DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.07.02

· 临床检验技术研究 ·

凝血酶原时间衍生法与冯·克劳斯法测定纤维蛋白原结果的一致性及临床应用*

张艳,杨怡,金心(国药葛洲坝中心医院 & 三峡大学第三临床医学院检验科,湖北宜昌 443002)

摘要:目的　建立沃芬 TOP 系列仪器纤维蛋白原(Fib)凝血酶原时间衍生法(PT-der 法)与冯·克劳斯法(Von Clauss 法)测定结果的一致性区间和 PT-der 法的适用范围,提升 PT-der 法的临床应用价值。**方法**　将 30 份低、正常和高 Fib 浓度的新鲜血浆按比例制备混合血浆,用 Von Clauss 法对其 Fib 浓度进行赋值,再用此血浆校准 PT-der 法。参考美国临床和实验室标准协会(CLSI) EP15-A 和 EP6-A 文件,评价精密度、线性范围,使用 WS/T 402—2012 推荐方法重新制定其参考区间;分别使用上述 2 种方法检测 5 142 例标本 Fib,建立 PT-der 法与 Von Clauss 法 99%的检测结果符合 WS/T 406—2012 中 Fib 准确度要求范围内的数值区间和适用范围。**结果**　重新校准后 PT-der 法精密度和线性范围经验证符合说明书要求,测定 Fib 浓度在 1.51~7.00 g/L 时与 Von Clauss 法的准确度符合率为 99.72 %,其适用范围不包括:使用大剂量抗凝药物后;肝硬化失代偿期;纤维蛋白降解产物(FDP)≥30 mg/L;凝血酶时间(TT)≥20 s,活化部分凝血活酶时间(APTT)≥80 s。**结论**　通过量值传递的方式校准 PT-der 法后,建立了 PT-der 法和 Von Clauss 法检测 Fib 结果的一致性区间,并确定 PT-der 法适用范围和参考区间。在保证 PT-der 法检测结果准确性的同时提升了其临床应用价值。

关键词:纤维蛋白原;凝血酶原衍生法;冯·克劳斯法;量值传递;一致性;适用范围

中图分类号:R446　　**文献标志码:**A

Consistency of fibrinogen determination by prothrombin time-derived method and von Clauss method and its application

ZHANG Yan, *YANG Yi*, *JIN Xin* (*Department of Clinical Laboratory*, *The Third Clinical Medical College of the Three Gorges University*, *Gezhouba Central Hospital of Sinopharm*, *Yichang* 443002, *Hubei*, *China*)

Abstract: Objective　To establish the consistent interval of the results of the fibrinogen (Fib) determined by Prothrombin Time-derived (PT-der) method and Von Claus method of Wolfen TOP series instruments, and the applicable scope of PT-der method, and improve the clinical application value of PT-der method. **Methods**　Mixed plasmas were prepared by proportioning 30 fresh plasmas with low, normal and high Fib concentrations. Von Clauss method was used to assign Fib concentration in the plasma samples, and then the results were calibrated by PT-der method. Refering to EP15-A and EP6-A documents of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), precision, linear range (range consistent results) were evaluated. WS/T 402—2012 recommended method was used to re-establish the reference interval. The Fib level in 5 142 samples were detected using the two methods. The numerical range and applicable range for 99% of the results detected by the two methods were established, in which Fib accuracy met with the requirements of WS/T 406—2012. **Results**　The precision and linearity of PT-der method after recalibration were certified to comply with the specification. The determinable concentrations of Fib were 1.51 to 7.00 g/L when the coincidence rate of accuracy of Von Clauss method was 99.72%. The scope of application should not include the following cases: after the use of high-dose anticoagulant drugs, decompensated cirrhosis, fibrinogen degradation products (FDP) ≥30 mg/L, thrombin time (TT) ≥20 s, activated partial thromboplastin time (APTT) ≥80 s. **Conclusion**　After calibrating of PT-Der method by the means of quantity value transfer, the consistent interval of PT-der method and Von Clauss method for Fib detection was established. The applicable scope and reference interval of PT-der method were determined. The accuracy of PT-der method may be guaranteed and improved for its clinical application.

Key words: fibrinogen; prothrombin derivative algorithm; Von Clauss method; value transmission; consistency; scope of application

纤维蛋白原(fibrinogen,Fib)是一种由肝细胞合成[1]的具有凝血功能的蛋白质,是纤维蛋白的前体。Fib 具有双重生物活性,既是凝血酶作用的底物,又是高浓度纤溶酶的靶物质,其主要生理功能是进入血液循环后参与凝血和调节纤溶[2],与应激反应、动脉血栓形成、弥漫性血管内凝血等密切相

*　**基金项目:**三峡大学科学基金青年科学基金(KJ2019A004)。

作者简介:张艳,1977 年生,女,主管技师,大学本科,主要从事血栓与止血研究。

通信作者:杨怡,主管技师,E-mail:15588060@qq.com。

关[3]。目前,Fib 的检测方法主要有冯·克劳斯(Von Clauss)法及凝血酶原时间衍生法(prothrombin time-derived, PT-der 法)2 种[4]。Von Clauss 法是 WHO 推荐的参考方法[5],也是美国国家临床检验标准委员会推荐的 Fib 常规测定方法[6]。Fib 因基因多态性[7]而具有高度异质性,其检测受较多因素影响。文献报道[8]在没有异常 Fib 存在的情况下,PT-der 法检测结果在 2.00~4.00 g/L 时可替代 Von Clauss 法。但在验证过程中发现,几乎所有 PT-der 法检测 Fib 的结果均比 Von Clauss 法高 10%~20%。在查阅资料后推测,2 种方法检测结果误差的原因可能是使用了同一校准品但赋值不同。本研究拟用量值传递的方法校准PT-der法,即以可溯源的 Von Clauss 法赋值混合血浆对 PT-der 法进行重新定标,再用大量临床样本确立其与 Von Clauss 法检测结果的一致性区间和适用范围。

1　材料和方法

1.1　仪器和试剂　沃芬 TOP 700 和 TOP 300 全自动凝血分析仪及其配套试剂(Von Clauss 法试剂批号 N0688281,PT-der 法试剂批号 N0386789)、校准品(批号 E0177755)和双水平质控品(批号 N0386250 和 H0864436)。校准品中 Fib 可溯源至英国国家生物制品检定所(National Institute for Biological Standards and Control,NIBSC)。

1.2　样本

1.2.1　标本来源　国药葛洲坝中心医院 2018 年 11 月至 2019 年 4 月住院及门诊检测凝血项目的患者 5 142 例,年龄 2~95 岁(中位年龄 52 岁),其中男 2 619例,女 2 523 例。采集清晨空腹静脉血 1.8 mL 于真空凝血采血管(含 0.2 mL 0.109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝剂)中,以离心力 2 000×*g* 离心 15 min,剔除黄疸、溶血、脂血标本及重度贫血患者标本。

1.2.2　混合血浆制备　用 30 份新鲜血浆按低值、正常和高值以 4∶23∶3 的比例等量混合(基于本院近 2 年约 50 000 份临床样本结果分布所得)。

1.3　PT-der 法校准

1.3.1　混合血浆赋值　用 Von Clauss 法连续检测混合血浆 Fib 20 次,计算其剔除离群值(超 3 倍标准差)后的均值,以此均值作为该混合血浆的赋值。

1.3.2　校准　用已赋值的混合血浆作为校准品依照原厂校准方法(六点拟合直线)校准 PT-der 法。

1.4　性能验证

1.4.1　精密度验证　参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)EP15-A 文件[9]推荐方法进行。选择正常和异常 2 个浓度水平的质控品,用 PT-der 法测定 Fib。先将各浓度水平取 1 支复溶,再分装成 5 份,冷藏,每天取出各 1 份复温后在 1 批中检测,每批每个水平重复测定 3 次,每个项目连续测定 5 d,将所测定结果进行统计学分析,计算批内精密度、批间精密度、实验室内标准差(s_1)、自由度(T)和验证值(V)。当 $s_1<V$ 时认为厂家声明的精密度通过验证。

1.4.2　线性范围验证　参照 CLSI EP6-A 文件[10],选择低值(L)和高值(H)样品各 1 份,将低值和高值样本按 4∶0、3∶1、2∶2、1∶3、0∶4 的比例混合,得到 5 份线性试验样本。对上述样本重复测定 3 次,取平均值。各样本浓度的预期值按公式($C_L\times V_L+C_H\times V_L$)/($V_L+V_H$)计算(式中 C 为样本浓度,V 为样本体积)。将实测平均值与预期值先进行数据检查,剔除离群值,再用多元线性回归分析,并绘制散点图进行评价。

1.4.3　重新制定本区域人群的参考区间　参照 WS/T 402—2012《临床实验室检验项目参考区间的制定》[11],选取不低于 120 例表观健康体检者(排除妊娠、糖尿病、血栓类疾病、肾病、免疫系统疾病、血液病、肝脏疾病),采集空腹抗凝血用 Von Clauss 法和 PT-der 法检测 Fib,分别取总体结果的 95%置信区间($P_{2.5}$~$P_{97.5}$)为本区域人群参考区间。

1.5　样本检测　在室内质控检测结果在控的情况下,在 TOP700 和 TOP300 上同时用 Von Clauss 法及 PT-der 法检测血浆样本 Fib,采集样本 2 h 内完成检测。各项操作严格按照仪器、试剂说明书及操作规程进行。将 PT-der 法检测结果设为观察组,Von Clauss 法检测结果设为参照组。

1.6　确立一致性区间及适用范围　用 2018 年 11 月至 2019 年 4 月本院凝血样本分别用 PT-der 法与 Von Clauss 法检测 Fib。以 Von Clauss 法检测为参照,确立 PT-der 法与 Von Clauss 法 99%的结果符合 WS/T 406—2012《临床血液学检验常规项目分析质量要求》[12]中 Fib 准确度要求(偏倚≤20%)范围内的数值区间和适用范围。偏倚以 Von Clauss 法检测结果为比对标准;符合率为同一样本用以 Von Clauss 法结果为靶值,PT-der 法检测结果达到准确度要求(偏倚≤20%)的比例。

1.7　统计学分析　采用 Excel 2010 软件进行。计算 $\bar{x}$、s、偏倚等,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行线性回归分析,拟合线性方程并计算相关系数(r)。

2　结果

2.1　校准前 PT-der 法与 Von Clauss 法 Fib 检测结果一致性分析　在用原厂校准模式时，对 PT-der 法线性范围（0.70～7.00 g/L）内的 855 例样本结果进行了比对，总计 70.18%（600/855）的 PT-der 法检测结果符合 WS/T 406—2012 的准确度要求，见表 1。

表 1　重新校准前两种 Fib 检测结果的比较

PT-der 法结果区间（g/L）	n	PT-der 法（g/L）	Clauss 法（g/L）	相对偏差（%）	符合率（%）
0.72～2.00	32	1.56±0.36	1.40±0.33	11.80±16.22	71.88
2.01～4.00	436	3.21±0.49	2.90±0.46	10.96±7.95	84.86
4.01～7.00	387	4.99±0.76	4.24±0.59	17.58±7.03	53.49

2.2　校准后 PT-der 法的性能验证

2.2.1　精密度验证结果　s_1（分别为 0.081 和 0.068）在正常和异常商业质量控制参考水平下均小于 V（分别为 0.101 和 0.085），表明厂家声明的精密度通过验证。

2.2.2　线性范围验证结果　PT-der 法检测 Fib 的预期值（y）与实测值（x）无明显离群值，最佳拟合方程为二次多项式，回归方程为 $y=-0.006\ 2x^2+0.949\ 4x+0.036\ 7$，$r^2=0.999\ 9$，5 个浓度梯度标本的偏差为－0.58%～0.62%，平均偏差为－0.07%。以 WS/T 406—2012 的偏倚（≤10%）为评判标准，PT-der法检测 Fib 在 0.70～7.01 g/L 范围内呈临床可接受的三阶线性，厂家声明的 0.70～7.00 g/L 线性范围通过验证。

2.2.3　本区域人群的参考区间　127 例符合入选标准的体检者，年龄 23～73 岁（中位数为 42 岁），其中男 72 例，女 55 例。用 PT-der 法检测 Fib 结果为 2.18～5.11 g/L（95%置信区间为 2.29～5.02 g/L），用 Von Clauss 法检测结果为 2.25～5.07 g/L（95%置信区间为 2.33～4.95 g/L），均无离群值。本实验室 PT-der 法、Von Clauss 法检测 Fib 的参考区间分别为 2.29～5.02 g/L、2.33～4.95 g/L。

2.3　校准后的 PT-der 法与 Von Clauss 法 Fib 检测结果的一致性分析

2.3.1　样本分布　2018 年 11 月至 2019 年 4 月用 2 种方法检测 Fib 总计 5 142 例，其中 Von Clauss 法检测结果异常 1 199 例，低于参考区间 723 例，高于参考区间 476 例。

2.3.2　适用条件　结果比对时发现，一些特殊情况（总计 44 份，占总样本的 0.86%）的检测结果偏差较大，包括：（1）大量使用抗凝药物后（如透析后）；（2）明确诊断肝硬化失代偿期等影响凝血的疾病；（3）纤维蛋白降解产物（FDP）≥30 mg/L；（4）凝血酶时间（TT）≥25 s 时；（5）活化部分凝血活酶时间（APTT）≥80 s。

2.3.3　PT-der 法适用范围的确定　排除上述异常样本后，总计有 5 098 份，年龄区间为 2～93 岁，其中男 2 596 例，女 2 502 例，PT-der 法结果在 1.51～7.00 g/L 区间内时 4 995 份样品中 4 981 份符合一致性要求（相对偏差≤20%），符合率为 99.72%，见表 2。

表 2　重新校准后 2 种 Fib 检测结果的比较

PT-der 法结果区间（g/L）	n	PT-der 法（g/L）	Clauss 法（g/L）	相对偏差（%）	符合率（%）
0.70～1.50	103	1.23±0.20	1.40±0.20	－6.39±12.18	83.50
1.51～2.28	606	2.00±0.21	2.12±0.28	－4.94±8.57	99.50
2.29～5.02	3 813	3.37±0.72	3.38±0.73	0.15±6.88	99.82
5.03～7.00	576	5.74±0.54	5.66±0.64	1.89±6.37	99.31

2.4　实际应用　结合以上研究和验证结果设立本实验室 Fib 的检测方案：2 台 TOP Family 系列凝血仪先分别用本研究方法进行 PT-der 法校准，再用 2 种方法同时检测 20 例以上样品，如 PT-der 法 95%及以上样品结果与 Von Clauss 法结果的偏倚≤20%，则认为校准成功，反之重新校准。校准成功后日常所有 Fib 的样本均使用 PT-der 法进行初次检测，（1）如结果在 1.51～7.00 g/L 范围内且未出现 2.3.2 中不适用条件时，直接报告结果；（2）如出现 2.3.2 中不适用条件，手动使用 Von Clauss 法复测 Fib；（3）如结果不在 1.51～7.00 g/L 范围内则会自动使用（已设置好的复检程序）Von Clauss 法复测 Fib；（4）使用自建 PT-der 法参考区间进行临床报告。在确立本方案后，本实验室半年中 Fib 复测率仅为 3.89%（418/10 975），如使用相关文献[8]报道方案估算复测率为 35.65%（3 913/10 975），大幅

度的提高了检测速度(PT、APTT、TT 和 Fib 在 TOP700 联合检测可由原先的每小时 60 例提升至每小时 78 例)和效率并减少了试剂开支。

3 讨论

Fib 是凝血状态的重要标志物[13],近年来研究发现其水平过高易引起缺血性心脏病、心源性猝死等心血管疾病[14],其水平过低也会导致凝血过程中血凝块形成质量下降[15],从而易引起出血性疾病。Von Clauss 法目前是 Fib 检测的参考方法[5];而 PT-der 法可在仪器测定凝血酶原时间(prothrombin time)时,通过 Fib 形成的纤维蛋白,根据纤维蛋白浊度推算出 Fib 的含量[16],更为经济实用。有文献报道[4,17] PT-der 法和 Von Clauss 法在正常范围内的检测结果较为接近,而在异常范围内则相差较大,也有学者认为 PT-der 法不是一种可靠的方法[5,17-18]。

本实验室验证 2 种方法检测 2.00~4.00 g/L 浓度 Fib 的一致性时发现,PT-der 法检测 Fib 的结果几乎均高于 Von Clauss 法 10%~20%。查阅说明书后发现,上述 2 种方法使用同一校准品但赋值却不相同,所以推测赋值不同引起检测结果不同。一项多中心研究指出 PT-der 和 Von Clauss 方法之间的偏差取决于校准曲线,且差异程度与校准曲线和血浆样品浊度有关[19]。而制造商提供的校准品浊度较高,考虑到这两方面因素,我们采用量值传递方式给新鲜清澈的混合血浆赋值,并以此重新校准 PT-der 法[16]。所谓量值传递就是将国际(国家)计量基准所复现的量值,通过检定或校准方式传递给下一级计量标准,并依次传递到工作计量器具,以保证量值准确一致[20]。本研究正是使用参考方法校准常规(下一级)方法,完全依照量值传递方式进行。因为 Von Clauss 法具有完整溯源链,所以重新校准的 PT-der 法也可以沿着 Von Clauss 法溯源链一级一级追溯到 NIBSC(原厂的溯源计量标准)。

关于 2 种方法结果相关性的研究较多,但大多数只停留于结果比对阶段,分析 PT-der 法的结果是否准确,但不同品牌、不同型号的血凝仪 2 种方法的差异程度也不尽相同[4]。而本研究却通过量值传递的方法重新校准并验证了 PT-der 法,并使用大量样本的结果比对建立了 PT-der 法的适用条件和范围,使 2 种方法检测结果在一定范围内可以互换。与此同时 Rizzo 等[21]也发现,不同方法检测到的 Fib 水平的偏差与肝硬化的严重程度有关,与本研究结果一致,即在肝硬化失代偿期,2 种方法的检测值偏差可能超过 20%。

值得注意的一点是,2 种方法原厂给出的参考区间并不完全相同,但所查阅到的文献均未提及。因此,本研究对 PT-der 法进行了重新校准,重新建立了本实验室的参考区间。在研究中,我们发现 2 种方法的一致性区间涵盖了 2 种方法的参考区间,而 PT-der 法参考区间又涵盖了 Von Clauss 法参考区间,加之实际应用中几乎所有一致性区间内的结果均使用 PT-der 法检测,故可用 PT-der 法参考区间进行临床报告。

需要指出,本研究仅使用本区域人群的检测数据,基于本实验室的设备和试剂并制定检测方案,不具有普遍适用性。不同实验室可借鉴此方法制定出适宜自己实验室的检测方案,在保证检验质量前提下以最小的成本和最快的速度为临床和广大患者服务。

4 参考文献

[1] 黄丹丹, 蔡挺, 张顺, 等. 1 例遗传性异常纤维蛋白原血症的鉴定及分子发病机制研究[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(9): 675-679.

[2] 罗莎莎, 杨丽红, 谢海啸, 等. 1 例遗传性异常纤维蛋白原血症导致胎停育[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(3): 187-190.

[3] 赵玉杰, 吕艳关. 纤维蛋白原与血清淀粉样蛋白 A 检测在子痫前期诊断中的价值[J]. 检验医学, 2020, 35(1): 79-80.

[4] 陈同庆. Sysmex CA7000 血凝仪 2 种方法测定纤维蛋白原结果的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(11): 1546-1547.

[5] 欧阳贵平, 谢香萍, 李小花, 等. CA-1500 全自动血凝仪两种方法测定纤维蛋白原的结果比较[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(1): 111-112.

[6] CLSI H30-A. Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; Approved Guideline[S]. Wanye, PA: CLSI, 1999, 99.

[7] 段家乐, 张晓敏, 孟鹏飞, 等. 血浆纤维蛋白原基因多态性、肥胖与缺血性脑卒中的关系探讨[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(13): 2168-2171.

[8] 刘振杰, 何燕香, 徐宁, 等. Sysmex CA-1500 全自动血凝仪 PT-der 法和 Von-Clauss 法检测纤维蛋白原的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(10): 1333-1334.

[9] NCCLS document EP15-A. User demonstration of performance for precision and accuracy; Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2001: 1-48.

[10] NCCLS document EP6-A. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2004: 1-47.

(下转第 494 页)