

凝血相关检测常见干扰因素分析与探讨

颜楠¹ 刁艳君¹ 韩峰¹ 刘家云¹

[摘要] 目的:探讨当 D-二聚体(D-D)检测出现假阴性与假阳性结果,且内源性凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ活性出现假性减低时,是否需要用稀释法排除干扰。**方法:**选取医院 2020 年 10 月—2021 年 10 月门诊与住院病例 155 例,将其分为 3 组。其中 D-D 假阴性组样本 100 例;收集 D-D>5 mg/L,纤维蛋白(原)降解产物(FDP)>20 μg/mL;D-D 假阳性组 50 例;狼疮抗凝物(LAC)阳性组 5 例,且内源性凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ活性测定假性减低。将各组相关指标分别进行各梯度稀释检测。**结果:**D-D 假阴性组:D-D 稀释检测前后结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$);D-D 假阳性组:D-D 稀释检测前后结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$);LAC 阳性组:将 5 例 LAC 阳性患者的凝血因子活性进行不同稀释度检测,发现随着稀释倍数的增加,内源性Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ活性随之升高明显且最终会恢复至大概正常的水平。**结论:**当 D-D 出现假阴性时,可用稀释法使其暴露更多的抗原表位,以确保高浓度 D-D 结果检测的准确性;当 D-D 出现假阳性时,可通过稀释法降低干扰物质的浓度来获得更加准确的结果;LAC 可对内源性凝血因子活性检测造成干扰,稀释法可得到更加准确的凝血因子活性。

[关键词] 稀释法;D-二聚体;假阴性;假阳性;LAC 阳性;凝血因子活性

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2023.10.001

[中图分类号] R446.11 **[文献标志码]** A

Analysis and discussion of common interfering factors in coagulation related test

YAN Nan DIAO Yanjun HAN Feng LIU Jiayun

(Department of Clinical Laboratory, Air Force Military Medical University Affiliated Hospital of Xiking, Xi'an, 710032, China)

Corresponding author: LIU Jiayun, E-mail: jiajun@fmmu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate whether dilution method should be used to eliminate interference when false negative or false positive results of D-D assay and false decrease of the activity of endogenous coagulation factors(F) Ⅷ, Ⅸ, Ⅺ and Ⅻ occurred. **Methods:** The outpatient and inpatient cases from October 2020 to October 2021 were selected and divided into three groups. D-D>5 mg/L, fibrin degradation product(FDP)>20 μg/mL, 100 cases of D-D false negative group; 50 cases of D-D false positive group were collected. There were 5 patients with reduced pseudocoagulants with positive Lupus anticoagulants(LAC) and activity of endogenous coagulation factors(F) Ⅷ, Ⅸ, Ⅺ and Ⅻ. The results were detected by gradient dilution. **Results:** D-D false negative group: The results were compared before and after D-D dilution test, and the difference was statistically significant($P<0.05$); D-D false positive group: The results were compared before and after D-D dilution test, and the difference was statistically significant($P<0.05$); Pseudodecreased endogenous coagulation factor activity group: The activity of coagulation factors in 5 LAC positive patients was detected by different dilutions, and it was found that with the increase of dilutions, the activity of endogenous coagulation factors Ⅷ, Ⅸ, Ⅺ and Ⅻ increased significantly and eventually recovered to about normal levels. **Conclusion:** When D-D was false negative, more epitopes of D-D could be exposed by dilution method to ensure the accuracy of detection of high concentration D-D. When D-D was false positive, the concentration of interfering substances could be reduced by dilution method to obtain more accurate results. LAC might interfere with the determination of endogenous clotting factor activity. Dilution method could obtain more accurate detection level of clotting factor activity.

Key words dilution method; D-D; false negative; false positive; lupus anticoagulants; coagulation factor activity

D-二聚体(D-D)是交联纤维蛋白凝块(血栓)在纤溶酶作用下生成的产物,其水平可反映体内凝

血和纤溶过程的变化^[1],是确定机体高凝状态及继发性纤溶亢进的指标^[2]。据报道,D-D 诊断静脉血栓栓塞症(venous thromboembolism, VTE)的敏感度为 86.6%~98.0%,特异度为 54.6%~

¹空军军医大学附属西京医院检验科(西安,710032)

通信作者:刘家云,E-mail:jiajun@fmmu.edu.cn

58.6%^[3]。目前临床上,D-D测定在VTE的诊断、评估心房颤动患者脑卒中的发生风险、预测心搏骤停患者的预后、判断恶性肿瘤患者的病情进展等方面都具有重要价值^[4]。但此方法也有一定的局限性,有时会出现假阴性与假阳性^[5]结果。狼疮抗凝物(lupus anticoagulants, LAC)是一种体外现象,导致磷脂(PL)依赖的凝血时间延长。其作用机制涉及自身抗体及其靶蛋白与PL的结合,从而限制凝血酶原复合体的结合^[6]。因LAC存在异质性,活化部分凝血活酶时间(APTT)试剂磷脂的不同组成导致了不同的敏感性,并对APTT值有显著的影响^[7-8]。所以有部分LAC阳性患者会出现APTT升高,使检测结果受到严重影响。同时也会使依赖APTT试剂检测的凝血因子活性的测定受到干扰,使其出现假性减低的情况。以上几种情况均易为临床诊断造成误判,给临床医生与检验工作者带来极大的困扰。而稀释法是一种简单易行减少干扰的方法。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择医院2020年10月—2021年10月门诊与住院的155例病例,将其分为3组。其中D-D>5 mg/L,纤维蛋白(原)降解产物(FDP)>20 μg/mL的D-D假阴性组100例,男56例,女44例,年龄36~67岁,平均(43.84±12.08)岁;D-D假阳性组50例,男27例,女23例,年龄26~59岁,平均(44.39±9.87)岁;LAC阳性组且内源性凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ活性测定假性减低患者5例,男1例,女4例,年龄16~49岁,平均(32.00±11.70)岁。

1.2 仪器与试剂

仪器为SysmexCS5100全自动凝血分析仪。除FDP试剂为日本积水医疗株式会社公司试剂外,其他检测试剂均为SIEMENS试剂。

1.3 方法

清晨空腹抽取1:9枸橼酸钠抗凝血。1500×g离心15 min后分离血浆。

D-D假阴性组:收集范围在D-D>5 mg/L, FDP>20 μg/mL的样本100例,分别做D-D与FDP的1/8与1/16稀释检测。将其稀释前后结果进行比较并计算回收率。

D-D假阳性组:收集D-D检测假阳性病例50例,分别做D-D与FDP的1/8与1/16稀释检测。将其稀释前后结果进行比较并计算回收率。

LAC阳性组:稀释蝰蛇毒试验可用来确诊LAC^[9],包括筛选(LA1)和确证试验(LA2),计算LA比值(LA比值=LA1比值/LA2比值),LA比值>1.2为阳性。收集我院5例LAC阳性患者(A、B、C、D、E)标本,并分别检测其(F)Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ八种凝血因子的活性。将5例标本分别按(1:1, 1:2ⁿ, n=1,2,3,4,5)的稀释度对其进行稀释并绘制曲线。

1.4 统计学方法

采用SPSS 21.0对数据进行分析。计量资料用 $\bar{X} \pm S$ 表示,以P<0.05为差异有统计学意义;采用回收率(检测值/理论值×100%)作为判断标准;应用GraphPad Prism 8软件绘图。

2 结果

2.1 D-D假阴性组与FDP稀释前后结果比较

100份样本分别做D-D与FDP的1/8与1/16稀释检测。将D-D稀释前后结果进行比较,差异有统计学意义(P<0.05),且回收率均不在(100±10)%范围内;FDP稀释前后结果比较,差异无统计学意义(P>0.05),且回收率均在(100±10)%范围内。见表1。

2.2 D-D假阳性组与FDP稀释前后结果比较

将50份样本,分别对D-D与FDP做1/8与1/16稀释检测,并将D-D稀释前后结果进行比较,差异有统计学意义(P<0.05),且回收率均不在(100±10)%范围内。FDP稀释前后结果比较,差异无统计学意义(P>0.05),且回收率均在(100±10)%范围内。见表2。

表1 D-D假阴性组与FDP稀释前后结果比较

$\bar{X} \pm S$

| 检测指标 | 稀释前结果 | 1/8 稀释 | | 1/16 稀释 | |
|----------------|------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | | 稀释后结果 | 回收率/% | 稀释后结果 | 回收率/% |
| D-D/(mg/L FEU) | 10.70±2.78 | 20.19±4.65 ¹⁾ | 174.99±12.56 | 20.56±5.05 ¹⁾ | 179.62±11.07 |
| FDP/(μg/mL) | 29.12±4.75 | 31.56±2.05 | 92.27±2.02 | 32.02±0.38 | 90.94±0.89 |

与稀释前比较,¹⁾P<0.05。

表2 D-D假阳性组与FDP稀释前后结果比较

$\bar{X} \pm S$

| 检测指标 | 稀释前结果 | 1/8 稀释 | | 1/16 稀释 | |
|----------------|-----------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | | 稀释后结果 | 回收率/% | 稀释后结果 | 回收率/% |
| D-D/(mg/L FEU) | 3.65±1.82 | 1.10±0.32 ¹⁾ | 38.66±4.34 | 0.44±0.06 ¹⁾ | 12.16±5.58 |
| FDP/(μg/mL) | 1.91±0.55 | 2.03±0.44 | 100.93±6.61 | 2.10±0.38 | 102.44±5.74 |

与稀释前比较,¹⁾P<0.05。

2.3 LAC 阳性组与各凝血因子活性原倍检测结果

列举 5 例患者(A、B、C、D、E)标本的 LAC 阳性检测结果与(F)Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ八种凝血因子活性的原倍检测结果,见表 3。将 5 例标本分别按不同稀释倍数(1 : 1、1 : 2ⁿ, n = 1, 2, 3, 4, 5)对其活性分别进行稀释检测并绘制曲线。实验结果为随着稀释倍数的升高,内源性 4 个因子活性显著增加,且最终可恢复到接近正常的水平,见图 1。

表 3 5 例患者 LAC 结果与各凝血因子活性原倍检测结果

| 检测指标 | 病例 A | 病例 B | 病例 C | 病例 D | 病例 E |
|------|------|-------|-------|-------|-------|
| LAC | 3.18 | 2.97 | 2.94 | 2.90 | 1.88 |
| FⅡ | 22.6 | 62.7 | 30.3 | 29.4 | 48.0 |
| FⅤ | 96.9 | 89.5 | 104.8 | 106.9 | 101.9 |
| FⅦ | 56.0 | 85.0 | 81.0 | 70.9 | 67.9 |
| FⅩ | 68.0 | 75.0 | 62.0 | 60.0 | 70.8 |
| FⅧ | 17.5 | 100.7 | 61.4 | 71.4 | 34.9 |
| FⅨ | 6.2 | 10.6 | 35.8 | 41.8 | 7.1 |
| FⅪ | 5.4 | 36.7 | 30.2 | 33.2 | 31.6 |
| FⅫ | 4.8 | 33.9 | 22.6 | 29.6 | 29.1 |

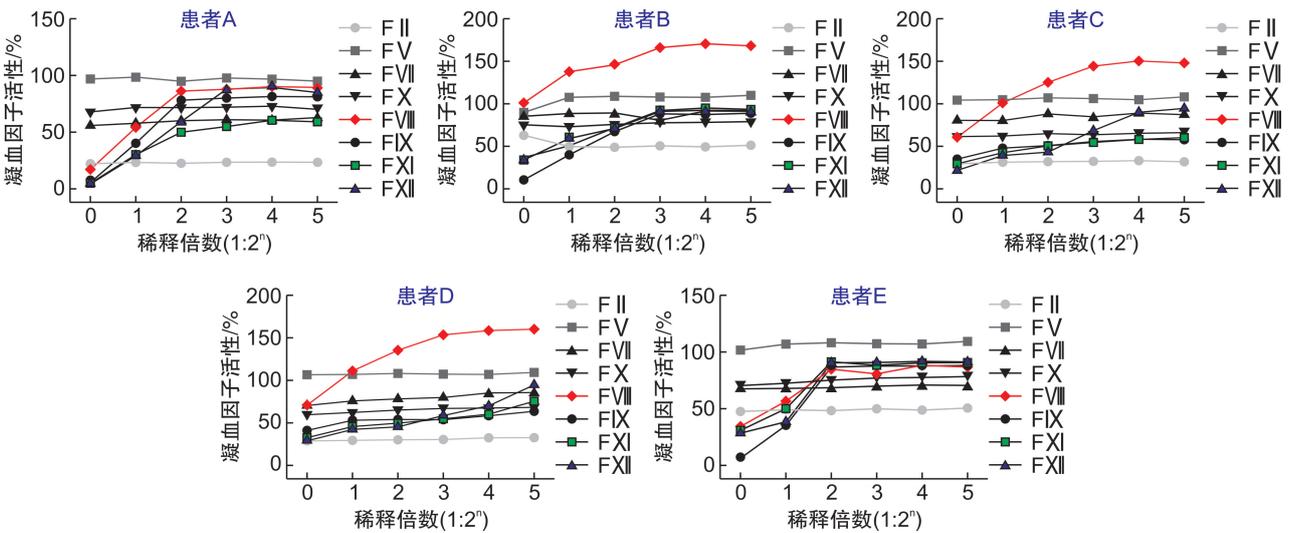


图 1 5 例患者(A、B、C、D、E)各凝血因子活性在不同稀释度 1 : 1、1 : 2ⁿ (n = 1, 2, 3, 4, 5) 下的变化曲线

3 讨论

本研究检测 D-D 的方法是基于抗原抗体反应的免疫比浊法^[10]。在检测过程中,抗原抗体是按一定比例进行反应,如果标本中 D-D 浓度过高易出现带现象^[11]。本文通过验证范围在 D-D > 5 mg/L, FDP > 20 μg/mL 的样本 100 份,分别做 D-D 与 FDP 的 1/8 与 1/16 稀释检测并计算回收率后,测得 D-D 的回收率均不在(100 ± 10)% 范围内,表明经本文验证当 D-D > 5 mg/L, FDP > 20 μg/mL 时,即患者血浆中存在的含 D-D 片段复合物的浓度就越高,易出现假阴性结果。需要对 D-D 进行稀释检测,使其暴露更多的抗原表位与试剂中的单克隆抗体结合,稀释后的结果即为真实的 D-D 水平,以保证了结果的准确性,并建议根据 FDP 浓度选择稀释倍数进行检测。

FDP 是纤溶酶作用下产生的各种降解产物的总称,包括 D-D 和其他片段,理论上 D-D 水平与 FDP 水平应呈一定的正相关关系^[12],即 FDP 水平应 > D-D 水平。但在检测中有时也会出现 D-D 与 FDP 结果的倒置现象,本文通过验证 50 份 D-D 假阳性(D-D 水平 > FDP 水平)样本,分别对 D-D 与 FDP 做 1/8 与 1/16 稀释检测并计算回收率后,测

得 D-D 的回收率均不在(100 ± 10)% 范围内。D-D 水平经过稀释后浓度均有所减低,且稀释倍数越大减低越多,经过稀释后 FDP 水平 > D-D 水平,均恢复正常比例,即明确提示 D-D 的检测存在干扰。这种个体差异的干扰因素可能是由于患者体内的异嗜性抗体^[13]、类风湿因子、补体、激素、氨基酸及其他蛋白质等造成的干扰误差。针对这些干扰因素可以通过稀释法、使用异嗜性抗体阻滞剂、阻断试剂盒等方法来消除一定的干扰^[14]。而当干扰物质的浓度较低时,稀释法则是一种简单易行减少干扰的方法。本研究对 FDP 与 D-D 出现倒置的 50 例样本进行稀释,通过降低干扰物质浓度的方法使部分 D-D 结果得以纠正,确保假阳性 D-D 标本检测的准确性。因此在检验过程中,对于此种情况必须尽可能地稀释标本降低干扰物质的滴度,将其干扰因素降到最低^[15]。

LAC 试剂包括 LA1 和 LA2。LA2 试剂与 LA1 试剂基本相同,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 = LA1 比值/LA2 比值),LA 比值 > 1.2 为阳性^[16]。本研究通过收集我院 5 例 LAC 阳性的患者标本进行比较,发现当内源性凝

血因子活性同时减低且 LAC 阳性时,需对凝血因子活性做不同稀释度 1 : 1、1 : 2ⁿ (n = 1, 2, 3, 4, 5) 检测,稀释后如果内源性凝血因子活性随稀释倍数增加而显著升高至接近正常活性水平,提示可能存在干扰。这是由于 LAC 阳性患者中的 LAC 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、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ因子等与磷脂微粒的结合,从而导致内源性凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ的活性假性减低。标本经稀释后,LAC 浓度显著降低,从而减少了因子检测的干扰。凝血因子检测方法为凝固法^[17],可用于诊断凝血系统相关疾病、评估手术风险,还可以通过监测血浆中凝血因子水平来评估基因治疗后血友病患者的基因表达情况^[18]。检测对标准血浆进行不同倍数的稀释检测,通过标准曲线求出各凝血因子活性。当 LAC 阳性时,需要通过 APTT 测得的内源性凝血因子的活性也同样会受到干扰。LAC 阳性的自身免疫性疾病以系统性红斑狼疮^[19]和抗磷脂综合征多见,其中系统性红斑狼疮是抗磷脂综合征的诊断标准之一^[20],且 LA 阳性患者被认为有较高的血栓风险^[21]。

检验工作者需要与临床保持紧密沟通,将实验室检测可能存在的干扰因素、方法学局限性等情况告知临床,避免错误理解和使用检验结果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 虞亚菲,张海平,居来提·艾尼瓦尔,等. 血栓弹力图联合 D-二聚体在肺部手术后下肢深静脉血栓形成的预测价值[J]. 中国血管外科杂志(电子版),2021,13(1):38-41.

[2] 杨柳,梁晶晶,董春霞,等. 急性早幼粒细胞白血病患者合并弥散性血管内凝血的影响因素及列线图模型构建[J]. 临床血液学杂志,2023,36(1):21-26,32.

[3] 张鸿艳,任静,杨晴,等. D-二聚体 2 种检测方法的参考值建立和排除静脉血栓栓塞症临界值设定[J]. 临床检验杂志,2020,38(6):473-477.

[4] 雷孝波,王秀杰. D-二聚体检测及其临床应用进展[J]. 医学综述,2020,26(22):4521-4527.

[5] 白著晓,刘慧敏,姜宏兵,等. Innovance 测定血浆 D-二聚体的分析性能评价[J]. 检验医学与临床,2015,12(9):1211-1214,1217.

[6] Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A, et al. Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagu-

lants[J]. Autoimmun Rev,2017,16(2):173-178.

[7] Lippi G, Favaloro EJ. Activated partial thromboplastin time:new tricks for an old dogma[J]. Semin Thromb Hemost,2008,34(7):604-611.

[8] Pouplard C, Trossaert M, Le querrec A, et al. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B[J]. Haemophilia,2009,15(1):365-368.

[9] 杨仁池. 凝血因子Ⅷ/Ⅸ抑制物诊断与治疗中国指南(2018年版)解读[J]. 临床血液学杂志,2019,32(1):6-8,12.

[10] 许强,王锡鸣,于东泽,等. 30 例 D-二聚体假性增高的数据分析[J]. 标记免疫分析与临床,2020,27(1):1-5.

[11] 王兰兰. 临床免疫学检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2017:15.

[12] Nagaoka K, Sadamatsu K, Yamawaki T, et al. Fibrinogen/fibrin degradation products in acute aortic dissection[J]. Intern Med Tokyo Jpn, 2010, 49(18):1943-1947.

[13] 杨益锋,曾丹,李娟,等. 两例 D-二聚体假性降低案例分析[J]. 检验医学与临床,2020,17(18):2747-2749.

[14] 蒋利君,黎宇,戴盛明. 异嗜性抗体对免疫测定干扰的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,2(1):68-72.

[15] 王清华. 临床免疫检验质量控制的相关性措施对检验结果的可靠性和准确性的影响研究[J]. 中国医学创新,2015,12(22):108-110.

[16] 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]. 罕少疾病杂志,2020,27(2):70-72.

[17] 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.

[18] 张磊,代新岳. 血友病基因治疗临床研究进展[J]. 临床血液学杂志,2022,35(7):464-468.

[19] Buyon JP, Kim MY, Guerra MM, et al. Predictors of Pregnancy Outcomes in Patients With Lupus[J]. Ann Intern Med,2015,163(3):153-163.

[20] Pengo V, Denas G. Diagnostics and treatment of thrombotic antiphospholipid syndrome (APS): a personal perspective[J]. Thromb Res,2018,169:35-40.

[21] 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.

(收稿日期:2023-03-01)