

Countermeasures of Specimens Showing below Reference Value in APTT Result

Hyun Oh Choi¹, Seung Gu Kim¹, Sang Hee Park¹, Jae Ki Lee¹, Bon Kyung Koo², and Chang Ho Park³

¹Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University Mokdong Hospital, Seoul 158-710, Korea

²Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea

³Department of Administration, Sysmex Korea Co., Ltd., Seoul 137-900, Korea

The activated partial thromboplastin time (APTT) is used primarily to evaluate coagulation abnormalities in the intrinsic pathway. The proper specimen is very important factor for precise results of blood coagulation analysis. The objective of this study was to get to the conclusion of whether to analyze again and to collect blood sample over again when APTT result shows below the reference value. We evaluated 126 samples showing a value below 20.0 sec at APTT result, which consist of 48 males and 78 females candidates during night duty from March 2012 to December 2012. Average comparisons of APTT result between first and retested analysis among study subjects were significantly different in male samples. APTT results comparison of recollected subjects among clotted samples were also significantly different with both sexes ($p < 0.000$). We suggest that we should carefully check the samples to get accurate results and collect samples again in case of only obtaining improper samples; even though the APTT result show below reference value.

Keywords: Activated partial thromboplastin time, Coagulation, Intrinsic pathway, Reference value

Corresponding author: Hyun Oh Choi
 Department of Laboratory Medicine,
 Ewha Womans University Mokdong Hospital,
 Seoul 158-710, Korea.
 Tel: 82-2-2650-5192
 E-mail: pumaoh@naver.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 The Korean Society of Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: July 26, 2013
 Revised: August 27, 2013
 Accepted: August 29, 2013

서론

각종 혈액 응고질환의 선별 검사 및 항응고제 치료 후의 추적검사로서 프로트롬빈 시간(Prothrombin Time, PT)과 활성 부분 트롬보플라스틴 시간(Activated Partial Thromboplastin Time, APTT)은 각 검사실에서 가장 기본적으로 이용되는 혈액 응고 검사이다(Marlar 등, 1984; Suschman 등, 1986). 특히 PT와 APTT 검사는 그 결과에 따라 차후 검사 및 치료 방침이 큰 영향을 받을 수 있으므로 검사실 나름의 참고치 선정 및 신중한 정도관리가 요구되는 검사이다(이 등, 2001). 따라서 이들 검사 결과의 신뢰성을 높이기 위해 혈액학 검사실에서는 사용하는 검사 기종 및 시약에 대한 정밀도, 민감도, 기기간 비교, 상관성, 응고인자 결핍 및 해파린에 대한 민감도 등을 측정하는 것은 중요하고도 기본적인 사항들이다. 또한 엄격한 내부 정도관리, 동일 기종 및 시약을 사용하는 검사실 간의 지속적인 정도관리도 매우 중요하다(이 등, 2001). 본원에서 사용하고 있는 혈액응고 자동분석기 CA-7000 (Sysmex

Corporation, Kobe, Japan)의 경우에도 기기 설치 후 평가해야 할 여러 사항들에 대해 엄격하게 평가한 후 참고범위를 설정하였고 현재 지속적인 정도관리를 기기와 시약의 안정성을 확인한 후 검체 분석을 시행하고 있다.

참고치 설정을 위해 정해진 규정과 절차를 충족시켰고 정도관리를 통해 기기와 시약의 안정성을 확인한 후 검체 분석을 시행하였음에도 불구하고 일부 검체들의 경우 본원 혈액학 검사실이 설정한 참고치(APTT 20.6~31.1초, PT 10.2~13.1초)의 하한값 이하로 측정된 APTT 검사 결과가 가끔 있었다. APTT 결과는 투여되는 여러 종류의 약물들에 의해서 영향을 받을 수도 있는데 남성의 경우는 복합 에스트로겐 치료를 받는 경우이고 여성의 경우에는 경구 피임약을 복용할 경우 APTT 결과의 감소가 일어날 수 있다고 한다. 하지만 알려진 원인이외의 단축된 APTT 결과는 연장된 것과 마찬가지로 환자의 응고 시스템에서 어떤 비정상 상태를 나타낼 수도 있다고 하였다(Ambrus 등, 1971; Prasad 등, 1999; Kamal 등, 2007).

한편 야간 당직 근무시 본원 혈액학 검사실 참고치 이하의 APTT 결과로 인해 검체 확인, 재검사 실시 및 검체 재채혈 후 검사를 시행하였고 이로 인해 환자들에게 불편과 검사 결과 보고 지체를 초래하였다. 이에 본원 검사실에서 설정한 참고치 이하이면서 시약에 첨부된 매뉴얼의 90% 참고치의 5번째 백분위수(22.1초)보다도 낮은 20초 이하의 APTT 결과를 보이는 검체들을 대상으로 이들의 특성을 파악하고 혈액 응고검사시 이러한 검체들에 대한 신속한 대응 방안을 마련하고자 본 연구를 시작하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

2012년 3월부터 2012년 12월까지 본원 응급검사실에 응급 응고검사를 의뢰한 환자들의 APTT 결과가 본원 검사실에서 설정한 참고치(20.6~31.1초) 이하이면서 시약 첨부 매뉴얼의 90% 참고치의 5번째 백분위수(22.1초)보다도 낮은 20초 이하의 결과를 나타내는 남성 48명과 여성 78명의 검체를 대상으로 총 126개를 분석하였다. 연구 대상이 된 검체들은 야간 근무시 APTT 결과가 20초 이하의 결과를 나타내는 검체들이 보일 때마다 무작위적으로 선택되었다.

2. 연구 방법

1) APTT, PT 검사

환자 혈액을 3.2% sodium citrate (Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)가 들어있는 진공 시험관에 9:1의 비율로 채혈하여 1,500 g (약 3,000 rpm)에서 10분간 원심분리하고 부적격 검체 여부를 확인한 후 상층의 혈장을 이용하여 검사를 시행하였다.

2) 기기 및 시약

CA-7000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) 자동 응고 분석기로 응고법의 원리를 이용하여 측정하였다. APTT, PT 검사를 위한 측정 시약은 SIEMENS ACTIN FS (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Marburg, Germany), SIEMENS Thromborel S

(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., ISI: 0.96), SIEMENS CaCl₂ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)를 이용하였다.

3) 자료 처리 및 분석

자료의 분석은 Microsoft Office Excel 2007을 이용하였으며 변수는 평균±표준편차로 나타내었다. 대상자의 일반적 특성을 산출하고 동일 검체에 대한 APTT 재검사 결과 비교, 동일 대상에 대한 재검체 후 검사 결과에 따른 평균치 분석은 t-test를 이용하였다. 통계분석을 위한 유의수준(p)은 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 일반적인 특성

기기에서 APTT 검사 결과가 20초 이하를 보이는 126개의 검체를 대상으로 APTT 검사결과에 미치는 영향을 파악하기 위해서 성별, 나이, 혈소판 수, PT 검사 결과를 비교 분석하였다. 분석된 검체 대상자들의 평균 연령은 남성은 61.7 ± 15.7 세, 여성은 64.1 ± 14.8 세였다. 혈소판 수는 남성이 232 ± 15.7 ($10^3/\mu\text{L}$)개, 여성은 223 ± 73.3 ($10^3/\mu\text{L}$)개로 남녀 모두 본원의 참고범위에 포함되는 혈소판 수를 나타내었다. PT 검사 결과는 남성은 10.6 ± 0.8 초, 여성은 10.7 ± 0.9 초로 본원이 설정한 참고치에 속하였고 통계적으로도 유의한 차이를 나타내지 않았다($p=0.769$). 하지만 APTT 검사 결과는 남성 19.2 ± 0.6 초, 여성 19.3 ± 0.5 초로 본원이 설정한 참고치보다 낮았고 통계적으로 성별간 유의한 차이를 나타내었다($p=0.002$) (Table 1).

2. 동일 검체의 APTT 재검사 시행 후 결과 비교

APTT 결과가 20초 이하를 보이는 검체들에 대해서 재검사를 실시하기 전에 먼저 검체 부적절 여부를 확인하였다. 먼저 육안으로 응집 여부를 확인하였고 그 다음 멧가지를 이용하여 응집이 없는 응고검사에 적절한 검체임을 확인한 후 다시 원심분리 하였다. 그리고 동일한 방법으로 APTT 검사를 시행한 후 처음 검사 결과와 재검한 검사 결과를 비교하였다. 처음 APTT 검사 결과는 남성의 경우 19.2 ± 1.1 초, 여성은 19.5 ± 0.5 초이었고 원심분리한 후 재검한

Table 1. Characteristics of study subjects

| Variables | Male (n=48) | Female (n=78) |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| Age (years) | 61.7 ± 15.7 | 64.1 ± 14.8 |
| Platelet ($10^3/\mu\text{L}$) | 232 ± 15.7 | 223 ± 73.3 |
| PT (sec) | 10.6 ± 0.8 | 10.7 ± 0.9 |
| APTT (sec) | 19.2 ± 0.6 | 19.3 ± 0.5 |

Mean±standard deviation.

Table 2. Comparison of retested APTT result of same sample

| Variables (test) | Male (n=20) | Female (n=20) |
|------------------|----------------|----------------|
| 1st (sec) | 19.2 ± 1.1 | 19.5 ± 0.5 |
| 2nd (sec) | 20.2 ± 2.5 | 20.4 ± 2.4 |
| p -value | 0.007 | 0.024 |

Mean±standard deviation, $p < 0.05$.

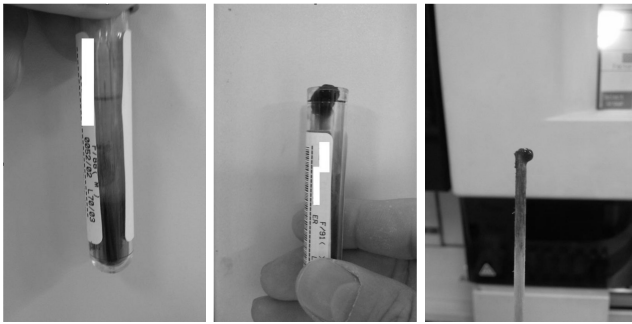


Fig. 1. Aspects of clotted sample. (A) Partial clotting of fibrins. (B) Clot aspect after centrifugation. (C) Clot detection using applicator.

APTT 검사 결과는 남자 19.5 ± 0.5 초, 여자 20.4 ± 2.4 초를 나타내었다. 검체에 관해서 적절한 검체인지 여부를 확인한 후 실시한 APTT 재검 결과는 남녀 모두에서 통계적으로 두 결과 사이에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 2).

3. 연구 대상 검체 중 발견된 부적절한 검체의 응집 형태

APTT 결과가 20초 이하를 보이는 모든 검체에 대하여 육안 검사 및 멧가지를 이용하여 검체의 응집 여부 및 부적절 검체 여부를 확인하였다. 연구 대상이 된 대부분의 검체에서 응집이 확인되지 않았다. 하지만 응집으로 판명된 일부 검체의 응집 형태를 확인한 결과 육안으로 응집이 확인되는 경우도 있었지만 대부분의 경우 멧가지를 이용하여 검체 용기 아래쪽에 가라앉은 미세한 응집을 주의 깊게 확인해야만 검체의 응집 여부를 찾아낼 수 있었다(Fig. 1).

4. 연구 대상 중 응고된 검체의 재채혈 후 실시한 APTT 검사 결과 비교

APTT 검사 결과가 20초 이하를 보이는 전체 126개의 검체 중 응집이 확인된 검체는 모두 18개 검체였고 이는 전체 연구 대상 검체의 14.3%에 이르렀다. 미세한 응집이 확인된 처음 검체의 APTT 검사 결과는 19.2 ± 2.5 초를 보였고 다시 채혈한 후 실시한 APTT 검사 결과는 22.8 ± 2.4 초를 나타내었다. 동일인에 대해 재채혈 후 실시한 APTT 검사 결과는 미세한 응집이 확인된 처음 검체의 APTT 검사 결과와 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 3).

고 찰

APTT 검사에서 본원 참고치(20.6초) 이하의 검사 결과를 보이는 검체들에 대해서 모두 재검사 및 재채혈한 후 결과를 보고해야 하는지에 대한 결론을 얻기 위해 2012년 3월부터 2012년 12월까지 본원 응급검사실에 의뢰된 응고검사 검체중 APTT 결과가 20초

Table 3. Comparison of resampled APTT result of same subject

| Sample | APTT result (sec) (n=18) |
|------------------|--------------------------|
| Clotted sample | 19.2 ± 2.5 |
| Resampled sample | 22.8 ± 2.4 |
| p value | 0.000* |

Mean \pm standard deviation.

* $p < 0.001$.

이하를 나타내는 126명의 환자 검체를 대상으로 검체 분석을 실시하였다.

검체 분석 기기로 사용된 CA-7000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan)은 응고법, 발색 기질법과 비탁 면역법 등의 측정원리가 통합되어 있으며 시약과 검체에 대한 전용 파이프가 분리되어 교대로 자동으로 분주됨에 따라 검사 소요시간 단축 및 여러 종류의 검사 항목이 동시에 검사 가능한 장비이다(Matsuo 등, 1999). 또한 원심분리 후 마개 제거없이 바로 검사가 가능하도록 한 cap-piercing 시스템을 적용하여 검사자의 손목 관절 상해 예방 및 검사실 검사자의 안전을 향상시켰고 조작이 쉽고 간편하며 검사실 자동화 시스템과의 연계도 용이한 기기로 알려져 있다(이 등, 2001). CA-7000에서 APTT 검사 측정은 light scattering 법과 percent detection for coagulation end point determination 법에 기초를 두고 있다. 검체에 시약이 첨가된 직후의 혼합물로부터의 산란광을 기준으로 응고반응이 진행됨에 따라 혼합물은 혼탁해지고 혼합물로부터의 산란광은 증가하게 된다. 이 혼합물 혼탁도의 변화에 따른 산란광의 변화량을 측정하는 것이 빛 산란 측정법이다. Percent detection for coagulation end point determination 법에서 percent detection 값은 선택적으로 설정된 2~80% 사이에서 단위시간당 산란된 빛의 양이 크고 일정한 변화를 보이며 응고반응이 가장 활성화되는 50% 검출지점을 표준으로 응고시간이 결정된다. CA-7000은 결과가 보고범위 밖에 있는 경우 'Range Over (short time) error'라는 메시지로 분석 결과가 보고범위 밖에 있음을 나타낸다. 이 메시지는 기기의 50% 검출지점의 응고시간이 최소한의 보고시간보다 짧은 경우를 나타내며 대개 결과로 보고되지 않지만 PT < 7초, APTT < 15초임을 나타낸다고 한다. 또한 이 메시지는 시약이 오염되었거나 장비 유지가 잘 되지 않았을 때 나타날 수도 있다고 한다(Toshikazu와 Shigemi, 1997).

하지만 본원에서 분석된 응고검사 결과에서 PT < 7초, APTT < 15초 이하의 결과를 보이는 경우는 PT, APTT 검사 항목 모두에서 단 한건도 발견되지 않았다. 따라서 기기나 시약의 이상으로 인해 APTT 검사 결과가 단축되지는 않았음을 알 수 있다. APTT 검사 결과가 단축되는 또 다른 이유로 선천적으로 응고인자가 많은 사람, 일부나마 혈전증의 경향이 있는 사람일 때 나타나기도 하고 사람이

극심한 스트레스를 받는 경우에도 혈액응고가 촉진되기도 한다고 한다. 한편 응고검사 검체속에 부분적인 응고가 있거나 혈액과 항응고제의 비율이 맞지 않는 경우, 정해진 sodium citrate 이외의 항응고제를 사용한 경우에도 응고검사 결과에 오류를 초래할 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 20초 이하의 검사 결과를 보이는 검체에서 부적격 검체로 확인된 경우 아주 미세한 부분적인 응집이 발견되었다. 이들 검체의 처음 APTT 검사 결과는 19.2 ± 2.5 초이었고 다시 채혈한 후 실시한 결과는 22.8 ± 2.4 초로 통계적으로 두 결과 사이에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(* $p < 0.001$). 따라서 혈액응고 검사시 정확한 검사를 위해서는 검체를 원심분리 후 기기에 분석을 시행하기 전에 우선 검체에 대한 세심한 단계의 부적격 검체 여부 확인이 필요하다고 생각된다. 응고 검체에 응집이 없음을 확인한 후 동일 검체에 대하여 재검을 실시하였을 때 APTT 검사 결과는 남자의 경우 처음 결과는 19.2 ± 1.1 초, 재검시 20.2 ± 2.5 초, 여자의 경우 처음 결과는 19.5 ± 0.5 초, 재검시 20.4 ± 2.4 초를 나타내었으며 처음과 재검한 결과 사이에는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 이는 재검 검체중 몇 개의 검체의 경우 본 연구를 위해 야간 당직 근무시 이전 근무자가 분석 후 보관된 검체중 해당 검체를 찾아서 하루 혹은 이틀 방치된 검체로 재검사를 실시한 것이 동일 검체이지만 검사 결과가 유의한 차이를 보이며 연장된 것으로 생각된다. APTT 검사 결과의 경우 채혈 후 4시간 이내에 검사를 실시하는 것이 가장 바람직하며 검체를 방치하여 분석이 지연되면 APTT 검사 결과가 연장되는 경향이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 Beckala 등(1978)과 Lewis와 Verwilghen (1993)에 의하면 분석한 검사 결과의 변이계수 값이 일내 정확도(within-day precision)의 경우 3% 이하, 일간 정확도(between-day precision)의 경우 5% 이하이면 정확도는 양호한 것이라고 하였다.

본 연구를 통해서 APTT 검사에서 본원 참고치(20.6초) 이하의 검사 결과를 보이는 검체들의 경우 모두 다시 채혈한 후 검사를 실시하고 결과를 보고하는 것보다는 우선 검체가 적절한지 여부를 세심하게 확인하는 것이 무엇보다도 중요하며 응집이 보이지 않고 재원심 후 검체를 분석했을 때 응고 검사 결과가 재검 허용범위 내의 차이를 보일 경우 처음 결과를 보고해도 무방하며 검체를 다시 채혈해서 재검사할 필요가 없다는 결론을 얻었다. 따라서 전체 126개의 검체 중 응집이 확인된 18개 검체의 경우처럼 결과에서 유의한 차이를 보이는 응집이 확인된 검체에 한해서만 재채혈한 후 검사 결과를 보고하는 것이 바람직하다고 생각된다. 이는 검사 결과 보고시간의 단축뿐만 아니라 환자의 재채혈에 의한 고통, 채혈자 및

검사자의 격무도 함께 줄일 수 있을 것으로 생각된다. 한편 검사중에 나타나는 분석 기기의 메시지 중에서 'Early reaction'에 의한 참고치 이하 APTT 결과를 보이는 검체에 대해서는 반드시 검체의 응집 여부에 대한 확인이 필요하다. 분석중 위의 메시지를 보인 대부분의 검체들에서 응집이 발견되지 않았지만 검체가 응집을 보인 경우(1건)도 있었다. 한편 미세한 응집이 발견되었음에도 불구하고 검사 결과가 연장되지 않고 참고치 이하의 APTT 검사 결과를 보이는 경우 어떤 현상에 의해서 APTT 검사 결과의 단축이 일어나는지에 관해서는 앞으로 확인이 필요한 과제라 하겠다.

본 연구 결과의 제한점으로 연구자의 야간근무 주기와 본원 참고치 이하 검사 결과를 보이는 검체 확보의 어려움으로 인해 재검 검체중 하루 혹은 이틀 전의 검체로 재검한 경우도 있었는데 이는 Table 2의 APTT 재검 결과가 연장된 원인중의 하나가 될 수도 있다고 생각한다.

참고문헌

- Ambrus JL, Schimert G, Lajos TZ, Ambrus CM, Mink IB, Lassman HB, et al. Effect of antifibrinolytic agents and estrogens on blood loss and blood coagulation factors during open heart surgery. *J Med.* 1971, 2:65-81.
- Beckala HR, Levelle DE, Didisheim P. Comparison of five manually operated coagulation instruments. *Am J Clinical Pathol.* 1978, 70: 71-75.
- Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc.* 2007, 82:864-873.
- Lewis SM, Verwilghen RL. Quality assurance in hematology. 1st ed, 1993, p113-143. Korea Medical.
- Marlar RA, Bauer PJ, Endres-Brooks JL, Montgomery RR, Millparer CM, Schanen MM. Comparison of the sensitivity of commercial APTT reagents in the detection of the mild coagulopathies. *Am J Clinical Pathol.* 1984, 82:436-439.
- Matsuo N, Kurosaki T. Overview of the Sysmex CA-7000 automated coagulation analyzer. *Sysmex J Int.* 1999, 9:170-174.
- Prasad RN, Koh SC, Viegas OA, Ratnam SS. Effect on hemostasis after two-year use of low dose combined oral contraceptives with gestodene or levonorgestrel. *Clin App Thromb Hemost.* 1999, 51: 60-70.
- Suchman AL, Griner PF. Diagnostic uses of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time. *Ann Intern Med.* 1986, 104:810-816.
- Kasai T, Motoi S. Principles of analysis by the automated coagulation analyzer CA-6000™. *Sysmex Journal International.* 1997, 7:43-45.
- 이유경, 이용화, 장철용, 임미선, 임병진. 자동응고분석기 CA-1500과 CA-7000의 평가. *임상 병리와 정도관리.* 2001, 23:253-258.