂微粒的结合,也可导致 APTT 延长^[8]。内源性凝血因子的检测方法同样为凝固法^[9],其原理是通过把不同稀释度的标准血浆检测得到的 APTT 值绘制成标准曲线来读取凝血因子活性水平,可以分别测得内源性凝血因子 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ的活性。dRVVT 的原理是在待测血浆中加入激活剂蝮蛇毒和钙离子,鲁赛尔氏蝮蛇毒可直接活化凝血因子 X 使血液凝固^[3]。其包括筛选试验和确证试验。如果血浆中存在 LAC 能使筛选试验的凝固时间延长。确诊试验的试剂和筛选试验试剂一样,但其含高浓度磷脂,外源性磷脂与 LA 抗体结合,很大程度上纠正了凝固时间。计算其比值(LA 比值=筛选试验比值/确诊试验比值),若 LA 比值>1.2,则判断患者为 LAC 阳性^[10]。该试验证明 LAC 存在特异且简便的检测手段。国际血栓与止血学会(ISTH)与临床实验室和标准化协会(CLSI)分别在 2009 年与 2014 年更新了关于 LAC 检测相关指南文件^[11-12],指南均推荐将 dRVVT 和 APTT 两种试验作为 LAC 的一线筛查试验。

当 LAC 阳性患者表现出 APTT 假性延长时,需要通过 APTT 来反映的内源性凝血因子 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ活性检测也同样会受到干扰。这无疑将大大增加临床的诊疗难度。临床应分析患者是否存在可

导致 LAC 阳性的感染或药物的使用,进一步检测并排除自身免疫性疾病。LAC 阳性的自身免疫性疾病以系统性红斑狼疮(SLE)^[13]和 APS 多见,其中 LAC 阳性是 APS 的诊断标准之一^[14]。当实验室检测间隔 12 周以上,连续 2 次检测 LAC 为阳性时,加上一项血栓形成或复发性流产的临床表现即可诊断 APS。LAC 阳性患者被认为有较高的血栓风险^[15],但极少有 LAC 阳性患者发生出血^[16]。

本研究首先将健康人混合血浆标本各稀释度的凝血因子活性检测结果与其对应稀释度的理论活性值进行线性相关分析,8 种凝血因子活性检测值与理论值均呈直线相关($R^2 \geq 0.90, P < 0.05$),而且凝血因子活性在不存在任何干扰物质的情况下随稀释度的增加而逐渐降低,即只表现为单纯的稀释效应。另外,本研究收集了 6 例 LAC 阳性且 PT、APTT 均延长的患者标本,用稀释法进行了同样的凝血因子活性检测。结果显示随着稀释度的增加,凝血因子 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ活性并没有表现出稀释效应,而是随稀释比例增加而逐渐升高最终恢复至大概正常水平,即明确提示存在干扰。因其标本在稀释的过程中 LAC 的滴度也随之降低,最终可以得到相对准确的结果。对于内源性凝血因子活性降低且 LAC 升高的患者,应综合分析实验室的检测结果,并需要进一步采用稀释法对凝血因子活性进行检测。而 FⅡ、FⅤ、FⅦ、FⅩ的活性变化较小是由于这 4 个凝血因子主要反映外源性凝血途径的凝血状况,而 LAC 主要作用于凝血酶原复合物(因子 X a、V a、Ca²⁺及磷脂)以及 Tenase 复合物(因子Ⅸ a、Ⅷ a、Ca²⁺及磷脂),并能在体外延长磷脂依赖的凝血试验的时间^[17]。所以内源性凝血途径的筛查试验 APTT 对 LAC 较敏感,通过 APTT 检测得到的 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ活性也更易受到干扰。在明确 APTT 延长的原因是 LAC 且不存在其他出血风险因素时,不应将 APTT 延长与内源性凝血因子活性降低视为手术禁忌。

临床实验室有必要开展凝血因子活性、LAC 等特殊项目的检测,以协助复杂出血性疾病与血栓性疾病的诊断。最后,实验室应与临床科室密切沟通,使临床科室充分了解影响实验室检测结果的干扰因素以及各类疾病的实验室检测路径,避免错误理解和使用检验结果,从而共同为患者提供更加快速、准确的诊断与治疗。

参考文献

[1] 中华医学会风湿病学分会. 抗磷脂综合征诊断和治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15(6): 407-410.
 [2] SHOENFELD Y, MERONI P L, GERSHWIN M E. Autoantibodies[M]. 3rd Ed. Elsevier; 2014. (下转第 3594 页)

呈负相关($r = -0.297, P < 0.05$);BNP 与左室舒张末期径、左室收缩末期径呈正相关($r = 0.345, 0.427, P < 0.05$)。IgE 检测的灵敏度、特异度分别为 91.6%、53.6%,BNP 检测的灵敏度、特异度分别为 84.9%、92.5%,IgE、BNP 联合检测的灵敏度、特异度分别为 92.3%、93.0%,联合检测的灵敏度、特异度均高于单项检测。IgE、BNP 联合诊断可提高心力衰竭的诊断效能,这与沈晓辉等^[11]的研究结果相符。张如南等^[12]报道,心力衰竭患者血清 IgE 水平高于冠心病组和健康组,IgE、BNP 联合诊断可提高对心力衰竭的诊断效能。

综上所述,血清 IgE、BNP 水平与部分血脂或心功能指标相关,IgE、BNP 联合诊断可提高心力衰竭的诊断效能。但本研究选取的样本量较少,需进一步加大样本量进行多中心的深入研究。

参考文献

[1] 孔洪. 女性心力衰竭诊治的研究进展[J]. 内科理论与实践, 2020, 15(2): 12-17.
 [2] 孔洪. 老年心力衰竭的诊治进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(8): 785-788.
 [3] 汪润, 曹高镇, 林庆庚. GDF-15、ST-2、NT-proBNP 在不同左室射血分数心力衰竭患者中的表达水平以及联合应用价值[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(1): 73-76.
 [4] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分会, 等. 急性心力衰竭基层诊疗指南(实践版 2019)[J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(10): 931-935.
 [5] SHEN M, CHEN H, CONG Y. Combined use of cardiop-

ulmonary ultrasound in the diagnosis of pulmonary edema in patients with heart failure: a retrospective analysis[J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2020, 10(5): 1325-1331.

[6] 周川, 张振刚, 龚开政. 心力衰竭的治疗进展[J]. 医学综述, 2019, 25(7): 1358-1362.
 [7] 丁涛, 张静, 赵同军, 等. 血清 NT-proBNP, GDF-15, P I CP 和 P III CP 联合检测对急性心力衰竭诊断及预后评估的临床价值[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(21): 89-93.
 [8] DEL BUONO M G, CARBONE S, ABBATE A. Letter by Del Buono et al regarding article, "A Simple, Evidence-Based Approach To Help Guide Diagnosis of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction"[J]. Circulation, 2019, 139(7): 990-991.
 [9] 李杰, 张施明, 杨淑莲. 抗氧化应激对慢性心力衰竭患者 CysC 及 Pro-BNP 的影响及相关性[J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(1): 31-36.
 [10] UNURJARGAL T, KHORLOO C, ULZIISAIKHAN G, et al. Screening for asymptomatic heart failure with preserved ejection fraction in mongolian population at high risk[J]. Kardiologia, 2020, 60(4): 86-90.
 [11] 沈晓辉, 杨文娟, 程慧, 等. N 末端脑利钠肽前体和二尖瓣舒张早期血流峰速度与二尖瓣环舒张早期运动速度比值预测心力衰竭患者预后价值[J]. 临床误诊误治, 2020, 33(5): 70-75.
 [12] 张如南, 袁慧, 范雪松, 等. 血清免疫球蛋白 E 在心力衰竭患者中的水平及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(7): 778-781.

(收稿日期: 2021-03-12 修回日期: 2021-08-29)

(上接第 3590 页)

[3] 谢波, 徐升强, 崔天益. 狼疮抗凝物实验室规范化检测进展[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(3): 144-146.
 [4] 寿玮龄, 陈倩, 吴卫, 等. 改良蝮蛇毒磷脂时间试验和硅凝固时间试验检测狼疮抗凝物的性能验证[J]. 检验医学, 2017, 32(3): 224-228.
 [5] 赵威. 凝血因子平行稀释试验在筛选凝血因子Ⅷ抑制物中的应用[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(2): 217-218.
 [6] 程航, 冀续峰, 刘海艳, 等. 凝血因子的多点稀释分析(MDA)方法在筛查病理性抗凝物中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(2): 243-247.
 [7] 罗俭权, 陈达勇, 陶珊花, 等. 内源性凝血功能障碍患者血浆纠正试验与狼疮抗凝物质的相关性研究[J]. 医学检验与临床, 2018, 29(1): 49-51.
 [8] 张利铭, 熊涛, 梁艳, 等. 系统性红斑狼疮患者 APTT 明显延长的临床分析[J]. 临床血液学杂志, 2015, 28(4): 612-614.
 [9] 刘加伟, 骆展鹏, 欧阳熊妍, 等. 血浆凝血因子Ⅷ含量检测实验室间比对分析探讨[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(16): 2137-2139.
 [10] 刘长钰, 黄锦维, 龚彩平, 等. 92 例狼疮抗凝物阳性病例的临床分析[J]. 罕见疾病杂志, 2020, 27(2): 70-72.

[11] PENG V, TRIPODI A, REBER G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detectn[J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(10): 1737-1740.
 [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory testing for the lupus anticoagulant; H60-A[S]. Wayne, PA: CLSI, 2014.
 [13] 廖秋燕, 汤冬娥, 赵鑫, 等. 系统性红斑狼疮的诊断新方法 with 临床验证[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(6): 721-727.
 [14] 李洋, 吕明恩, 薛峰. 狼疮抗凝物二例报告并文献复习[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(2): 130-133.
 [15] 郭梦妮, 华宝来, 赵永强, 等. 北京协和医院住院患者凝血筛查试验异常原因的分析[J]. 血栓与止血学, 2016, 22(5): 486-490.
 [16] CLARK C A, DAVIDOVITS J, SPITZER K A, et al. The lupus anticoagulant: results from 2 257 patients attending a high-risk pregnancy clinic[J]. Blood, 2013, 122(3): 341-347.
 [17] 王学峰, 吴竞生, 胡豫, 等. 临床出血与血栓性疾病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

(收稿日期: 2021-03-11 修回日期: 2021-09-01)