

狼疮抗凝物检测的性能验证及大连地区参考区间建立

靳 岩,袁晓阳[△]

(大连医科大学附属第一医院检验科,辽宁大连 116011)

摘要:目的 对用稀释蝰蛇毒时间(DRVVT)检测狼疮抗凝物(LA)方法进行性能验证,并建立此方法在大连地区的参考区间,为临床实验室检测 LA 提供参考依据。**方法** 按 ISO15189 文件要求对 DRVVT 法检测 LA 日内精密度、日间精密度、准确性、携带污染率、试剂更换批号比对在 CS-5100 血凝仪上进行性能验证,并按美国临床和实验室标准协会(CLSI)EP28 文件要求对 138 例表观正常体检健康者用 DRVVT 法进行 LA 检测,建立参考区间。**结果** LA 检测筛选、确证时间、LA 比值日内精密度、日间精密度、携带污染率、准确性、试剂更换批号比对均符合 ISO15189 相关文件要求。筛选、确证试验、LA 比值参考区间分别为 29.3~40.3 s、28.7~34.7 s、0.96~1.22,与试剂说明书有差异(31.0~44.0 s、30.0~38.0 s、0.80~1.20)。LA 比值临界值(1.22)高于试剂说明书(1.20)。**结论** DRVVT 法检测 LA 性能验证符合 ISO15189 文件要求,可以用于临床。但大连地区参考区间与说明书有差异,各地应建立自己的参考区间。

关键词:狼疮抗凝物; 性能验证; 参考区间建立

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.003

中图法分类号:R446

文章编号:1673-4130(2019)05-0522-03

文献标识码:A

Performance validation and reference interval establishment of lupus anticoagulant assay in Dalian people

JIN Yan, YUAN Xiaoyang[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China)

Abstract: Objective To validate performance and establish reference interval (RI) of lupus anticoagulant (LA) assay by diluted russell viper venom time (DRVVT) in Dalian people, and to provide a reference of LA determination for clinical laboratory. **Methods** According to ISO15189, intra- and inter-day precision, accuracy, carryover rates and comparison between different batch number reagents of DRVVT were evaluated using CS-5100 coagulation analyzer. According to CLSI EP28 documents, LA was detected in 138 cases of healthy physical examinees and RI was established. **Results** LA screen and confirm test time, LA ratio, intra- and inter-day precision, carryover rates, accuracy and comparison between different batch number reagents met requirements of ISO15189. RI of screen and confirm test time, LA ratio were 29.3–40.3 s, 28.7–34.7 s and 0.96–1.22. They were different from those of reagent instructions that were 31.0–44.0 s, 30.0–38.0 s and 0.80–1.20. Cut-off value was 1.22, higher than 1.20 from reagent instructions. **Conclusion** Performance validation of LA detection by DRVVT meets requirements of ISO15189. This method is suitable for clinical detection. However, RI of Dalian people is different from that of reagent instructions, and each region should establish its own reference intervals.

Key words: lupus anticoagulant; performance validation; reference interval establishment

狼疮抗凝物(LA)是抗磷脂抗体家族成员之一,是病理性循环抗凝物^[1]。在疑似抗磷脂综合征或不明原因活化部分凝血活酶时间延长时可检测 LA,近几年极受临床医生关注。稀释蝰蛇毒时间(DRVVT)法是 LA 最佳检测方法^[2],但此方法的性能验证和参考区间建立国内鲜有报道,本文对 DRVVT 法检测 LA 做性能评估,并建立大连地区参考区间,为开展或计划开展此项目的实验室提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次实验采用的样本均为 2018 年 6—8 月在大连医科大学附属第一医院体检的体检健康者和就诊的科室患者。1:9 枸橼酸钠抗凝(3.2%)静脉血样本 3 000 r/min 离心 10 min,2 次,样本采集后 2 h 内完成上机检测。

1.2 仪器与试剂 用于 LA 检测的 CS-5100 全自动血凝仪由日本希森美康公司提供,DRVVT 筛选、确

作者简介:靳岩,女,副主任技师,主要从事血栓与止血方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: sunday999_1999@163.com。

本文引用格式:靳岩,袁晓阳.狼疮抗凝物检测的性能验证及大连地区参考区间建立[J].国际检验医学杂志,2019,40(5):522-524.

证试剂及质控品均为原厂配套试剂,由西门子公司提供。

1.3 性能验证

1.3.1 精密度 日内精密度:根据 ISO15189 评审文件制定过程中参考的其中一项文件,即美国临床和实验室标准协会(CLSI)EP15 文件^[3],要求取健康人混合样本和高值混合样本,每个样本连续测 20 次,计算标准差(SD)和变异系数(CV%),与文件要求比较。日间精密度正常水平:取同一批号正常水平质控品,用同一批号试剂每天测定一次,连续测定 20 d,计算 SD 和 CV%;异常水平:取异常混合样本分装 EP 管,−40℃冰冻保存,使用前 37℃速溶,用同一批号试剂每天测定一次,连续测定 20 d,计算 SD 和 CV%,与文件要求比较。

1.3.2 准确性 取正常水平质控品检测 LA1、LA2 并计算比值,连续测定 3 次,计算均值,与说明书给定靶值比较,偏差=(测定均值−质控品定值)/质控品定值×%,与文件要求比较。

1.3.3 携带污染率 异常样本对正常样本污染:取 LA 比值正常水平样本(N)放样本架 1 号和 3 号位置,异常水平样本(A)放 2 号位置。每个样本分别测 3 次,结果为 N1、N2、N3、A1、A2、A3、N4、N5、N6,携带污染率 $K1 = [N4 - \text{Mean}(N1, N2, N3)] / \text{Mean}(N1, N2, N3)$ 。正常样本对异常样本污染:取 LA 比值异常水平样本(A)放在样本架 1 号和 3 号位置,正常水平样本(N)放在 2 号位置,每个样本分别测 3 次,结果为 A1、A2、A3、N1、N2、N3、A4、A5、A6,携带污染率 $K2 = [A4 - \text{Mean}(A1, A2, A3)] / \text{Mean}(A1, A2, A3)$, $K \leq 10\%$ 为合格。

1.3.4 试剂更换批号比对 取 LA 比值正常样本 3 例,异常样本 2 例,分别用新旧两个批号检测 LA 比值,计算偏差,偏差=(新批号测定值−旧批号测定值)/旧批号测定值×%,与文件要求比较。

1.4 参考区间建立 根据 CLSI EP28 文件^[4],收集 138 例体检健康者抗凝血,年龄 18~70 岁,男女比例为 1:1。通过问卷调查、化验结果、体检报告,结果表现正常,检测 LA 筛选、确证试验,LA 比值,用单个样本 K-S 检验判断检验结果符合正态分布, $\bar{x} \pm 2SD$ 表示 95%数据分布范围。并与说明书参考区间比较。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件和 Excel 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 日内及日间精密度 CV%远远小于试剂说明书给定标准(正常值样本 CV%≤5.00%,异常样本 CV%≤10.00%),也在实验室 ISO15189 文件允许范围内。结果见表 1。

2.2 准确性验证 准确性验证用定值质控品验证,与 1/2CIA'88 室间质评要求比较合格。结果见表 2。

2.3 携带污染率 携带污染率验证合格。远远低于

实验室 ISO15189 文件要求。结果见表 3。

表 1 DRVVT 精密度验证表

项目	正常水平				异常水平			
	$\bar{x}$	S	CV%	判断标准 CV%	$\bar{x}$	S	CV%	判断标准 CV%
日内								
LA1	34.60	0.14	0.39	≤2.00	43.50	0.18	0.41	≤2.00
LA2	31.80	0.05	0.16	≤2.00	33.60	0.07	0.20	≤2.000
LA1/LA2	1.09	0.01	0.42	≤2.00	1.29	0.01	0.51	≤2.00
日间								
LA1	39.10	1.81	4.62	≤5.00	45.20	2.01	4.44	≤5.00
LA2	35.60	1.58	4.43	≤5.00	34.00	1.43	4.21	≤5.00
LA1/LA2	1.11	0.05	4.67	≤5.00	1.33	0.06	4.70	≤5.00

表 2 DRVVT 准确性验证表(正常水平)

项目	均值	靶值	偏差(%)	允许偏差(%)
LA1(s)	41.30	39.20	5.30	≤7.5
LA2(s)	37.30	36.00	3.60	≤7.5
LA1/LA2	1.11 0	1.09	1.80	≤7.5

表 3 DRVVT 携带污染率验证表

项目	携带污染率(%)	判断标准(%)
正常样本对异常样本	0	≤10.00
异常样本对正常样本	−0.92	≤10.00

2.4 试剂更换批号比对 5 个样本偏差均小于 1/2CIA'88 室间质评要求,符合 ISO15189 文件标准。结果见表 4。

表 4 DRVVT 试剂更换批号比对验证表(比值)

LA1/LA2	新批号	旧批号	偏差(%)	允许偏差(%)
1	1.10	1.09	0.92	≤7.50
2	1.18	1.14	3.51	≤7.50
3	1.09	1.07	1.87	≤7.50
4	1.33	1.29	3.10	≤7.50
5	1.28	1.26	1.59	≤7.50

2.5 参考区间建立 本实验参考区间与试剂说明书有差异,LA 比值临界值(1.22)高于试剂说明书(1.20),充分证明了自建参考区间的重要性。结果见表 5。

表 5 DRVVT 参考区间建立($\bar{x} \pm 2SD$)

项目	健康体检者	参考区间	试剂说明书	参考区间
LA1(s)	34.70±5.40	29.30~40.30	37.50±6.50	31.00~44.00
LA2(s)	31.70±3.00	28.70~34.70	34.00±4.00	30.00~38.00
LA1/LA2	1.09±0.13	0.96~1.22	1.00±0.20	0.80~1.20

3 讨论

LA 持续存在常见于抗磷脂抗体综合征、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病,与患者动静脉栓塞、病态妊娠风险密切相关^[5]。有报道在妊娠晚期联合应

用 LA 和其他凝血指标,可进一步提高对血栓形成事件风险评估的准确率^[6],且自身免疫性疾病 LA 阳性患者血栓形成概率明显高于阴性组^[7],检测 LA 不仅可以预防血栓发生,还可以预测治疗后血栓好转情况^[8],对临床各科的疾病诊断有很大意义。最新指南指出,一个 LA 检测完整实验项目至少包括筛查和确证试验,结果以 LA1 与 LA2 比值方式报告。西门子公司提供两个完整的检测项目,LA1 筛选试验,LA2 确证试验,满足国际血栓与止血学会委员会发布的针对 LA 检测标准。自 2003 年《医学实验室质量和管理》要求(ISO15189:2003)发布以来,国内有 100 多家医学实验室通过认可^[9],本实验室在 2013 年就通过了评审。按 ISO15189 医学实验室认可:2007 要求^[10],实验室新开展项目要进行性能验证,目前血栓与止血特殊项目性能验证没有标准,本实验按凝血普通项目标准来验证,日内精密度、正常和异常样本 CV%均 $\leq 2.00\%$,日间精密度、正常水平为西门子厂家质控品, CV% $\leq 5.00\%$,由于该厂家没有异常水平质控品,异常水平日间精密度采用异常混合样本代替, CV% $\leq 5.00\%$ 。准确性与定值质控值相比偏差 $\leq 7.50\%$ 。携带污染率验证,LA 比值正常样本对异常样本污染为 0,异常样本对正常样本污染仅为 -0.92,远远小于 ISO15189 文件规定 $\leq 10.00\%$ 标准,试剂更换批号比对偏差均 $\leq 7.50\%$ 。所做性能验证都能符合 ISO15189 要求,说明 DRVVT 试验可以适用于临床,但因为 DRVVT 试验原卫生部没有开展室内质评,没有做正确度验证,有待进一步完善验证。

参考区间是解释检验结果,分析检验信息的一个尺度和依据,本次试验建立的参考区间与试剂说明书有差异,LA 比值临界值也不同,分析原因为试剂说明书参考区间用手工倾斜管测定与自动化仪器有差异,还有差异的原因是由于此试剂为进口试剂,实验人群为白种人,不同地区人群在遗传学、生活环境和饮食习惯上都存在差异。国内寿玮龄等^[11]研究 DRVVT 试验临界值为 1.24,高于本实验室研究,分析原因为她采用 $\bar{x} \pm 3SD$,以健康人群 99 百分位数计算,本实验依据文献^[12]以及抗磷脂抗体专家小组第 14 界国际共识以 $\bar{x} \pm 2SD$ 表示参考区间,更适用于临床^[13]。值得注意的是,实验前样本如需冷冻,必须进行再次离心,去除血小板(低于 $10 \times 10^9/L$),否则会使 LA1 筛选试验时间缩短^[14]。还要认识到肝素、维生素 K 拮抗剂等抗凝药物可影响 LA 检测^[15],感染、肿瘤和药物均可导致 LA 一过性存在,阳性患者应在 12 周后复检。

4 结 论

使用 DRVVT 检测 LA 有良好性能,可以用此方法检测狼疮抗凝物的存在,但说明书给定的参考区间有待于验证,必要时建立实验室自己的参考区间,使

检验结果更精准,更好地为患者服务。

参考文献

- [1] 李洋,吕明思,薛峰,等.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.
- [2] 寿玮龄,陈倩,吴卫,等.不同狼疮抗凝物检测试验的临床诊断效能研究[J].中华医学杂志,2015,95(34):2760-2765.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias; approved guideline-third edition: EP15-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, third edition: EP28-A3 [S]. Gary L. Horowitz, MD, Chairholder, et al, USA: CLSI, 2010.
- [5] FANGTHAM M, PETRI M. Update: hopkines lupus cohort[J]. Curr Rheumatol Rep, 2013, 15(a):360
- [6] 孔万仲,王怡,郭跃丽,等.妊娠晚期孕妇狼疮抗凝物检测血栓形成性疾病发生的临床意义[J].中国现代医生, 2017,55(12):144-146.
- [7] 罗国忠,贺海文,林晓春,等.自身免疫性疾病患者伴狼疮抗凝物阳性的实验室指标与临床特点[J].血栓与止血学,2015,21(6):355-357.
- [8] 陈新光,赵永强.磷脂抗体综合征狼疮抗凝物和血栓临床相关性分析[J].哈尔滨医科大学学报,2013,47(4):370-373.
- [9] 王贞,马晓露,曹盛吉,等.临床血液学与体液学实验室申请医学实验室认可的方法研究[J].重庆医学,2015,44(1):132-133.
- [10] 中国合格评定国家认可委员会.医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189:2007):CNAS-CL02[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [11] 寿玮龄,陈倩,吴卫,等.改良蝰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.
- [12] 曾洁,陈文祥,申子瑜.参考区间研究现状概述[J].中华检验医学杂志,2010,33(6):570-573.
- [13] BERTOLACCINI M L, AMENGUAL O, ANDREOLI L, et al. 14th international congress on antiphospholipid antibodies task force. report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends[J]. Autoimmun Rev, 2014,13(9):917-930.
- [14] 谢波,徐升强,崔天盆.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] 唐宁,孙自镛.三例出血患者的狼疮抗凝物检测阳性原因分析[J/CD].中华临床实验室管理电子杂志,2014,2(2):62-63.