

• 短篇论著 •

APTT 纠正试验检测方法的建立及临床应用*

王 贤, 夏 茂, 夏永泉, 沈 瀚[△]

南京大学医学院附属南京鼓楼医院检验科, 江苏南京 210007

摘 要:目的 建立活化部分凝血活酶时间(APTT)纠正试验的检测方法和解释规则, 分析其在临床 APTT 延长患者中的应用价值。方法 选取该院 APTT 延长, 凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fg)正常的患者, 根据患者确诊情况, 将其分为单纯因子缺乏组、抗磷脂抗体阳性组、Ⅷ因子抗体阳性组(后两组均属于凝血抑制物阳性患者)。用枸橼酸钠抗凝静脉血进行 APTT 纠正试验。绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线), 确定纠正试验中即刻试验 Rosner 指数(RI)、温育试验差值(温育差)的诊断界值, 分析 APTT 纠正试验在筛查 APTT 延长原因中的应用价值。结果 即刻试验 RI 鉴别抗磷脂抗体阳性与单纯因子缺乏的诊断效能高于即刻试验 RI 鉴别凝血抑制物阳性与单纯因子缺乏的诊断效能($P < 0.05$)。即刻试验 RI 的诊断界值为 11.0%, 鉴别抗磷脂抗体阳性与单纯因子缺乏的灵敏度为 85.7%, 特异度为 91.2%; 温育试验差值的诊断界值为 3 s, 鉴别检测Ⅷ因子抗体阳性与阴性的灵敏度为 85.7%, 特异度为 91.2%。根据 APTT 纠正试验中即刻试验 RI、温育差将患者分为 3 类: 单纯因子缺乏、非时间依赖性抑制物、时间依赖性抑制物。115 例患者的 APTT 纠正试验结果判定正确率为 89.8%(103/115)。4 例单纯因子缺乏患者被误判, 其中 2 例患者的即刻试验 RI 及 2 例患者的温育差均接近诊断界值; 8 例被误判为单纯因子缺乏的患者, 5 例为低滴度狼疮抗凝物(LA)阳性, 3 例为低滴度Ⅷ因子抗体阳性。2 例 LA 阳性患者被误判为凝血抑制物呈时间依赖性。结论 该研究建立了 APTT 纠正试验的检测方法和解释规则。APTT 纠正试验可以用于临床 APTT 延长原因的鉴别诊断, 是一项简单有效的筛查试验。

关键词: APTT 纠正试验; 诊断界值; 抑制物; 时间依赖性; 非时间依赖性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.04.026

中图法分类号: R446.1

文章编号: 1673-4130(2021)04-0497-04

文献标志码: A

活化部分凝血活酶时间(APTT)延长是临床常见的凝血功能障碍, 原因主要是凝血因子的缺乏或者凝血抑制物的存在, 其中凝血抑制物以抗磷脂抗体、Ⅷ因子抗体最常见。不同原因导致的 APTT 延长, 临床治疗方案不同^[1-2]。APTT 纠正试验是分析 APTT 延长原因的凝血筛查试验, 用于判断患者是存在凝血因子缺乏还是凝血抑制物, 为下一步治疗提供信息。APTT 纠正试验操作简便易行, 不需要昂贵的仪器, 基层单位也可开展。但是目前 APTT 纠正试验没有标准化^[3-4], 国内文献较少见关于完整的 APTT 纠正试验操作方法和解释规则建立、分析的报道, 这影响了 APTT 纠正试验的临床应用。本研究旨在建立完整的 APTT 纠正试验的操作方法及解释规则, 探讨 APTT 纠正试验在鉴别 APTT 延长原因中的应用价值, 推进 APTT 纠正试验的标准化和临床普及。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 1 月至 12 月本院收治

的 APTT 延长、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(Fg)正常的患者共 115 例。其中临床确诊为单纯内源凝血因子缺乏(简称单纯因子缺乏)的患者 68 例, 各种不同类型凝血抑制物阳性患者 47 例。凝血抑制物阳性患者中, 抗磷脂抗体阳性患者 29 例, 包括狼疮抗凝物(LA)阳性 25 例, 抗心磷脂抗体阳性 4 例; Ⅷ因子抗体阳性患者 18 例。所有患者均符合临床及实验室诊断标准。本研究所使用的标本均为本实验室进行凝血试验后剩余的枸橼酸钠抗凝血标本, 排除有分析前误差及行抗凝治疗的患者标本。所有标本均进行 APTT 纠正试验检测。

1.2 仪器与试剂 日本 Sysmex CS-5100 全自动凝血分析仪, 试剂均为配套产品, 包括 APTT 检测试剂盒(凝固法)和氯化钙。

1.3 方法

1.3.1 制备正常血浆 选取至少 20 份健康者的血浆混合, 要求: APTT 结果接近参考范围(28~32 s)的

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81602702)。

[△] 通信作者, E-mail: shenhan10366@sina.com。

本文引用格式: 王贤, 夏茂, 夏永泉, 等 APTT 纠正试验检测方法的建立及临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(4): 497-500.

中间值;避免选择妊娠妇女的血浆标本。混合后的正常血浆进行凝血因子(I、II、V、VII、VIII、IX、X、XI、XII)活性和血小板计数的检测,要求:所有凝血因子水平要接近 100%;血浆中血小板计数 $<10\times10^9/L$ 。制备好的正常血浆分装后于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

1.3.2 即刻试验 取 3 支试管(1、2、3 号),依次放入患者血浆、正常血浆、混合血浆(患者血浆与正常血浆 1:1 混合),上机检测 APTT,测得的结果分别标记为 A、B、C,计算 Rosner 指数(RI)=[(A-B)/C] $\times$ 100%。

1.3.3 温育试验 即刻试验完成后,将混合血浆全部放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴温育 2 h,结束后再取 1 支试管(4 号),放入温育后的混合血浆,上机检测 3、4 号管的 APTT,测得的结果分别标为 D、E,计算温育试验检测管 D 与对照管 E 之间的差值(温育差)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料呈非正态分布,以 $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验(Z 检验)。采用非参数法构建受试者工作特征曲线(ROC 曲线),确立诊断界值,ROC 曲线间的比较采用 Z 检验。计数资料以百分率或频数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建立 APTT 纠正试验中即刻试验 RI 的诊断界值 凝血抑制物阳性患者的即刻试验 RI[18.7%(6.7%~24.9%)]高于单纯因子缺乏患者[3.8%(1.6%~9.8%)],差异有统计学意义($Z=-8.847, P<0.001$);绘制即刻试验 RI 用于凝血抑制物阳性与单纯因子缺乏患者鉴别诊断的 ROC 曲线,曲线下面积(AUC)为 0.829(标准差为 0.03),见图 1。抗磷脂抗体患者的即刻试验 RI[21.4%(11.2%~24.9%)]高于单纯因子缺乏患者[3.8%(1.6%~9.8%)],差异有统计学意义($Z=-11.484, P<0.001$);绘制即刻试验 RI 用于抗磷脂抗体阳性与单纯因子缺乏患者鉴别诊断的 ROC 曲线, AUC 为 0.930(标准差为 0.02),见图 2。两条 ROC 曲线的 AUC 比较,差异有统计学意义($Z=2.801, P=0.002$),即刻试验 RI 用于鉴别凝血抗磷脂抗体阳性与单纯因子缺乏的诊断效能比用于鉴别凝血抗磷脂抗体阳性与单纯因子缺乏的诊断效率高。即刻试验 RI 用于鉴别抗磷脂抗体与单纯因子缺乏患者的最佳诊断界值为 11.0%,灵敏度为 85.7%,特异度 91.2%。

即刻试验 RI 用于鉴别诊断的结果分析:68 例单纯因子缺乏患者中,66 例 APTT 纠正试验结果显示为被纠正,纠正率 97.1%;18 例 VIII 因子抗体阳性患者中,8 例被纠正,纠正率 44.4%;29 例抗磷脂抗体阳性

患者中,5 例被纠正,这 5 例均为低滴度 LA 阳性患者,LA 标准化比值依次为 1.2、1.2、1.3、1.5、1.5。单纯因子缺乏患者、VIII 因子抗体阳性患者、抗磷脂抗体阳性患者的纠正率依次降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

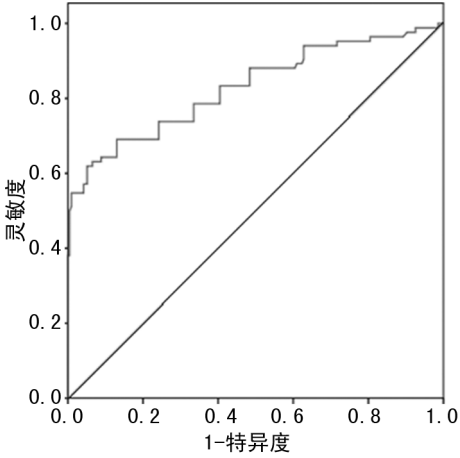


图 1 即刻试验 RI 用于鉴别凝血抑制物阳性与单纯因子缺乏患者的 ROC 曲线

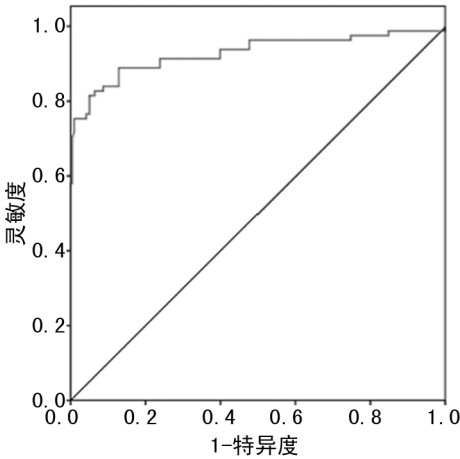


图 2 即刻试验 RI 用于鉴别抗磷脂抗体阳性与单纯因子缺乏患者的 ROC 曲线

2.2 建立 APTT 纠正试验中温育差的诊断界值 VIII 因子抗体阳性患者的温育差[6.5(2.6~19.4)s]与 VIII 因子抗体阴性患者[0.6(-1.3~2.7)s]相比,明显升高,差异有统计学意义($Z=-6.803, P<0.001$)。绘制 APTT 纠正试验中温育差用于鉴别 VIII 因子抗体阳性与阴性患者的 ROC 曲线, AUC 为 0.927(标准差为 0.02),最佳诊断界值为 3 s,灵敏度为 85.7%,特异度为 89.8%,见图 3。

2.3 APTT 纠正试验结果判定规则的建立及应用 根据 APTT 纠正试验中即刻 RI、温育差将患者分为 3 类:单纯因子缺乏、非时间依赖性抑制物(本研究中为抗磷脂抗体)阳性、时间依赖性抑制物(本研究中为 VIII 因子抗体)阳性,见表 1。

APTT 纠正试验结果判定的正确率为 89.6%

(103/115),见表 2。单纯因子缺乏组中,4 例患者判定错误;其中 2 例被误判为时间依赖性抑制物阳性,温育差接近诊断界值,分别为 3.0、3.3 s;2 例被误判为非时间依赖性抑制物阳性,即刻 RI 分别为 11.2%、11.8%。抗磷脂抗体阳性组中,5 例患者被误判为单纯因子缺乏,均为低滴度 LA 阳性患者;2 例被判定为时间依赖性抑制物阳性,温育差分别为 6.1、4.4 s;Ⅷ因子抗体阳性组中,3 例患者被误判为单纯因子缺乏,温育差分别为 2.6、2.9、2.9 s,Ⅷ因子抗体滴度分别为 0.9、1.2、1.0 BU/mL。

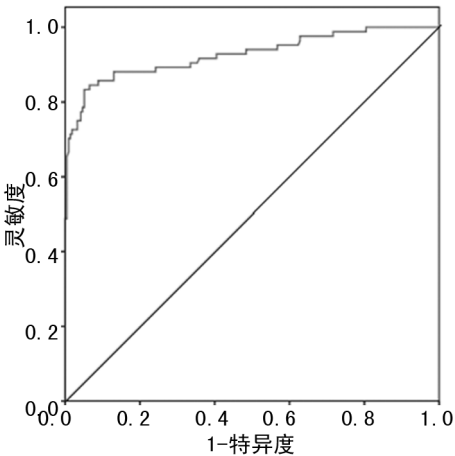


图 3 温育差用于鉴别Ⅷ因子抗体阳性与阴性患者的 ROC 曲线

表 1 APTT 纠正试验的结果判定规则		
即刻 RI(%)	温育差(s)	结果判定
<11.0	<3	单纯因子缺乏
<11.0	≥3	时间依赖性抑制物阳性
≥11.0	≥3	时间依赖性抑制物阳性
≥11.0	<3	非时间依赖性抑制物阳性

表 2 APTT 纠正试验的判定结果分析(n)				
组别	单纯因子缺乏	时间依赖性抑制物阳性	非时间依赖性抑制物阳性	合计
单纯因子缺乏组	64	2	2	68
抗磷脂抗体阳性组	5	2	22	29
Ⅷ因子抗体阳性组	3	15	0	18
合计	72	19	24	115

3 讨 论

临床引起 APTT 延长的原因主要有两大类,一类是凝血因子缺乏,一类是凝血抑制物存在,其中凝血抑制物主要有抗磷脂抗体和凝血因子抗体两类,根据反应特性又可以分为时间依赖性抑制物和非时间依赖性抑制物^[3],其中时间依赖性抑制物中最常见的是Ⅷ因子抗体,非时间依赖性抑制物最常见的是抗磷脂

抗体。APTT 延长原因不同患者的临床治疗方案差异很大:(1)凝血因子缺乏容易增加患者的出血风险,治疗上需要补充相应的凝血因子、解决凝血因子缺乏的原因;(2)Ⅷ因子抗体会抑制Ⅷ因子的活性,容易引起出血,加重血友病 A 患者的病情,使其原有治疗手段失效^[5];(3)抗磷脂类抗体因为与磷脂结合,会干扰 APTT 检测和基于 APTT 试验的凝血因子检测,造成 APTT 假性延长、凝血因子假性减少,抗磷脂抗体对于临床而言,更多的是增加血栓发生风险,而不是出血风险^[6]。APTT 纠正试验是有助于临床判定 APTT 延长原因的筛选试验,操作简单、耗时短且易于开展,为治疗方案的制订提供参考。

目前,APTT 纠正试验无论是操作流程还是解释规则都没有统一的共识,缺乏标准化,各实验室间都存在很大的差异,所选取的诊断界值灵敏度和特异度差异也很大^[7-10],限制了 APTT 纠正试验的临床应用,尤其是在基层医院临床实验室。本研究确立了 APTT 纠正试验的即刻 RI 和温育差的诊断界值,建立了 APTT 纠正试验的完整解释规则,并将其应用于临床 APTT 延长原因的筛查。本研究采用建立的 APTT 纠正试验方法和解释规则进行判定,正确率为 89.6%,说明本研究建立的 APTT 纠正试验方法可以有效地用于临床 APTT 延长原因的筛查,为进一步推进 APTT 纠正试验的标准化提供了依据。

本研究中,4 例被误判的单纯因子缺乏患者,2 例的即刻 RI,另 2 例的温育差均接近诊断界值;被误判为单纯因子缺乏的患者中,5 例为低滴度 LA 阳性患者,即刻 RI 接近诊断界值,3 例为低滴度Ⅷ因子抗体,温育差接近诊断界值。笔者认为当 APTT 纠正试验在即刻 RI、温育差检测值接近诊断界值时,结果判定的准确性下降,对于低滴度的抗磷脂抗体和低滴度的Ⅷ因子抗体阳性的患者,容易出现假阴性结果,导致漏诊。APTT 纠正试验在临床的应用中,对于这种现象应加以重视^[11-13]。

本研究认为,APTT 纠正试验稀释效应造成了低滴度凝血抑制物检测的假阴性^[2,11],英国血液学标准委员会指南(BCSH 2012)中指出稀释效应可导致弱阳性 LA 检测结果出现假阴性,即使 1:1 混合试验结果阴性,筛选试验和确证试验检测结果呈阳性时,仍应判定结果为阳性。美国临床和实验室标准协会指南(CLSI 2014)则完全更改了 LA 的检测流程(筛选试验—确证试验—1:1 混合试验)并指出只有在筛选试验和确证试验结果难以解释时再进行 1:1 混合试验^[5]。本研究结果与上述理论一致,APTT 纠正试验对于低滴度 LA 阳性患者会产生假阴性的结果。

Ⅷ因子抗体有两种类型,一种是来自于血友病 A

患者的同型抗体,一种是获得性血友病患者的自身抗体,它们与Ⅷ因子的免疫反应均为时间依赖性,是一种慢反应性物质,在 37℃ 2 h 才能对Ⅷ因子达到完全的抑制^[13]。本研究中的 18 例Ⅷ因子抗体阳性患者中,仅有 10 例被 APTT 纠正试验中的即刻试验判定为未被纠正,8 例被判断为被纠正,纠正率达 44.4%,这与Ⅷ因子反应特性相符合,说明 APTT 纠正试验仅凭即刻试验无法有效对Ⅷ因子抗体等时间依赖性抑制物阳性和单纯因子缺乏进行鉴别^[14]。

有文献报道,有 10%~15% 的 LA 也会呈时间、温度依赖性,因此纠正试验的温育试验并不能完全鉴别Ⅷ因子抗体和抗磷脂抗体阳性的患者^[15]。本研究中,2 例 LA 阳性患者被判定为时间依赖性抑制物阳性,温育差分别为 6.1 s 和 4.4 s,猜测可能是患者体内有部分 LA 为时间依赖性慢反应抑制物,与文献^[15]报道相符。这提示,单凭 APTT 纠正试验无法完全鉴别抗磷脂抗体与Ⅷ因子抗体,必要时需要增加其他实验室检测项目来辅助结果的判定。

综上所述,APTT 纠正试验是临床判定 APTT 延长原因,检测凝血抑制物的重要筛查试验。建立完整的操作流程和解释规则是 APTT 纠正试验开展的关键。临床在根据 APTT 纠正试验的检测数据进行结果判定时,要充分了解它的优势和局限性,才能得出准确的结论。

参考文献

[1] 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.

[2] BARBOSA A C N, MONTALVAO S A L, BARBOSA K G N, et al. Prolonged APTT of unknown etiology: a systematic evaluation of causes and laboratory resource use in an outpatient hemostasis academic unit[J]. Res Pract Thromb Haemost, 2019, 3(4): 749-757.

[3] TANG N, CHEN Y, LI D, et al. Determining the cutoff value of the APTT mixing test for factor Ⅷ inhibitor[J]. Clin Chem Lab Med, 2019, 57(5): 88-90.

[4] KUMANO O, IEKO M, NAITO S, et al. New formulas for mixing test to discriminate between lupus anticoagulant and acquired hemophilia A[J]. Thromb Res, 2016,

143(1): 53-57.

[5] 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, 1(32): 6-12.

[6] 寿玮龄.狼疮抗凝物测定方法的优化选择及生物变异度研究[D].北京:北京协和医学院, 2015.

[7] KUMANO O, MOORE G W. Ruling out lupus anticoagulants with mixing test-specific cutoff assessment and the index of circulating anticoagulant[J]. Res Pract Thromb Haemost, 2019, 3(4): 695-703.

[8] ESMEDERE EREN S, KARAKUKCU C, CIRACI M Z, et al. Activated partial thromboplastin time derivative curves: helpful diagnostic tool in mixing test interpretation[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2018, 29(4): 410-414.

[9] Asai H, Shirayama R, Oshida K, et al. A pediatric case of acquired hemophilia A: the usefulness of the activated partial thromboplastin time (APTT) cross-mixing test for early diagnosis[J]. J UOEH, 2018, 40(4): 331-337.

[10] KUMANO O, MOORE G W. Lupus anticoagulant mixing tests for multiple reagents are more sensitive if interpreted with a mixing test-specific cut-off than index of circulating anticoagulant[J]. Res Pract Thromb Haemost, 2017, 2(1): 105-113.

[11] 李刚,陈振萍,唐凌,等.血浆纠正试验差值在血友病 A 患儿抑制物中的诊断价值[J].检验医学与临床, 2015, 12(23): 3451-3452.

[12] MATSUMOTO T, NOGAMI K, SHIMA M. A combined approach using global coagulation assays quickly differentiates coagulation disorders with prolonged aPTT and low levels of FⅧ activity[J]. Int J Hematol, 2017, 105(2): 174-183.

[13] 李刚,陈振萍,甄英姿,等.血友病 A 患儿血浆纠正实验与凝血因子Ⅷ抑制物相关性研究[J].中华检验医学杂志, 2015, 38(7): 480-483.

[14] KERSHAW G. Detection and measurement of factor inhibitors[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1646: 295-304.

[15] KERSHAW G, ORELLANA D. Mixing tests: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin times [J]. Semin Thromb Hemost, 2013, 39(3): 283-290.

(收稿日期:2020-06-22 修回日期:2020-11-19)