

第三章：实验室诊断与监测

Steve Kitchen, Francisco de Paula Careta, Silmara A. de Lima Montalvão, Emna Gouider, Radoslaw Kaczmarek, Claude T. Tagny, Pierre Toulon, Glenn F. Pierce, Alok Srivastava

建议

3.1 | 介绍

建议 3.1.1

WFH 建议，血友病的诊断和监测必须由具有凝血实验室测试知识和经验的工作人员使用经过验证的专用血检设备和试剂进行。

• **备注：** WFH 实验室手册描述了血友病的诊断和监测的实验室检查详情

。 **CB**

3.2 | 凝血实验室检查

建议 3.2.1

在准备采集血液样本以测定凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 或 FVIII/FIX 活性方面，WFH 建议血友病患者应保持正常饮食，抽血前不需禁食。

• **备注：** 当使用光学凝血计时，血浆中高水平的脂质可能会影响凝血时间的测定。 **CB**

建议 3.2.2 :

在准备采集血液样本以测定 APTT 或 FVIII/FIX 活性时，

WFH 建议血友病患者在抽血前避免剧烈运动。

• **备注：** 剧烈运动或压力可暂时使轻度 A 型血友病患者 FVIII 活性升高至参考值范围；因此，患者应在静脉穿刺前休息几分钟。

CB

建议 3.2.3 :

对于 A 型和 B 型血友病的诊断和监测，WFH 建议，应立即为血液样本贴上标签，注明患者的姓名、身份证号码或出生日期以及标本采集日期和时间。这一步应该在离开患者之前完成。

• **备注：** 对于在采血前还是采血后立即对试管贴标签，

目前还没有达成共识。 **CB**

建议 3.2.4 :

WFH 建议，用于测定 PT、APTT 或 FVIII/FIX 活性的血液样本应收集在含有 0.105-0.109M (约 3.2%) 柠檬酸三钠水溶液的柠檬酸管中，在处理过程中盖好，并在运输和存储过程中保存在 18-25°C 条件下。血液样本应在室温下至少以 1700 g 离心至少 10 分钟，并在采集后 8 小时内进行分析 (FVIII:C 需 4 小时) 或在 -35°C 或更低的温度下储存。

• **备注：** 应避免在 2-8°C 保存柠檬酸盐全血样本，因为这可能导致失去 FVIII 活性。

• **备注：** 在测定 FVIII/FIX 活性之前，贫血小板血浆 (PPP) 样本可在 -35°C 保存 3 个月，在 -70°C 保存 6 个月。将 PPP 储存在 -20°C 通常不够。在测定 PT、APTT 或 FVIII/FIX 活性之前，不应使用具有自动除霜功能的冷冻室来存储 PPP。 **CB**

建议 3.2.5 :

WFH 建议，如果用于测定 PT、APTT 或 FVIII/FIX 活性的血液样本的采样管中包含的 PT、APTT 或 FVIII/FIX 活性低于目标填充体积的 80%，则应作废并更换。

• **备注：** 如果采样管包含其目标填充体积的 80% 到 90%，使用某些方法获得的结果可能会导致 PT 和 APTT 的人为延长和 FVIII/FIX 活性的人为减少。 **CB**

建议 3.2.6 :

WFH 建议，如果在用于测定 APTT 或 FVIII/FIX 活性的血液样本的采集和处理过程中发生了体外溶血或凝血，则应作废并更换。

• **备注：** 体外溶血对 PT 的影响不足以影响患者管理。

• **备注：** 可以接受和检测从体内溶血患者中采集的用于检测 PT、APTT 或 FVIII/FIX 活性的样本。 **CB**

第三章：实验室诊断与监测

建议 3.2.7：

对于临床怀疑患有 A 型血友病的患者进行的实验室检查，WFH 建议还应使用含有人体组织因子的实验室试剂进行凝血酶原时间检测。

• **备注：** 尽管临床怀疑存在 A 型血友病，但有时也会被排除。这类病例可能有其他因子缺陷。某些 FVII 缺陷患者可能出现类似于轻度血友病的症状，但如果实验室试剂中含有非人组织因子，PT 和 FVII 活性可能正常，从而漏诊。CB

建议 3.2.8：

对于因临床怀疑血友病而被评估的患者进行实验室检查时，WFH 建议不要使用参考范围内的 APTT 结果来排除轻度 A 或 B 型血友病存在。

• **备注：** 在一些轻度 A 或 B 型血友病的病例中，APTT 可能在正常范围内。CB

建议 3.2.9：

WFH 建议，对于包含患者和混合正常血浆的等体积混合物的样本，如果在混合物制备后立即进行分析，那么在该样本中获得的正常范围内的 APTT 结果不应用于排除 FVIII 抑制物存在的可能性。

• **备注：** 如果患者样本含有中性抗 FVIII 抑制物，则在 37°C 孵育 1 至 2 小时后，患者和正常血浆等体积混合物的 APTT 会显著延长。CB

建议 3.2.10：

对于临床怀疑为 A 型血友病的患者进行实验室检查，WFH 建议在初始诊断检查中同时使用一步 FVIII 分析和显色 FVIII:C 分析。

• **备注：** 即使两种分析之一显示 FVIII 活性在正常范围内，也应进行两种检测。

• **备注：** 一步 FVIII 分析需要使用缺乏 FVIII 的血浆，其中 FVIII 活性低于 1 IU/dL (<1%)，其他凝血因子的水平正常，它们可影响 APTT（纤维蛋白原，FII、FV、FIX、FX、FXI、FXII、前激肽释放酶和 HMWK）。CB

建议 3.2.11：

对于临床怀疑为 B 型血友病的患者进行的实验室检查，WFH 建议在初始诊断检查中使用一步 FIX 分析。

• **备注：** 目前的数据还不足以对显色 FIX 分析在 B 型血友病的初步诊断检查中所起的作用提出建议。

• **备注：** 一步 FIX 分析需要使用缺乏 FIX 的血浆，其中 FIX 活性小于 1 IU/dL (<1%)，其他凝血因子水平正常，它们可影响 APTT（纤维蛋白原、FII、FV、FVIII、FX、FXI、FXII、前激肽释放酶和 HMWK）。

。CB

建议 3.2.12：

对于一步或显色 FVIII/FIX 分析，用于校准的参比/标准血浆（无论是市售还是当地制备的）必须可溯源至 WHO 国际标准，结果应以国际单位 (IU) 报告。

• **备注：** 结果应以 IU/mL 或 IU/dL 报告。

• **备注：** 原则上，只有当活性不能追溯至 WHO 国际标准的混合正常血浆作为参比血浆进行分析时，百分比才是合适的活性单位。CB

建议 3.2.13：

对由于使用一步 FVIII/FIX 分析时临床怀疑血友病而进行的实验室检查，

WFH 建议使用 3 种不同稀释度的检测血浆样本进行分析。

• **备注：** 采用平行线分析方法对试验结果与标准血浆稀释度进行比较。一种评估方法是使用公式 $CV = ([\text{标准差} / \text{平均值}] \times 100)$ 计算 3 个结果的变异系数 (CV)。如果 3 个结果的 CV 小于 15%，则应报告 3 个结果的平均值。如果 CV 大于 15%，

则应仔细检查结果。如果存在针对特定凝血因子或狼疮抗凝剂的病理抑制物，可能会干扰某些一步 FVIII 和 FIX 分析。一些治疗性抗凝剂也能表现出这种干扰作用。在所有这些情况中，因子活性在分析中随着血浆的不断稀释而增加。当血浆稀释更少时，因子活性被低估，当检测血浆稀释更多时，活性结果更准确。CB

建议 3.2.14：

在出现狼疮抗凝物的人群中，WFH 建议使用对狼疮抗凝物不敏感的 APTT 试剂进行一步 FVIII/FIX 分析。CB

第三章：实验室诊断与监测

建议 3.2.15：

对于所有一步 FVIII/FIX 分析，只有在校正曲线范围内的试验样本稀释物的凝血次数才应用于计算待测样本中的 FVIII/FIX 活性。

• **备注：**当分析来自中度或重度 A 或 B 型血友病患者的检测样本时，可能需要延长或额外的校准曲线。在不分析参比/校准血浆的额外稀释液的情况下，不可以通过外推的方法来延长校准曲线。**CB**

建议 3.2.16：

对于所有类型的 FVIII 和 FIX 分析，应在每批分析样本中添加一个内部质量控制 (IQC) 样本。只有在确认 IQC 结果在该材料的目标范围内后，才应将结果用于患者管理。

• **备注：**WFH 实验室手册中说明了如何设置 IQC 材料的目标范围以及如何处理 IQC 超出范围的结果。**CB**

建议 3.2.17：

对于 FVIII/FIX 活性在 50-150 IU/dL 范围内的内部质量控制样本，分析间变异系数应小于 10%。

• **备注：**一些研究表明，使用存储的校准曲线比使用与患者样本共同生成的新校准曲线具有更高的分析间 CV。**CB**

建议 3.2.18：

为了监测使用 FVIII 或 FIX 浓缩物的替代治疗，WFH 建议实验室使用经验证可与特定浓缩物共同用于治疗 FVIII/FIX 分析。

• **备注：**这一建议对于 FVIII 和 FIX 的改良分子形式尤为重要。**CB**

建议 3.2.19：

为了监测血浆源性 FVIII 浓缩物的替代治疗，WFH 建议使用通过可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一步或显色的 FVIII 分析。**CB**

建议 3.2.20：

为了监测含有全长重组 FVIII 的凝血因子浓缩物的替代治疗，WFH 建议使用通过可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一步或显色的 FVIII 分析。**CB**

建议 3.2.21：

为了监测 efmoctocog alfa (重组 FVIII 与人免疫球蛋白 G1 融合 [rFVIII_h]; Elocta[®]/Eloctate[®]) 替代治疗，WFH 建议使用通过可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一步或显色的 FVIII 分析。**CB**

建议 3.2.22：

为了监测 turoctocog alfa pegol (带有位点特异性 40 kDa 聚乙二醇基团的重组 B 结构域截断 FVIII [N8-GP]; Esperoct[®]) 替代治疗，WFH 建议使用经验证的试剂进行显色 FVIII 分析或基于 APTT 的一步 FVIII 分析，包括通过可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一些鞣花酸活化剂试剂 (Actin[®]、Actin[®]FS、SynthAFax[™]、DG Synth[™]) 和一些硅活化剂试剂 (pathrtin[®]SL、SynthASil[™])。

• **备注：**APTT-SP[™]、STA[®]-PTT Automate 或 TriniCLOT[™] APTT HS 试剂的一步 FVIII 分析明显低估了 N8-GP 的实际 FVIII 活性，因此不应使用。**CB**

建议 3.2.23：

用于监测 damoctocog alfa pegol 替代治疗 (与位点特异性 60 kDa 支链聚乙二醇基团的重组 B 结构域缺失 FVIII [BDD-rFVIII]; Jivi[®])，WFH 建议使用经验证试剂的显色 FVIII 分析或基于 APTT 的一步 FVIII 分析，包括经可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的鞣花酸活化剂试剂 Actin[®]FSL 和一些硅活化剂试剂 (Pathromtin[®]SL、SynthASil[™])。

• **备注：**用鞣花酸活化剂 Actin[®]FS 或高岭土活化剂 C.K. Prest[®] 进行的一步 FVIII 分析明显高估了 FVIII 的实际活性，因此不应使用。APTT-SP[™]、STA[®]-PTT Automate 试剂的一步 FVIII 分析明显低估了实际 FVIII 活性，因此不应使用。**CB**

第三章：实验室诊断与监测

建议 3.2.24：

为了监测 rurioctocog alfa pegol

（全长重组 FVIII 与非位点特异性 20 kDa 聚乙二醇；Adynovate®/Adynovi®）的替代治疗，WFH 建议需要进行更多的实验室分析研究，才能告知有关实验室监测的建议。

• **备注：**评估在含有 rurioctocog alfa pegol 的样本中使用一步和显色 FVIII 分析的文献中存在相互矛盾的结果。CB

建议 3.2.25：

为了监测 lonoctocog alfa（单链重组 FVIII [rVIII-SingleChain]；Afstyla®）的替代疗法，

WFH 建议使用经可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的显色 FVIII 分析

• **备注：**产品特性总结建议使用显色分析。它还指出，与显色分析结果相比，一步 FVIII 分析结果低估了约 45% 的 FVIII 活性水平，并建议如果使用一步分析，结果应乘以 2 倍。CB

建议 3.2.26：

为了监测血浆源性 FIX 浓缩物的替代治疗，WFH 建议使用通过可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一步或显色的 FIX 分析。CB

建议 3.2.27：

为了监测含有未改良重组 FIX 的凝血因子浓缩物的替代治疗，WFH 建议使用通过可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一步 FIX 分析。

• **备注：**据报告，显色 FIX 分析低估了重组 FIX 浓缩物的 FIX 活性。CB

建议 3.2.28：

为了监测 eftrenonacog alfa（与人类免疫球蛋白 G1 [rFIXFc] 融合的重组 FIX；Alprolix®）的替代疗法，WFH 建议使用经验证试剂的显色 FIX 分析或基于 APTT 的一步 FIX 分析，包括经可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一些鞣花酸活化剂试剂（Actin®、Actin® FS、Actin® FSL）、一些硅活化剂试剂（Pathromtin® SL、SynthASil™）和多酚活化剂试剂（Cephascreen®）。

• **备注：**使用 STA®-PTT Automate 或高龄土活化剂(C.K. Prest®) 试剂的一步 FIX 分析严重低估了实际 rFIXFc (Alprolix®) 的活性，因此不应使用。CB

建议 3.2.29：

为了监测 albutrepenonacog alfa

（与重组人白蛋白融合的重组 FIX [rFIX-RFP]；Idelvion®），WFH 建议使用经验证试剂的基于 APTT 一步 FIX 分析，包括使用可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的一些硅活化剂试剂（Pathromtin® SL, SynthASil™）。CB

• **备注：**用鞣花酸活化剂 Actin®FS 或使用高龄土活化剂 C.K. Prest®的一步 FIX 分析明显低估了实际 rFIX-RFP (Idelvion®) 活性，因此不应使用。使用鞣花酸活化剂 SynthAFax™ 试剂的一步分析或显色 FIX 分析显著高估了实际 rFIX-RFP (Idelvion®) 活性，因此不应使用。CB

建议 3.2.30：

为了监测 nonacog beta pegol（有 40-kda 的聚乙二醇基团的重组 FIX

[N9-GP]；Refixia®/Rebinyn®）的替代疗法，WFH 建议使用经验证试剂的显色 FIX 分析或基于 APTT 的一步 FIX 分析，包括经可溯源至 WHO 国际标准的血浆标准校准的鞣花酸活化剂 SynthAFax™ 或多酚活化剂 Cephascreen®。

• **备注：**大多数一步 FIX 分析明显高估或低估了 N9-GP 的实际 FIX 活性，因此不应使用。使用鞣花酸活化剂 SynthAFax™ 或多酚活化剂 Cephascreen® 的一步分析，适用于监测 N9-GP 治疗。CB

第三章：实验室诊断与监测

建议 3.2.31：

对于需要确认预期 emicizumab 水平的接受 emicizumab 治疗患者，WFH 建议使用改良一步分析，包括使用试验血浆进行额外的血浆稀释前步骤和使用特定的 emicizumab 校准品进行分析校准。

• **备注：**即使在亚治疗水平的 emicizumab，APTT 在有或没有抑制物的重度 A 型血友病患者中可能正常或低于正常。CB

建议 3.2.32：

为了测定接受 emicizumab 的 A 型血友病患者的 FVIII 活性，WFH 建议使用含牛 FX 的显色 FVIII 分析。

• **备注：**在治疗水平方面，emicizumab 影响任何含人源 FX 的显色 FVIII 分析。Emicizumab 也可能影响含人源的 FIXa 和牛源 FX 的显色 FVIII 分析，但仅在 Emicizumab 水平高于接受建议剂量患者的预期水平才影响。CB

建议 3.2.33：

为了测定接受 emicizumab 的患者的 FVIII 抑制物活性，WFH 建议使用含牛源 FX 的显色 FVIII 分析。CB

建议 3.2.34：

对于疑似具有中和抗 emicizumab 抗体的患者，WFH 建议使用改良一步分析测量 emicizumab 水平，包括使用试验血浆进行额外的稀释前步骤和使用特定的 emicizumab 校准品进行分析校准。

• **备注：**如果可行，经验证的抗药物抗体分析也可用于此目的。CB

建议 3.2.35：

对于含有大于 5 IU/dL FVIII 活性的样本中抗 FVIII 抑制物的测定，WFH 建议在检测之前，应将样本加热到 56°C 30 分钟，并在室温下至少以 1700 g 离心至少 5 分钟。

• **备注：**Nijmegen-Bethesda FVIII 抑制物的定量限约为 0.6 BU/mL。

• **备注：**Nijmegen-Bethesda FVIII 抑制物分析需要使用缓冲的混合正常血浆作为 FVIII 的来源，然后将其与等量的缺少 FVIII 血浆混合以制备对照混合物。CB

建议 3.2.36：

对于含有大于 5 IU/dL FIX 活性的样本中抗 FVIII 抑制物的测定，WFH 建议在检测之前，应将样本加热到 56°C 30 分钟，并在室温下至少以 1700 g 离心至少 5 分钟。CB

建议 3.2.37：

对于抗 FVIII 抑制物的定量，WFH 建议使用 Nijmegen-Bethesda 分析。

• **备注：**Bethesda 分析检测中和抗体。一小部分抗 FVIII 抗体是非中和性的，缩短了输注 FVIII 的半衰期，无法通过 Bethesda 分析检测到。

• **备注：**Nijmegen 调节描述了一种缓冲混合正常血浆的特定方法；其他的缓冲方法可能合适。CB

建议 3.2.38：

对于 FVIII 和 FIX 抑制物的定量，WFH 建议仅使用对照混合物中 FVIII/FIX 25% 至 75% 的残留 FVIII/FIX 活性来计算抑制物浓度。

• **备注：**当残留 FVIII/FIX 活性接近对照混合物水平的 50% 时，可以获得最准确的抑制物结果。CB

建议 3.2.39：

对于低滴度抗 FVIII 抑制物 (<2 BU/mL) 的定量，WFH 建议使用显色 Nijmegen-Bethesda FVIII 分析测定残留 FVIII 活性。

• **备注：**如果不存在抑制物时报告了假阳性抑制物，使用显色 Nijmegen-Bethesda FVIII 分析代替一步 FVIII 分析，增加了特异性，并减少了残留 FVIII 分析中潜在变异性，导致结果被低估。CB

第三章：实验室诊断与监测

建议 3.2.40：

- 为了定量基因转移受体中的 FVIII 活性，WFH 建议需要进行更多的研究来确定显色和一步分析在预测止血保护方面的相对准确性。
- **备注：**就多个 FVIII 转基因产品，一步分析似乎持续出现，大约是用显色分析 1.6 倍的 FVIII 活性结果。对于血浆和重组 FVIII 特异性活性和临床反应的相关性，可能需要准确测定受者的 FVIII 活性。
。CB

建议 3.2.41：

- 为了定量基因转移受体中的 FVX 活性，WFH 建议需要进行更多的研究来确定显色和一步分析在预测止血保护方面的相对准确性。
- **备注：**FIX Padua (R338L) 因比天然 FIX 的活性更高而被用于 FIX 基因治疗。一步分析似乎持续出现大约是用显色分析 1.6 倍的 FIX Padua 活性结果。为了准确测定接受者的 FIX Padua，需要血浆和重组 FIX 特异性活性的相关性。CB

3.3 | 使用正确的设备和试剂

建议 3.4.1：

WFH 强烈建议凝血实验室对所有实验室系统实施质量保证方案，以确保质量依从性、实验室血液检测程序的可靠性以及诊断和治疗血友病的报告的可靠性。CB

建议 3.4.2：

对于止血筛查试验，WFH 建议至少每天对所有试验批次使用至少两级内部质量控制样本（正常和异常血浆样本）进行内部质量控制。CB

建议 3.4.3：

WFH 强烈建议临床实验室定期参与

用于血友病诊断和治疗的每种分析的外部质量评估。

- **备注：**实验室参与 WFH 国际外部质量评估计划 (IEQAS) 能够改进血友病实验室检测并制定标准。CB

CB, 基于共识; PT, 凝血酶原时间; APTT, 活化部分凝血活酶时间; PPP, 贫血小板血浆; IQC, 内部质量控制。

第 6 页, 共 6 页