

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.10.03

3 种稀释蝰蛇毒磷脂时间试验检测狼疮抗凝物的性能评价

寿玮龄, 陈倩, 范连凯, 张建平, 吴卫 (中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘要:目的 对 3 种稀释蝰蛇毒磷脂时间试验 (dRVVT) 的狼疮抗凝物 (LA) 检测方法进行性能评价, 比较不同系统间检测结果的一致性, 并初步探讨不同检验流程对检测结果的影响。方法 按照美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 文件及临床血液学检测常规项目分析质量文件 (WS/T 406—2012), 对 3 种 LA 检测方法的精密性、携带污染率进行评价, 验证 3 种方法检测 LA 的参考区间 (RI)/cut-off 值, 并分析检验结果一致性和不同检验流程对检测结果的影响。结果 3 种 dRVVT 检测方法重复性以 CV 表示为 0.44%~1.69%; 期间精密性以 CV 表示, 为 1.43%~2.43%。3 种检测方法携带污染率绝对值 < 3.00%。系统 1 和 2 的 RI 验证通过, 系统 3 验证未通过。3 种不同系统筛选试验、确认试验及比值间结果差异有统计学意义 ($P=0.000$)。3 种不同系统阴性判断结果间差异有统计学意义 ($\chi^2=11.333, P=0.000$)。系统 3 以说明书推荐流程分析结果, 与筛选/确认比值 (R) 或标准化比值 (NR) 结果表示方式相比, 53 例阴性结果中 2 例为假阴性。结论 3 种 dRVVT 检测系统性能良好, 适于临床常规使用。但各实验室应验证或建立适合本实验室的 RI/cut-off 值, 确定合理的检测流程, 关注检测分析前中后影响因素, 合理解释检测结果。

关键词: 狼疮抗凝物; 稀释蝰蛇毒磷脂时间试验; 性能验证; 参考区间/cut-off 值

中图分类号: R446

文献标志码: A

Performance evaluation of three diluted Russell viper venom time tests for the detection of lupus anticoagulant

SHOU Weiling, CHEN Qian, FAN Liankai, ZHANG Jianping, WU Wei (Department of Laboratory Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To evaluate the performance of three diluted Russell viper venom time (dRVVT) tests for the detection of lupus anticoagulant (LA), compare the consistency of detection results from different systems, and preliminarily investigate the influence of different test processes on the detection results. **Methods** According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standardizations and analytical quality specifications for routine tests in clinical hematology (WS/T 406—2012), the precision and carry-over contamination rates of three dRVVT tests were evaluated, the reference interval (RI) / cut-off values of three dRVVT tests for the detection of LA were validated, and the consistency of detection results and the influence of different procedures on the detection results were analyzed. **Results** The within-run and between-run coefficients of variation (CV) of three dRVVT tests were 0.44% to 1.69% and 1.43% to 2.43%, respectively. The absolute values of carryover contamination rates of three tests were less than 3.00%. The verification of RI/cut-off values of system 1 and 2 were passed, while that of system 3 was failed. There were statistical differences in the results of screening tests, confirmatory tests and normalized ratios of three systems ($P=0.000$). There were significant differences in the evaluation of positive and negative results for three systems ($\chi^2=11.333, P=0.000$). When the results of system 3 were analyzed with the recommended process of the manual and the results were compared with those expressed by LA-R or LA-NR, 2 out of 53 negative results were false negative. **Conclusion** Three dRVVT detection systems have good performance and are suitable for clinical routine use. However, each laboratory should verify or establish a suitable RI/cut-off value for the laboratory, determine a suitable testing process, pay attention to the influencing factors of the whole process of analysis, and reasonably interpret the detection results.

Key words: lupus anticoagulant; diluted Russell viper venom time test; performance validation; reference interval/cut-off value

狼疮抗凝物 (lupus anticoagulant, LA) 是一组能直接与负电荷磷脂或磷脂蛋白复合物结合的免疫球蛋白, 为抗磷脂抗体 (antiphospholipid antibody, APA) 中的一种^[1]。LA 可见于抗磷脂抗体综合征 (antiphospholipid syndrome, APS)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 及结缔组织病

(connective tissue diseases, CTD) 等多种疾病, 与患者动静脉血栓和病态妊娠风险密切相关^[2]。

现行 LA 的检测方法大多基于 LA 与磷脂结合可延长磷脂依赖的凝血试验时间这一原理, 而活化部分凝血活酶时间 (APTT) 试验和稀释蝰蛇毒磷脂时间 (diluted Russell viper venom time, dRVVT) 试验

作者简介: 寿玮龄, 1985 年生, 女, 主管技师, 硕士, 研究方向为血栓与止血实验室检测。

通信作者: 吴卫, 副主任技师, E-mail: ww_pumch@sina.com。

为指南推荐和文献报道常用的检测方法^[3-5]。本研究根据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 文件和行业标准《临床血液学检测常规项目分析质量要求》(WS/T 406—2012), 评价 3 种不同 dRVVT 检测系统的性能是否满足临床检测需求^[6-8]。目前, 尚未见针对 3 种 dRVVT 试验检测系统结果一致性评价的相关研究报道, 而 3 种检测系统推荐结果表达方式和试验流程亦不相同。本研究在分析不同检测系统间结果一致性的基础上, 探讨不同检验流程对结果的影响。

1 材料与方 法

1.1 标本采集与处理 采集 2019 年 11 月至 12 月北京协和医院门诊、住院患者及体检健康者静脉血 2.7 mL, 与枸橼酸钠 (109 mmol/L) 抗凝剂按比例 9:1 混匀, 1 h 以内以离心力 $2\ 500\times g$ 离心 10 min 获得血浆样品, 4 h 内完成检测。血浆样品均无溶血、凝血、乳糜现象, 血细胞比容 $<55\%$ 。本研究通过北京协和医院伦理学委员会批准 (伦理号: ZS-2598)。

1.2 主要仪器与试剂 系统 1: 试剂 Staclot[®] DRVV SCREEN/CONFIRM (批号 254229/253933)、质控品及 STA-R Evolution[®] 全自动凝血分析仪由法国 Stago 公司提供; 系统 2: 试剂 dRVVT Screen/Confirm (批号: N0889953/N0688573)、质控品及 ACL TOP 700 全自动凝血分析仪由美国 Instrumentation Laboratory (IL) 公司提供; 系统 3: 试剂 LA1 Screening reagent/LA2 Confirmation reagent (批号: 549993A/548866A)、质控品由德国 Siemens 公司提供, CS5100 全自动凝血分析仪由日本 Sysmex 公司提供。

1.3 方 法

1.3.1 重复性 取 3 个不同浓度的血浆样品, 每个血浆样品连续测定 11 次, 弃掉第 1 次结果, 计算后 10 次结果的算术平均值 (\bar{x})、标准差 (s) 和变异系数 (CV)。

1.3.2 期间精密度 根据 CLSI EP5-A2 文件要求, 用同一批号试剂每天测定 2 个不同水平质控品, 连续测定 10 d, 计算 \bar{x} 、 s 和 CV 。

1.3.3 携带污染率 取高值血浆样品 1 份, 连续测定 3 次; 再取低值血浆样品 1 份, 连续测定 3 次。将测定结果记为 H1、H2、H3 和 L1、L2、L3, 计算携带污染率。携带污染率 = $|L1-L3| / (H3-L3) \times 100\%$ 。

1.3.4 参考区间 (RI)/cut-off 值验证 收集 40 例表

观健康人枸橼酸钠抗凝血浆样品, 男 20 例, 年龄 22~60 岁, 女 20 例, 年龄 18~65 岁。分别用 3 种系统检测 LA 水平, 按照试剂说明书要求验证 RI/cut-off 值适用性。判断标准: 40 例验证数据与说明书 RI/cut-off 值比较, 超出 RI/cut-off 值的检测数据个数 $\leq 10\%$ 时, 验证通过。

1.3.5 结果比对 收集 136 例枸橼酸钠抗凝血浆样品, 男 55 例, 女 81 例, 年龄 11~79 岁。其中免疫系统疾病 56 例 (APS 19 例, SLE 24 例, CTD 等其他免疫系统疾病 13 例)、血栓性疾病 12 例, 孕史不良 4 例, 其他 29 例, 健康体检者 35 例。暂以常规检测报告系统结果判定选择血浆样品, 分别覆盖阴性、弱阳性、阳性和强阳性范围。在 2 h 内分别用 3 个不同系统检测 LA 水平, 分析检测结果间一致性。

1.3.6 不同检验流程结果分析 系统 1 和系统 2 说明书推荐同时进行 LA 筛选和确认试验, 以标准化比值 (NR) 表示。系统 3 说明书推荐流程为: (1) LA 筛查试验正常, 提示 LA 阴性; (2) LA 筛查试验延长, 进行 LA 确认试验, 检测结果以筛选/确认比值 (R) 表示。系统 3 分析 136 例血浆样品, 采用说明书推荐流程以 R 为结果报告方式和同时进行筛选、确认试验以 NR 为结果报告方式的 2 种检测流程。

检测 LA 的筛选及确认试验直接用 dRVVT 试验测定的凝固时间 (s) 表示。NR = 筛选比值/确认比值, 筛选比值 = 筛选试验时间 (s) / 筛选试验正常均值 (s), 确认比值 = 确认试验时间 (s) / 确认试验正常均值 (s)。R = 筛选试验时间 (s) / 确认试验时间 (s)。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件和 Excel 2010 对数据进行统计学分析。采用单个样本 K-S 检验判断检测结果是否符合正态分布, 正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 非正态分布数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。采用 Friedman 检验比较 3 种检测系统间差异, 2 组配对样本的比较采用 Wilcoxon 秩和检验, 多组样本间率的比较采用卡方检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度 见表 1、2。3 种系统检测 3 个水平血浆样品 LA 水平, 重复性以 CV 表示, 为 0.44% ~ 1.69%; 期间精密度以 CV 表示, 为 1.43% ~ 2.43%。

表 1 3 种 LA 检测方法的重复性结果

系统	结果表达 方式	水平 1		水平 2		水平 3	
		$\bar{x}\pm s$	CV (%)	$\bar{x}\pm s$	CV (%)	$\bar{x}\pm s$	CV (%)
1	NR	1.02±0.014	1.41	1.44±0.011	0.80	2.32±0.019	0.83
2	NR	1.00±0.006	0.63	1.45±0.013	0.87	2.35±0.016	0.70
3	NR	0.98±0.017	1.69	1.32±0.006	0.44	2.22±0.013	0.60
3	R	1.12±0.019	1.69	1.51±0.007	0.44	2.54±0.015	0.60

表 2 3 种 LA 检测方法的期间精密度结果

系统	结果表达 方式	水平 1		水平 2	
		$\bar{x}\pm s$	CV (%)	$\bar{x}\pm s$	CV (%)
1	NR	1.04±0.025	2.37	1.93±0.047	2.43
2	NR	1.03±0.015	1.49	1.94±0.028	1.43
3	NR	1.01±0.019	1.91	1.72±0.035	2.03
3	R	1.16±0.040	1.91	1.97±0.040	2.03

2.2 携带污染率 3 种 LA 检测方法以 NR 为结果表示方式,携带污染率分别为 1.03%、0.00% 和 0.91%;方法 3 以 R 为结果表示方式,携带污染率为 0.91%,绝对值均小于 3.00%。

2.3 RI/cut-off 值验证 系统 1 和系统 2 按照说明书以 NR 为结果表达方式,40 例表观健康人血浆样品 LA 检测结果分别为 0.89~1.15 和 0.87~1.20,RI/cut-off 值验证通过。系统 3 检测按照说明书以 R 为

结果表示方式,LA 检测结果为 1.02~1.29,其中 7 例超出 1.20,验证不通过;若以 NR 为结果表示方式,LA 检测结果为 0.80~1.13,均在 1.20 以内。

2.4 结果比对 见表 3、4。不同系统间筛选试验、确认试验及比值结果差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),系统 3 的 2 种不同结果表示方法间差异有统计学意义($Z = -10.128, P = 0.000$)。

以指南推荐 $NR \geq 1.20$ 为阳性标准,3 种系统检测 136 例血浆样品的 LA 阳性率分别为 53.7%、65.4%、56.6%(系统 3 以 NR 为结果表示方式)和 71.3%(系统 3 以 R 为结果表示方式),差异有统计学意义($\chi^2 = 11.333, P = 0.010$),其中系统 3 的 R 结果阳性率高于 NR 结果阳性率。

表 3 3 种检测系统检测比对结果($n = 136$)

系统	结果表示方式	筛选试验(s)	确认试验(s)	NR/R
1	NR	47.10(36.00,60.85)	34.98(31.30,36.98)	1.215(1.020,1.543)
2	NR	41.40(32.65,55.13)	27.30(25.90,29.10)	1.335(1.060,1.595)
3	NR	43.10(34.80,62.53)	30.35(28.73,33.20)	1.265(1.020,1.640)
3	R	43.10(34.80,62.53)	30.35(28.73,33.20)	1.415(1.170,1.815)
χ^2		75.087	261.629	148.812
P		0.000	0.000	0.000

表 4 3 种检测系统阴性判断结果($n = 136$) [n (%)]

系统	结果表示方式	阴性	$1.20 \leq NR/R < 1.50$	$1.50 \leq NR/R < 2.0$	$NR/R \geq 2.0$	阳性合计
1	NR	63(46.3)	35(25.7)	27(19.9)	11(8.1)	73(53.7)
2	NR	47(34.6)	42(30.9)	26(19.1)	21(15.4)	89(65.4)
3	NR	59(43.4)	25(18.4)	35(25.7)	16(11.8)	76(56.6)
3	R	39(28.7)	37(27.2)	40(29.4)	20(14.7)	97(71.3)

2.5 不同检验流程结果分析 系统 3 按照说明书流程检测血浆样品 LA 水平,筛选试验正常共 53 例,其中 2 例 NR 结果分别为 1.21 和 1.23,R 结果分别为 1.39 和 1.40,存在假阴性。系统 1 检测上述 2 例血浆样品 LA 水平,NR 结果分别为 1.22 和 1.20,系统 2 检测上述 2 例血浆样品,NR 结果分别为 1.32 和 1.24。

3 讨论

LA 检测可分为以下 3 个流程:(1)筛选试验:磷脂依赖的凝血试验延长,提示可能存在循环抑制

物;(2)1:1 混合试验:证实凝血时间延长不是由凝血因子缺乏导致;(3)确认试验:试剂中含高浓度磷脂,以证实循环抑制物具有磷脂依赖性^[5]。

目前,国际指南均推荐基于凝血过程共同途径的 dRVVT 试验为 LA 首选检测方法之一,Thiagarajan 等^[9]于 1986 年首次报道了该方法。本研究验证 3 种不同系统 dRVVT 法检测性能,各系统重复性以 CV 表示,小于 1.70%,期间精密度以 CV 表示,小于 2.50%,与试剂说明书数据基本一致。WS/T 406—2012 规定准确度验证应使用至少 5 份质评物,但因缺少标准物质,本次验证无 LA 检测的准确度数据。

各指南推荐以健康人群第 97.5 百分位数或第 99 百分位数设置 RI/cut-off 值。对于 LA 检测方法所提及 cut-off 值不同于根据 ROC 曲线所建立的 cut-off 值概念。系统 3 以 R 为结果表达方式时, RI/cut-off 值验证未通过;提示各实验室需根据各实验室仪器及试剂对每一种 LA 检测方法建立或验证各实验室 RI/cut-off 值,包括纠正百分比等计算值^[5,10-11]。

因试剂种类、磷脂构成和浓度、原理的不同,以及终点判断方式的不同等均会影响检测结果^[12-13]。本研究比较不同系统间检测结果一致性并初步探讨不同流程间差异,提示临床对于 LA 结果解释需关注检测系统的差异。系统 3 中, R 结果阳性率(71.3%)高于 NR 结果(56.6%),筛选试验 53 例阴性血浆样品,2 例按照 NR 表示结果分别为 1.21 和 1.23, R 结果分别为 1.39 和 1.40,存在假阴性现象;提示实验室结合临床需求,对所采用检测系统说明书的推荐流程进行验证。

此外,LA 检测对分析前质量控制要求严格^[14]。对于以 NR 报告结果的检测方法,在更换 LA 试剂批号时需重新确定筛选试验和确认试验正常血浆均值。患者进行肝素、华法林及直接口服抗凝药等抗凝剂治疗时可产生假阳性结果^[15-17],3 种试剂中均含有肝素中和成分,可中和 0.8~1.0 IU/mL 普通肝素,从而减少普通肝素对 LA 检测的影响。同时,LA 可在感染、肿瘤和药物治疗患者中一过性出现,只有间隔 12 周且 2 次及以上检测 LA 仍存在,才能诊断抗磷脂抗体综合征^[1]。因此,实验室应与临床医生进行及时有效的沟通,对患者的检测结果做出正确解释。

4 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] Du VX, Kelchtermans H, De Groot PG, *et al.* From antibody to clinical phenotype, the black box of the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms of the antiphospholipid syndrome [J]. *Thromb Res*, 2013, 132(3): 319-326.

[3] Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, *et al.* Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH [J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(4): 809-813.

[4] Keeling D, Mackie I, Moore GW, *et al.* Guidelines on the investiga-

tion and management of antiphospholipid syndrome[J]. *Br J Haematol*, 2012, 157(1): 47-58.

[5] CLSI Document H60-A. Laboratory testing for the lupus anticoagulant; approved guideline[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.

[6] CLSI Document EP5-A2. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.

[7] CLSI Document EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.

[8] 卫生部临床检验标准专业委员会. WS/T406—2012: 临床血液学检验常规项目分析质量要求[S]. 中国标准出版社, 2012.

[9] Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants[J]. *Blood*, 1986, 68(4): 869-874.

[10] Moore GW, Kumano O. Lupus anticoagulant assay cut-offs vary between reagents even when derived from a common set of normal donor plasmas[J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(2): 439-444.

[11] Cohen H, Mackie IJ, Devreese KMJ, *et al.* Clinical and laboratory practice for lupus anticoagulant testing: An International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee survey[J]. *J Thromb Haemost*, 2019, 17(10): 1715-1732.

[12] Bai B, Christie DJ, Gorman RT, *et al.* Comparison of optical and mechanical clot detection for routine coagulation testing in a large volume clinical laboratory[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2008, 19(6): 569-576.

[13] Lawrie AS, Mackie IJ, Purdy G, *et al.* The sensitivity and specificity of commercial reagents for the detection of lupus anticoagulant show marked differences in performance between photo-optical and mechanical coagulometers [J]. *Thromb Haemost*, 1999, 81(5): 758-762.

[14] 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(2): 144-146.

[15] Favaloro EJ, Mohammed S, Curnow J, *et al.* Laboratory testing for lupus anticoagulant (LA) in patients taking direct oral anticoagulants (DOACs): potential for false positives and false negatives[J]. *Pathology*, 2019, 51(3): 292-300.

[16] Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A, *et al.* Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants[J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(2): 173-178.

[17] Favaloro EJ. The Russell viper venom time (RVVT) test for investigation of lupus anticoagulant (LA) [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(11): 1290-1296.

(收稿日期: 2019-12-31)

(本文编辑: 王海燕)