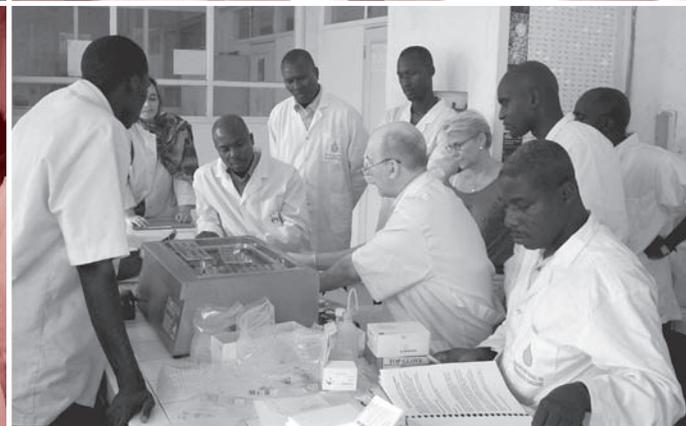


血友病和其它出血 性疾病诊断

实验室手册
第二版



Steve Kitchen
Angus McCraw
Marión Echenagucia

WORLD FEDERATION OF
HEMOPHILIA
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOFILIE
FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA
Treatment for All



世界血友病联盟(WFH)出版。

© 世界血友病联盟, 2010

WFH 鼓励非营利性血友病的组织颁发用于教育的WFH的出版物。

如需获得再版或翻译本出版物,请通过下列地址与通讯部联系。

可从世界血友病联盟的网站 www.wfh.org 下载本出版物。

也可通过下列联系方式获得其他出版物:

World Federation of Hemophilia
1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010
Montréal, Québec H3G 1T7
CANADA
Tel.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916

E-mail: wfh@wfh.org
Internet: www.wfh.org

血友病和其它出血性疾病诊断

实验室手册

第二版

Steve Kitchen

WFH Laboratory
Training Specialist
Sheffield Haemophilia
and Thrombosis Centre
Royal Hallamshire
Hospital
Sheffield, U.K.

Angus McCraw

WFH Laboratory
Training Specialist
Katharine Dormandy
Haemophilia Centre
and Thrombosis Unit
The Royal Free Hospital
London, U.K.

Marión Echenagucia

(co-author, Automation)
Banco Municipal
de Sangre del D.C.
Universidad Central
de Venezuela
Caracas, Venezuela

责任

WFH 实验室科学委员会

主席 (2010 年) : Steve Kitchen, Sheffield, U.K.

副主席: Sukesh Nair, Vellore, India

此版本经下列人员审核, 在编写本手册时他们为世界血友病联盟实验室科学委员会成员:

Mansoor Ahmed

Norma de Bosch

Ampaiwan Chuansumrit

Marión Echenagucia

Andreas Hillarp

Clarence Lam

Sukesh Nair

Alison Street

Alok Srivastava

其中部分章节又得到了世界血友病联盟血管性血友病和罕见出血性疾病委员会成员的审核。

致谢: 本文中介绍的几种方法以谢菲尔德血友病中心 Annette Bowyer 起草的实验室标准操作规程为基础。因此, 在此对其贡献表示感谢。

本书作者及 WFH 衷心感谢王学锋教授, 丁秋兰和戴菁医生 (上海交通大学医学院附属瑞金医院) 对该书中文翻译版本的认真校准。

警示事项: 如果本手册涉及商业来源的数据, 编写时仅作为示例。并不代表世界血友病联盟 (WFH) 作者或 WFH 实验室科学委员会给予了认可。也决不表示其它来源不可靠或不合适。实验室测试中提供材料的制造商可能已改变材料的成分。因此, 在编写时涉及的商业来源在将来是否可靠并不清楚。

作者联系信息

steve.kitchen@sth.nhs.uk

amccraw@nhs.net

目录

1. 实验室设备.....	1
2. 移液枪和称重天平的校准.....	3
3. 实验室安全.....	5
4. 样本采集和分析前变量.....	10
5. 室内质量控制和室间质量评估.....	13
6. 手动倾斜试管技术.....	18
7. 正常混合血浆 (PNP) 的制备和校准.....	20
8. 建立正常参考范围.....	22
9. 试剂.....	25
10. 血小板计数.....	27
11. 出血时间.....	31
12. 凝血酶原时间 (PT).....	33
13. 活化部分凝血活酶时间 (APTT).....	36
14. 异常 PT 和 APTT 进一步研究的混合检测.....	40
15. 凝血酶时间.....	43
16. 鱼精蛋白硫酸中和凝血酶时间检测肝素.....	45
17. 爬虫酶时间.....	46
18. 纤维蛋白原 (改良的 CLAUSS 检测法).....	48
19. 血浆中肝素的去除.....	51
20. 纤维蛋白原抗原检测——放射状免疫扩散法 (RID).....	52
21. 凝血因子 XIII 筛查.....	54
22. 凝血因子 II, V, VII 或 X 活性检测——基于 PT 法.....	56

2 3.	FVIII:C, FIX, FXI 或 FXII 一步法检测——基于 APTT	59
2 4.	冷沉淀中的凝血因子 VIII:C 检测	62
2 5.	凝血因子 VIII:C 的两步法凝血检测	63
25.1	两步法因子 FVIII:C 检测所用的混合试剂的制备	64
2 6.	发色底物法 FVIII:C 的检测	67
2 7.	内源性凝血途径一步法检测激肽释放酶原 (PKK) 和高分子量激肽原 (HMWK)	70
2 8.	基于 APTT 的凝血因子抑制物筛查	72
2 9.	瑞斯托霉素辅因子活性/血管性血友病因子活性 (VWF:RCo 或 VWF:Act)	74
29.1	固定血小板制备	76
3 0.	ELISA 法检测血管性血友病因子抗原 (VWF:Ag)	77
3 1.	血管性血友病因子胶原结合试验 (VWF:CB)	79
3 2.	凝血因子 VIII 结合试验诊断 NORMANDY 型血管性假血友病	81
3 3.	VWF 多聚体分析	87
3 4.	FVIII 抑制物的定量检测	95
3 5.	因子 IX 抑制物检测	100
3 6.	凝血因子 XIII 活性检测	101
3 7.	狼疮抗凝物与抗磷脂抗体	104
3 8.	稀释蝰蛇毒素时间 (DRVVT)	106
38.1	DRVVT 所用洗涤血小板的制备	109
3 9.	血小板功能测试	110
39.1.	血块收缩	111
39.2.	血小板聚集试验	112
4 0.	冻干血浆	120
4 1.	血凝仪的评估和使用	122
4 2.	分子遗传分析	128

使用本手册中所述部分或所有技术来诊治出血性疾病的实验室均需要具有基本的设备。注：半自动和全自动血凝仪参照第 41 节所述进行评价和使用。

基本设备：

- 储存试剂的 4°C 冰箱1台
除非制造商另有说明，试剂通常保持在 2°C – 8°C。冰箱需符合国家级质量标准。
- 至少 -35°C低温冰箱1台
对于更长时间的储存，更低的温度是有益的，例如：-70°C。凝血因子在此温度下可至少稳定六个月 (Woodhams 等. 2001)。对于止血检测所用的血浆和试剂,-20°C 的冷冻柜一般尚不能达到储存要求。具有周期性自动除霜功能的冷冻柜不符合要求。
- 调解后温度维持在37°C ± 0.5°C 的水浴箱1台或多台
干热仪可能适合，也可能不适合，这取决于仪器情况。通常，水浴器可较好保持温度。
- pH 值测量仪1个
- 光源灯1个（例如，Anglepoise 灯）
- 秒表1只或多只
- 校准过的能精准地转移 0 μl – 200 μl和1000 μl 之内样品和试剂的自动移液器数个，请务必检查移液器的精确度（参见第 2 节）。
- 校准过的用于转移少于 5 ml 液体的移液器1个
- 可产生至少 1700 g 力的离心机1台
对于大多数凝血分析，在室温下 (20°C – 25°C) 离心是可以接受的。(在有些方法中，建议使用 2500 g，4°C 条件下离心。)
- 能准确测量到克小数点后三位的校准后分析称/天平1台
参见第 2 节的准确性检查程序。

有些检测需要的其它设备，包括：

- 酶联免疫吸附技术 (ELISA)检测所需微孔板阅读器1台

- 血小板聚集仪1台
- 特定方法表上指定的设备。

在温度较高国家，每个房间配备空调系统是一个非常有利的条件。

消耗品供给应充足。应避免重复使用洗涤后的实验检测试管和移液器吸嘴，因为残留物质可对结果有不利影响，从而造成试剂和时间的浪费。

参考文献

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, and Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229–36.

为了帮助质量管理，应每隔 3 至 6 个月校准一次天平和移液枪容量。如果仪器校准失败，应立即停止使用，直到重新校准后再使用。所有移液枪都应有唯一的标识。

检查移液枪标度的方法

- 1 移液枪可能为一种、两种或三种容量，也可有连续的容量范围。
 - 有一个或两个固定设定值的移液器，则对每个设定值进行校准。
 - 有三个固定设定值的移液枪，则对最小和最大设定值进行校准。
 - 对于有连续范围容量设定值的移液枪，校准最大设定值以及最大设定值的 25% 的容量。即：
 - 10 ml 移液枪 - 10 ml 和 2.5 ml
 - 5 ml 移液枪 - 5 ml 和 1.25 ml
 - 1 ml 移液枪 - 1 ml (1000 μ l) 和 0.25 ml (250 μ l)
 - 0.2 ml 移液枪 - 0.2 ml (200 μ l) 和 0.05 ml (50 μ l)
 - 0.1 ml 移液枪 - 0.1 ml (100 μ l) 和 0.025 ml (25 μ l)
 - 50 μ l 移液枪 - 50 μ l 和 15 μ l
- 2 通过在天平上对五次重复相同容量的蒸馏水（室温）称重来检查校准。每次重量都以克记录（精确到小数点后三位）。1.000 ml 重量为 1.000 g。

结果

结果和所采取的任何行动均应予以记录。

当所吸平均容量与实际容量误差超过 10% 表明移液枪不准确，必须立即停止使用，直至按照制造商的说明重新校准后方可再使用。移液器最好精确到误差小于 10%。

注：如果移液枪误差超过以下限值（平均重量），则必须立即停止使用。

- **10 ml 移液枪**
10 ml: 9.000 g - 11.000 g
2.5 ml: 2.250 g - 2.750 g
- **5 ml 移液枪**
5 ml: 4.500 g - 5.500 g
1.25 ml: 1.125 g - 1.375 g
- **1 ml 移液枪**
1 ml: 0.900 g - 1.100 g
0.25 ml: 0.225 g - 0.275 g
- **0.2 ml 移液枪**
0.2 ml: 0.180 g - 0.220 g
0.05 ml: 0.045 g - 0.055 g
- **0.1 ml 移液枪**
0.1 ml: 0.090 g - 0.110 g
0.025 ml: 0.0225 g - 0.0275 g
- **50 µl 移液枪**
50 µl: 0.045 g - 0.055 g
15 µl: 0.013 g - 0.165 g

检查天平的方法

为了确保其精确性，已校准后的重物每隔 6 个月称重一次，并记录重量值。

- 1 将天平归零。
- 2 称重三个校准后的重量，每次一个。记录重量，精确到小数点后三位（例如：1.003 g）。
- 3 如果任何重量超出规定限值（> 2%），在问题得到纠正之前不可使用。

处理化学品和生物样本的实验室是存在潜在危险的地方。

出于健康和环境原因，近年来，业界越来越认识到安全操作规范的重要性。这种意识使安全文件记录、员工培训和风险评估等问题备受重视。

单位责任人有责任提供必要的防护服装和设备，并提供关于安全操作规范的培训。

如果安全操作规范到位，对自己、同事和民众导致严重伤害的概率将大大降低。

安全专员

每个部门必须要任命一名或多名安全专员。这些专员负责介绍和维护安全规程。然而，保证安全是实验室全体工作人员的责任。

安全手册

应该要有一个全面的安全手册，涵盖整个部门安全操作规范的方方面面。

全体工作人员必须阅读该手册并签署一份声明，表明他们已经理解手册内容。

副本应由安全专员保管，还应该放置副本于所有工作人员容易拿到的地方。

安全措施：全面防护措施

全面防护措施系统要求，应通过良好操作规范来避免或最大程度地降低任何来源的感染危险。

所有血液样本、血液制品（包括血浆试剂和试剂盒）以及其他人体标本应视为潜在感染危险。

处理任何材料时，都要采用最充分的防护措施。

不要进行其它风险分类。血液之外的所有体液和材料，无论是为了测试而采集或放入设备，还是为了任何其它目的，均应如处理血液时一样小心。

实验室

实验室应始终保持清洁整齐。文字工作区应与实验室测试区分开。尽量不要在实验室存储大件物品。尽量确保人人都参与维护实验室整洁。

防护服

每个人（包括访客）在进入实验室时，均应穿上实验室工作服。如果工作服受到污染，应立即更换。

一次性手套

很多人不喜欢使用手套，但实验室处理的样本均有潜在危险。在处理有毒材料时应始终戴手套。

手套和工作服显然不能防止针扎意外，但可防止 HIV 阳性血清或毒素与您皮肤上的任何伤口或创口接触。

如果手套破裂或被刺破，务必立即更换。

眼部清洗

许多种感染很容易通过眼睛粘膜接触而感染。

如果可能感染您眼睛的材料进入眼内，请立即用大量冷流水冲洗。

利器

利器（如：针头和碎玻璃）有很大的危险，请使用可容纳利器而不被刺破的容器盛放。

曾有工作人员因针扎受伤而感染的案例。

气溶胶

避免在可能发生微滴或尘埃在空气中飞溅或溢泄的开放型实验室进行任何操作。

产生气溶胶的操作必须在通风橱中进行，并佩戴安全眼镜。

全部溢出物应立即用漂白剂清理，必要时使用中和剂。

有毒和易燃物质

有毒或易燃物质必须放在通风橱或适当的安全箱中。

电子设备

对于接触液体的电子设备，如电泳槽和水浴器，应特别小心。

务必请合格人员对设备进行安装、维护和修理。

个人物品和实验室行为

切勿将个人物品（如：钢笔、包和梳子）带入实验室。

在实验室时，避免双手与脸部或黏膜（眼睛、鼻子和嘴）接触，如果必须要这样做，请一定要事先洗手。

禁止将食品、香烟和化妆品带入实验室。

禁止用嘴吸移液器。

在离开实验室之前要彻底洗净双手。

意外事件

所有意外事件应立即报告，并在安全部门保存的意外事故登记本中记录。尤其是针刺伤一定要记录。在这些情况下，请遵照当地医院体系进行记录和报告，并且遵从当地医院的建议和要求。

危害健康物质控制法 (COSHH)

英国实验室使用的这项法律是确定风险和危害性方面的有用指南。

危害和风险

物质带来的危害是指其潜在的伤害。该物质的风险是指其可能伤害在现行条件下使用该物质的人员。

危害识别

危害识别是风险评估的必要先决条件。不同的物质，认识其危害性所需时间不同。

风险评估

请考虑下列实际情况：

- 危害性
- 使用条件
- 使用量
- 可能的接触途径或部位（吸入、食入、皮肤或眼睛）

风险评估的结果由下列因素确定：

- 贮存条件
- 处理程序
- 丢弃程序
- 监测和卫生监督要求
- 应急程序

风险评估必须每年审核，并在必要时更新。

参见下图 3.1 和 3.2，如何使用 COSHH 程序记录风险评估信息的实例。

此表描述的是确定特定程序中使用设备相关的危害及控制措施。只有能胜任的人才能执行相关程序，并且只有在阅读了相关的健康和安文件后才可执行该程序。

图 3.1. PT 和 APTT 为基础的凝血因子检测 COSHH

COSHH 参考号检测 1

实验室参考一步法 II, V, VII, VIII, IX, X, XI 和 XII 检测

程序/实验名称:

物质	大致量	确定危害
咪唑缓冲液，包括（参见**）	<5 ml	如果食入，则有害。
**咪唑	3.4 g/l	具有腐蚀性：引起烧伤。如果吸入、食入或经皮肤吸收，则有害。对眼睛有刺激。
**氯化钠	5.85 g/l	刺激眼睛和双肺。避免皮肤接触。
乏因子血浆	1 ml	感染风险
凝血活酶	2 ml	风险低
APTT 试剂	2 ml	风险低
0.025M 氯化钙	5 ml	风险低
Owren 缓冲液	<500 ml	含有巴比妥：吞食有害。皮肤接触或吸入可致敏。
凝血分析仪清洗液 1	<50 ml	引起烧伤：对眼睛、皮肤等有害。请勿与其它消毒剂混合。 具有腐蚀性。与可燃物接触可引起火灾。 与酸接触可释放有毒气体。与铵盐有剧烈反应。有机溶剂：有爆炸风险。
凝血分析仪清洗液 2	<50 ml	含 0.16% 盐酸和洗涤剂。具有刺激性：可伤害眼睛和皮肤。
标准/对照/患者的血浆	<1000 µl	有感染风险。

图 3.2.因子 XIII 检测 COSHH

程序/实验名称:

物质	大致数量	确定危害
催化试剂: 牛凝血酶; 凝血抑制剂 (0.01 g 甘氨酸-亲-精氨酸-丙氨酸酰胺); 氯化钙; 海美溴铵 (40 mg); 牛白蛋白; N-二甘氨酸缓冲液 (100M m/l); 和2.5 mg 叠氮钠	5 ml 的小瓶	含有叠氮钠: 如果经皮肤吸收或食入, 则有剧毒。可导致可遗传的基因损伤。与某些金属发生爆炸性反应。
NADH 试剂: 2 mg NADH; 牛血清白蛋白和 2.5 mg 叠氮钠	5 ml 的小瓶	含有叠氮钠: 如果经皮肤吸收或食入, 则有剧毒。可引起遗传性基因损害。与某些金属发生爆炸性反应。
检测试剂: 合成肽; 甘氨酸乙酯 (7 mg); α 酮戊二酸 (13.5 mg); 牛血清白蛋白; HEPES 缓冲液和 5 mg 叠氮钠	5 ml 的小瓶	含有叠氮钠: 经皮肤吸收或食入, 则有剧毒。可导致可遗传的基因损伤。与某些金属发生爆炸性反应。
标准/对照/患者的血浆	<1000 μ l	有感染风险。

4 样本采集和分析前变量

样本采集

一些指南（CLSI 2007, 2008a, 2008b）对止血检测的血样采集和处理过程均有详细描述。

尽可能从肘弯静脉采集静脉血并用止血带协助采血。在采血开始前扎上止血带。成人血样采集使用的针头不应大于 21 号，应使用注射器和/或可快速采集血样的真空采集系统采集血样。将血液轻轻抽入注射器。婴幼儿血样采集需使用 22 或 23 号针头。

静脉穿刺一次成功，但没有快速和顺利抽得的血样一律丢弃，因为这样的血液可能已被激活。血样采集入注射器后，不能经针头回流。应先取下针头，再把血液从注射器转移到抗凝容器中。血样采集后不要耽搁，应立即与抗凝剂混合。

血液和抗凝剂混合后，应密封容器并轻轻上下颠倒五次混匀。避免剧烈震动。有些作者建议最初采集的 5 ml 血液不应该用于止血检测。

如果使用真空采集系统，应注意在血液抽至抗凝剂管后，仍然需要轻轻上下颠倒五次混匀。

血液与浓度为 0.109M（3.2% 枸橼酸钠二水）枸橼酸钠抗凝剂或类似抗凝剂（例如有些真空系统成功使用了 0.105M 枸橼酸抗凝剂）按 9:1 比例混匀。抗凝溶液在 4°C 下最多保存 3 个月，但在使用前应进行检查，如果有颗粒物质则应丢弃——例如污染发生时。样本容器不应引发接触激活（使用塑料或硅化玻璃容器）。如果患者的红细胞压积低于正常，尤其是红细胞压积高于正常，会影响检测结果。抗凝剂容积应根据血浆容积的减少进行调整。下面图 4.1 给出了一个红细胞压积异常的 5 ml 血样所需抗凝剂容积的指南。

另外，0.5 毫升抗凝剂可保持不变，加入的血体量根据红细胞压积有所不同。血液加入量（加入至 0.5 毫升 0.109M 柠檬酸）根据以下公式计算：

$$\frac{60}{100 - \text{红细胞压积}} \times 4.5$$

图 4.1. 红细胞压积异常的样本所需的血液和抗凝剂量

红细胞压积	抗凝剂量	血液量
25%–55%	0.5 ml	4.5 ml
20%	0.7 ml	4.3 ml
60%	0.4 ml	4.6 ml
70%	0.25 ml	4.75 ml
80%	0.2 ml	4.8 ml

离心

血小板功能试验使用的富血小板血浆 (PRP) 由抗凝血在室温下以 150 g – 200 g 离心 10 分钟制备。取上清液，用加塞小瓶在室温下保存，使用期限不得超过两小时。

大多数凝血试验使用乏血小板血浆 (PPP)。血液样本应 1700 g 的速度离心至少 10 分钟。如果室温不超过 25°C 可在室温下离心，超过 25°C 时，应使用低温 (4°C) 离心机。

有些检测要求离心血浆两次。要做到这一点，将第一次离心获得的乏血小板血浆转移至加塞塑料管进行第二次离心。注意不要使用第二次离心后底部血浆，因为其中可能包含第一次离心后残留的血小板。

即刻测试的样本

样本应尽可能在采集后四小时内进行测试。虽然研究表明，室温下保存的全血样本在进行凝血酶原时间测量时具有稳定性 (Baglin 和 Luddington, 1997)，但是在进行筛查试验和凝血因子测定时应避免长时间储存。筛查试验和测定凝血因子 VII 的样本应在室温下保存，以避免可能发生的冷激活作用。

高风险样本

由于存在传染肝炎、HIV 和其它病毒的风险，因此，处理所有血浆样本时应谨慎。

参见第 3 节《实验室安全》。

超低温冷冻血浆

样本可超低温冷冻保存供以后测试之用。储存温度最好为 -70°C 或更低。凝血因子在此温度下可保持稳定至少六个月 (Woodhams, 等. 2001)。对于大多数测试, 可在 -35°C 下短期保存。 -20°C 温度通常不可用于储存样本。如果样本在狼疮抗凝分析之前进行了超低温冷冻, 则应进行两次离心 (参阅以上《离心》一节)。

在检测 APTT 之前尽量避免冰冻和解冻, 因为结果可能受到影响。分析前, 任何冰冻血浆必须立即转移至 37°C 水浴, 浸泡四至五分钟, 并轻轻翻转混匀。应避免在较低温度下缓慢解冻, 否则形成的冷沉淀会降低上清液中的 FVIII:C, VWF, 以及血浆纤维蛋白原的含量。

参考文献

- Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: Approved standard*, 6th ed. 2007; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H3-A6: 27(26).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures and devices for the collection of diagnostic capillary blood specimens: Approved standard*, 6th ed. 2008 (a); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H4-A6: 28(25).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: Approved guideline*, 5th ed. 2008 (b); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H21-A5: 28(5).
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229-36.

质量保证 (QA) 是一个整体术语，用来描述确保实验室检测和报告可靠性所采取的一切措施。包括：测试的选择、患者有效样本的采集、标本分析和结果及时准确的记录、适当情况下对结果的解读以及将这些结果转达给会诊临床医生。

室内质量控制 (IQC) 和室间质量评估 (EQA) (有时称为熟练度验证) 两者不同但互为补充，均为实验室质量保证方案的组成部分。IQC用来确定一段时间内一系列技术和程序是否始终如一地执行，以确保实验室日常活动的一致性。EQA用来确定某个实验室的结果与其它中心获得的结果之间的一致性。

在大型 EQA 计划中，对参与实验室获得的结果进行回顾性分析不仅可识别单个实验室的问题，同时也能发现产生不可靠或误导性结果的试剂和方法。

EQA 去的主要功能是对单个实验室检测进行熟练度测试。世界血友病联盟的 EQA 项目包括对出血性疾病诊断和管理相关的分析 (详细信息请联系 WFH)。本项目中的数据已经在以下参考文献中发表：

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Development of a World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme: results of a pilot study. *Haemophilia* 1996; 2: 4-46

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Laboratory performance of haemophilia centres in developing countries: 3 years' experience of the World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme. *Haemophilia* 1998; 4: 739-746.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the WFH EQA programme 2003-2008. *Haemophilia*. 2009; 15:571-7.

WFH EQA 项目联系信息 (2010)

总监：F. Eric Preston 教授

科学总监：Steve Kitchen 博士

Rutledge Mews 电话：+44-114-267-3300
3 Southbourne Road 传真：+44-114-267-3309
Sheffield 网址：www.ukneqasbc.org
S10 2QN
United Kingdom

大型 EQA 项目可提供关于分析程序（包括方法原理、试剂和仪器）的相对绩效。持续参加 EQA 项目与实验室绩效改进相关。这已不仅体现整体绩效上（由各实验室结果之间可变性减小而得到证实），还体现于单个实验室的绩效。

评估各个实验室的绩效是 EQA 项目的重要组成部分。WFH EQA 项目将参与者的结果与参加英国国家室间质量评估项目（英国 NEQAS）的相同样本在全球 700 个中心分析所得的凝血检测结果进行了比较。

一个实验室得出不理想结果的可能原因有很多。虽然这个原因可能很快显现出来，但是找出潜在问题并不简单。较大的 EQA 项目能够识别涉及试剂差异或方法学差异的特定绩效问题。

完全保密是所有 EQA 项目的重要特征。在上面提到的国际 EQA 中，关于单个实验室绩效的信息不得泄露给除获得书面授权指定部门负责人之外的任何人。

室内质量控制

室内质量控制用来确定一段时间内一系列技术和程序是否始终如一地执行。质量控制一词通常用来描述一系列程序，这些程序用于核查实验室研究结果是否足够可靠以进行公布从而帮助临床决定、治疗监测和止血异常诊断。质量控制程序的运用应可确保对结果的产生进行直接和持续的控制。

在一个实验室环境中，所获质控结果受诸多因素影响，包括：

- 样本采集和处理的正确性
- 合适技术的选择和标准化操作程序的更新
- 可靠试剂和相关材料的使用
- 合适的自动化设备的选择和维护
- 适当记录
- 结果的报告体系

此外，在常规实践中所获质量效果依赖于对称员工的选择、培训和激励。

室内质量控制非常有利于确定某一特定技术的精确度-精确度是指某个样本反复测量后结果的一致性程度。需知道，某项精确技术并不一定准确，准确度是指评估值与真值之间的近似度。

质量控制材料

为了评估某个特定方法的精确度，需要对同一标本反复取样测试分析。同时包括正常值和异常值的质量控制 (QC) 样本，以确保该方法对不同水平值都在质控范围内，

因为在检测异常对照样本时，即使分析过程较小的变化也可能导致结果的较大差异。

对照材料应与测试样本的特性类似，并且同时进行分析。人源质量控制物更有可能接近于人体试验样本。所有瓶与瓶之间或分装的质控物间应一致，以确保测定结果间的差异不是由于质控物的瓶间差异造成的。

QC 物在预期使用期间应该稳定。关于止血测试和检测，血浆样本必须深度冷冻（最好为 -35°C 或更低），或者冻干，以确保其作为 QC 物使用时足够稳定。对于冻干样本复溶，需使用 pH 6.8-7.2 的蒸馏水，并至少复溶五分钟。

如果使用商用 QC 物，则应该根据制造商的说明用准确的移液器进行复溶。如果使用超低温冰冻的 QC 物，则应该在 37°C 下迅速解冻5分钟。在选择 QC 物时，应考虑血源性病毒传播的风险。不应使用高风险QC 物。

在每组筛查测试或检测中应包括至少一种 QC 物。对于筛查测试，最适合的做法可能是在这种方法中加入一种正常的 QC，并每天/每个班次/怀疑怀疑方法是否在质控中时测试一次异常的 QC 物。关于分析两种水平 PT/APTT IQC 问题的解决指南，请参见下图5.1。

图 5.1. IQC 问题解决

PT 水平1 IQC	PT 水平2 IQC	APTT 水平 1 IQC	APTT 水平2 IQC	结论/检查
失控	控制	控制	控制	PT 水平1 IQC物
失控	失控	控制	控制	PT 试剂
控制	控制	失控	控制	APTT 水平1 IQC 材料
控制	控制	失控	失控	APTT 物
失控	失控	失控	失控	仪器

低值 QC 物应进行测试，用于诊断和监测与出血相关的先天性缺陷症。

在所有情况下，对照物均应与测试样本尽可能完全同样地进行操作。由于有些变化必然会发生，导致生物、技术和分析变化。因此，应该记录每次 QC 的结果并评估其范围是否可接受，见如下所述。

可接受的变化范围

对于商品化 IQC，样本的厂商通常提供可接受值的靶范围。在筛查测试和随机检测

时，获得的结果将取决于执行测试所使用的试剂和终点检测系统。靶范围必须考虑到这些影响。如果某个特定的技术没有靶范围，可建立当地的靶范围。

当测试方法已知得到控制（例如，可选 QC 物显示出靶范围内的结果）时，在不同的时间内可反复（最少 10 次）测试 IQC 物。

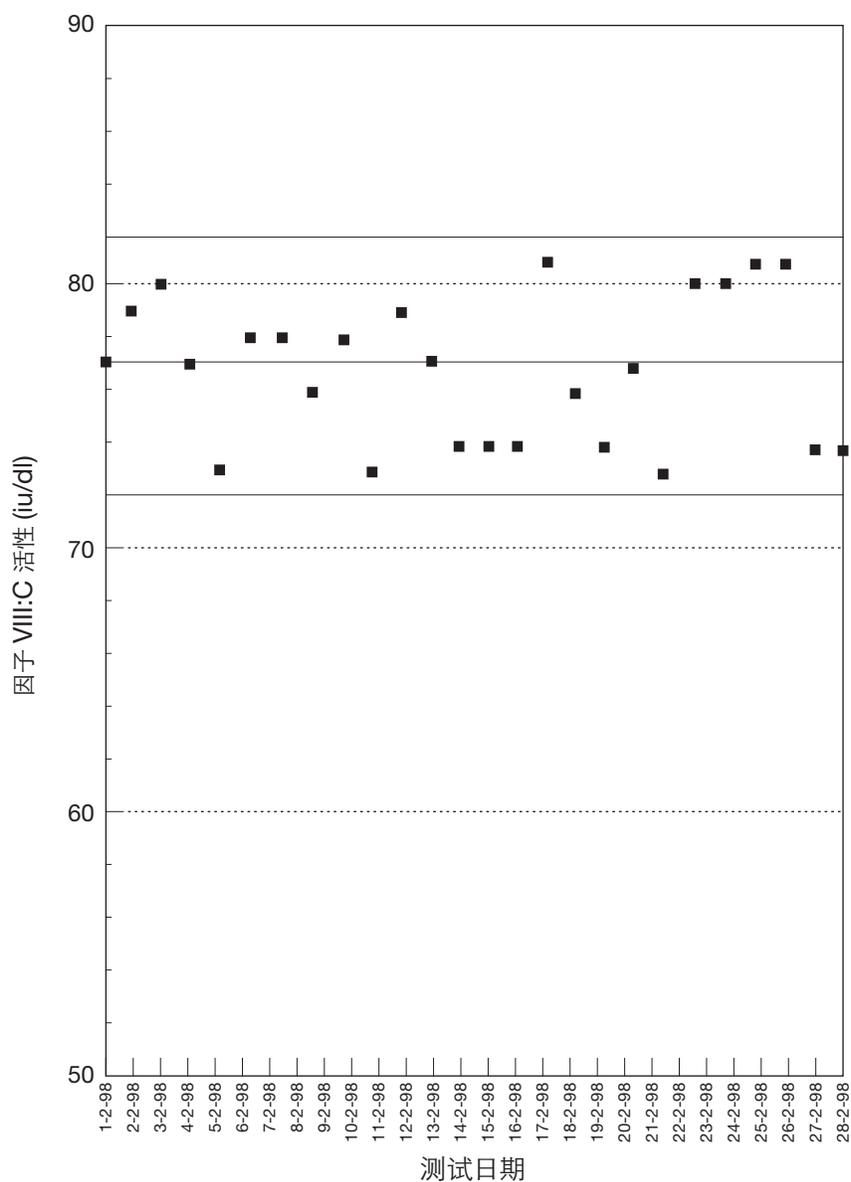
然后，将计算这些结果的均值和标准差 (SD)。SD 是 d^2 之和除以 $n-1$ 的平方根，其中 d 表示各个结果与平均值的差值， n 为测定次数。SD 是对结果分布的评估手段：SD 越大，表示结果分布范围越大。另一个重要参数是变异系数 (CV)，表示平均值百分比的 SD ($CV = SD$ 除以平均值乘以 100%)。不同日期 QC 样本凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间的结果的 CV 应始终小于 8%，最好更低。至于 FVIII:C 和 FIX:C 的检测，对于若干天内执行的测试应实现 CV 小于 10%。

在大多数情况下，所获 IQC 样本的结果将显示为正态（高斯）分布。常见的做法是将 IQC 结果的靶范围设为平均值 ± 2 SD，因为这应包括 95% 的检测值。

单个结果应记入识别靶范围的图表。示例如下图 5.2 所示。在限定值内的任何所测值视为可接受值。

此范围之外的结果表明，QC 物变质或者处理不当，亦或该方法没有在质控内。因而，对未来 QC 物的重复测试可区分这两种可能性，进一步处于限值范围之外的结果可证实测试系统失控。根据累积记录图表的观察结果，QC 测试结果的中期或长期漂移（因诸如仪器或试剂变质或变化所致）将变得明显。

图 5.2.于不同日期检测的内部质量控制样本的 FVIII:C 检测结果



每个点代表同一材料的不同检测。实线表示针对本材料的 20 次检测的平均值和两个标准差，上下两条实线被视为可接受结果的限值。

6 手动倾斜试管技术

虽然凝血试验有各种不同仪器可供选择（见第 41 节自动化内容）并在世界各地使用，但是，手动倾斜试管技术仍然被许多中心成功使用。即使使用自动化仪器，有些测试也可能需要手工进行，因为特殊样本与使用中的仪器偶尔会出现不兼容。在以下情况下发生：分析黄疸样本时血脂浓度大大升高、测试样本中血块形成模式明显不同于正常样本（尤其是纤维蛋白原浓度明显降低时）。

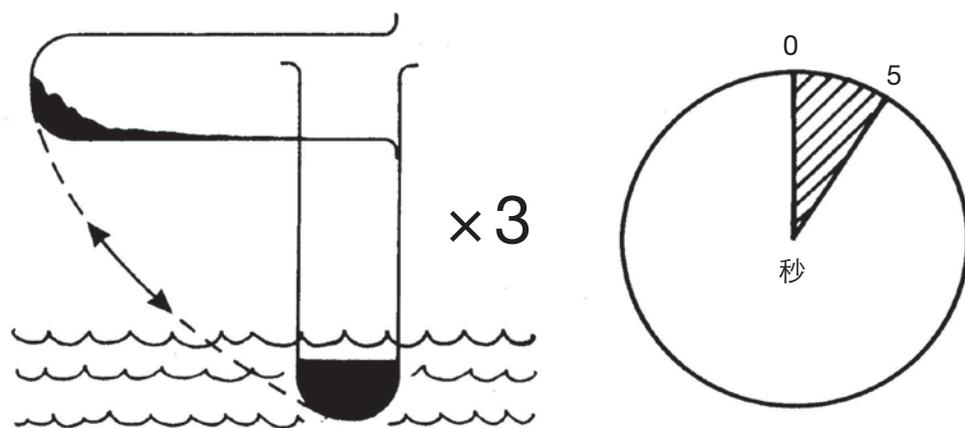
手动凝血测试最好在玻璃管中执行。试管大小为75mm × 10mm。不同类型的玻璃管均可使用，但可能会影响获得的凝血时间，特别是在筛查测试中，可影响活化部分凝血活酶时间 (APTT) 等。如果试管的来源（制造商或合成物）有变化，应考虑影响到结果的可能性。可通过使用两种类型试管比较某些测试（如 APTT）的结果而获知该可能性。如果出现了系统性差异，则应确定新的正常值范围。应尽量避免使用清洗试管。

由于手工技术存在诸多变异并可能的污染来源，因此，应进行重复试验。在任何情况下，如果重复试验的凝血时间的差异超过 10%，则应重新测试。

使用手动倾斜试管技术时，以下特点很重要：

- 在用于凝血测试之前，试剂必须预热至37°C，时间至少五分钟。
- 测试血浆和试剂的混合物在加入混合物的最后成分后应立即快速摇晃试管一至两秒进行混合，同时启动秒表。
- 然后，应在观察下倾斜混合物至 90°，每五秒钟进行三次，同时记录凝血时间。该程序如下图 6.1 所示。
- 在倾斜操作之间应将试管浸入 37°C (±0.5°C) 的水中，使试管底部进入水面约 3~4 厘米，使混合物的温度尽量保持接近37°C。
- 应在 Anglepoise 灯或类似光源下检查凝血混合物，记录凝血时间。

图 6.1. 凝血试验使用的手动倾斜试管技术



每5秒钟倾斜3次

7 正常混合血浆 (PNP) 的制备和校准

图 7.1.正常混合血浆的采集

献血者	未服用干扰凝血因子和凝血反应药物的最少 20 名正常健康人。口服避孕药的女性可纳入。男性和女性人数大致相等。年龄应为 20 至 50 岁。
抗凝剂	用 N-2-羟乙基哌嗪缓冲的 0.109M (3.2%) 柠檬酸三钠（二个水分子）。每 100 ml 柠檬酸三钠 5 g N-2-乙磺酸 (HEPES)。
采集	使用一次性 60 ml 塑料注射器和 21 g 的蝶形针在上午 9 点至 11 点取献血者的血样。

PNP 制备方法

- 1 于含 6 ml 抗凝剂的塑料容器内采集 54 ml 血液，混匀。
- 2 样本混合过程中应放在冰上。
- 3 在 4°C 下 2500 g 离心 15 分钟。
- 4 混合血浆贮存在非接触激活的塑料容器内。
- 5 每 1.5 ml 的塑料管中分装成 0.5 ml。
- 6 在干冰/固体 CO₂（如果有）上快速冷冻。或者直接放到 -70°C 的开放式架子上。
- 7 请在四小时内完成以上程序。
- 8 在 -70°C 下稳定 6 个月以上。

虽然不同正常混合血浆中 FVIII 和血管性血友病因子 (VWF) 有很大差异，但是用这种方法制备的正常混合血浆 (PNP) 的因子 II, V, VII, IX, X, XI, XII, HMWK, 前激肽释放酶原的水平均约为 1 U/ml，即 100 U/dl。这种本地 PNP 应以国际单位 (IU) 校准品进行校准，因为上述所有凝血因子中，除 FXII 外，均有国际标准校准品。假定 FXII 的效力为 100 U/dl 或 1 U/ml，PNP 可在未校准的情况下使用。为了以 IU

校准，有必要获取经校准的 WHO 参考制剂（英国国家生物标准与控制研究所提供，地址：South Mimms, Potters Bar, Herts, U.K.）或购买制造商以 IU 校准的合适的商用参考血浆。每 12 至 18 个月应考虑更换正常混合血浆，除非室内质量控制结果证明其一直保持稳定。

本地 PNP 的校准方法

- 1 获取校准标准品，如 WHO 国际标准品 (IS)（至少2瓶）。
 - 2 在两个不同的日期，使用一瓶国际标准品和四份本地PNP。
 - 3 第一天，使用每份新鲜稀释的血浆检测国际标准品、本地血浆、本地血浆、本地血浆、本地血浆、国际标准品，并重复。
 - 4 第二天，使用每份新鲜稀释的血浆检测本地血浆、本地血浆、国际标准品、国际标准品、本地血浆、本地血浆，并重复。
 - 5 计算每份本地混合血浆相对于两个国际标准品结果的平均值的效力。
-

4份 × 2 倍稀释 × 2天 (n = 16) 的平均结果作为本地标准血浆的效力。

8

建立正常参考范围

为了正确解读化验结果，需有健康正常人检测结果的数据。健康并没有明确的条件，通常是一个相对的概念。在某些情况下，理想组别在年龄、性别方面以及 FVIII/VWF, ABO 血型等情况可能与检测人群非常相符。

但是，如此谨慎的选择对于很多凝血检测没有必要。在实践中，为了建立正常值范围而选择健康正常受试者要根据实际需要。未服用任何药物的健康医务人员以及健康献血者或患者的健康配偶均可纳入。有一些与正常参考值范围相关的重要因素需考虑，说明如下。

采集血液时，正常受试者的状态可影响结果。最近 ISTH指南中审查了一些与女性健康问题相关的这些分析前变量 (Blomback, 等. 2007)。其中审查了身体紧张（例如，10 小时内 FVIII/VWF 持续增加 2.5 倍）、精神紧张（急性精神紧张后 FVIII 和 VWF 增加）、激素作用、昼夜变化、采血姿势和饮食的影响。给出了一般性建议，而并不限于对女性患者的调查。这些建议如下：

- 静脉穿刺前 24 小时禁止进行任何剧烈的体育锻炼。
- 选择可减轻身体和精神紧张的环境。
- 在静脉采血当天早上，禁止摄入脂类食物和抽烟。
- 在早上（上午 7 时至 9 时）献血者以放松的姿势静坐 20 至 30 分钟后抽取样本。

应确定本地的正常参考值范围。文献与供应商的信息应作为参考。

正常样本采集、处理和分析使用的技术应尽量与患者样本相同。

尤其对于筛查试验 (PT, APTT)，应考虑同一制造商的不同批号试剂的正常参考值范围不同的可能性。对与任何变化重叠的内部 QC 数据应予以认真审查。任何变化均表示需要不同的正常参考值范围。

对于检测，文献与制造商的信息仅供参考。最合适的检测技术所得的本地正常参考值范围应与文献中的大致相同。

新生儿（早产儿或足月儿）和儿童的有些凝血试验的正常范围不同于成人 (Andrew, 等. 1987, 1990, 1992)。

正常参考值范围，特别是筛查试验的正常参考值范围应仅作为临床信息的协助工具。对于具有个人和家庭史的一些患者在筛查测试结果正常的情况下也需要进一步研究。

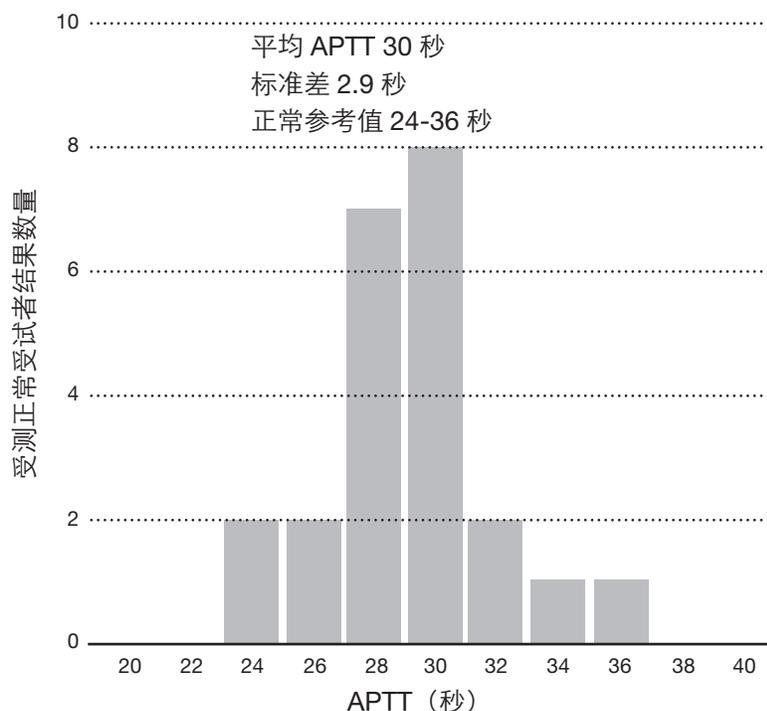
对于筛查试验异常的其他患者，如果导致异常的原因显而易见，则需要接受进一步的研究。因此，正常参考值范围可能不等于决定范围和干预范围。

统计学要求：建立完全有效的正常参考范围需要至少120名正常受试者，但出于实践目的，可通过检测较少人数获得近似值，有些本领域专家认为出于临床目的这样做是可接受的 (CLSI 2008)。在研究出血性疾病相关的止血检测中，选定进行分析的正常受试者数量应不少于30例。

在建立正常参考值范围时，正常受试者的样本在当地采集、处理和分析使用的技术应与分析患者样本所用的技术相同。如果患者样本为了批量分析而需冷冻储存，则正常样本也应冷冻处理。如果患者样本在运输到实验室期间延迟几个小时后才进行处理，则用于计算参考区间的正常受试者样本的采集和测试之间也应有这样类似的延迟。文献和试剂制造商的信息仅供参考。

对于每一次检测，从健康、正常受试者样本中获得的结果均用于建立正常参考值范围。大多数与研究出血性疾病相关的检测结果均呈正态（高斯）分布。通过目视检查图表中的数据而对此进行确认是有益的。数据如图8.1所示。与大多数其它参考值相差甚远的明显离群值很有可能是异常结果。将这些值排除后，进一步的计算是可以接受的。

图 8.1.健康正常受试者 APTT 结果的分布



注：数据呈正态分布，即均匀地分布于平均值的两边。

通常，参考值或正常参考值包括95%的区间值。如果分布与图 8.1 所示明显不同（例如，向一个方向倾斜），则可能需要更多的正常样本。简便的方法是去除左右两边2.5%区间的值，保留中间 95%区间值。

如果呈正态分布，则适于计算正常值的平均值和标准差（如第 5 节所述），并以平均值+2SD 和平均值-2SD分别作为上限值和下限值。

在任何情况下，正常参考值仅作为一个指南，用于解释结果的临床意义。

关于建立参考范围的更全面讨论，请参阅 CLSI (2000)。

参考文献

Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:95-104.

Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70:165-72.

Andrew M, Vegh P, Johnston, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80:1998-2005.

Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R on behalf of the ISTH SSC on Women's Health Issues. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *Thromb Haemost* 2007; 5:855-858.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline*, 2nd ed. 2000; Clinical and Laboratory Standards Institute Document C28-A2.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-stage prothrombin time (PT) test and activate partial thromboplastin time (APTT) test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

氯化钙

例如，BDH 化学物。摩尔溶液。

25mM CaCl_2 溶液：25 ml 1M CaCl_2 装入容量瓶，加蒸馏水稀释至1 升。

Owren 巴比妥缓冲液, pH 7.35

5.875 g 二乙基巴比妥酸钠（巴比妥钠）

7.335 g 氯化钠

- 1 放入容量瓶，溶于约 780 ml 蒸馏水中。
- 2 加入 215 ml 0.1M 盐酸。
- 3 用蒸馏水将容量调整至 1 升。
- 4 检测 pH 值，如果必要，调整至 pH 7.35。

Owren 缓冲盐水

200 ml Owren 巴比妥缓冲液

800 ml 生理盐水（0.9 g% 氯化钠）

咪唑缓冲液

2.72 g 咪唑

4.68 g 氯化钠

- 1 将上述试剂放入容量瓶，溶于约 650 ml 蒸馏水中。
- 2 加入 148.8 ml 0.1M HCl，将 pH 值调整至 7.3。
- 3 用蒸馏水将容量调整至 1 升。

筛查试验试剂

出血性疾病诊断的筛选检测，选择和应用合适的筛选试剂，特别是凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血活酶时间(APTT)检测试剂是非常重要的。许多不同的试剂遍及世界各地。有充分的选择时，应考虑灵敏度的不同。在用 PT 和 APTT 进行出血性疾病筛查时，可考虑以下与某个特定试剂性能可能相关的信息来源：

- EQA 项目（如国际 EQA）相关试剂可比较的数据（参见第 5 节）
- 发表的数据
- 有已知缺陷的患者血浆的检测
- 供应商的数据表

本地生产的 PT 和 APTT 试剂在价格上可能具有吸引力，但可能会导致标准化的困难，因此最好避免使用。

还应指出的是，有些供应商提供不同的试剂。此外，同名试剂的成分会随时间改变。这意味着，无法对使用某种特定来源试剂给予建议。

原理

将血液用一种可溶解红细胞的稀释剂混合。滴入血细胞计数器内，显微镜下计数血小板，如果有的话，最好使用相差显微镜。

材料/设备

- 平底薄计数室（带有 Neubauer 尺的相差血细胞计数器）
- 带有长工作距离相聚光镜的相差显微镜（如果有的话）；否则使用普通光学显微镜
- 20 μl 移液管
- 2 ml 刻度移液管
- 12 \times 75 mm 试管
- 机械式混合器

试剂

稀释液：1% 草酸铵水溶液。

存放于冰箱中，每次使用前过滤。

标本

如果针刺手指取血，则必须清洁并且让血自然流出。擦去第一滴血。如果静脉采血，则必须采集至带有不小于 21号短针头的干燥塑料（或硅化玻璃）注射器中。在血液被注入装有 EDTA 的容器之前，必须取下针头。血液和抗凝剂必须轻轻混匀，避免起泡，混合时不得有任何延误。

方法

- 1 将0.38 ml 的稀释液移至试管内。
- 2 用移液管吸取 20 μl 抗凝血，并将吸头外面擦干净。

- 3 将抗凝血注入稀释液中，清洗吸头数次后将液体完全排出。手工或最好通过机械混合器混合至少 10 分钟。
- 4 按如下所述填充血细胞计数器。
- 5 用皮氏培养皿盖住计数室 10 至 20 分钟，使血小板沉降。在培养皿中放入一片湿棉或滤纸，以防止蒸发。
- 6 使用显微镜计算 1 mm 大正方形 (= 0.1 μ l) 内的血小板。计算尽可能多个正方形，计数至少 100 个血小板。血小板呈圆形或椭圆形，其内部颗粒结构和紫色光泽可用于与碎片区别。背景中可看到被草酸铵裂解的红细胞影。如果没有相差显微镜，可使用普通光学显微镜，但前提是聚光镜不要过分聚光，获得低强度的光线。
- 7 根据以下公式计算每升血液的血小板数量。

血细胞计数器

构建带有 Neubauer 或改进 Neubauer 尺度的血细胞计数器的计数室，使玻璃盖底面和计数室表面的距离为 0.1 mm。计数室的表面含有两个带有尺寸的特别刻度区域，如图 10.1 所示。中央的 1 mm² 有的两条或三条边界线。在中央区域，改进 Neubauer 有 25 个正方形，Neubauer 尺度有 25 个正方形。每个正方形的面积为 0.04 mm² (0.2 \times 0.2 mm)。这些正方形又分成更小的正方形，每个为 0.0025 mm² (0.05 \times 0.05 mm)。刻度区域的外象限各为 1 mm²，并分成 16 个正方形。

计算

计算公式：

$$\text{计数 (细胞/l)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

其中，N = 计算得出的细胞总数

D = 稀释度

A = 计数的总面积 (单位为 mm²)

10 = 计数室面积 (mm²) 和深度 (0.1 mm) 乘积所计算的体积 (μ l) 的系数

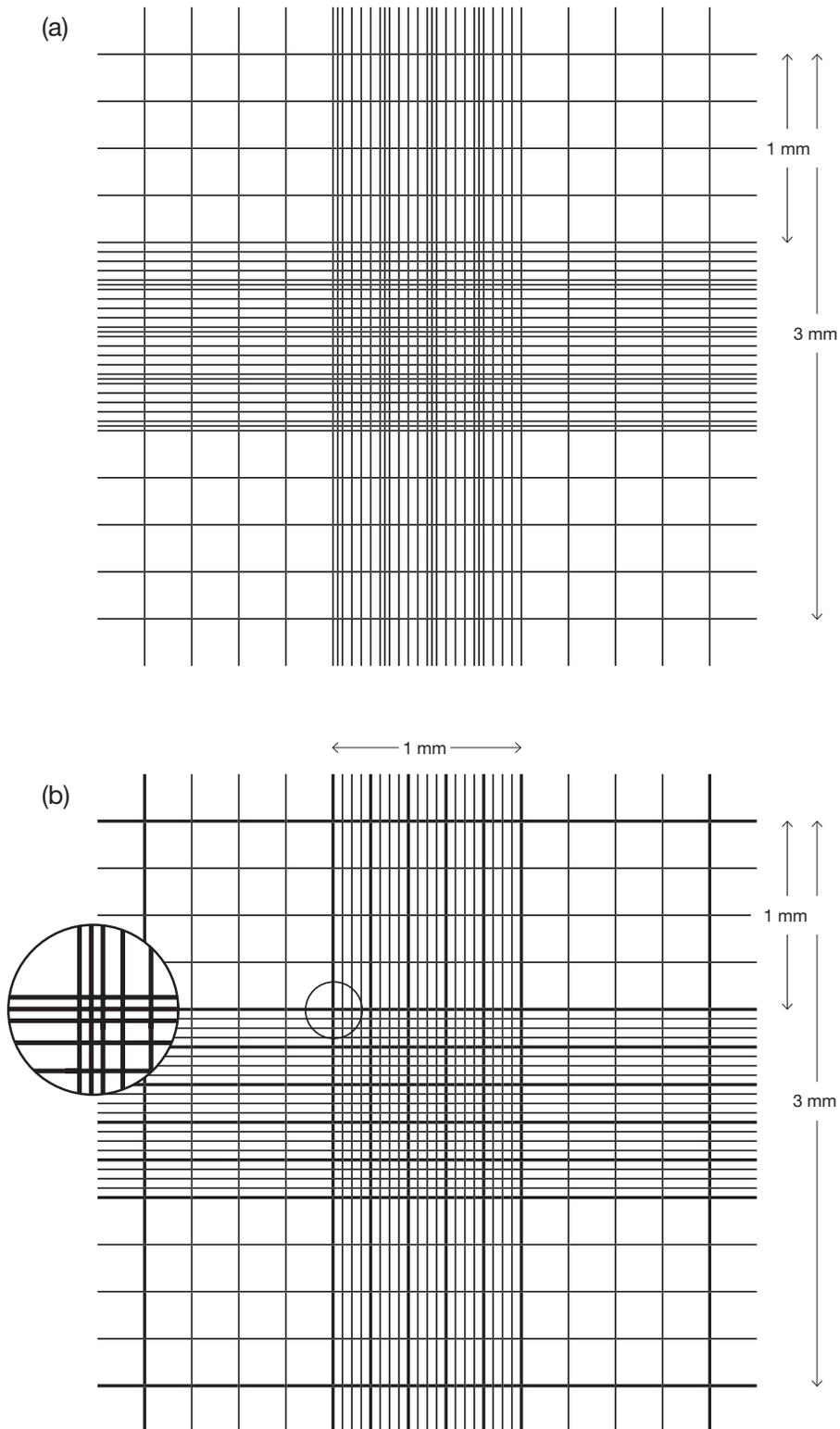
10⁶ = 数量/ μ l 到数量/L 的换算系数

细胞计数的误差来源

如果使用毛细血管血液，则必须采集自动流出的血滴。

如果使用抗凝血，血液采集到试管后至少颠倒混匀 20 次，充分混匀后再吸取血样。由于摇晃可产生泡沫而致使不能准确移液，因此，请勿摇晃试管。将充分混匀的试管倾斜至 45° 角或略大角度，之后按照毛细血管血同样处理程序将血液吸出。

图 10.1. 血球计的计数室 (a) Neubauer 和 (b) 改进型 Neubauer



采集血样的移液器必须清洁干燥。

必须快速吸入移液器，之后必须使用与移液管配套吸头吸取血液，直至充装至所需的刻度线。如果略超刻度线，则可按压移液管吸头将多余的血液排到滤纸或软纸上。如果超过刻度线较多，则必须使用新的移液管。

吸入移液管的血中不得含有气泡。

在移液管中的血液注入稀释液中之前，必须将移液管外面的血液擦拭干净（注意不要从吸头处回抽血液）。

在移液管内的血液注入稀释剂中后，必须用稀释液反复冲洗移液管几次，以确保所有的血液均排入稀释液中。

含有稀释血液的试管必须用手（最好用机械式摇动器）轻轻摇晃至少两分钟。摇动试管后，立即用巴斯德移液器或毛细管充装计数室。

计数室用毛细管填充，并且调节移液器或毛细管的液体流出，以便快速顺利填充。必须将计数室充满，但是液体不能溅入槽内。让细胞在计数室沉降 10 至 20 分钟，然后进行计数。

血细胞计数器的计数室和玻璃盖在使用前必须清洁干燥。指纹或油性薄膜可导致较大误差。

为了减少细胞随机分布导致的误差，必须计算足够数量的细胞。在实践中，应至少计算 100 个细胞。在检查计数室内细胞是否正确分布时，在每个区域（即，大正方形）内计算的细胞数量差异应不超过 10%。

对照

必须稀释两次，并取两次计数的平均值；两种计数值的差异小于 10%。

血小板计数的误差来源

静脉采集的血液优于毛细血管血，因为毛细管采血时血小板粘附到伤口上，随之发生血液稀释，使结果的重复性差。

移液和血细胞计数的常见误差如上所示。此外，必须特别注意确保计数室彻底清洁，因为污垢和碎片可误计为血小板。用肥皂水清洗计数室，然后用蒸馏水冲洗，排干、并用无绒棉布擦拭。确保盖玻片干净。

血小板凝集的出现致使计数不可靠。如果样本出现血小板聚焦，则必须使用新的样本。

草酸铵稀释剂应冷藏保存，如果出现细菌污染，必须丢弃。

标本必须在采集后三小时内进行计数。

原理

出血时间是指固定深度和长度的标准皮肤割伤至出血停止之间的时间。

患有血小板减少、血管性血友病、格兰兹曼氏血小板功能不全、Bernard-Soulier 综合征、血小板贮存池疾病和其他血小板疾病的患者会出现出血时间延长。纤维蛋白原是必需的，并且FV 也发挥作用。因此，纤维蛋白原或 FV 缺陷症的患者出血时间可延长。出血时间延长也发生于一些肾脏疾病、异常蛋白血症和血管性疾病等。

材料/设备

- 血压计
- 清洁棉签
- 标准化出血时间装置
- 1 mm 厚的滤纸
- 秒表

方法

- 1 将血压计袖带绕在上臂并充气至 40 毫米汞柱。在整个测试过程中均维持该压力。
- 2 将前臂背侧面清洗干净，之后将出血时间装置紧贴到皮肤上，但不要有压迫感。放松触发器，秒表启动。
- 3 应避开浅静脉、疤痕和青肿处。
- 4 在 30 秒间隔时间内，用滤纸吸干血流。使滤纸靠近切口处，不要接触伤口边缘。
- 5 记录穿刺至出血停止的时间。

释义

成人出血时间的正常范围少于 8 min，但根据所使用的不同方法，可能有所不同。

注释

- 截至撰写本文时，市场上有两种测量出血时间的一次性装置。不论使用何种装置，均应确定本地的正常值范围。
- 切口应与手臂纵向平行。与手臂垂直的切口出血时间更长。
- 如果结果异常，应重复测试。
- 如果出血持续超过 20 分钟，则无需记录终点。
- 干扰血小板功能的药物的影响应予以考虑。例如，含有阿司匹林的药物可能会导致出血时间延长。因此，如果可能，在测试前七日内应不服用这些药物。
- 出血时间测量切口处可能会结痂。在切开前，这些应告知患者。

参考文献

Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52:210-211.

原理

该测试反映了外源性凝血系统的整体效率。对因子 V, VII 和 X 变化比较灵敏, 但对因子 II (凝血酶原) 变化的灵敏度较低。也不适合检测纤维蛋白原水平的微小变化, 但是, 如果纤维蛋白原水平很低, 或者存在抑制物, 则PT值可能会不正常。该测试的灵敏度受所使用的试剂和技术所影响, 重要的是要建立本地的参考值范围。

凝血酶原时间所测得的途径如图 12.1 所示。PT 试剂, 通常称为凝血活酶, 含有组织因子和磷脂。

许多可用的试剂已经上市。第 9 节包括了试剂选择的说明。

试剂

- 凝血活酶 (可能含有氯化钙)
- 25mM 氯化钙 (仅在凝血活酶试剂中不含钙时需要)

方法: 手工操作

- 1 向前两个试管中加入 0.1 ml 正常血浆, 加温至 37°C 2 分钟。
- 2 加入 0.2 ml 预热 (37°C) 的凝血活酶试剂 (如果试剂中含有钙)。
- 3 启动秒表、混合、并记录凝血时间。
- 4 每个测试样本重复此操作。
- 5 报告患者的凝血时间 (以秒为单位)。

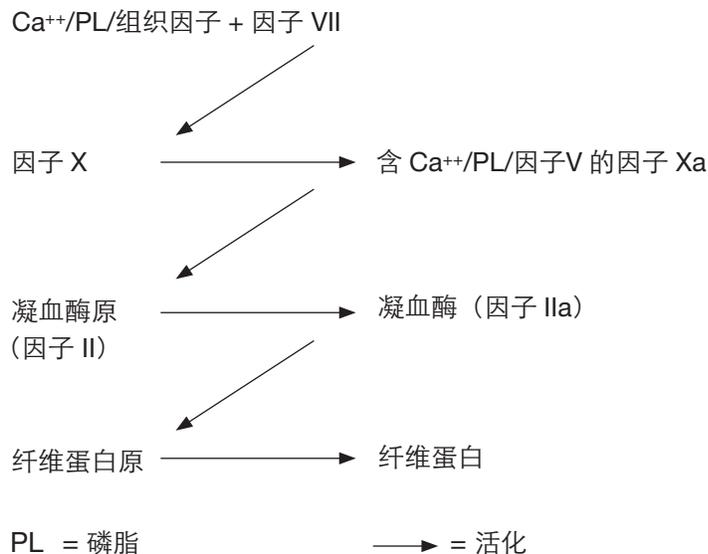
对于手工操作, 所有测试均需重复检测。两次凝血时间的差值不应超过 10%。对于变异系数小于 5% 的自动化检测, 单次测试通常可接受, 但结果延长时需复检。

注释

- 如果凝血活酶试剂中不含有钙, 则测试过程为 0.1 ml 血浆、0.1 ml 凝血活酶并与 0.1 ml 预热的 25mM 氯化钙混合凝集。

- 组织因子：FVII 对 FIX 的活化发生于体内。在大多数 PT 测试条件下，FX 均被强烈活化，以致该检测对 FIX 或 FVIII 的缺乏不敏感。
- 凝血活酶/氯化钙在使用前应预热5至30分钟。
- 凝血时间通常受不同的凝血仪影响，取决于如何检测以及何时确定检测终点。这进一步强调了建立实验室目前使用方法的正常参考值范围的重要性。
- 出现因子 II, V, VII 或 X 轻度缺乏时，凝血酶原时间轻度延长。FII 缺乏症患者的PT可能在正常范围内。
- 有些 PT 试剂会受到狼疮抗凝物质/抗磷脂抗体的影响，有些稀有抗体可能会导致 PT 延长，但不会延长 APTT。磷脂含量较低的试剂更容易受到影响，如由脂质化重组组织因子组成的试剂。
- 无论用重组 VIIa 治疗后，还是体内的 FVII 被活化，均可导致 PT 缩短。其作用取决于所使用的组织因子试剂。含牛组织因子的试剂尤其容易受到这种作用的影响 (Kitchen et al. 1992)。血液样本在测定 PT 之前不得储存于 2°C - 8°C，否则可导致FVII 的冷活化。
- 用于测定 PT 的全血可稳定至少 24 小时，且取决于使用的试剂 (Baglin and Luddington 1997)。
- 用含人组织因子的试剂测定的 PT 可能与使用含其它物种（如：兔子）组织因子的试剂所测得的 PT 不同。这种情况下，用人组织因子试剂获得的结果可能更能提示出血的风险。
- 关于测定 PT 相关问题的详细讨论，请参阅 CLSI (2008)。

图 12.1. 凝血酶原时间测试途径



参考文献

- Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.
- Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68:301-5.

13 活化部分凝血活酶时间 (APTT)

原理

这是内源性系统的一种非特异检测。该测试和正常凝血酶原时间相结合，是检测凝血因子 VIII, IX, XI 和 XII 缺乏症的最有效筛查试验。

当任何涉及共同途径的缺乏症 (V, X, II 因子缺乏症，或轻度的纤维蛋白原缺乏症) 和抑制物存在时，APTT 均可延长。一些治疗性凝血因子抑制物 (如肝素) 也会延长 APTT。对于 APTT 延长的患者，请务必首先排除使用这些方法治疗的可能性。

当存在前激肽释放酶原 (PKK) 或高分子量激肽原 (HMWK) 缺乏症的时候，APTT 也会延长，除非检测试剂是一种以鞣花酸为活化剂。使用这种试剂，即使该因子完全缺乏，APTT 也会正常。

APTT 测得的途径如图 13.2 所示。

试剂

- APTT 试剂
- 25mM 氯化钙

方法

- 1 在使用前将含氯化钙的试管于 37°C 下放置 5 分钟。
- 2 将 0.1 毫升的 APTT 试剂加入两个 37°C 预温的玻璃凝血管中。
- 3 将 0.1 毫升的对照血浆加入第一个试管。
- 4 启动主秒表。混合。
- 5 将 0.1 毫升的对照血浆加入第二个试管。混合。
- 6 孵育时间达到推荐的时间后*，先后向每个试管中加入 0.1 毫升氯化钙，对每个试管启动各自的秒表。混合。记录血浆凝固时间。

对于手工操作，所有测试需重复测定。两次凝血时间相差不应超过 10%。对于自动

化操作，测定变异系数应小于 5%，单次测定通常可接受，结果延长时需复查。

* 应遵循试剂制造商的建议。孵育时间通常为 2 至 5 分钟。孵育时间非常重要，其通常会影 响检测结果，对于任何特定试剂，较长的孵育时间可缩短凝血时间。

释义

应确定当地的正常值范围。

如果 APTT 较长并且 PT 正常，则表明 VIII, IX, XI, XII 因子、高分子量激肽原、前激肽释放酶可能缺乏，或者存在抑制物。APTT 较长时，应测试正常血浆和测试血浆的等比混合物（即 1 份测试血浆和 1 份正常血浆的混合物，以下称为 50:50 混合）。如果 APTT 校正值超过正常血浆和测试血浆凝血时间差值的 50%，则表示缺乏凝血因子。校正效果低下表明可能存在抑制物，抑制了系统中或非特异类型凝血因子之一，例如狼疮抗凝剂（参见第 25 节）。

图 13.1. APTT 释义示例

样本	结果
APTT 对照	35 秒
测试	60 秒
如果 50: 50 混合	42 秒 (校正良好, 则可能存在因子缺乏)
如果 50: 50 混合	52 秒 (校正效果差, 则可能存在抑制物)

注释

- 许多可用的试剂已经上市。包括具有不同敏感性的各种材料。试剂选择的说明见第 9 节。
- 对于 PT，凝血时间可能会受到血凝仪使用的影响。
- 在测试血浆内，一种高含量的凝血因子可补偿其他因子的低含量。例如，急性期反应期间 FVIII 明显上升，在 FIX 或 FXI 减少时，APTT 可正常，这对临床很重要。如果患者有相应的出血性疾病个人病史或家族病史，则在 APTT 正常时，特别是在参考值范围的高值时，有必要进行更全面的分析（包括特定因子分析）。
- 各种试剂的磷脂浓度明显不同。这是为什么各试剂对狼疮抗凝剂敏感性明显不同的原因之一。如果对狼疮敏感的试剂用于初始 APTT 检测，进行第二次 APTT 检测将会有帮助（Kitchen 等人，1999 年），第二次 APTT 应使用含有高浓度磷脂

的试剂，例如Actin FS（德国马尔堡 Dade Behring 公司）。如果初始APTT结果延长的原因是狼疮抗凝物质，那么第二次 APTT 将是正常的，因为使用肌动蛋白 FS 时狼疮抗凝物质很少能使 APTT 延长。

只有APTT 延长的研究

对于PT正常但 APTT 延长的患者，应遵循的正常研究顺序是：

- 1 检测凝血酶时间（参见第 15 节）。如果凝血酶时间正常，继续执行步骤 2 和 3。如果凝血酶时间延长，在鱼精蛋白硫酸盐中重复本步骤（参见第 16 节）。如果凝血酶时间校正至正常，则表明存在肝素，不需要进一步进行以下检测。如果不知道患者是否接受过肝素治疗，则应要求重复取样检测。
- 2 使用正常血浆和患者血浆 1:1 (50%) 的混合血浆，检测该混合血浆的 APTT。如果 50% 混合血浆未将 APTT 校正至正常值，则表示存在抑制物。
- 3 用第二种试剂检测 APTT，该试剂应含有诸如肌动蛋白 FS（Dade Behring 公司）的高浓度磷脂。如果初始 APTT 明显延长（超过所使用的正常上限至少三秒钟），并用含肌动蛋白 FS 的试剂测得的 APTT 正常，那么可能存在狼疮抗凝物质。这可在随后使用的特定检测进行确认——例如稀释蝰蛇时间（DRVVT，参见第 38 节），不过，如果不考虑将狼疮抗凝物质 (LAC) 列为血栓形成的危险因素，则通常没有必要进行这些特定检测。极少数情况下，使用肌动蛋白 FS 时 APTT 正常、使用硅或高岭土作为活化剂的试剂时 APTT 明显延长，另外一个可能原因为前激肽释放酶原缺乏症。与大多数 LAC 一样，这与任何出血风险无关。因此无需再次确认。
- 4 当初始 APTT 明显延长（三秒或超过三秒），并且肌动蛋白 FS 测试的 APTT 正常时，没有必要进行因子测定。
- 5 如果两次 APTT 均延长，则根据需要进行 FVIII:C, FIX 和 FXI 活性检测（参见第 23 节）。如有需要，可进行 FXII 测定，因为 FXII 缺乏比较普遍，并且查出 FXII 缺陷便可解释 APTT 延长的原因。FXII 缺乏症与出血风险增加无关，因此不存在出血性疾病。
- 6 使用鞣花酸作为接触活化剂的试剂，诸如肌动蛋白 FS，即使存在严重前激肽释放酶原缺乏症，APTT 结果仍可正常。

如有必要，为了节省时间，步骤 1 至 3 可同时进行。

注释

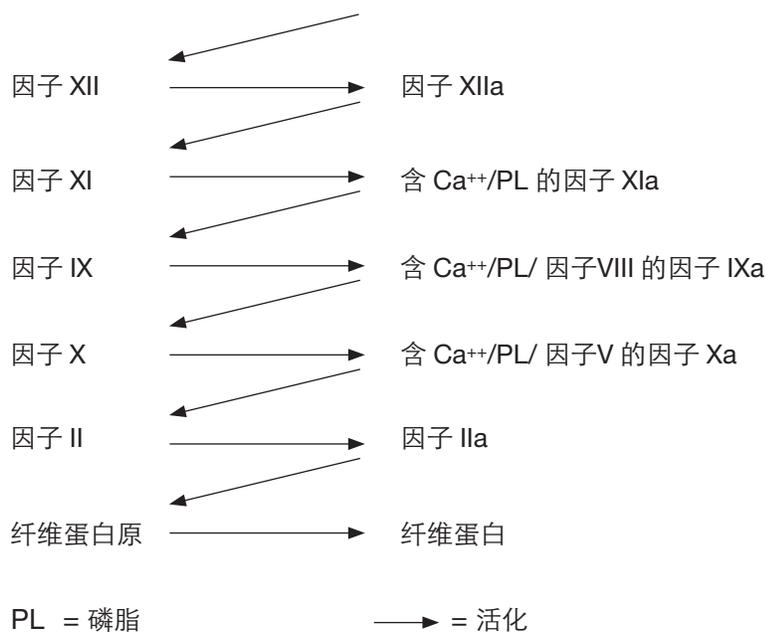
- 使用肌动蛋白 FS 时 APTT 正常与初始 APTT（Synthasil / 白细胞介素）延长相结合一般排除了 FVIII, FIX 或 FXI 缺乏症的存在，在这种情况下不需要再测定因子。

- 当 FIX 或 FXI 轻度降低 (30-50 U/dl) 而 FVIII 明显升高时, 在此罕见情况下, 使用任何试剂 APTT 均可能正常。
- 如果 FXII 下降到 20 U/dl-50 U/dl 范围内, 使用肌动蛋白 FS 时 APTT 通常正常; 使用基于高岭土或硅激活时, APTT 轻度升高。这一缺陷并没有临床相关性。
- 少数强效狼疮抗凝物质可延长使用肌动蛋白 FS 时的 APTT。
- FVIII (或 FIX 或 FXI) 的特异抗体可延长 APTT, 与试剂无关。

关于测定 APTT 各种问题的详细讨论, 请参阅 CLSI (2008)。

图 13.2. 以 APTT 测得的途径

涉及激肽释放酶原、高分子量激肽原和带负电荷表面的接触活化



参考文献

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of 7 APTT reagents in relation to heparin sensitivity *Br J Haematol* 1999; 106:801-8.

14 异常 PT 和 APTT 进一步研究的混合检测

原理

发现有异常筛查试验结果（即 PT/APTT）的血浆样本要进行进一步研究，用混合试验确定异常。首先，需证明患者血浆 APTT 延长可用正常血浆纠正，以排除抑制物的存在。通过添加下述的一种试剂纠正异常 APTT，则表明所加试剂含有测试样本所缺乏的物质。

如果筛查测试结果异常，则使用添加物和测试血浆等体积（以下称为 50:50）混合物重复检测。

以下试剂可用于混合试验：

- 正常血浆
- 老年人血浆
- 吸附血浆
- 乏 FVIII 血浆
- 乏 FIX 血浆

老年人血浆

- 1 正常静脉血与 0.1M 草酸钠按 9:1 体积混合。
- 2 离心血液获得乏血小板血浆，在无菌条件下分离并在 37°C 下培养两至三天。
- 3 这段时间结束时凝血酶原时间应超过 90 秒，并对凝血活酶敏感。
- 4 然后，在塑料容器中等分，并保存于 -35°C（或更低温度）下。

老年人血浆缺乏因子 V 和 VIII。

吸附血浆

- 1 将 1 g 湿凝胶与 4 ml 蒸馏水混合为稳定的混悬液，从而制得氢氧化铝凝胶（氧化铝）。

2 柠檬酸化乏血小板血浆采集自 5 位正常献血者，储存。

3 1/10 体积的氢氧化铝加入预温的血浆，混合，并于 37°C 下培养 3 分钟。

4 然后立即离心（1700 g, 3 分钟、室温）混合物使凝胶沉淀。

5 将上清移至塑料容器中，可于 -35°C 下保存数周。

吸附血浆缺乏因子 II, VII, IX 和 X（维生素 K 依赖性因子）。用敏感试剂测试，凝血酶原时间应为 > 60 秒。

注：须注意吸附时间，过度吸附将导致其它凝血因子丢失。

FVIII/FIX 缺乏性血浆

从 FVIII 或 FIX 单一严重缺乏 (< 1 IU/dl) 的患者中获取的血浆对混合研究很有用。如有可能，应优先于老年人血浆和吸附血浆使用。为此目的选定的血浆应具有正常的 PT，确认肝脏中合成的其它凝血因子在正常水平。

可冻干这些血浆进行长期储存，或在 -35°C（或更低温度）下保存至少三个月。

使用按 50:50 比例混合的添加物和患者血浆的混合物，可检测出特定的异常。

在 APTT 单一延长的情况下，乏 FVIII 血浆优于老年人血浆。同样，乏 FIX 血浆优于吸附血浆。

注释：

- 氢氧化铝可从 BDH 公司获得（地址：Poole, BH15 1TD, England）。
- 虽然含有较弱抑制物或低滴度抑制物的血浆可能会被正常血浆部分纠正，但是影响 APTT 的非特异性抑制物（如狼疮抗凝物质）通常不能被纠正。
- 抗 FVIII 的特异性抑制物的存在导致的 APTT 延长可能不能被正常血浆立即纠正。在其它情况下，正常血浆可立即纠正 APTT，之后混合物的 APTT 随之逐渐延长。测试血浆和正常血浆的混合物可于 37°C 下孵育 1 小时后再进行检测，同时可对单独孵育的正常血浆和测试血浆分别进行 APTT 检测。
- 针对其他凝血因子的特异性抑制物十分少见，但依旧存在。除了 FIX 抑制物是即可反应抑制物，其他的抑制物很难在混合实验中总结他们的特性。
- 图 14.2 中给出了获得性 A 型血友病的 APTT、并显示抗 FVIII 抗体滴度的一些示例，并且描述了添加 20% 和 50% 正常混合血浆的作用。所使用的 APTT 检测方法中，37 秒为正常范围的上限。这说明，如果存在抗 FVIII 抗体，按 50:50 比例混合的患者血浆和正常混合血浆的混合物在某些情况下可能发生完全纠正。如果这些混合物在 37°C 下孵育，由于抗 FVIII 抗体抑制 FVIII，APTT 会逐渐延长。

图 14.1.出现单个因子缺乏情况下的混合检测结果模式

测试血浆缺乏	APTT	老年人血浆或 FVIII 缺乏	吸附血浆或 FIX 缺乏	正常血浆
FVIII	abn	no corr	corr	corr
FIX	abn	corr	no corr	corr
FXI/FXII	abn	corr	corr	corr
抑制物	abn	no corr	no corr	no corr

测试血浆缺乏	PT	APTT	老年人血浆	吸附血浆	正常血浆
FII	abn	abn	corr	no corr	corr
FV	abn	abn	no corr	corr	corr
FVII	abn	norm	corr	no corr	corr
FX	abn	abn	corr	no corr	corr

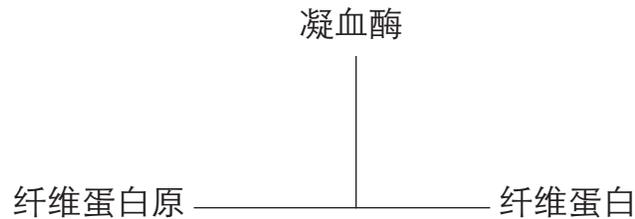
abn = 异常; no corr = 未纠正; corr = 纠正

图 14.2.获得性 A 型血友病中的混合研究

Bethesda 滴度 (U/ml)	APTT (秒)	APTT + 20% 正常血浆 (秒)	APTT + 50% 正常血浆 (秒)
1.0	210	137	77
1.1	83	52	38
2.0	82	43	34
6.6	107	51	37
8.4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

原理

凝血酶时间反映了凝血酶与和纤维蛋白原之间的反应。



在以下情况下，凝血酶时间延长：纤维蛋白原水平非常低（小于 1.0 g/l）时；存在肝素和肝素样物质时；出现其它抑制物时，如纤维蛋白（原）降解产物 (FDP)；纤维蛋白原定性异常（异常纤维蛋白原血症），包括肝病继发性先天和后天性缺乏。

试剂

在大约 15 分钟内诱导正常血浆凝结的凝血酶溶液。

作用更强的溶液测得的凝血酶时间较短，并且轻度缺乏时结果正常。

方法：手工操作

- 1 将 0.2 ml 血浆加入玻璃凝血管。
- 2 加热至 37°C。
- 3 加入 0.2 ml 凝血酶。
- 4 启动秒表。记录血浆凝固时间。
- 5 应确定本地的正常参考值范围。
- 6 重复测定两次。

注释

- 所使用的凝血酶浓度为能使正常混合血浆（对照）测得凝血时间大约为 15 秒的浓度。如果使用高浓度凝血酶，则在生理盐水中稀释至约10-15 U/ml，并按要求进一步稀释，直到得到适当的对照时间。
- 重组凝血酶可储存于 -35 °C或更低温度下，并且在稀释后方可使用。
- 稀释过的凝血酶在室温下会变质。
- 每组测试均应包含正常混合血浆。

普通肝素和低分子量肝素的存在可导致凝血酶时间延长。

延长凝血酶时间的分子量较大的肝素，可用鱼精蛋白硫酸盐 (PS) 中和。很多医院的药房都提供鱼精蛋白硫酸盐，用作逆转肝素效果的治疗性药物。

治疗制剂的药物浓度通常远高于用于实验室检测目的制剂。因此，应用生理盐水稀释至浓度为 40 mg% 的工作溶液。含 PS 的凝血酶工作溶液可通过将九份凝血酶试剂与一份 40 mg% 的 PS 混合而制得。可用于替代第 15 节所述的凝血酶溶液。应同时检测正常对照血浆。如果凝血酶时间延长但可纠正至不超过对照结果两秒，则确认有肝素存在。

17 爬虫酶时间

原理

爬虫酶是从矛头蛇 (*Bothrops atrox*) 中获取的一种蛇毒。它是类似于凝血酶的一种酶，直接作用于纤维蛋白原将其转化为纤维蛋白。抗凝血酶不对其产生抑制作用，所以不会受到肝素的抑制。因此，可用来评估肝素存在时纤维蛋白原→纤维蛋白的转换率。

它有助于核查延长的凝血酶时间是否由样本中存在肝素所致。如果凝血酶时间延长但爬虫酶时间正常，则最有可能的原因便是肝素的存在。存在异常纤维蛋白原血症时，爬虫酶时间可能比凝血酶时间更灵敏（即，时间更长）。

试剂

- 浓度为 25 mg/15 ml Owren 缓冲液溶解的爬虫酶（Sigma Aldrich 公司，代号 V5375）。该试剂有危险，须小心避免吸入粉末。操作人员应佩戴手套和口罩。储备溶液应储存于 -70°C 下，每等份 0.5 ml。在该条件下，至少可稳定两年。

使用前解冻储备试剂，并用 Owren 缓冲液按 1/10 稀释；分成等份，然后于 -70°C 下再次冷冻备用。这种工作试剂在上述条件下至少可稳定三个月。

分装的等份工作液应在 37°C 下水浴至少 3 分钟进行解冻。在 $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ 的环境温度下使用时至少可稳定 12 小时。

- 正常血浆：按第 7 部分所述制备的正常混合血浆。在 37°C 下水浴约 3 分钟进行解冻。

方法

所有检测均需重复。

- 1 将足量的 $75 \times 10 \text{ mm}$ 玻璃凝血管放在 37°C 下水浴（每名患者血浆用二支，加上对照血浆两支）。
- 2 将 0.3 ml 血浆（对照血浆或患者血浆）加入预温的凝血管中。
- 3 加温 1 至 2 分钟。

- 4 加入 0.1 ml 爬虫酶稀释液，并启动秒表。
- 5 倾斜 3 次混合，然后每 5 秒钟倾斜 3 次，直至血浆凝固。
- 6 记录血浆凝固时间。
- 7 对照时间应为 15 至 18 秒。（如果时间不足，则用 Owren 进一步稀释爬虫酶试剂进行调整。）
- 8 如果血浆没有凝固，则报告 >90 秒。

正常参考值范围

患者血浆凝固时间应不超过对照血浆 3 秒。对照时间应和患者时间一同报告。

释义

图 17.1. 凝血酶时间延长解释

凝血酶时间	爬虫酶时间	原因	备注
延长	同等延长	低/无纤维蛋白原血症	测量纤维蛋白原
延长	大大延长	异常纤维蛋白原血症	先天或后天
延长	正常	肝素	
延长	略有延长	肝素伴有低/异常纤维蛋白原血症	异常纤维蛋白原血症罕见病例可表现出这种模式
延长	同等延长	弥散性血管内凝血(DIC)	测量 D - 二聚体

注意

有几个制造商提供工作浓度的爬虫酶试剂。这些试剂的优势是，无需处理有健康和安全问题的粗毒制剂。如果使用其中一种试剂，请遵照制造商的使用说明。正常参考值范围可能与以上所述不同，但对结果的解释如图 17.1 所示。爬虫酶是一种昂贵的试剂，可使用鱼精蛋白中和/凝血酶时间法（第 16 节）确认测试样本中是否含有肝素。

18 纤维蛋白原（改良的 CLAUSS 检测法）

原理

将已知纤维蛋白原含量的标准正常血浆用甘恶啉缓冲液稀释。加入凝血酶后测定血浆凝固时间，并以纤维蛋白浓度及血浆凝固时间作图。

凝血时间与纤维蛋白原浓度成正比，取 1/10 稀释液表示标准制剂的值。测试血浆稀释为 1/10，结果从标准线中读取。

试剂

- 含已知纤维蛋白原浓度的标准或参考血浆
- 凝血酶 30 U/ml - 100 U/ml（浓度根据不同来源可不同）
- 咪唑缓冲液（甘恶啉）或 Owren 缓冲液，pH 7.35

方法

- 1 用咪唑缓冲液按 1/5, 1/10, 1/15, 1/20 稀释标准血浆。
- 2 将两份 0.2 ml 每种稀释液加入玻璃凝血管内。
- 3 加温至 37°C 2 分钟。
- 4 加入 0.2 ml 凝血酶 (30 U/ml - 100 U/ml) 并记录血浆凝固时间。
- 5 对于手工操作，测试需重复。如果采用自动化测试，大多数凝血仪不需要如此。
- 6 在双对数图纸上绘制平均血浆凝固时间与纤维蛋白原浓度曲线，取 1/10 稀释液表示标准值。
- 7 测试血浆稀释为 1/10，测定血浆凝固时间，并从图上读取数值。

应确定本地的正常参考值范围，通常接近 1.5 g/l - 3.5 g/l。

对于大多数 Clauss 技术，血浆凝固时间与纤维蛋白原在一定范围内呈线性关系，通常为 10 到 25 秒。

- 对于正常测试血浆，可按 1/10 稀释。
- 对于低浓度（例如，0.75 g/l-1.5 g/l）血浆，应按 1/5 稀释（从图表中的读取值再乘以 5/10 的值）。
- 对于 <0.75 g/l 浓度的血浆，应按 1/2 稀释（从图表中的读取值再乘以 2/10 的值）。
- 对于较高浓度 (>4 g/l) 的血浆，应按 1/20 稀释（从图表中的读取值再乘以 20/10 的值）。

本检测不受静脉血栓栓塞所用治疗浓度肝素的影响。但是，心肺分流术后所用的较高浓度的肝素可延长血浆凝固时间，从而使纤维蛋白原值检测值偏低，除非试剂中含有肝素中和剂。

典型校准数据

注：校准曲线用当地使用的试剂建立。

标准血浆：2.1 g/l 纤维蛋白原

图 18.1. 纤维蛋白原校准示例

标准稀释	纤维蛋白原浓度 (g/l)	凝血时间 (秒)
1/5	4.2	8.5
1/10	2.1	14
1/15	1.4	19.5
1/20	1.05	24.5

示例：

测试血浆 1: 1/10 稀释液，凝血时间 15 秒。

纤维蛋白原 = 1.9 g/l（根据校准图）

测试血浆 2: 1/5 稀释液，凝血时间 16 秒。

纤维蛋白原 = 1.8 g/l（根据校准图）× 5/10（按 1/5 稀释，而不是 1/10）
= 0.9 g/l

有些凝血分析仪可通过测定凝血酶原时间估算纤维蛋白原水平。上述情况是有可能的，因为血浆凝固导致的光散射或透射的变化与最初纤维蛋白原浓度成正比。这些方法通常被称为 PT 衍生的纤维蛋白原测定法。

大部分 PT 衍生测定法具有局限性。特别是，当纤维蛋白原水平非常低 (<1.5 g/l) 或升高（超过 5 g/l）时，得到的结果往往比 Clauss 检测法的结果高出许多。有异常纤维蛋白原时，结果通常为正常。关于这些问题，请参阅 Mackie 等人 (2003) 的文献。

此外，还存在可测定未稀释测试血浆的 Clauss纤维蛋白原含量测定方法，但其结果不可与运用稀释血浆的Clauss 法测定结果等同(Jennings et al. 2009)。

参考文献

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: data from the UK National External Quality Assessment scheme. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20:388-90.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121: 396-404.

原理

肝素酶 1 (Hepzyme® 的活性成分) 特异性针对肝素, 在每个分子的多个位点裂解, 产生失去抗血栓活性的寡糖。Hepzyme® 是肝素黄杆菌中产生的一种纯化细菌肝素酶 1。它能消除每毫升血浆最多 2 IU 的肝素。Hepzyme® 可用于中和样本中的肝素, 以便评估潜在的凝血状态。它特别适用于肝素污染的情况。

试剂

Hepzyme® 是一瓶含肝素酶 1 和稳定剂的干粉制剂。

制造商: Dade Behring

贮存: 4°C

稳定性: 按制造商说明的有效期内。每瓶仅用于测试 1 名患者。

方法

- 1 加入 1.0 ml 乏血小板枸橼酸钠抗凝血浆至 Hepzyme® 瓶。
- 2 加塞, 并轻轻翻转 5 至 10 次。
- 3 室温下放置 15 分钟。
- 4 转移至 2 ml 塑料样本杯中, 等待片刻让所有气泡消失。
- 5 进行所需测试。

检查所有肝素是否被成功去除时应包括凝血酶时间。

测试应尽快进行 (即, 在该程序的测试指南规定的时间内)。

释义

这种酶不会去除任何凝血因子 (不像有些去除肝素的替代技术), 因此, APTT、凝血酶时间或 PT 经 Hepzyme 处理后凝血时间大大缩短则表明肝素的存在。普通肝素和低分子肝素均可由这种酶降解。

20

纤维蛋白原抗原检测——放射状免疫扩散法 (RID)

简介

当 Clauss 纤维蛋白原检测结果明显低于凝血酶原时间衍生的纤维蛋白原或纤维蛋白原抗原法检测的结果时，则怀疑有异常纤维蛋白原血症（II 型纤维蛋白原缺乏症）。

Clauss 法通过加入高浓度凝血酶后确定纤维蛋白形成率而检测纤维蛋白原，而其衍生方法则通过血浆凝固后形成的纤维蛋白凝块检测光密度/光散射的变化。

纤维蛋白原抗原检测通过 Clauss 法检测活性降低，抗原含量正常来诊断异常纤维蛋白原血症。

无纤维蛋白原血症与血浆凝血异常和血小板功能缺陷导致的出血相关。众多缺陷导致异常纤维蛋白原血症，可能表现为纤维蛋白肽 A/B 释放障碍以及纤维蛋白单体聚合异常。II 型缺陷可能无临床症状，但有些变化与出血或血栓形成倾向有关。患者的出血或血栓形成倾向也可能与异常纤维蛋白原血症无关，可能只是偶然发现。

材料

NOR-Partigen 纤维蛋白原 R.I.D. 平板

制造商：Dade Behring

每板有 12 个孔。

试剂

- 含已知浓度纤维蛋白原（可追溯至 WHO 纤维蛋白原国际标准）的校准血浆。
- 待检血浆：枸橼酸钠抗凝血浆通常用生理盐水中稀释（稀释或不稀释均可）至约 2.5 g/l 的浓度（如果该浓度预计大于 5 g/l）。小于 0.5 g/l 的结果报告为 <0.5 g/l（灵敏度的下限）。

方法

- 1 让 RID 板升温至室温，然后取下盖子，打开 5 分钟蒸发多余的水分。
- 2 标准血浆在 100% 浓度以及用生理盐水按 75%, 50% 和 25% 稀释后进行检测。

-
- 3 向孔中精确加入不同稀释度的 5 μ l 标准品、质量控制物、患者血浆（最好两份）。需要加入小体积时，精确移液器必不可少。

 - 4 样本扩散入凝胶（加入样本后不超过 5 分钟）后立即更换盖子，并将平板在室温下平放于湿箱内约 48 小时。

 - 5 只要直径不超过 5.5 mm，即可在 18 小时后估算结果。最终结果必须在 2 天后报告，若直径大于 8 mm，将平板再放一天，让其完全扩散。直径 > 9.3 mm 表明纤维蛋白原水平超过分析灵敏水平，在这种情况下，样本必须用生理盐水稀释后重新检测。

 - 6 使用 Behring 板读取装置（与板一起提供）测量沉降直径。测量至最近的 0.5 mm 处，并读取两次（直径相互成 90°）。

 - 7 绘制标准曲线：以直径² 与标准品浓度值于线性图纸上作图。

 - 8 从该曲线中读取质量控制血浆浓度和患者血浆浓度。

 - 9 如果质量控制血浆浓度在目标范围内，则以 g/l 为单位报告。

21 凝血因子 XIII 筛查

原理

凝血酶和钙激活FXIII，将纤维蛋白交联为稳定形式。在此方法中，尽管使用枸橼酸钠抗凝血浆，仍然有足够的钙离子来激活 FXIII。

正常乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝血浆用于对照。在该血浆中，EDTA 导致钙离子完全螯合，FXIII不能交联纤维蛋白。加入 2% 乙酸或 5M 尿素导致非交联的纤维蛋白分解，而 FXIII 活性大于 10 U/dl 的枸橼酸钠抗凝血浆仍有不溶性凝块。一般来说，使用乙酸（非尿素）的检测灵敏度较高，因为乙酸存在时纤维蛋白凝块会在 FXIII 较高水平时溶解 (Jennings et al. 2003)。

材料/试剂

- 75 × 30 mm 的玻璃管
- 0.9% 生理盐水
- 30 U/ml 凝血酶
- 正常 EDTA 血浆
- 2% 乙酸

方法

- 1 加入 0.2 ml 柠檬酸化测试血浆至含 0.2 ml 0.9% 生理盐水的玻璃管。对于阳性对照，用 0.2 ml EDTA 血浆重复。对于阴性对照，用 0.2 ml 柠檬酸化正常血浆重复。
- 2 加入 0.1 ml 30 U/ml 凝血酶。混合。
- 3 于 37°C 下放置 30 分钟。
- 4 轻轻拍打试管使两侧散开。
- 5 加入 5 ml 2% 乙酸，给试管加塞。室温下放置 12 小时。

结果

- EDTA 血浆无可见凝块。
- 柠檬酸化正常血浆应有完整可见的凝块。
- 如果血块不可见，则受试者有 FXIII 缺乏症。

正常范围

对于正常受试者，2% 乙酸中在 12 小时后仍可见到凝块。

注释

- 可使用 5M 尿素替代 2% 乙酸，所需孵育时间为 18 小时。该方法比使用乙酸的（如上所述）灵敏度低。
- 加钙使血浆凝固再用尿素使凝块溶解只有在 FXIII 水平低于 5 U/dl 时才会产生异常结果。相比之下，用 30 U/ml 凝血酶使血浆凝固后用再 2% 乙酸溶解可使 FXIII 水平低于 10 U/dl 时便有异常结果 (Jennings et al. 2003)。
- FXIII 水平高于 5 U/dl 的患者也有可能出血（参阅 Bolton-Maggs 等人 2004 年的文献）。

参考文献

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders — review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Problems relating to the diagnosis of FXIII deficiency. *Thromb Haemost* 2003; 1: 2603-8.

22

凝血因子 II, V, VII 或 X 活性检测—— 基于 PT 法

原理

凝血因子 II, V, VII 和 X 均可使用基于凝血酶原时间的一步法进行检测。该检测包括比较标准或参考血浆和待检血浆稀释液纠正已知完全缺乏某种凝血因子血浆的凝血酶原时间的能力。例如（如下所述），在凝血因子 V 活性的检测中，血浆缺乏凝血因子 V, 但含有正常量的凝血因子 II, VII, X 和纤维蛋白原。凝血因子 II, VII 和 X 可用类似方法检测，可用以下示例中的乏 FV 血浆替代待检因子的乏因子血浆，并使用含已知浓度待检凝血因子的参考血浆。

试剂

- 乏FV 血浆
为凝血因子 V 先天性或后天性（老年人血浆）缺乏。
- Owren 缓冲盐水
OBS 或甘恶淋缓冲液（见第 9 节）
- 乏血小板枸橼酸钠抗凝血浆：待检血浆和标准血浆
标准血浆使用 20 名供血者正常混合血浆（保存于 -70°C 或以下）或商用参考或标准血浆。
- 凝血活酶/钙（与 PT 测试中使用的一样）

方法

- 1 按图 22.1 所示在塑料试管中制备待检血浆和标准血浆稀释液。

图 22.1. 测试和标准血浆稀释液的制备

稀释	血浆 (ml)	OBS (ml)
1/5	0.1	0.4
1/10	0.1	0.9
1/20	0.5 (1/10)	0.5
1/40	0.5 (1/20)	0.5

注：在使用 1/10 稀释液制备 1/20 稀释液之前，要充分混匀 1/10 稀释液。在使用 1/20 稀释液制备 1/40 稀释液之前，要充分混匀 1/20 稀释液。血浆稀释液应在制备后立即测试。如果室温超过 25°C，有必要在分析之前将稀释液于湿冰上保存。

2 按以下操作检测参考或标准血浆的稀释液：

- i. 将 0.1 ml 的各种稀释度的稀释液加入 75 × 10 mm 的玻璃试管内。
- ii. 加入 0.1 ml 乏凝血因子 V 血浆。
- iii. 加温至 37°C 2 分钟。
- iv. 加入 0.2 ml 预加温的凝血活酶/钙试剂。
- v. 启动秒表并混合。

注：如果凝血活酶试剂不含有钙，则将 0.1 ml 凝血活酶加入稀释液和乏因子血浆的混合物中。升温至 37°C 1-2 分钟后，混合物中加入 0.1 ml 预加温（至 37°C）的钙溶液中。

3 记录血浆凝固时间。

4 重复各种稀释度血浆的检测。

对于预期正常的待检血浆，检测按 1/10、1/20 和 1/40 稀释的稀释液。对于预期凝血因子含量下降的待检血浆，检测按 1/5、1/10 和 1/20 稀释的稀释液。

对于“空白”管也应按以下操作检测：

- 0.1 ml OBS
- 0.1 ml 乏凝血因子 V 血浆
- 0.2 ml 凝血活酶/钙试剂

“空白”管的血浆凝固时间反映了乏因子血浆的质量，其因子活性应小于 1%。

结果

在 3 × 2 周期对数表上以对照和待检血浆的血浆凝固时间和 FV 的浓度绘图。该类图表的示例（FVIII 检测法）如第 23 节所示。1/10 稀释代表 100% 活性，因此，1/5 稀释相当于 200% 活性，以此类推。在对数标尺上绘制浓度，在线性标尺上绘制血浆凝固时间。

从这些图中推断出相对于正常血浆或标准参考血浆的患者血浆中的 FV 相对含量。示例参见基于 APTT 检测法一节（图 23.1）。等于 100% 活性的检测血浆的凝血时间（100% 浓度的标准血浆处对应的待测血浆的 PT 值）可从标准曲线中读取，不同浓度

的标准血浆均对应着各自的PT值。由此曲线可以得出待测血浆中的凝血因子相对于标准血浆因子活性的百分比。该百分比乘以标准血浆中凝血因子浓度（单位为 IU/dl）可得出待检血浆中的凝血因子浓度（单位为 IU/dl）。

注释

- 对于上述每种凝血因子，应确定当地的正常参考值范围，但 FV、FVII 和 FX 的下限通常为 50-70 IU/dl。正常 FII 的下限值较高。在一项研究中，有 FII 缺乏症家族史的正常受试者以及其它无关的正常受试者的 FII 含量范围为 84-130IU/dl (Girolami et al.1998)。另一个中心报告了 84 - 132 IU/dl 的参考值范围 (Bolton Maggs et al. 2004)。
- FV 含量下降的个体也应进行 FVIII 检测，以排除 FV和 FVIII联合缺陷症。
- 在有些 FVII 缺乏症的病例中，根据凝血活酶来源不同，所测得的 FVII:C 含量可能有差异。因此，建议使用人凝血活酶，在此基础上获得的结果可能更能反映出体内的活性。参见 Bolton-Maggs 等人(2004) 的文献。在某些罕见情况下，如果使用兔凝血活酶，结果可能会偏低，但如果检测中使用人凝血活酶，则正常。这可能是有些重度 FVII 缺乏症患者无出血症状的原因。

参考文献

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A. Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinol* 1998; 9: 557-569.

FVIII:C, FIX, FXI 或 FXII 一步法检测——基于 APTT

23

原理

本节描述了 FVIII 一步法检测。这种检测法基于比较标准和待检血浆稀释液纠正已知完全缺乏 FVIII, 但含有正常凝血所需的其它所有因子血浆的 APTT 的能力。对于因子 IX, XI 和 XII, 检测方法基本相同, 以相关因子缺乏血浆替代乏 FVIII 血浆以及选择适当的参考血浆后进行检测。

试剂

- 乏血小板柠檬酸化待检和标准血浆
所使用的标准血浆应是本地制备的混合血浆（保存于 -70°C 或以下）或商用标准血浆。无论是哪种情况, 参考血浆都必须用 FVIII 的国际标准进行校准。正常混合血浆有 100 U/dl 的 FVIII:C 是一种理想的假设。
- 乏 FVIII 血浆
该血浆可从商业途径获得, 也从 FVIII 水平低于 1 U/dl、不含抗 FVIII 抗体、两周未接受过治疗、以及肝功能正常的献血者中采集。肝功能异常可导致其它凝血因子水平的下降, 从而影响该检测的特异性。

该血浆可等份储存于 -37°C 。最好使用正常血浆经 FVIII 免疫吸附（使用单克隆抗体）产生的乏 FVIII 血浆。可从商业途径获得, 与接受过血浆产品治疗的血友病患者的血浆相比, 其被病毒污染的可能性更小。然而, 并非所有免疫吸附血浆中的 FVIII 水平都 <1 U/dl, 应注意核实。有些专家认为, 乏 FVIII 血浆中含有正常浓度的 VWF 可能更好, 并且在 FVIII 活性检测作为 FVIII 抑制物测定的部分, 有证据支持这种优势。
- APTT 试剂
- Owren 缓冲生理盐水（OBS 或甘恶啉缓冲液；见第 9 节）
- 25mM CaCl_2

方法

- 1 用塑料试管中的生理盐水制备标准和待检血浆的 1/10 稀释液。（如果测试血浆预期凝血因子 VIII 含量很低, 则以 1/5 稀释开始）。

- 2 取 0.2 ml 体积，在塑料试管中制备按 1/10 至 1/40 稀释的标准和待检血浆 OBS 的倍比稀释液。（在转移到下一个试管之前将每个稀释液充分混匀。）血浆稀释液应在制备后立即检测。如果室温超过 25°C，有必要在测试之前将稀释液于湿冰上保存。
- 3 将 0.1 ml 的每份标准稀释液加入 75 x 10 mm 的玻璃试管内。
- 4 加入 0.1 ml 乏 FVIII 血浆，并转至 37°C 水浴。
- 5 加入 0.1 ml APTT 试剂，并孵育 5 分钟。
- 6 5 分钟后加入 0.1 ml CaCl₂ 并记录血浆凝固时间。
同时，“空白”对照应按如下步骤进行：
 - 0.1 ml OBS
 - 0.1 ml 乏 FVIII 血浆
 - 0.1 ml APTT 试剂
 - 孵育 5 分钟
 - 0.1 ml CaCl₂

空白对照物的凝血时间不得长于校准表中标准血浆 1% FVIII 活性所对应的时间。如果时间较短，则表明基质血浆仍含有一定量的 FVIII，因此，不是一种合适的基质血浆。

结果

结果绘制如第 22 节所示，要求为双对数或对数/线性标尺图纸。

将 1/10 稀释的标准血浆 FVIII：C 赋值为 100%，1/20 稀释为 50%，1/40 稀释为 25%。

应获得两条互相平行的直线。

读取待检样本的浓度，如图 22.1（第 22 节）所示。在此示例中，待检样本的 FVIII 浓度是标准样本 FVIII 浓度的 7%。如果标准样本的浓度为 85 IU/dl，则测试样本的浓度为 $85 \text{ IU/dl} \times 7\% = 6 \text{ IU/dl}$ 。

如果直线不平行，则应重复检测。

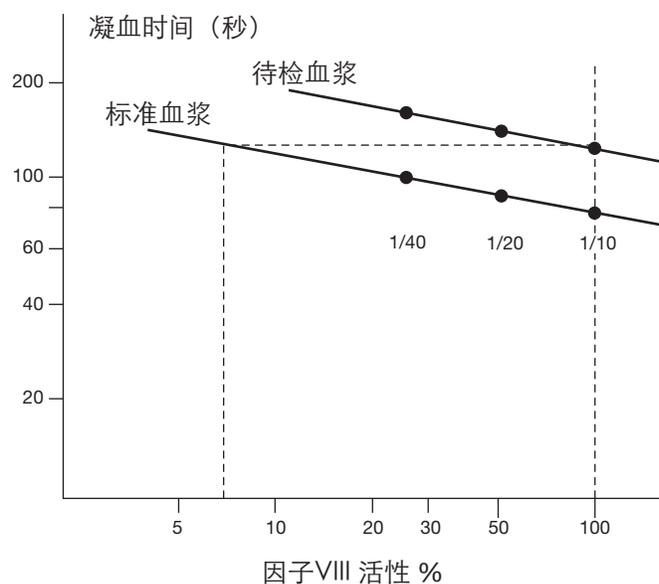
直线不平行也可能是技术误差所致。如果排除了技术误差，则有可能是血浆中含有抑制物所致，这些抑制物可能是特异的 FVIII 抑制物或是狼疮型抗凝物质，呈现出聚合模式。交叉直线通常发生于被激活的样本。

注释

- 如果待检血浆 FVIII（或 FIX、FXI 或 FXII）浓度接近零（即，所有稀释液的凝血时间与空白对照类似），则可出现不平行的直线。

- 应确定当地的正常参考值范围，但 FIX 或 FXI 的下限值通常为 50-65 IU/dl。
- 对于 FXI，国际单位最近已确立。在撰写本文时，报导的以 IU 为单位的 FXI 正常含量值的相关资料很少。以往提出的以 IU 为单位的文献指出，FXI 正常范围的下限值为 63 - 80 U/dl（参见 Bolton-Maggs 等人2004 年的文献）。

图 23.1.FVIII 检测图



参考文献

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders — review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

24 冷沉淀中的凝血因子 VIII:C 检测

如果待检样本中含有正常或接近正常水平的 FVIII:C，则第 23 节所述的检测条件可以采用。如果水平高于 150IU/dl，则这些条件需要调整以使检测方法可行。

冷沉淀中 FVIII:C 的水平可因供体个体不同而不同，但一般均在 200 - 1000 IU/dl 范围内。在这些水平中，待检标本必须在检测前预先稀释以降低浓度。对于大多数冷沉淀，按 1:5 或 1:10 的比例预稀释将浓度降低至第 23 节所述检测方法所要求的水平（即，预稀释标本在分析缓冲液中按所述方法以 1/5、1/10、1/20 进一步稀释）。

如果冷沉淀未预先稀释至合适的浓度，则不能获得线性的样本曲线，或样本曲线不能与校准曲线相平行。这样的检测将失败，并且结果也不准确。

在 FVIII:C 检测之前应立即完成冷沉淀的预稀释。有些中心使用 FVIII:C 检测法中的缓冲液来稀释（如：Owren 缓冲液或咪唑/果绿定），而另一些中心则使用乏 FVIII 血浆稀释。一般情况下，如果使用乏 FVIII:C 血浆，这种预稀释液可能更稳定。因此，乏 FVIII:C 血浆为首选稀释剂。

各中心对冷沉淀的 FVIII 检测精度与检测血浆样本时的精度要求类似 (Jennings et al. 2009)。

参考文献

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme 2003-2008. *Haemophilia* 2009; 15: 571-7.

原理

在 1955 年，此法作为凝血活酶稀释检测的改良方法。两步法 FVIII:C 检测原理是：在含有过量 FX、激活的 FIX、磷脂、钙和 FV 的检测混合液中，系统中的 FVIII 含量限制了凝血速率。氢氧化铝吸附血浆去除了活化的因子及维生素 K 依赖性因子。需去除凝血酶原，使最初孵育混合液中不含有这种酶。如果没有这一步骤，则混合液中将包含形成纤维蛋白所需的所有成分，之后混合液将凝固。

被吸附的标准和待检血浆的稀释液在第 1 步用组合试剂进行孵育后生成 FXa。正常混合血浆中凝血酶原和纤维蛋白原将在第 2 步加入，使凝块形成并使血浆凝固时间依赖于凝血因子 VIII:C 的最初含量。

试剂

- 组合试剂（参见以下的“组合试剂的生产”）
- Owren 佛罗那缓冲液
- 正常混合血浆（基质血浆）：超冷冻储存
- 标准血浆或参考血浆
- 内部质量控制 (IQC)
- 0.0125M CaCl₂（如：APTT 测试中使用的按 1:2 稀释的 0.025M CaCl₂）
- 氢氧化铝混悬液（如：SIGMA 目录代号 A8222）：在室温下储存

样本要求

枸橼酸钠抗凝血浆，如果需要，可在测试前冷冻保存。

方法

- 1 用蒸馏水重悬标准血浆 10 分钟后使用，并且用 3 ml 0.0125M CaCl₂ 重组组合试剂至少 15 分钟后使用。
- 2 制备 IQC 血浆和基质血浆。如果有任何血浆冻结，则使用前在 37°C 下解冻 5 分钟。

- 3 为盛放每份样本（包括 IQC 和标准样本）的一次性塑料试管贴标签。
- 4 将 0.45 ml 标准、IQC 和患者血浆放入对应的塑料试管中。
- 5 将 50 μ l 充分混匀的氧化铝溶液加入每根试管，充分混匀。
- 6 对于少量血浆，加入 0.225 ml 血浆和 25 μ l 氧化铝溶液。
- 7 在 37°C 下孵育 3 分钟，以 5000 g 旋转 2 分钟。
- 8 立即将上层血浆转移至与使用的分析仪兼容的塑料量杯或试管中。注意不要混起沉淀的氧化铝。

注：以下步骤以使用 Sysmex CA 系列分析仪为基础。该检测可在一些其他制造商的仪器上执行。本手册的一名共同作者已成功地使用来自 Instrumentation Laboratory 的分析仪进行了检测，该方法与其它类型的分析仪也兼容。因此，这种特殊的方法列为一个示例介绍。

- 9 装载组合试剂、检测缓冲液、正常混合血浆/基质血浆至自动分析仪上。
- 10 吸附血浆按以下顺序用于分析中：标准血浆、IQC 血浆、患者血浆、最后用第二份标准血浆。FVIII 浓度正常的样本通常使用 1/50-1/400 三种不同的稀释方法进行检测。

如果 FVIII 含量低 (< 0.05 IU/dl)，可按 1/10、1/20 和 1/50 稀释。如果 FVIII 含量升高 (>1.5 IU/dl)，可按 1/800-1/3200 稀释。否则，患者剂量反应线可能与标准线不平行。

结果

结果绘制和 FVIII 活性计算如一步法检测中（第 23 节）所述。

25.1 两步法因子 FVIII:C 检测所用的混合试剂的制备

取足量的 FV 和磷脂与稀释的老年人血清按 5:1:1 的比例制备（即，5份血清对 1 份磷脂和 1 份 FV）。例如，240 ml 稀释血清、48 ml FV 和 48 ml 磷脂（或 180 ml: 36 ml: 36 ml）。

试剂

- 老年人血清
 1. 玻璃试管中采集自至少 6 名正常供血者的 10 ml 血液；无添加物。

2. 在 37°C 下孵育 4 小时，然后在 4°C 下过夜。
 3. 以 3000 rpm 旋转 10 分钟。
 4. 在硅化玻璃管中分离并吸出，制备混合血清（可冷冻保存）。
- 牛 FV (Diagnostic Reagents 公司，地址：Thame, Oxfordshire, England)
用 1 ml 甘恶啉缓冲液重悬每份样本。
 - 磷脂 (Bell 和 Alton, Diagnostic Reagents 公司，地址：Oxford England)
用 1 ml 甘恶啉缓冲液（即，5 倍浓度）重悬每份样本。
 - 甘恶啉缓冲液
 - HEPES 酸 (Sigma H3375)

方法

- 1 用甘恶啉缓冲液按 1/10 比例稀释老年人血清。
 - 2 每毫升血清中加入一个小玻璃球（路标玻璃球）激活稀释血清一小时，然后放置于旋转混合器上一小时，并用实验室所用薄膜覆盖在顶部。（注：100 个路标玻璃球的重量为 3.7 g）。
- 注：对于第 3 至第 8 步，要尽快执行。
- 3 用 1 ml 甘恶啉缓冲液重悬 FV 血浆。
 - 4 用 1 ml 甘恶啉缓冲液重组磷酸。
 - 5 稀释的活化血清、FV 和磷酸按 5:1:1 的比例混合。
 - 6 充分混匀，加入 HEPES 粉，使之浓度为 1%，以将 pH 值稳定于 7.0（例如，如果为 300 ml 液体，则加入 3 g HEPES）。
 - 7 分为每份 0.5 ml。
 - 8 可冻干（参见第 40 节关于冻干处理内容）
 - 9 按以下所述检验新试剂的最佳条件。

FXa 生成稳定状态评估

最佳样本稀释方法、培养时间、检测所用的总体积、0.0125M CaCl₂ 重悬体积、重悬时间、以及重悬混合试剂的稳定性需要系统评估以了解 FXa 生成的稳定状态。

以下情况发生的顺序和程度尚不明确。根据批号不同，会有变化。很好的出发点是在相同条件下使用当前批次，然后，每次变化一个参数。

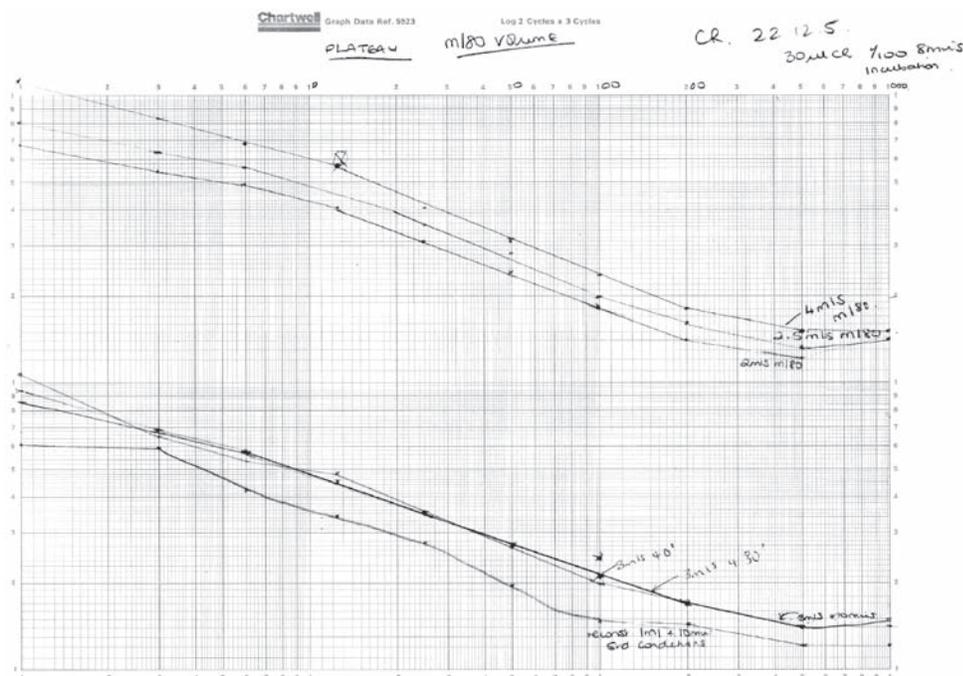
- 含0.0125M CaCl₂的重组体积：0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml, 3 ml, 3.5 ml。
- 使用前的重组时长/重组后的稳定性：使用前立即重组、5分钟、10分钟、30分钟、60分钟、120分钟。
- 培养时间：5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟。
- 样本稀释：1/20, 1/50, 1/80, 1/100。
- 检测所用组合试剂的体积：20 μl, 30 μl, 40 μl, 50 μl 等。

每次进行检测时，根据图 25.1 中的示例在双对数图纸上绘制所有结果。选择有曲线直线部分中大部分点的稀释法和条件。第一次稀释的理想条件中，凝血时间约为 20 至 30 秒。

注释：

- 正常混合血浆/底物来自于凝血筛查中检测后剩余的正常血浆或来自于健康正常人的血浆。
- 每份混合血浆的 PT 和 APTT 均要正常。
- 正常混合血浆可以 3 ml 或 5 ml 装入塑料瓶，在 -80°C 下储存至少六个月。

图 25.1.FXa 生成稳定状态示例



简介

很多年以来，全球最常用FVIII:C的检测方法为一步法检测，如第 23 节所述。

一步法检测有诸多局限，包括：如果存在狼疮抗凝物则有干扰。更重要的是，一步法检测的正常 FVIII:C 含量结果不能排除轻度血友病A。几个研究报道显示采用不同的检测法测定测得的轻度血友病A患者的FVIII 活性存在差异 (Parquet-Gernez et al. 1988, Duncan et al. 1994, Duncan et al. 1999)。20% 以上的轻度血友病A患者与此差异相关，表明不同检测系统所得结果存在着两倍差异 (Parquet- Gernez et al. 1988)。

在有些病例中，一步法检测获得的结果比两步法或发色底物法获得的结果高五倍 (Parquet- Gernez et al.1988)。最常见的是，一步法获得的结果比两步法或发色底物法获得的结果高两倍以上。但在上述四分之三以上的患者中，所有检测结果低于参考范围的下限，从而不论使用何种方法进行分析，均可作出可靠的诊断。

然而，在一小部分患者中，一步法获得的结果完全在正常值范围内，但是两步法或发色底物法测得的结果降低 (Keeling et al.1999, Mazurier et al.1997)。这些患者有出血病史，与两步法或发色底物法测得的低水平一致。

在很多病例中，基因缺陷以被检测到，所以毫无疑问这些受试者确实患有血友病 (Rudzi et al. 1996, Mazurier et al. 1997)。根据文献，约有 5%-10% 经基因分析确认为轻度血友病A的患者一步法 FVIII:C 检测正常。由于 FVIII 活性在一步法 APTT 检测中正常，因此，APTT 在这些患者检测中也正常就不足为奇。这提示有轻型血友病A临床病史的患者还用采用两步法（参见第 25 节）或发色底物法检测，即使 APTT 和一步法检测结果为正常也应如此。

发色底物法检测 FVIII:C有商业化试剂盒提供。适用于一步法FVIII:C检测正常血友病A患者的进一步检测。这些患者结果的示例如图 26.1 所示。应用Siemens/Dade Behring公司提供的商用发色底物检测试剂盒，但是其最终结果并没有显示出优于其它类似检测方法，这些方法也同样成功地用于类似的检测。

有这样的轻型血友病A病例：一步法检测结果FVIII:C下降，但是两步法或发色底物法测得结果正常 (Mumford et al. 2002, Lyall H et al. 2008)。有许多病例（但不是全部病例），没有个人或家族出血病史也不需要 FVIII 替代治疗，他们的临床表型与发色底物法或两步法检测FVIII:C相一致 (Lyall H et al. 2008)。

图 26.1. 经基因确认为轻度血友病 A 患者以及检测结果差异示例

病例	一步法(IU/dl)	两步法 (IU/dl)	发色底物法 (IU/dl)
A	101	34	13
B	88	15	28
C	63	30	40
D	55	24	40
E	58	21	33
F	72	21	36
G	84	19	45

基于上述结果，血友病中心应该能够进行发色底物法及两步法检测FVIII:C。应对 APTT 正常且一步法检测FVIII:C正常的个人和家族临床出血史与轻型血友病相一致的受试者中进行上述两种方法测试。

一种改良的发色底物法（Coamatic 检测法的改良版本，Instrumentation Laboratory 公司）已有报道。适合于 FVIII 水平非常低时检测 (Yatuv et al. 2006)。据报道这种方法在 FVIII:C 为 0.1-2 IU/dl 范围内可准确和精确测量 FVIII (0.1-2% FVIII, 或 0.001-0.02 IU/ml)

分析原理

在有些（但不是全部）发色底物法中，样本中的所有 FVIII 被凝血酶激活。在活化的 FIX、磷脂和钙离子存在条件下，FVIII a 加速 FX 向 FXa 转换。FXa 活性通过水解 FXa 特异的对硝酸苯胺基质而进行计算。在 405 nm 下测得的对硝酸苯胺（黄色）释放初始率与 FXa 活性成正比，与样本中的 FVIII 活性也成正比。请参阅 Lundblad 等人 (2000) 的文献。

参考文献

Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, Lloyd JV. Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII assay methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 87: 846-848.

Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, Waseem N, Bagnall R, and Lloyd JV. Diagnostic importance of the two stage FVIII:C assay demonstrated by a case of mild hemophilia associated with His1954 → Leu substitution in the FVIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999; 105: 1123-6.

- Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG, White GC. Issues with the assay of FVIII activity in plasma and FVIII concentrates. *Thromb Haemost* 2000; 84:942-8.
- Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346 → Cys mutation results in factor VII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype: Is this mild haemophilia A? *Haemophilia* 2008; 14:78-80.
- Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gernez A. Mutations in the FVIII gene in seven families with mild haemophilia A. *Br J Haematol* 1997; 96:426-7.
- Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJD, Manning RA, Kemball-Cook G. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of FVIII in an individual with FVIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol* 2002; 118:589-594.
- Parquet-Gernez A, Mazurier C, Goudemand M. Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs: Characterisation of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost* 1998; 59:202-206.
- Rudzi Z, Duncan EM, Casey GJ, Neuman M, Favaloro RJ, Lloyd JV. Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and familial discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol* 1996; 94:400-406.
- Yatuv R, Dayan I, Baru M. A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of FVIII activity (FVIII:C). *Haemophilia* 2006; 12:253-257.

27

内源性凝血途径一步法检测激肽释放酶原 (PKK) 和高分子量激肽原 (HMWK)

原理

HMWK (Fitzgerald 因子) 和 PKK (Fletcher 因子) 是接触途径中的凝血因子。两者之中任何一个因子水平下降均可使大部分 APTT 试剂 (不同的激活剂) 检测的活化部分凝血活酶时间延长。当 HMWK 或 PKK 完全缺失 (<1 U/dl) 时, APTT 通常 >200秒, 并且长于相同检测系统中FVIII 或 FIX 完全缺乏时的 APTT检测结果。但两者之中任何一个因子缺乏时,应用鞣花酸作为活化剂的 APTT试剂 (例如, Actin FS) 检测时可得到正常的APTT结果。因此, 此类试剂不能用于这些因子的一步法检测。

用一步法对这些因子进行检测时, 某些试剂的剂量反应曲线的斜率较其它试剂的要大。这里介绍的方法采用一种剂量反应曲线特别陡峭的特定试剂进行检测, 可以获得更准确和更精确检测结果。

试剂

- Dapttin APTT 试剂 (Technoclone 公司, Vienna, Austria)
根据制造商的说明, 储存于 2°C-8°C 下。
- 25mM CaCl₂
储存于 2°C-8°C
- Owren's Veronal 缓冲液
储存于 2°C-8°C
- 乏PKK (Fletcher 因子) 血浆
例如: 冻干试剂 (Technoclone 公司, Vienna, Austria)
储存于 2°C-8°C
- HMWK (Fitzgerald 因子) 缺乏性血浆
例如: 冻干试剂 (Technoclone 公司, 地址: Vienna, Austria)
储存于 2°C-8°C
- 参比血浆 (例如: 正常混合血浆, 参见第 7 节)
- 室内质控样本

方法

- 1 检测法设计如同第 23 节所述的FVIII因子的一步法检测（即，3个稀释度的标准血浆，3个稀释度的待测血浆）。
 - 2 使用 Owren 缓冲液进行稀释。
 - 3 最适合的检测稀释度通常比前面所述的一步法 FVIII 或 FIX 检测法中使用的稀释度高。
 - 4 校准曲线的分析和建立、以及检测结果的计算如一步法 FVIII 检测法中（第 23 节）所述。
-

文献中的正常范围如下：

HMWK: 0.70-1.20 U/ml (70-120 U/dl)

PKK: 0.70-1.20 U/ml

在撰写文本时，尚没有 HMWK 或 PKK 的国际标准品。

28 基于 APTT 的凝血因子抑制物筛查

原理

影响 APTT 的凝血抑制物可能是即刻起作用或具有时间依赖性。含有即刻作用性抑制物的测试血浆与正常血浆混合时，很少或不能够纠正凝血时间。另一方面，时间依赖性抑制物在被检测之前需要与正常血浆共同孵育一段时间。

正常血浆和待测血浆在 37°C 孵育 1-2 小时，不仅各自孵育而且还有两者 50:50 混合物的孵育。然后测定正常血浆、待测血浆、孵育混合物、以及单独孵育（即时混合）后等体积待测血浆和正常血浆制备的混合物的 APTT 值。对每种混合物的 APTT 纠正程度进行比较。

独立孵育后制备的混合物纠正作用差提示有即刻作用性抑制物。孵育混合物的纠正作用差提示有时间依赖性抑制物。

试剂

- 正常血浆：20 名供体的混合血浆
- 待测血浆
- APTT 试剂

方法

- 1 准备三根试管，分别标记为：A, B 和 C
- 2 向 A 试管加入 0.5 ml 正常血浆，B 试管中加入 0.5 ml 待测血浆，C 试管分别加入 0.2 ml 正常血浆和待测血浆。
- 3 37°C 孵育 1-2 小时。
- 4 试管 A 和 B 分别取出等量血浆按 50:50 比例混合，即为试管 D。试管 D 为即时混合的试管。
- 5 分别对试管 A, C, D 和 B（按此顺序）测定 APTT 两次。

结果与解释

图 28.1. 基于 APTT 的凝血因子抑制物筛查示例

样本	1	2	3
A: 正常血浆	40	40	40
B: 待测血浆	90	90	90
C: 待测 + 正常血浆 (在混合后孵育)	45	70	70
D: 待测 + 正常血浆 (在混合前单独孵育)	45	48	70

样本 1: 有内源性凝血因子缺陷但无抑制物的血浆

样本 2: 含时间依赖性抑制物的血浆

样本 3: 含即刻作用抑制物的血浆

29

瑞斯托霉素辅因子活性/血管性血友病因子活性 (VWF:RCo 或 VWF:Act)

简介

瑞斯托霉素辅因子检测对诊断血管性血友病 (VWD)至关重要。虽然在进行血小板聚集试验时可进行瑞斯托霉素诱导的血小板聚集（在富血小板血浆中），但是该测试不够灵敏，并且在除 VWD 之外的其他疾病中可出现聚集结果异常。VWF:RCo 检测在诊断 2A, 2B 和 2M 型 VWD 中非常有用，这些亚型中 VWF: Ag 可能正常或接近正常而 VWF:RCo 明显降低。

瑞斯托霉素辅因子检测

这里描述的方法结合了肉眼可见的检测方法以及Evans和 Austen 血小板固定技术。

试剂

- 参比血浆
- 固定洗涤的血小板
采用Evans和 Austen方法 (1977)，用甲醛固定从血小板浓缩剂（如：治疗血小板疾病患者所使用的血小板浓缩剂）中得到的正常人血小板。参阅第85页的“固定血小板制备”。
- 瑞斯托霉素 (Ristocetin A SO₄ Macrofarm Ltd., Third Floor, 27 Cockspur Street, Trafalgar Square, London SW1Y 5BN)
100 mg 粉末用 3.3 ml 生理盐水溶解，每份 0.1 ml 分装于加盖塑料试管内，并保存于 -70°C。这种储存液的浓度为 30 mg/ml。检测时需要的最终浓度为1.0 mg/ml。由于检测中要求按 1/4 稀释，因此所需溶液的浓度为 4.0 mg/ml。在0.1ml 30mg/ml储存液中加入0.65ml生理盐水就可得到4.0mg/ml的溶液。（这应给出空白时间，即，0.2 血小板 + 0.1ml瑞斯托霉素 + 0.1 缓冲液的混合物应> 60 秒）
- 6 g% 白蛋白柠檬酸-生理盐水缓冲液
柠檬酸/生理盐水（1 份 0.11M 柠檬酸钠：5份生理盐水）缓冲液加入1.2 g 牛血清白蛋白

方法

1 使用白蛋白柠檬酸-生理盐水缓冲液，按以下方法稀释正常和待测血浆：

- 标准血浆：1/2, 1/4, 1/8
 - 待测血浆：1/2, 1/4, 1/8
-

2 在室温下按以下所述测试每份稀释液：

- i. 在玻璃凝血管中，加入：
 - 0.2 ml 固定洗涤的血小板（血小板悬浮液中计数为 $800 \times 10^9/l$ ）
 - 0.1 ml 稀释的血浆
- ii. 充分混匀，尽量避免气泡形成。加入 0.1 ml 瑞斯托霉素（4.0 mg/ml，终浓度为 1.0 mg/ml）。
- iii. 启动秒表。用灯光照亮试管，在黑暗的环境中倾斜试管并轻轻摇晃。
- iv. 记录较大可见聚集形成的时间。

每份稀释液测试两次，如果两次之间的差异 >10%，则测试三次。

计算

在 2 周期双对数坐标纸 (2-cycle log-log paper) 上以正常血浆稀释液凝集所需的时间对应稀释度/浓度绘制曲线，同时绘制不同浓度待测血浆凝集所需要时间曲线，两个曲线应该呈平行的直线。

待测血浆中瑞斯托霉素辅因子的浓度从标准曲线中读取，并按稀释度进行纠正，类似于一步法 FVIII 检测章节（第 23 节）中所述的方法。

应建立本地的正常值范围，但通常接近 50-150 IU/dl。

29.1 固定血小板制备

图 29.1. 固定血小板制备所用试剂

0.2% EDTA 溶液	2 g EDTA-Na ₂ , 8.5 g NaCl, 蒸馏水定容至 1 升, pH 6.4。
固定液	20 ml × 40% 甲醛溶液 (或 22.2 ml 36% 甲醛)。0.2 g EDTA-Na ₂ , 8.5 g NaCl, 0.4 g 磷酸氢二钠, 1.1 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 蒸馏水定容至 1 升, pH 6.4。
洗涤液	1 份柠檬酸三钠溶液 (3.8%) 5 份生理盐水溶液, pH 6.4
混悬溶液	成分同洗涤液, 但 pH 为 7.4
储存溶液	0.2 g EDTA-Na ₂ , 8.5 g NaCl, 0.10 g 叠氮化钠, 蒸馏水定容至 1 升, pH 6.4。

方法

- 1 获取尽可能新鲜的血小板储存于柠檬酸-磷酸-葡萄糖溶液 (用于血制品的采集) 内或将血液抽取到 0.109M 柠檬酸溶液并制备富血小板血浆 (PRP)。
- 2 将 PRP 置于加盖塑料容器中, 并于室温下静置一小时, 然后在 37°C 放置一小时。将 9 份 PRP 和 1 份 EDTA 溶液混合。在室温下静置两分钟。
- 3 在 4°C 条件下加入等量的固定溶液, 然后置于 4°C 过夜。
- 4 以 280 g 离心 20 分钟。弃上清液并将血小板颗粒控干。
- 5 加入 2% PRP 起始体积的洗涤液并将血小板重新悬浮。
- 6 进一步加入 25% PRP 起始体积的洗涤液并置于 4°C 一小时。
- 7 以 280 g 离心 20 分钟, 沥干并重悬于混悬液供即时使用或加入储存液置于 4°C 备用。
- 8 重悬至浓度约为 $800 \times 10^9/L$ 。

血小板储存时易形成松散的沉淀物。检测开始前, 去除血小板上层的储存液, 并用等体积混悬液替代。血小板可至少稳定两个月。

参考文献

Evans RJ, Austen DE. Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. *Brit J Haemato* 1997; 37: 289-94.

ELISA 法检测血管性血友病因子抗原 (VWF:Ag)

30

原理

人血管性血友病因子 (VWF) 的多克隆抗体包被在微孔板的塑料表面，加入稀释后的待测血浆和标准血浆并孵育，孵育过程中vWF可与包被的抗体结合，后加入酶标记的二体，酶标抗体也可与 VWF 结合。结合上去的总的抗体量可通过加入酶底物后的显色反应来进行量化。

缓冲液

- 碳酸盐缓冲液0.05M, pH 9.6
1 升含： 1.59 g 碳酸钠
2.93 g 碳酸氢钠
0.20 g 叠氮化钠
- 磷酸盐缓冲液 0.01M, pH 7.2
1 升含： 0.345 g 磷酸二氢钠
2.680 g 磷酸氢二钠 · 12H₂O
8.474 g 氯化钠
1 ml/l PBS 吐温 20
0.5 ml/l PBS 吐温 20
- 柠檬酸磷酸盐缓冲液 0.1M, pH 5.0
1 升含： 7.30 g 柠檬酸
23.87 g 磷酸氢二钠 · 12H₂O

底物溶液

80 mg 1,2-二氯邻苯二胺溶解于 15 ml 柠檬酸磷酸盐缓冲液中并加入 10 μ l 的20 vols 的过氧化氢。

注：每次必须新鲜制备。

其它材料

- 抗 VWF 抗体
例如：来自 DAKO a/s 的兔抗人 VWF (Production Svej, DK-2600, Glastrup, Denmark)。

- 过氧化物酶标记的抗 VWF 抗体（也来自 DAKO）。

注：其它来源的抗体同样也可以使用。以下建议使用的抗体稀释液可能因所用抗体的来源和批号的不同而异。

- 一次性微孔板和酶标仪
- 10% 硫酸盐溶液

方法

- 1 将抗体用碳酸盐缓冲液按 1/1000 比例稀释，每孔加入 100 μ l。室温下将平板置于湿盒内孵育一小时。
- 2 弃去孔内液体，每孔加入含 0.5 ml/l 吐温的 PBS，然后翻转并吸水纸上轻轻拍打，重复洗涤四次。
- 3 用 1 ml/l 吐温-PBS 稀释标准血浆（按 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/80, 1/160, 1/320 比例）和待测血浆（对于正常血浆，按 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 比例；对于预期结果值较低者，按 1/5 比例）。
- 4 每孔加入 100 μ l 稀释好的样本，孵育一小时并洗涤。方法同前。
- 5 在 1 ml/l 吐温 PBS 中，按 1/1000 比例稀释过氧化物酶标记的 VWF 抗体（DAKO 公司产品），取 100 μ l 加入每孔，孵育，方法同前。
- 6 制备底物缓冲液；用铝箔避光保存，并不断混合，直到晶体或小片溶解。（在使用前即时加入过氧化氢。）
- 7 开启酶标仪。
- 8 用 0.5 ml/l 吐温 PBS 洗涤两次，然后用 0.1M 柠檬酸磷酸盐缓冲液洗涤一次。
- 9 每孔加入 100 μ l 新鲜底物溶液，湿盒中室温孵育约 6 分钟（直至在最低浓度的标准品可观察到颜色）。
- 10 以与加入底物时相同的速率向每孔中加入 100 μ l 10% 硫酸盐溶液终止反应。如果使用多通道移液管，则可以很方便地在 10 秒间隔内将底物依次加入每排的孔中，然后按照同样的顺序，在 10 秒间隔内加入硫酸溶液。
- 11 在 492 nm 下读取吸光度 (OD)。

通过在双对数图纸上以 OD 对稀释度绘制标准曲线，并读取结果。绘制和计算方法在第 23 节的一步法 FVIII 检测的说明中有描述。

血管性血友病因子胶原结合试验 (VWF:CB)

31

原理

血管性血友病因子 (VWF) 有多种功能。除了在血浆作为 FVIII 的载体蛋白并形成复合体保护 FVIII 不致被蛋白酶降解外，还可通过在血小板活化后附着到血小板膜受体 (GpIb 和 GpIIb/IIIa) 而充当血小板聚集的调节剂。它在一期止血中也非常重要，因为它充当血小板与内皮下成分的中介。

VWF:RC₀ (第 29 节) 是一个衡量 VWF 粘附特性的指标，但并不能完全反应 VWF 的生理功能。测量 VWF 的能力有时更能反映其生理功能。VWF:RC₀ 和 VWF:CB 的结果在大多数 (但不是全部) 的 VWD 病例中是一致的。而在较少的 VWD 病例中，可出现其中一个检测结果下降，而另一个结果在正常范围内。虽然很多中心只检测其中的一个指标，但是要进行完整的诊断可能需要对两者同时检测。有些作者在 VWF:RC₀ 的检测方法不是很精确时，选择检测 VWF:CB。

在撰写本文时，市场上有一些市售试剂盒。下面给出一个实例，不过其他产品也可成功使用。选择这种特定的方法并不表示对该公司产品的认可。如果使用不同公司的产品，须遵照制造商的使用说明。

试剂

TECHNOZYM VWF:CBA ELISA 试剂盒 (Technoclone 公司, Vienna, Austria)

根据制造商的说明，储存于 2°C-8°C 下。

样本

柠檬酸化待测血浆和定标品在检测前可在 -35°C 或以下深低温冰箱保存。

方法

- 1 确保试剂盒在使用前于室温下放置 30 分钟。根据要测试的样本数量，试剂盒可分为三份或四份。
- 2 用 0.5 ml 蒸馏水复溶标准血浆和质控血浆，放置 15 分钟，如果预先冷冻则将其融化。旋转混匀 10 秒。

- 3 按1+ 25比例稀释所有的待测样本、对照和标准血浆（即20 μ l 血浆加 500 μ l 孵育缓冲液），然后旋转混匀。
- 4 将定标品和对照血浆进行分装并冻存于 -80°C 。
- 5 于适当的孔中加入 100 μ l 稀释好的样本，盖上薄膜，并在室温 ($20-25^{\circ}\text{C}$) 下孵育 45 分钟。所有样本均做复孔。
- 6 准备洗涤缓冲液。用 9 份蒸馏水稀释 1 份浓缩洗涤缓冲液，并充分混匀。稀释前，出现的任何结晶沉淀物可在 37°C 下孵育 10 分钟将其溶解。
- 7 45 分钟后，每孔用 200 μ l 洗涤液洗涤三次，然后翻转并在吸水纸上轻轻拍打。
- 8 用 50 份孵育缓冲液稀释 1 份标记物，从而制备标记物工作液。由于其只能稳定 60 分钟，因此需要在使用前制备。如 8 个孔，用 1000 μ l 缓冲液与 20 μ l 标记物混合。
- 9 每孔加入 100 μ l 标记物工作液，盖上薄膜，并在室温下孵育 45 分钟。
- 10 如前，每孔用 200 μ l 洗涤缓冲液洗涤三次，然后翻转并在吸水纸上轻轻拍打。
- 11 每孔加入 100 μ l 底物溶液，用薄膜覆盖，并在室温下孵育 15 分钟。
- 12 向每孔加入 100 μ l 反应终止液。
- 13 震荡 10 秒。使用合适的酶标仪，在 10 分钟内测量 450 nm 时的吸光度 (OD)。
- 14 使用直线-直线点对点的方法（手工或使用统计软件包），以 VWF:CB 浓度 (X 轴) 对 OD 值 (Y 轴) 做图。

正常范围：0.49-1.32 IU/ml

深度阅读

Favaloro EJ. An update on the VWF collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33:727-44.

Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, Peake IR, Pasi KJ. The diagnosis of VWD: A guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 2004; 10:199-217.

凝血因子 VIII 结合试验诊断 NORMANDY 型血管性假血友病

32

原理

2 型 VWD 是一种由于 VWF 质的缺陷而影响 VWF 蛋白功能的 VWD 亚型。2 型 Normandy 型 (2N) VWD 的特点是 VWF 与 FVIII 的亲和力减弱而导致 FVIII:C 水平的异常降低。只有少量的 FVIII 被结合并免受降解/清除, 从而导致血浆中 FVIII 浓度较低。在 VWF 的 FVIII 结合域中发现有导致 2N 型 VWD 的突变。从表型上来看, 2N 型 VWD 患者与轻度血友病患者类似: FVIII:C 下降、VWF:RC₀ 和 VWF:Ag 的水平通常为正常, 但是, 2N 型 VWD 患者为常染色体隐性遗传。

FVIII 结合试验是一种基于 ELISA 方法用来检测 VWF 与 FVIII 是否正常结合的试验。单克隆抗体是用来捕获 VWF, 氯化钙可清除与 VWF 结合的内源性 FVIII, 此后加入已知量的重组 FVIII 至加样孔中可与固相化的 VWF 结合。然后通过 FVIII 的发色底物法测定结合的 FVIII。一种已发表的 FVIII 结合试验 (Nesbitt et al. 1996) 如下所述。

使用最新开发的商品化试剂盒 (Asserachrom VWF:FVIII B, Diagnostica Stago) 测得的数据已经以摘要形式发表 (Caron et al. 2009)。本检测法类似于下述的初步分析步骤中的一种方法。它使用了兔抗 VWF 抗体包被的微孔, 来结合患者稀释血浆中的 VWF/FVIII。在去除内源性 (患者) FVIII 后, 加入重组 FVIII, 其与患者 VWF 的结合取决于患者 VWF 分子的性质。此检测法与下述的方法不同, 此法在检测结合的 FVIII 时使用了过氧化物酶标记的鼠抗人 FVIII 抗体。在对先前确诊为 2N 型的 37 例 VWD 患者以及 13 例杂合突变携带者进行分析检测后得出该法的灵敏度和特异性为 100% (Caron et al. 2009), FVIII 结合百分率的检测方法的批内变异系数 <10%。

试剂

- 针对 VWF GPIb 结合位点的 MAS 533p 单克隆抗体 (Oxford Biotechnology OBT0085, Oxford U.K.)
根据制造商的说明, 储存于 4°C 下。注意, 也可使用其它不同来源的抗体。
- FVIII 浓缩剂 2.5 U/ml (如: Advate, Baxter Pharmaceutical)
-80°C 下储存。

浓缩剂用以下物质制成的 HEPES 溶液进行稀释:

- 2.763 g/l HEPES 酸
- 2.188 g/l HEPES 盐

- 8.19 g/l NaCl
- 加入 1% BSA
- 制备 100 ml, pH 值为 7.35
- Coatest FVIII 显色试剂盒 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, U.S.A.)
一个试剂盒足够用于两个平板。整理试剂盒, 将其余的试剂置于 -80°C 冻存。
- 20% 乙酸
- 质控样本
包括正常对照样本以及一份已知的 Normandy 型 VWD 对照样本 (如果提供的话)

缓冲液

这些缓冲液可用食品染料进行染色, 以便在微孔板上观察。每次检测时需制新鲜备。

- 柠檬酸磷酸缓冲液 0.1M, pH 5.0
0.5 升含:
 - 3.65 g 柠檬酸 (BDH 10081)
 - 4.74 g 无水磷酸氢二钠 (BDH 102494C)
- 10xTris 缓冲盐水 (TBS): 50mM Tris、100mM NaCl, pH 8.0
0.5 升含:
 - 30.27 g Tris (Sigma)
 - 29.22 g NaCl (Sigma)
 约需 60 ml 1M HCL 调整 pH。
- 洗涤缓冲液: TBS/0.1% BSA
1 升含:
 - 100 ml 10 x TBS
 - 900 ml H₂O
 - 1 g 牛血清蛋白 (Sigma)
- 血浆稀释剂: TBS/3% BSA
100 ml 含:
 - 10 ml 10 x TBS
 - 90 ml H₂O
 - 3 g 牛血清蛋白 (Sigma)
- 氯化钙溶液 0.35M
50 ml 含:
 - 17.5 ml 1M 氯化钙溶液
 - 32.5 ml H₂O

- FVIII 稀释剂：
100 ml 含：
 - 100 ml 洗涤缓冲液
 - 0.147 g 氯化钙
 - 0.002 ml 吐温 20 (Sigma P5927)：将黄色 tip 头浸入吐温中，并滴 1 滴至缓冲液中。

方法

该检测法需连续进行三天。在开始该检测前，确保已获知每名患者的 VWF:Ag 结果。

第 1 天（下午）

- 1 在 0.1M pH 5.0 柠檬酸缓冲液中将 MAS 533p 单克隆抗体 (Oxford Biotechnology) 稀释至浓度为 2.5 $\mu\text{g/ml}$ （即 10 ml 缓冲液中加入 50 μl 抗体）。
- 2 使用 100 μl 抗体/缓冲混合液包被 NUNC 微孔板，并用保鲜膜覆盖置于 4°C 过夜。这些液体只够包被 11 行，故而剩下的第 12 行不必包被。

第 2 天（下午）

- 3 用含 0.1% BSA 的 TBS (50mM Tris、100mM NaCl, pH 8.0) 洗涤四次，之后吸干多余液体。
- 4 用含 3% BSA 的 TBS 缓冲液对标准品和待测血浆进行稀释 (标准品浓度从 1 U/dl VWF:Ag 至 0.125 U/dl VWF:Ag)，每孔加入 100 μl 稀释液，置于湿盒中 4°C 孵育过夜。见下文“稀释方案”以及图 32.1 平板布局图。

稀释方案

- 用对倍稀释的方法将每份测试血浆进行四种浓度的稀释。第一份稀释度的体积至少从 0.6 ml 开始。
- 每份样本的 VWF:Ag 必须稀释至 1 U/dl (0.01 U/ml)，因此在进行此项检测前必须获知 VWF:Ag 浓度。例如，如果 VWF:Ag 为 0.90 IU/ml，则以 1/90 比例作为起始稀释度；如果 VWF:Ag 为 0.06 IU/ml，则以 1/6 比例作为起始稀释度，以此类推。
- 对于患者和质控样本，则将 VWF:Ag 水平稀释至最接近 0.05 U/ml（即，若 VWF:Ag = 0.13，则按 1/15 比例稀释，以此类推。）。

第 3 天（大约上午 9:30 开始）

- 5 洗涤方法同前。

-
- 6 为了去除内源性FVIII，室温下加入100 μ l 0.35M CaCl_2 孵育两次，每次一小时。在第二次加入之前，应将前一次的 CaCl_2 弃去。两次之间不必洗涤。
-
- 7 洗涤方法同前。
-
- 8 将 200 μ l FVIII加至 10 ml FVIII 稀释液中稀释使FVIII浓度为0.05 U/ml。每孔加入100 μ l，并在 37°C 孵育两小时。
-
- 9 洗涤方法同前。
-
- 10 按以下方法使用 Coatest SP4FVIII 显色试剂盒：
- i. 使用前，将其从冰箱中取出，室温放置30 分钟。
 - ii. 根据试剂盒说明书准备试剂：
 - FIXa + FX加入3 ml 蒸馏水，各准备 2 瓶
 - S-2765溶解于12 ml 蒸馏水中
 - iii. 选择合适的一次性塑料试管，将下列成分进行混合：
 - 5 份 FIXa + FX (4.12 ml) (新鲜制备)
 - 1 份磷脂 (0.83 ml)
 - 3 份按 1/10 稀释的试剂缓冲液 (250 μ l 试剂缓冲液和 2.25 ml水)
 - iv. 每孔加入 75 μ l 该混合液，然后在 37°C 孵育5分钟。
-
- 11 每孔加入25 μ l 0.025M CaCl_2 (混合液不必弃去)。37°C孵育5分钟。
-
- 12 每孔加入 50 μ l底物 S-2765。
-
- 13 置于 37°C，直至显色 (通常约需 20 分钟)，并且1.0 U/dl的质控品吸光度 (OD) 为 0.8-1.0。酶标仪在 405 nm波长读取数值 (过滤器 1)。
-
- 14 用 50 μ l 的 20% 乙酸 (由 2 ml 冰醋酸和 8 ml 水制得) 终止反应。
-
- 15 使用酶标仪在 405 nm 下重新读取每份样本的吸光度 (过滤器 1)。
-
- 16 绘制 VWF抗原浓度与 405 nm下结合 FVIII 的吸光度曲线。结果应以图表和表格形式报告 (参见下文“数据解读”)。
-

图 32.1. 96-孔微滴定板的布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	CTL 1.0	PT2 1.0	PT4 1.0	PT6 1.0	PT8 1.0	CTL 1.0	PT2 1.0	PT4 1.0	PT6 1.0	PT8 1.0	
B	B2	CTL 0.5	PT2 0.5	PT4 0.5	PT6 0.5	PT8 0.5	CTL 0.5	PT2 0.5	PT4 0.5	PT6 0.5	PT8 0.5	
C	B3	CTL 0.25	PT2 0.25	PT4 0.25	PT6 0.25	PT8 0.25	CTL 0.25	PT2 0.25	PT4 0.25	PT6 0.25	PT8 0.25	
D	B4	CTL 0.125	PT2 0.125	PT4 0.125	PT6 0.125	PT8 0.125	CTL 0.125	PT2 0.125	PT4 0.125	PT6 0.125	PT8 0.125	
E	B5	PT1 1.0	PT3 1.0	PT5 1.0	PT7 1.0	N 1.0	PT1 1.0	PT3 1.0	PT5 1.0	PT7 1.0	N 1.0	
F	B6	PT1 0.5	PT3 0.5	PT5 0.5	PT7 0.5	N 0.5	PT1 0.5	PT3 0.5	PT5 0.5	PT7 0.5	N 0.5	
G	B7	PT1 0.25	PT3 0.25	PT5 0.25	PT7 0.25	N 0.25	PT1 0.25	PT3 0.25	PT5 0.25	PT7 0.25	N 0.25	
H	B8	PT1 0.125	PT3 0.125	PT5 0.125	PT7 0.125	N 0.125	PT1 0.125	PT3 0.125	PT5 0.125	PT7 0.125	N 0.125	

B = 空白

CTL = 质控

PT = 测试样本

N = 已知 Normandy 型 VWD 对照（如果有的话）

单个平板上可测试八名患者。

数据解读

1 计算每名患者、质控品和阴性对照样本的平均 OD。

2 在 Excel 中，启动新的工作表并输入以下数据：

- A 列 – A1 内输入: VWF:Ag U/dl; A2 内输入: 1.0; A3 内输入: 0.5; A4 内输入: 0.25; A5 内输入: 0.125
- B 列 – B1 内输入: 患者姓名; B2-5: 四个患者稀释液的平均 OD
- C 列 – C1 内输入: 正常对照; C2-5: 四个对照稀释液的平均 OD
- D 列 – D1 内输入: Normandy 对照; D2-5: 四个 RD 稀释液的平均 OD

- 3 选择含平滑线的“图表向导-XY散点图”。选定所有四列和 OD，确保该系列位于纵列内。
- 4 形成的图表中，X 轴应标有 VWF:Ag U/dl。Y 轴标注 405 nmFVIII的结合。在 sheet 1 内嵌入该图表。
- 5 正常对照结果和患者结果添加线性趋势线，然后选择图表上的“显示公式”。其将显示每条曲线的公式，类似于 $y = 0.x + 0.y$ 。只有使用 $0...x$ 的部分来计算患者结果/质控品结果的梯度比。

参考文献

- Caron C, Ternisien C, Wolf M, Fressinaud E, Goudemand J, Veyradier A. An accurate and routinely adapted ELISA for Type 2N von Willebrand disease diagnosis. Abstracts of Congress of International Society for Haemostasis and Thrombosis, Boston, 2009.
- Nesbitt IM, Goodeve AC, Guillatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996; 75:959-64.

原理

多聚体分析的原理是，在 SDS 琼脂糖凝胶上根据 VWF 多聚体的分子量不同对其进行电泳分离，之后用碱性磷酸酶标记的抗体系统进行非放射性显影。在 Enayat 的方法中，分离胶的浓度从 1% 至 1.8% 不等（通常为 1.2%、1.4% 和 1.8%），以确定全系列 VWF 多聚体 (1%)、以及各多聚体的三联体结构 (1.8%)。

该方法源自于 Enayat (1983) 和 Ruggeri (1981) 的方法。

图 33.1. VWF 多聚体分析工作时间表

日期/时间	周一/周二	周二/周三	周三/周四	周四/周五
上午 8 点	在测试前一天制备除电泳胶缓冲液外的其他缓冲液	观察标记染料。到达滤纸时停止。可能需要增大电流。		
上午 9 点		用水冲洗凝胶。	用水冲洗凝胶。在当天结束前将凝胶面朝上在 TBS/吐温缓冲液中冲洗 8 次。	用水冲洗凝胶。将凝胶面朝上在 TBS/吐温缓冲液中冲洗 8 次。下午 3 点前完成
上午 10 点	制备电泳胶缓冲液，需加入琼脂糖	使用冷吹风机吹干凝胶。*		
上午 11 点	准备好制胶板；用微波炉加热电泳胶缓冲液。			
上午 11:30	在铺板前，使之冷却至 65°C- 60°C。			
中午 12 点	将制备好的凝胶板置于室温 30 分钟，之后置于 4°C 一小时。			

下午 2 点	启动冷却器。 稀释电泳缓冲液并调整其 pH。 裁剪滤纸。 冻融患者样本和混合血浆样本并进行适当稀释			
下午 3 点	制孔。 加入患者血浆标本。 以 30mA (230V) 电泳30 分钟。	将凝胶面朝上置于150 ml 含5% 牛奶 TBS缓冲液中并放置于轨道混合器上。		弃去最后的洗涤液，将凝胶面朝上放置，在其上加 AP 溶液。
下午 4 点	当样本跑出加样孔时，往加样孔中添加电泳胶缓冲液，并将电流减至 5mA (110V)。			显色后 (45-60 分钟)，在水中冲洗几次停止反应。使用冷吹风机吹干凝胶。
下午 5 点		用水冲洗凝胶。将凝胶面朝上放置于加有25 ml 一抗溶液的玻璃槽内过夜。	用水冲洗凝胶。将其面朝上放置于加有25 ml 二抗液体的玻璃槽内过夜。	

*可选项：为加速干燥过程，可挤压凝胶 30 至 60 分钟，然后在热空气中晾干（如：使用家用吹风机）。

试剂

每次检测时所有的缓冲液均需新鲜制备。所有试剂均用蒸馏水配制，并对 pH 值进行调整。

- 电泳胶缓冲液：0.4M TRIS, 0.1% SDS, pH 8.8
 - 4.54 g Tris 碱 (SIGMA T1503)
 - 0.1 g SDS (十二烷基硫酸钠) (BDH 436696N)
 - 100 ml 蒸馏水

在 100 ml 的锥形瓶中，将以下物质一起混合：

- 100 ml 电泳胶缓冲液
- 1.6 g Seakem HGT (P) 琼脂糖 (Seakem 50050) 用于制备正常凝胶 或
- 1.8 g 琼脂糖用于三联体区分的 或
- 1.0 g 琼脂糖用于高分子量 (HMW) 多聚体分析

1.6%的胶浓度可用于高分子量多聚体分析，1.8%的胶浓度可对三联体进行区分。

注：低浓度的1.2%琼脂糖仅显示高分子量（HMW）多聚体；高浓度的1.8%凝胶可同时显示低分子量（LMW）和 HMW 多聚体。

该体积足够用于制备2份凝胶。

- 电极缓冲液：pH 至 8.35

10 倍浓缩液

- 15.15 g Tris 碱
- 72.1 g 甘氨酸
- 5 g SDS
- 500 ml 蒸馏水

工作溶液

1800 ml 蒸馏水中加入 200 ml 10 倍浓缩缓冲液；调节pH 至 8.35

- 样本缓冲液：10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0

10 倍浓缩的储存液

- 1.21 g Tris/氨基丁三醇 (SIGMA T1503)
- 0.07 g EDTA 二钠盐 (BDH 10093)

用蒸馏水定容 100 ml。

工作溶液

用 100 ml 蒸馏水中按 1:10 比例稀释 10 倍浓缩的样本缓冲液，以获得工作溶液，再加入：

- 4.8 g 尿素 (BDH 102904W)
- 0.2 g SDS（十二烷基硫酸钠）(BDH 436696N)调整pH 至 8.0。

- Tris盐水缓冲液-储存液(TBS)：50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.4

- 12.1 g Tris 碱
- 18 g NaCl
- 2 L蒸馏水

- 封闭缓冲液

- 20 g 5% 脱脂奶粉
- 133 ml TBS 储存液

- 洗涤缓冲液

- 500 μ l 吐温 20
- 1L TBS 储存液

- 一抗

兔抗人 VWF 多克隆抗体（VWF:Ag 包被抗体；例如 Dako A0082）。

- 二抗
猪抗兔碱性磷酸酶标记抗体（例如，Dako D0306）
- 碱性磷酸酶标记检测试剂盒 (Biorad 170-6432)
- Gel bond 凝胶载体 (Biowhittaker Molecular Applications 53750)

方法

第1天：制备凝胶和电泳

- 1 微波加热琼脂糖和电泳胶缓冲液，直至其清澈，备用。准备倾倒时再融化，倒出前使其冷却至 65°C（顶部放置箔纸避免蒸发）。
- 2 按下文所述，将凝胶倒入两块玻璃板（200 x 120 mm）形成的“三明治”装置中，并在玻璃板的顶部放置一个 U形垫片（15 mm 宽）。
- 3 裁剪一张所需尺寸的凝胶结合滤膜。湿润一块玻璃板，将凝胶结合滤膜放置于顶部，让其一侧在顶部紧邻于纸膜（亲水侧）。使用滚筒将气泡清除。将垫片放置于顶部，然后将第二个玻璃板放置于顶部，再用 bulldog 夹固定侧面和底部周围。确保倾倒凝胶前该装置处于水平位置。
- 4 在琼脂糖凝胶溶液冷却至 60°C - 65°C 的过程中，通过在热水中运行或使用吹风机给制胶装置加温。
- 5 将琼脂糖倒入预热的注射器中并使用蝶形针上连着的管子将其注入制胶装置中。
- 6 在试管中保留少量琼脂糖凝胶，用于之后填充孔。
- 7 将凝胶置于室温放置至少 30 分钟，之后放置在 4°C 的湿箱内一小时。如果不立即使用则储存于湿盒内，但需用石蜡密封开放的边缘，以防止变干燥（若需要的话凝胶可保存过夜）。
- 8 将电泳槽冷却至 14°C，并制备 2 L 稀释的 10% 电泳缓冲液（稀释后调整 pH 值）。将 1 缓冲液放入电泳槽各侧。
- 9 凝胶制好后，使用打孔器在其顶部制备 11 个加样孔。用蒸馏水湿润电泳板，并将凝胶放置于槽内白/蓝色冷却板中心，样本孔在其远侧（阴极）。
- 10 量取 10-15 厘米长的滤纸 (WHATMAN 3030690)，将其折叠，并再折叠两次。弯曲锋利的折痕并撕下（这通常会比切割更为整齐），每份你都可以得到三至五层的滤纸。根据凝胶的宽度将滤纸进行切割。用电泳缓冲液浸泡滤纸，然后在凝胶的两端分别放上裁剪好的滤纸，与凝胶的重叠部分长度约为 5 mm。

1 1 稀释患者样本，并以混合血浆样本作为质控品。用样本稀释液将血浆样本按 1/10 进行稀释，使其 VWF:Ag 约为 1.0 IU/ml，但如果预期结果值很低，则按 1/2 稀释。不推荐使用未稀释的血浆。（血小板 VWF 通常稀释为 1/2。）

1 2 制胶装置使用后需在热水中彻底洗涤。

1 3 每孔中加入 20 μ l 稀释的样本，再加入 1 μ l 的 1% 溴酚蓝。1, 6 和 11 泳道加入混合血浆（作为正常对照）。

1 4 盖上电泳槽的盖子，并开启电源装置，检查红色电线是否连接至红色接头，黑色线至黑色接头。在最大电流下运行 30 至 60 分钟，让样本跑出加样孔。注意试验所需的电泳条件。

1 5 关闭电流，用备用琼脂糖凝胶填充加样孔。

1 6 重新开启电源，在 5 mA 的恒电流下电泳约 20 小时（约 80 V）。如果电压过高，滤纸的电阻需要进行调整（欧姆定律），可向阴极添加滤纸，直至电压在允许范围。

第2天：凝胶显色

1 7 到第二天上午，溴酚蓝应移到凝胶的正极端。

1 8 当蓝色标记物离凝胶末端约 1 厘米时，记录电泳参数，之后停止电泳。从电泳设备中取出凝胶。

1 9 弃去电泳缓冲液，用水彻底洗涤电泳槽，再沿金属丝小心擦拭橙色间隔。

2 0 将凝胶面朝上放入装有蒸馏水的塑料槽，并在轨道混合器或摇杆上轻轻摇晃，洗涤一至两个小时。期间换水数次。

2 1 小心取出凝胶并用棉纸吸取多余水分。

2 2 将凝胶的两端固定使其平铺，用中等热度的吹风机将其吹干，或用滤纸将其包裹并在其上放一块水平的玻璃面板，另放上几本厚书挤压凝胶一到两个小时，之后用中等热度的吹风机吹干，操作如前。每份凝胶晾干可能需要一个小时。

2 3 当凝胶完全干燥时（将出现光泽并在凝胶结合物上平铺晾干），清除多余的凝胶结合物，但是在凝胶的边缘留下至少 5 mm 的结合物。

2 4 将凝胶面朝上放入含有 5% 脱脂牛奶的 TBS (Marvel) 的塑料槽内，之后在 Stuart 摇杆上低速孵育至少 90 分钟（时间越长越好）。

2 5 用蒸馏水冲洗凝胶数次。

2 6 用 TBS缓冲液按1/2000稀释抗 VWF（包被）一抗：在 25 ml TBS 中加入 12.5 μ l 抗体。将稀释好的抗体放入pyrex玻璃碟中。

2 7 吸干凝胶多余的水份，并且将凝胶面朝下放入抗体稀释液中。确保凝胶和抗体稀释液的接触面没有气泡。

2 8 盖上玻璃碟的盖子，将其置于工作台上室温过夜。

第3天

2 9 从一抗溶液中取出凝胶，之后用蒸馏水简单冲洗几次。

3 0 将凝胶面朝上放入塑料槽内并放置在轨道混合器上，用 0.05% 吐温-TBS缓冲液（100-150 ml/每次）进行洗涤，一天内至少洗涤八次。

3 1 标记的猪抗兔VWF抗体（二抗）按1/2000用TBS缓冲液进行稀释：在 25 ml TBS 中加入 12.5 μ l 抗体。将稀释后抗体放入二抗专用的pyrex玻璃盘中。

3 2 用蒸馏水冲洗凝胶，吸干凝胶表面多余的水，并且将凝胶正面朝下放入二抗溶液中。确保凝胶和抗体液体表面之间没有气泡。

3 3 盖上盖子，将其置于在工作台上室温过夜。

第4天：多聚体显影

3 4 从二抗溶液中取出凝胶，之后用蒸馏水简单冲洗几次。

3 5 将凝胶面朝上放入塑料槽内并放置在轨道混合器上，用 0.05% 吐温-TBS缓冲液（100 - 150 ml/每次）进行洗涤，一天内至少洗涤八次。

3 6 在最后一次洗涤期间（约下午 3 时左右），用 25 \times 碱性磷酸酶显色缓冲液试剂盒 H102 制备 20 ml 底物缓冲液。对于每份凝胶，在 20 ml 水中稀释 800 μ l 25 \times AP 缓冲液。然后分别加入 200 μ l 溶液 A 和 200 μ l 溶液 B 至缓冲液并彻底混匀。

3 7 最后一次洗涤结束，取出凝胶并吸干多余的液体。

3 8 将凝胶面朝上放入显色pyrex玻璃盘内，并将制备好的底物缓冲液混合物倒到凝胶上。

3 9 在摇杆上轻轻摇动，直至反应完成并出现多聚体条带。这一过程可能最多需要 45 分钟。

4 0 反应完成后，丢弃底物液用蒸馏水至少洗涤两次，同时摇动 30 至 60 分钟以停止进一步反应。

4 1 吸干凝胶表面任何多余的液体并用吹风机吹干，方法如前。

4 2 凝胶可进行扫描并以电子文档的方式储存，如有必要可通过灰度扫描进行量化。

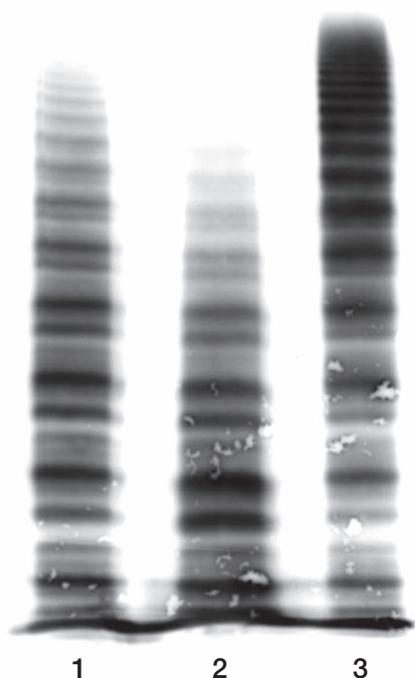
根据凝胶上观察到的多聚体模式，获得的结果可能会按照图 33.2 进行报告。

图 33.2. 多聚体模式解读

多聚体模式	释义
出现了所有分子量的多聚体	正常模式
低分子量三联体过度形成	HMWM 减少
HMW 多聚体总损耗	HMWM 略有上升
第一个LMW 条带增加	HMWM 略有减少
看不到多聚体	未检出多聚体

图 33.3. 多聚体凝胶示例

注：较高分子量形式的 VWF 在柱上层。



柱 1 为 2B 型 VWD 患者
柱 2 为 2A 型 VWD 患者
柱 3 为正常对照，多聚体完整显示

参考文献

Enayat MS, Hill FG. Analysis of the complexity of the multimeric structure of FVIII related antigen/von Willebrand protein using a modified electrophoretic technique. *J Clin Pathol* 1983; 36:915-9.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Classification of variant VWD subtypes by analysis of functional characteristics and multimeric composition of FVIII/von Willebrand factor. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370:205-9.

原理

使用 FVIII 治疗的血友病患者产生的FVIII 抑制物呈时间依赖性。

如果含抑制物的血浆中加入FVIII，混匀后孵育，外加的FVIII可被逐渐中和。如果将FVIII的浓度和孵育时间进行标准化，则抑制物强度可按照添加的FVIII被中和的量进行单位定义。

该试验可使用人源或猪源性的FVIII制剂。

如果患者进行FVIII 输注时出现半衰期缩短并且恢复差，则可怀疑有存在抑制物的可能。

Bethesda 检测法

抗人FVIII抗体滴定使用混合正常血浆作为FVIII的来源；抗猪抗体的滴定则用FVIII浓缩制剂经乏FVIII血浆稀释后作为FVIII的来源。

1个Bethesda 单位定义为：37°C 两小时，中和外源性添加的一个单位FVIII 的 50% 的抑制物的量。

预期没有抑制物的患者：

1. 将患者血浆和正常混合血浆进行等比例混合(各0.2 ml)。
2. 0.2 ml 正常混合血浆中加入0.2 ml FVIII:C为0%的血浆样本（即乏FVIII血浆）作为对照。
3. 37°C 孵育两小时。然后进行 FVIII:C 检测。

预期有抑制物的患者：

1. 将患者血浆用FVIII 检测缓冲液进行稀释。最好能进行多个浓度的稀释。在2个小时孵育结束后，未进行检测之前可以一直保存冰上。如果之前有关于抑制物滴定的相关资料，则可作为参照对样本进行适当的稀释。
2. 将正常混合血浆（FVIII浓度已经过标准化检测）加入每份待测的稀释血浆样本中 - FVIII浓度通常为约 100 U/dl。因此，每份混合物的FVIII起始浓度大约为 50 U/dl。由于所有的混合物中均加入了同样的样本，因此，浓度是否精确并不重要。

3. 两小时孵育结束后进行FVIII:C 检测，使用正常混合血浆和乏FVIII血浆的混合物作为标准品进行定标，并且以该标准曲线来计算其它混合物的 FVIII 活性。本检测中，此混合物的FVIII:C为 100%。

正常血浆的缓冲非常重要，可以采用最近的Nijmegen 改良法中加入 pH 7.4 的 0.1M 咪唑，或使用第 7 节所述的缓冲正常混合血浆。这提高了检测灵敏度和特异性。对于抗猪抗体的滴定，因猪血浆不易获得。因此，可以使用乏FVIII血浆将猪源性的FVIII浓缩制剂稀释到1 U/ml进行使用。

4. 孵育结束后，测量各混合物的残余FVIII水平，并且根据残余FVIII与抑制物单位的关系图计算抑制物的浓度。（见图 34.1。）

试剂/设备

- 咪唑缓冲液（见第 9 节）
- Owren 缓冲盐水（见第 9 节）
- 正常混合血浆（见第 7 节）
注：必须进行缓冲以提高 FVIII 在检测中两个小时孵育期内的稳定性。
- 猪源性的FVIII浓缩制剂
- 乏FVIII血浆
- APTT 试剂
- 冰浴
- 塑料试管（75 × 12 mm）

方法

抗人-FVIII

- 1 使用咪唑缓冲液作为稀释液，在塑料试管中将患者血浆进行对倍稀释，每管的总体积为 0.2 ml。各患者所需的稀释浓度不同。建议从原倍开始，之后为 1/2, 1/4, 以此类推。

注：如果患者之前接受过抑制物检测，可提供检测结果，作为应使用何种稀释度的大致指南。同时也要注意，如果患者最近接受过 FVIII 治疗，则抑制物水平有可能偏高或偏低。

- 2 将 0.2 ml 乏FVIII血浆吸入另一根塑料试管。用作标准管。

- 3 将 0.2 ml 正常混合血浆加入标准管和稀释后的待测血浆中。所有试管的 FVIII 水平都大约为 50 U/ml。孵育结束后进行检测时，FVIII:C 则视为 100%。
- 4 盖上所有试管、混合并在 37°C 孵育两小时。
- 5 除非要立即进行 FVIII 检测，否则两小时后应将所有试管转移至冰上保存。
- 6 使用常规 FVIII:C 检测法对所有孵育后的混合样本进行 FVIII 检测，但是假设试管中 FVIII:C 为 100%。FVIII 检测所使用的合适稀释比例为 1/5, 1/10 和 1/20。
- 7 以对照混合液作为 100% 读取每份待测混合样本的残余 FVIII。

结果/释义

应选择残余 FVIII 含量接近 50% 的稀释度，但也可选择残余 FVIII 在 30-60% 范围内的待测血浆稀释倍数用于抑制物的计算，只需计算每份稀释液的结果，取平均值即可。残余 FVIII < 25% 或 > 75% 的其他任何稀释度均不得用于计算抑制物的含量。

根据抑制物单位的定义，可以残余 FVIII % - 抑制物单位在双对数曲线上绘制标准曲线（见图 34.1）。

读取每份待测混合样本中残余 FVIII 相对的抑制物水平，并以稀释倍数进行校正。例如：

1/4 稀释 + 正常混合血浆

残余 FVIII = 50%

抑制物单位（根据图表）= 1 BU

乘以稀释倍数 (1/4) = 4 BU

注释

- 重型血友病患者经常需要进行抑制物定量检测，该类样本凝血因子 VIII:C 含量很低或不能测出。如果待测血浆中含有 5 U/dl 以上的 FVIII，则在计算抑制物滴度时必须予以考虑。

可用以下三种方法：

- 第一种方法是，在对照混合样本中较待测混合样本加入更多的因子，以补偿待测混合样本中的 FVIII。例如，如果待测血浆中含 20 U/dl FVIII，则对照混合样本则由 120 μ l 正常混合血浆和 80 μ l 乏 FVIII 血浆制成。（在孵育开始时，待测和对照混合样本中均含有大约 60 U/dl 的 FVIII。这种方法只能用于患者血浆不需要进行稀释时，若需要进行稀释，则稀释后的血浆可能改变 FVIII 最初浓度。

- 或者，待测血浆中FVIII初始水平在计算时可予以考虑。在这种情况下，混合样本以正常方式进行配制。
- 另一种方法是：分析前，在 58°C下将待测血浆热灭活90 分钟，这将破坏所有凝血因子，包括 FVIII。由于免疫球蛋白具有耐热性，因此，抑制物的滴度不受这种处理方式的影响。
- 在对照混合样本中使用的乏FVIII血浆非常重要。应包含正常水平的VWF，已证实如果乏FVIII血浆不含 VWF，则抑制物滴度可降低 30-50% (Verbruggen et al. 2001)。

例 1: 患者FVIII水平为20 U/dl

对照正常混合血浆 + 0% FVIII

- a. 正常混合血浆 + 未稀释的待测血浆 - 初始 FVIII = 120%
- b. 正常混合血浆 + 按 1/2 稀释的待测血浆 - 初始 FVIII = 110%

孵育两小时后，进行因子活性检测。

- a. 正常混合血浆 + 为稀释的待测血浆 - FVIII = 对照的 120%
残余 FVIII: $120/120 = 100\%$; 抑制物的结果: 阴性
- b. 正常混合血浆 + 按 1/2 稀释的待测血浆 - FVIII = 对照的110%
残余 FVIII: $110/110 = 100\%$; 抑制物的结果: 阴性

示例 2: 患者FVIII水平为 20 U/dl (存在抑制物)

未稀释的患者血浆

正常混合血浆 + 未稀释的待测血浆 - 初始 FVIII = 对照的 120%

孵育两小时后，进行FVIII 检测。

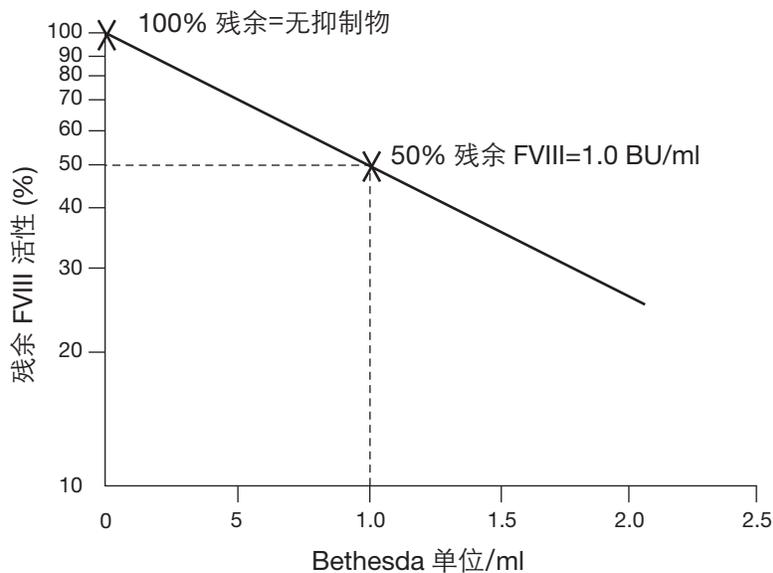
正常混合血浆 + 未稀释的待测血浆 - FVIII = 对照的 90%
残余 FVIII = $90/120 = 75\%$

抗猪-FVIII

猪 FVIII 抑制物与人抑制物除了 FVIII 的来源不同外，两者检测方法基本相同。前者应使用猪源性血浆，但至今仍不能广泛获得可靠的猪 FVIII 血浆。因此，使用血友病患者的血浆（人）将猪源性的浓缩制剂稀释至 1 U/ml，进行检测。

注：如果未稀释的待测样本与猪浓缩剂混匀孵育后样本中残余 FVIII 为 80% 至 100%，则说明不存在抑制物。虽然目前不使用血浆来源的猪 FVIII，但是重组猪 FVIII 浓缩剂在撰写本文时正在研发中。

图 34.1. 残余 FVIII 与抑制物滴度之间的关系



参考文献

- Kasper C, Aledort L, Counts R, Edron J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Laserson J, Levine P, MacMillan C, Pool J, Shapiro S, Shulman N, Eys J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34:869-872.
- Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Meninsk E, Novakova I. The type of FVIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assays for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86:1435-1439.
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda Assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73:247-251. (for the Nijmegen modification)

35 因子 IX 抑制物检测

原理

因为抗原/抗体反应较快完成，FIX的抑制物和 FVIII的抑制物显示出不同的酶动力曲线。该检测方法为向患者血浆中加入等量的外源性FIX，并在 37°C 孵育10 分钟，之后进行FIX水平检测。

1个单位抑制物的定义为在37°C 10 分钟内消除 50% FIX 活性的量。

试剂

- 同FIX 检测（见第 23 节）。
- 正常混合血浆作为 FIX的来源（同FVIII 抑制物检测时使用的正常混合血浆）。

方法

如果怀疑存在抑制物，则将患者血浆进行适当的稀释。否则，应使用未稀释的血浆进行抑制物筛查。

- 1 使用 75 × 12 mm 塑料试管：
 - 测试：加入 0.2 ml 患者血浆（或稀释后的样本）至 0.2 ml正常混合血浆。
 - 对照：加入 0.2 ml 0% FIX 至 0.2 ml 正常混合血浆。
- 2 对照：10 分钟后，使用对照混合样本作为参照物进行 FIX 检测（与 FVIII 抑制物检测一样）。

计算

计算出相对于对照的残余百分比结果。抑制物单位用第 34 节所述 Bethesda 方法中计算 FVIII:C 抑制物同样的方式计算。

原理

纤维蛋白原包被于微量滴定板表面。一种特殊的封闭剂可阻止非特异性结合。样本中的 FXIII 由凝血酶和钙离子激活。在结合步骤中，受试血浆中的 FXIIIa 与底物 (5-生物素戊胺) BAPA 结合，在钙离子存在的条件下一同作用于包被在平板表面的纤维蛋白原 (FXIII 的底物)。BAPA 的结合量与受试样本中 FXIII 的活性成正比。在下一步骤中，Strept-AP 酶标试剂 (链霉亲和素-碱性磷酸酶) 与已结合的 BAPA 相作用。碱性磷酸酶可催化底物 pNPP (对硝基苯基磷酸盐) 转化为磷酸盐和对硝基酚，在 405 nm 处进行检测。

以下所述方法的试剂已有商品化的试剂盒提供 (Pefakit FXIII 结合法, Pentapharm Switzerland)。注意，其他的生产商也可提供不同的活性检测试剂盒，包括 Berichrom 试剂盒 (Dade Behring, Marburg, Germany)，它们采用了不同的分析原理。

试剂

商品化试剂盒中含有所有需要的试剂。

方法

第1天

- 1 将试剂盒放置室温 30 分钟。
- 2 根据制造商的推荐体积，将包被液 (R2) 用蒸馏水复溶。
- 3 在微孔滴板板条中每孔加入 100 μ l 包被液。
- 4 任何过量的包被液均需冷冻保存，以备以后使用。试剂在 -20°C 下可稳定保存六个月。
- 5 用提供的塑料封条覆盖反应板，并在 $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜 (14 至 16 小时)。

第2天

- 6 20 X的浓缩TBS R1 (Tris 缓冲生理盐水) 50 ml加 950 ml 的蒸馏水进行稀释。也可根据需要进行。
- 7 3 ml 封闭液 (R3) 加入 27 ml TBS R1进行稀释。过量的 R3冻存。
- 8 弃去微孔滴定板中的包被液, 倒置板条并于纸巾上拍打, 以清除残余洗涤液。
- 9 向每孔加入 300 μ l 稀释后的封闭液。
- 10 在孵箱中 37°C 孵育 1 至 1.5 小时。
- 11 用0.5 ml 蒸馏水复溶校准液 R10, 用0.2 ml 蒸馏水分别复溶三种对照品 (R11, R12 和 R13)。
- 12 在分析前将受试血浆置于在37°C 5 分钟冻融。
- 13 准备装有数百毫升冰/水混合物的容器用于冰浴。
- 14 将所有受试和对照血浆进行稀释: 10 μ l 血浆中加1 ml 稀释的 TBS R1 缓冲液 (1:101 稀释)。涡旋混匀。
- 15 制备以下标准品稀释液:
 - 标准品 1: 30 μ l R10 + 970 μ l TBS R1
 - 标准品2: 20 μ l R10 + 980 μ l TBS R1
 - 标准品 3: 75 μ l R10 + 25 μ l TBS R1
 - 标准品 4: 25 μ l R10 + 75 μ l TBS R1
 - 标准品 5: 10 μ l R10 + 0 μ l TBS R1注: 稀释液 1 和 2 为即用型。稀释校正液3-5需吸样 10 μ l, 在 1 ml TBS R1 中进行再次稀释。
- 16 用300 μ l/孔 TBS R1 洗涤平板三次。倒置于纸巾上拍打, 清除多余的液体。
- 17 分别用 5 ml 蒸馏水复溶激活剂A(R4) 和 B (R5)。置于冰浴中不得超过 30 分钟。
- 18 分别将 25 μ l 标准品、对照、或测试血浆加入相应的孔中。包括 TBS R1 空白液。
- 19 将A 和 B 激活剂 (R4 和 R5) 混合, 形成最终结合试剂。

2 0 每孔加入 75 μ l 最终结合试剂, 包括空白孔。

2 1 在孵箱中 37°C 孵育30 分钟。

2 2 每孔加入 200 μ l 结合反应终止液 R6。在平板摇动器上轻轻混匀 10 分钟。

2 3 加入 12 ml 蒸馏水复溶检测试剂 R7。未使用的稀释 R7冻存。

2 4 用300 μ l/孔 TBS 洗涤平板四次。拍打去除多余的液体。

2 5 每孔加入 100 μ l 检测试剂 R7。在孵箱中 37°C 孵育 15 分钟。

2 6 用 300 μ l/孔 TBS 洗涤平板四次。拍打去除多余的液体。

2 7 使用前即时制备底物溶液:

- 对于 96 孔 (满板), 22.5 ml 二乙醇胺缓冲液 R8a中加 9 片 R8b
 - 对于 64 孔 (8 条), 15 ml 二乙醇胺缓冲液中加6片 R8b
 - 对于 32 孔 (4 条), 7.5 ml 二乙醇胺缓冲液中加3片 R8b
 - 对于 24 孔 (3 条), 5 ml 二乙醇胺缓冲液中加2片 R8b
-

2 8 每孔加入 180 μ l 底物溶液。在孵箱中 37°C 孵育 11 分钟。

2 9 每孔加入 50 μ l 反应终止液 (4M NaOH) R9。

3 0 5分钟内在酶标仪中读取 405 nm 时的吸光度值。

注: 如前文所述, 几种试剂可低温冷冻保存供以后使用。但是, 底物、激活剂A 和 B, 标准品以及对照品不能冷冻。含后者材料的部分试剂盒可另外购买, 并能与任何冷冻的其他部分试剂一起使用。在小批量分析受试样本时, 可降低每次测试的成本。

结果计算

每个试剂盒都提供标准品稀释液和对照值。

使用合适的数据处理软件或图纸, 在扣除空白吸光度值后, 绘制标准品浓度相对于吸光度值的校准曲线。使用标准曲线的线性范围。

受试样本/对照品的OD值扣除空白 OD值之后, 使用校准曲线将所得的OD值转换为 FXIII 活性。

37 狼疮抗凝物与抗磷脂抗体

简介

对研究可能患出血性疾病患者的实验室来说，确定患者是否存在导致实验室测试结果（如APTT）延长的抗体是非常重要的。

可导致 APTT 显著延长的是一组异质性抗体，统称为抗磷脂抗体 (APA)，文献中有时称为狼疮抗凝物 (LAC)。目前已经弄清所谓的抗磷脂抗体是一组与自身蛋白表位反应的异质性抗体家族，此类自身蛋白与带负电荷的磷脂进行络合。许多此类抗体都需要 β -2-糖蛋白1（一种与磷脂结合的蛋白）。另外还有一些影响PT试验的抗体。

值得注意的是，这些抗体可能会干扰实验室凝血反应，延长磷脂依赖的测试（如：APTT, 偶尔PT），但是它们与出血无关，除非有明显获得性凝血酶原缺乏症等少数情况。奇怪的是，这些抗体与动静脉血栓形成明确相关，但是机制尚不明确。

对于出血性疾病诊断中心而言，在对APTT延长的患者进行研究的过程中使用特异性检测法测定此类抗体是十分必要的。若干指导性文件以及对使用不同技术获得结果的综述文章已经发表，它们回顾了狼疮抗凝物 (LAC) 的实验室检测，包括本节末尾列出的参考文献中所用的检测方法。

必须认识到，不同的 APTT 检测方法通常没有检测这些抗体的灵敏度。由于此组抗体的异质性，因此建议进行一次以上的检测来确定狼疮型抗凝物的存在。

判断狼疮抗凝物是否存在标准如下：

1. 磷脂依赖的凝血试验结果延长。
2. 混合试验证实有抑制物存在。
3. 确认该抑制物具有磷脂依赖性的特性。
4. 缺乏某种凝血因子特异性抑制物的特性（如：FVIII:C, FIX:C, FXI）。

样本制备

关键要确保受试血浆中的残余血小板数量尽可能少，特别当血浆被冻存后于分析之前冻融时应尤为注意。最大程度去除血小板的一种方法是使用 0.22- μ 滤器过滤离心后的血浆（同其它凝血测试所需的血浆制备）。或者可按第 4 节所述，将血浆离心两次。其目的是使待测血浆中的血小板计数 $<10 \times 10^9/l$ 。由于过滤法可能会影响其它凝血检测并且价格可能昂贵，因此优选的方案应为在第一次离心（至少 1700 g 离心 10 分钟以上）后吸取细胞上清的乏血小板血浆，放入第二个容器中，在同样条件

下对其进行第二次离心。第二次离心后，小心吸取血浆，避免底层受干扰，因为其包含第一次离心时没有去除的少数额外血小板。用这种方法两次离心制得的血浆，其残留的血小板通常低于 $10 \times 10^9/l$ ，因此适合在分析狼疮抗凝物测试之前进行深低温保存。以上说明适用于对照血浆和受试血浆的制备。

混合试验

第 14 节详细介绍了混合试验，用以检测抑制物可能存在的情况。

检测 LAC 和 APA 的特定测试

用于狼疮抗凝物测定的试剂越来越多，其中包括稀释蝰蛇毒素时间 (DRVVT) 和高岭土凝血时间 (KCT)，也称作 Exner 测试。其它基于蛇毒素的特定测试，比如 Textarin 时间或 taipan 蛇毒时间，以及稀释凝血活酶时间也有应用。以下列出的参考文献中有这些测试方法的详细介绍。

虽然使用了 DRVVT 等相对特异性测试方法，但是使用确诊试验来确认抑制物的磷脂依赖性质仍然十分重要。

下面给出了 DRVVT 的一种方法，此方法相对于 APTT 而言，其异常结果对确定抗磷脂抗体的存在更具特异性

最近出版的 ISTH 指南更新版本 (Pengo et al. 2009) 建议使用 DRVVT 和 APTT 这两种磷脂依赖性试验，如果出现异常值，应在过量磷脂的条件下进行重复测试。作者指出，由于缺乏标准化以及制剂之间可能存在批次与批次之间的差异，因此，将洗涤过的血小板作为过量磷脂的来源可能存在问题。在此，我们为可能依旧使用此方法的中心提供一种制备洗涤血小板的方法。ISTH 文件不建议使用 KCT 或稀释凝血活酶时间、或一些并不十分典型的基于蛇毒的检测方法。

参考文献

Brandt JT, Triplett DA, Alung B, Scharer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Anti-phospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1184-1190.

Lupus Anticoagulant Working Party. Guidelines on testing for the lupus anticoagulant. *J Clin Pathol* 1991; 44:885-889.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Thromb Haemost* 2009; 7:1737-40.

38 稀释蝰蛇毒素时间 (DRVVT)

原理

蝰蛇毒素 (RVV) 中含有一种能直接激活 FX 的酶，随后在磷脂、钙离子和 FV 存在的条件下可进一步激活凝血酶原。稀释毒素和磷脂可使该试验对 LAC/APA 的存在特别敏感。虽然 DRVVT 的延长可由磷脂酶抑制物造成，但也可能是由因子 II, V, X 或纤维蛋白原缺乏或异常所引起。如果检测结果较本地确定的正常范围时间延长，则用洗涤的冷冻/解冻裂解的血小板取代磷脂重复 DRVVT，若用血小板取代磷脂时，异常结果得以纠正则表示存在抗磷脂抗体。

试剂

- 咪唑（甘恶啉缓冲液）- 0.05M pH 7.3
 - 3.4 g 咪唑
 - 5.85 g 氯化钠
 - 1. 用 800 ml 蒸馏水溶解。
 - 2. 使用 1M HCL 将 pH 调整至 7.3
 - 3. 用蒸馏水定容至 1 升。
- 蝰蛇毒素 (Diagnostic Reagents, Chinnor Road, Thame, U.K.)
 1. 在 0.2 mg 蛇毒中加入 2 ml 蒸馏水，使浓度为 0.1 mg/ml。
 2. 在 -35°C 或更低温度下冻存，每份 20 μ l。
 3. 使用时，解冻并用咪唑缓冲液按大约 1:500 的比例稀释（10 μ l:5 ml），以制备稀释 RVV (DRVV)。
- 磷脂 (PL; Diagen Bell 和 Alton Platelet 替代品, Diagnostic Reagents 公司, 地址: Chinnor Road, Thame, U.K.)
根据制造商的说明书，用蒸馏水复溶。
- 25mM 氯化钙溶液
- 经洗涤的冷冻/解冻裂解血小板
正常人血小板经洗涤后通过冷冻/解冻进行裂解，以暴露促凝磷脂。本节最后附有一种完整的方法（见 P123 “DRVVT 所用洗涤血小板的制备”）。

- 正常混合血浆
该血浆应仔细制备，以确保尽可能少的血小板在血浆中残留，如上文样本制备中所述。使用第7节中所述的正常混合血浆可能更为方便，但前提是混合血浆在深低温冻存前需离心两次。

方法

- 1 将玻璃试管放置在37°C，加入 0.1 ml 磷脂和 0.1 ml 正常混合血浆。
- 2 37°C 温浴1-2 分钟。
- 3 加入 0.1 ml 稀释的 RVV（RVV为室温）。在 37°C 混合并放置30 秒。
- 4 加入 0.1 ml 预加温的25mM 氯化钙。混合并同时启动秒表。
- 5 记录凝块形成时间。所有试验均进行两次。
正常混合血浆的凝血时间应为 30-35 秒。如果 <30 秒，应在RVV 溶液加入更多的咪唑缓冲液进行进一步稀释。如果 >35 秒，则应加入更多的RVV 储存液。对正常混合血浆进行重复测试，直至凝血时间达到 30-35 秒为止。
- 6 用生理盐水制备磷脂稀释液，稀释比例为1/8；例如，0.1 ml 磷脂加0.7 ml 生理盐水
- 7 用 1/8 稀释的血小板替代品替代磷脂，重复步骤 1-5。
如果凝血时间（之前为 30-35 秒）延长至 35-40 秒，则表明磷脂的稀释浓度比较合适，足以使试验对磷脂抗体敏感。
如果凝血时间超过 40 秒，则使用按1/4比例稀释的磷脂重复步骤 1-5。如果凝血时间仍然为 30-35 秒，则使用按1/16比例稀释的磷脂重复步骤 1-5。如果凝血时间为 35-40 秒，则进行下一步骤。
- 8 使用该 RVV 溶液（用纯磷脂和正常混合血浆测得结果为30-35 秒）和磷脂稀释液（相关凝血时间为 35-40 秒），重复步骤 1-5，将正常混合血浆替换为患者血浆。
- 9 计算患者血浆的 DRVV 时间 (DRVVT) 与正常混合血浆 DRVVT 之比，以获得 DRVVT 比值。
- 10 现在分别使用正常混合血浆和受试血浆再次重复步骤 1-5，但是使用经洗涤的冷冻/解冻裂解血小板替代磷脂。此即为血小板中和程序 (PNP)。在步骤 2 中，混合液孵育 2 分钟。计算所得测试血浆和正常混合血浆的比值即为 PNP。

结果解释

应使用正常受试者的血浆建立本地 DRVVT 比值的正常范围，如第 8 节所述。PL 的 DRVVT 比值的正常范围（平均值 \pm 2 SD）通常为 0.90-1.10。DRVVT 比值的延长表明有因子 II, V, X 或纤维蛋白原的缺乏，或表明可能有抗磷脂抗体的存在。

磷脂的 DRVVT 比值延长但 PNP 的比值下降或被纠正则表明有抗磷脂抗体。

请注意，上述凝血因子的缺乏可能使磷脂 DRVVT 和 PNP 的比值均延长。

样本中存在肝素可导致与存在抗磷脂抗体相类似的结果出现。

PNP 测试对 DRVVT 的纠正

延长的 DRVVT 比值得以纠正或下降至正常范围是 LAC 存在的有力证据。

通常情况下，PNP 比值不能纠正至正常范围内。显示可能存在 LAC 所需的纠正程度目前尚不确定。一种方法为计算纠正百分比，即：

$$\frac{\text{PL 的 DRVVT 比} - \text{PNP 比}}{\text{PL 的 DRVVT 比}} \times 100$$

高于正常范围的结果若在 PNP 中纠正 $>10\%$ ，则提示存在有 LAC。

38.1 DRVVT 所用洗涤血小板的制备

试剂

Tyrode 缓冲液 pH 6.5

- 8.0 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 0.065 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.415 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- g NaHCO_3

溶解于900 ml 蒸馏水中，并调整 pH 至 6.5。用蒸馏水将体积调整至 1 升。

方法

- 1 新鲜枸橼酸盐抗凝血在室温下以170 g (1200 rpm) 离心 10 分钟，以制备富血小板血浆 (PRP)。或
使用用以患者治疗的浓缩血小板。
- 2 用 Tyrode 缓冲液按1/2 比例稀释 PRP。
- 3 将稀释血小板放置于塑料圆锥底离心管中，并在室温下以 850 g 离心 10 分钟。
- 4 使用巴斯德塑料滴管弃上清液，并用 Tyrode 缓冲液重新混悬血小板颗粒。（加入与 PRP 原体积同等量的缓冲液）如前所述以 850 g 离心。此过程重复两次。
- 5 弃上清液并用Tyrode 缓冲液（缓冲液的量为PRP 原体积的25%）重新混悬。
- 6 用塑料试管分装洗涤完成的血小板，每份1.0 ml，使用前在-20°C下冷冻-解冻两次。

39 血小板功能测试

血小板主要通过以下两种方式参与止血：

- 血小板粘附到血管壁的内皮下微纤维和胶原纤维，之后改变形状、经过特定的释放反应，随后聚集形成一个初级血栓栓子。
- 经过上述这些活动，特别是释放和聚集期间的活动导致促凝血活性的产生，主要涉及血小板膜磷脂，进而使血液在血小板发生聚集的区域开始凝固。

血小板数量或质量缺陷可导致明显的出血倾向，主要是由于血小板栓子无法形成所致，次要的原因也可由凝血激活效果不佳引起。

血小板功能缺陷或血小板减少症在临床上可表现为各种不同症状，并强烈提示初期止血失败（如瘀青或瘀斑、鼻衄、胃肠道出血、或月经过多）。血小板缺陷通常会引起较为轻度的出血性疾病。患者可能只在手术或拔牙后出现过量出血。

血小板缺陷包括存储池病、血小板无力症和 Bernard-Soulier 综合征。

在对疑有出血性疾病的患者进行研究时，搜集详细的临床病史十分重要。血涂片检查、血小板计数测定、出血时间测定（详见第 11 节）均是重要的筛选测试。如果这些测试结果都在正常范围内，则被研究的对象发生出血症状可能不是由于血小板缺陷所导致。

药物史也十分重要。有些药物可影响血小板功能的检测结果，包括出血时间。例如，最近服用阿司匹林最多可影响 10 天的测试结果。

关于可干扰血小板功能的药物列表，请参阅下文引用的英国血液学协会血小板功能测试指南。

另一种可能出现异常的简易试验为血块收缩试验，介绍如下。

39.1. 血块收缩

凝结全血中的血块收缩可提示血小板的数量和功能。当血块收缩时可有血清析出，从而检测血块收缩的程度。

方法

- 1 采集 1 ml 血液至玻璃试管（75 mm × 10 mm）中，并放置于 37°C。
- 2 目测试管，直至出现稳固的血块。37°C再静置一小时。
- 3 测量试管底部与血清凹面之间的距离。用细木条（如鸡尾酒棒）小心取出血块，将从血块中析出的血清留在试管中。
- 4 测量试管底部与血清凹面之间的距离。
- 5 血清距离除以总距离再乘以 100 得到一个百分比。

释义

通常情况下有40% 以上的血清析出。在一些血小板缺陷的情况下，血清析出可减少，特别是血小板无力症时。

注意

- 试管和木条都必须绝对清洁，以防止血块粘附到试管上。
- 血块必须小心而轻轻地去除以避免挤压，从而可使更多的血清析出。

参考文献

Chanarin I (ed.). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*.
Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.

Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH
Haemostasis and Thrombosis Task Force. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1322-1330.

39.2. 血小板聚集试验

原理

当血小板形成聚集时，富血小板血浆光密度下降。其下降的程度和速率很大程度上取决于血小板的活性，但前提是其它所有的变量（如：血小板计数、混合速度、温度）在可控范围内。

监测富血小板血浆在一种诱导剂的作用下光密度的变化情况，即可反映血小板聚集的程度。

使用连接到图表记录仪的血小板聚集计监测光密度，从而结果可以图表的形式记录。

不同中心目前实验操作的一些综述 (Jennings et al. 2008, Duncan et al. 2009) 和指南 (Bolton-Maggs et al. 2006) 已经出版。

研究血小板聚集前的注意事项

由于阿司匹林会干扰释放反应，因此在测试前至少 10 天不得使用含阿司匹林的化合物，除非正在特别研究这些药物对血小板聚集的影响。

已知影响血小板功能的其它药物也应避免服用，至少在药物从循环系统中清除所需的时间内。这些药物包括某些抗组织胺、抗生素和抗抑郁药。在进行血小板功能测试前也应对任何处方药进行检查。

由于乳糜微粒会干扰血小板聚集试验，因此在摄入含脂肪的食物后不应立即进行研究。

许多其它的“正常”饮食成分，包括酒精、葱、蒜、辣椒、姜，也可能抑制血小板聚集。在评估结果时应考虑这些因素的影响。

富血小板和乏血小板血浆的制备

在确保最小静脉阻塞的情况下进行静脉采血，并注入含有 1/10 体积枸橼酸盐 (0.109M) 的聚丙烯或有机硅玻璃管中。一次完整的聚集试验大约需要 20 ml 血液。

低温可激活血小板，所以血液应在 20°C - 25°C 下处理。富血小板血浆 (PRP) 通过将标本在 20 g 离心 10 至 15 分钟获得。

将 PRP 小心移至聚丙烯试管，避免被红细胞或白细胞层污染（如果出现两者之一将会削弱聚集能力）。将 PRP 在 20°C - 25°C 下保存，直至测试。对保存的温度没有严格要求，但因温度可影响检测结果，因此，应将所有的 PRP 样本在相同的温度中保存。

剩余的血液以 2000 g 离心 20 分钟，吸取乏血小板血浆 (PPP)，并在 4°C 下保存。

对PRP要进行血小板计数：血小板的数量会影响聚集反应的结果，但绝大多数PRP血小板计数均下降在一定范围内($200 - 600 \times 10^9/l$)，因此该影响微乎其微。事实上，有证据表明，用同一名患者的PPP稀释PRP可抑制得到的聚集反应的结果，这可能是因为PPP中可能含有由于较高速度离心导致血小板额外损伤而释放的一种物质，(Cattaneo et al. 2007, Linnemann et al. 2008)。基于这些原因，PRP血小板计数若在上述范围之内，通常不必作调整。

过高的PRP计数($>1000 \times 10^9/l$)可能会影响聚集反应。因此，将血小板数量调整至更合适的水平可能更有利。这可通过利用患者自身的PPP稀释PRP而实现。同样，血小板计数较低($<200 \times 10^9/l$)可能会使聚集反应减弱。浓缩血小板事实上总是能诱导功能性改变，因此不建议使用。但是，在PPP中稀释至相同PRP计数的正常对照血浆可用于比较。

血小板聚集呈pH依赖性，因此，PRP的PH值应维持在7.7-8.0范围内。将PRP保存在密闭的试管内，并在采血后两小时内完成测试，可实现良好的质量控制。

聚集剂

ADP和胶原蛋白之类的试剂可与血小板膜上的特异性受体结合，从而激活血小板，触发一系列反应，从而导致血小板发生变形、收缩、运动以及颗粒内容物的释放，最终引起血小板聚集。

根据所用诱导剂的类型、浓度，会出现几种不同但相互联系的血小板活化途径，最终导致血小板聚集。在反应管中，血小板由均一的混悬液变成聚集状态，导致吸光率下降、透过血小板混悬液的透射光增加，这种改变可通过记录仪结合血小板聚集仪进行检测。

下面列出的五种聚集剂应足以确定各种血小板功能缺陷性疾病。

腺苷-5-二磷酸 (ADP)

1mM/l二钠盐的储存液可用Owren缓冲液(OBS)进行配制，进行分装后置于 -40°C 保存，至少可稳定三个月。溶液一旦解冻，应在三小时内使用，否则应丢弃。

如需使用，则需用OBS进行进一步的稀释。ADP反应模式取决于其最终浓度。

- 在 $2 \mu\text{mol/l}$ 时，可看到明确定义的初次聚集和二次聚集：前者代表诱导剂诱导的直接影响，而后者表示内源性ADP的释放以及血栓烷 A_2 (TXA_2)的生成导致的血小板聚集。
- 低于 $2 \mu\text{mol/l}$ 时，越来越少的正常受试者显示二次聚集，同时由于ADP被酶降解，通常初次聚集可被逆转。
- $3 \mu\text{mol/l}$ 以上时，初次聚集通常非常强烈，以至于其与二次聚集难以区分。

ADP 可诱导血小板的形状从碟形变为尖球形，最初可导致血小板混悬液的光密度轻度增加，但这只有在初次聚集受损时才能看到。

肾上腺素

用OBS缓冲液制备 1mM/l 的酒石酸盐的储存液。其贮存和使用方法与ADP相同。对于肾上腺素而言，其所用浓度和反应模式均与 ADP 相似。然而，在没有二次聚集的情况下，初次聚集不会发生逆转，同时，即使其初次聚集非常强烈也不会遮蔽二次聚集。

胶原

德国慕尼黑 Hormon-Chemie公司提供的马肌腱胶原纤维 (1 mg/ml) 是一种非常稳定的混悬液，得到了广泛应用。有些其它材料也同样适用。它于 4°C 下保存，在用缓冲液对其进行稀释之前，必须将其充分混匀。在PRP中，它使用的最终浓度应为 0.5 - 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，而且稀释的混悬液可在 4°C 稳定一周。

用胶原作诱导剂不会出现初次聚集。反应通常界定为发生聚集之前的迟滞期以及聚集的强度。在聚集之前，血小板形状的改变导致光密度的轻度增加。

目前使用的胶原来源各不同。胶原的类型以及制备制剂所用的物种（如：马或牛）都可对所得的结果产生重要的影响。事实上，根据来源材料不同，需要超过一百倍的浓度范围。因此，选择胶原的合适来源以及建立其当地参考范围非常重要，如果来源发生变化，则应重新评估。请参阅 Jennings 等人 (2008) 的文献。

瑞斯托霉素

在 PRP 中，当瑞斯托霉素的最终浓度为 1 mg/ml 时，可清楚辨别初次聚集和二次聚集，但高于上述浓度时，由于直接作用太强，故两相发生合并。

初次聚集可对血浆中血管性血友病因子的含量进行评估，而二次聚集是由于内源性物质释放所致。

花生四烯酸

用OBS溶解花生四烯酸钠（99% 纯度），使其浓度达到10mM/L。小量分装的溶液放置于黑色玻璃小瓶中并冲满氮气以防止氧化，用塞子盖紧，于-20°C以下冷冻保存。

聚集一般是单相的，之前有一短暂的迟滞期。

试剂

注意：如果一份中加入九份 PRP，则以下为合适浓度。

- ADP
按 1/10 稀释 = 100 μM （即0.1 ml 1000 μM 溶液 + 0.9 ml OBS）

用上述ADP，制备两种工作浓度：

- 20 μM （即0.2 ml 100 μM + 0.8 ml OBS）
- 30 μM （即0.3 ml 100 μM + 0.7 ml OBS）

当测试高聚集能力时，可能需要较低的浓度（例如，10 μM , 5 μM ）。

- 肾上腺素
按 ADP 同样的方法稀释
- 胶原
充分混匀后在 OBS 中稀释：
 - 按1/500稀释（即0.1 ml 储备溶液 + 4.9 ml OBS）= 20 $\mu\text{g/ml}$
 - 按 1/100稀释（即0.5 ml 1.50 稀释液 + 0.5 ml OBS）= 10 $\mu\text{g/ml}$
- 瑞斯托霉素
根据所得的结果，最多可使用四种浓度: 15 mg/ml, 12.5 mg/ml, 7.5 mg/ml 和 5 mg/ml
- 花生四烯酸
10 mM/L

方法

由于离心可导致血小板不能聚集，因此，聚集试验必须在 PRP制备后 30 分钟内开始。特别是，PRP制备后的 20 至 30 分钟期间血小板对 ADP 的反应降低。总之，应在两小时内完成检测。

- 1 开启血小板凝集仪，加温至 37°C，然后将搅拌速度设为 900 rpm。
有些凝集仪有两个通道，因此，每个通道可很方便使用记录纸的一半宽度。
在 10 mV 的偏转下，为通道 1 和 2 使用的 PRP 设置分别为 0.5 和 5.5 mV（代表 0% 聚集），相应的空白值（使用 PPP 设置）将为 4.5 和 9.5 mV（代表 100% 聚集）。
- 2 将 0.45 ml PRP 放入含有硅化的“搅拌棒”的玻璃比色管中（一次性使用）。
- 3 放入通道 1 的固定器内，并设置透过率至 0% (0.5 mV)。换成含 0.5 ml PPP 的比色管，并设置透过率至 100% (4.5 mV)。重复此过程，直到不需进一步的调整。
- 4 对于通道 2，使用 5.5 和 9.5 mV 重复设置。
- 5 让 PRP 升温至37°C 2分钟。向比色管底部加入 0.05 ml 激动剂，观察3分钟内的光密度的变化。

对于每种激动剂均重复此过程。

注释

- 对于 ADP 和肾上腺素，以 20 μ M 浓度开始。在 PRP 中的终浓度为 2 μ m。
- 对于胶原蛋白，使用 10 g/ml 的浓度。终浓度将为 1 μ g/ml。
- 对于瑞斯托霉素，使用 12.5 mg/ml 的浓度。在筛查 2B 型 VWD 时，还需检测 7.5 mg/ml 和 5 mg/ml 的浓度。在 PRP 中终浓度分别为 1.25 mg/ml、0.75 mg/ml 和 0.5 mg/ml。如果对 12.5 mg/ml 没有反应，则使用 15 mg/ml 的浓度。

如果血小板与 0.5 mg/ml 瑞斯托霉素有高聚集力（2B 型 VWD 或血小板型 VWD）：

- 在凝集仪上相同的搅拌条件下并且不添加任何刺激聚集的激动剂，监测 PRP，从而检查自发性聚集。
- 用 EDTA 柠檬酸盐水洗涤 PRP 3 次（如：1ml 患者和正常血浆 \times 3）。在正常血浆中小心重新混悬患者血小板，并且用患者血浆混悬正常血小板。用 0.5 mg/ml 瑞斯托霉素重新检测。

反应应符合以下模式之一。

图 39.1. 反应模式

患者 PRP 患者 PPP	患者血小板 正常 PPP	正常血小板 患者 PPP
聚集	无反应	聚集 = 2B 型 VWD
聚集	自发性聚集	无反应 = 血小板型 VWD*

*对于血小板型 VWD，请参阅 Franchini Franchini et al. (2008)。

聚集模式解读

- 如果被检测的血小板不能产生正常的反应 - 即，两阶段的聚集占了标尺的 50% 以上，高浓度聚集占了标尺的 50% 以上 - 那么，使用更高的浓度，直至获得理想的反应。
- 在有明显释放缺陷的情况下，监测对花生四烯酸的反应。
- 如果花生四烯酸没反应，则用血栓素 A2 和/或钙离子载体进行测试。
- 当血小板聚集用于高聚集能力评估时，则使用较低浓度的 ADP 和肾上腺素以获得获取剂量反应曲线。使用的浓度为：在 PRP 中的终浓度为 2 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M, 0.1 μ M。在检测这些激动剂诱导血小板聚集前，还要进行自发性聚集检测：
 1. 将 0.5 ml PRP 放入比色管，之后放入凝集仪。
 2. 监测 15 min 内的光密度变化。

如果 PRP 体积不足，用于标准比色管的最小体积为 0.36 ml PRP + 40 μl 激动剂。

- 来自健康正常供体以同样方式制备的 PRP 可用于检测试剂。特别是患者结果异常时，这一做法非常重要，因为有些激动剂不稳定，特别是稀释至工作浓度时。以这种方式检测的健康正常受试者的结果可用于计算参考值范围，以帮助解读患者结果。

结果计算

结果通常用以下三种方法表示：

- 加入激动剂后测3分钟内光密度下降的百分比。这是最方便的方法，虽然它不提供关于聚集曲线形状的信息。
- 聚集描记的初始斜率。这表明了聚集率，但并不能说明是否发生了二次聚集。
- 激动剂界限浓度的确定，即，刚好能诱导S波反应所需的聚集剂量（这往往浪费 PRP）。

结果解释

解释血小板聚集模式需要非常谨慎。一些技术因素可能会影响结果。切记，比浊法测定的聚集与体内发生的聚集之间有很多重大差异。

即便如此，还可获得有用的诊断信息，一些聚集模式的示例如图 39.2 所示。

图 39.2. 各种疾病中血小板聚集结果

疾病	ADP	胶原	瑞斯托霉素 1.25 mg/ml	瑞斯托霉素 0.5 mg/ml	花生四 烯酸	肾上腺 素
1 和 2A 型 VWD	N	N	A/R**	A	N	N
2B 型 VWD	N	N	N	H	N	N
巨大血小板综合征	N	N	A	A	N	N
血小板无力症	A	A	N	A	A	A
贮藏池病	P/N	R/N	P/N	A	R/N	P/N
环氧化酶缺陷*	R/N	R	N	A	R	R/N

N = 正常；A = 无；R = 下降；H = 反应性提高；P = 仅 P 波

*或阿司匹林作用 **轻度 1 型 VWD 中可能正常

血小板功能的进一步研究

如果在个体中检测到异常聚集模式，最好重复评估至少一次以检查异常的一致性。

出现异常聚集时，进一步的研究是有用的。包括测定血小板聚集期间核苷酸含量以及释放反应。

为了明确诊断 Bernard-Soulier 综合征和血小板无力症，要对膜糖蛋白进行定量分析。

可测定血小板 ADP 和三磷酸腺苷 (ATP) 的总含量以及致密颗粒中 ATP 或 5-羟色胺 (或两者) 的释放量从而评估血小板释放机制。

图 39.3. 影响血小板功能的技术因素

抗凝剂	柠檬酸钠 1/10 体积。
时间	制备 PRP 30 分钟内开始测试。 在采血后两小时内完成检测。
离心	应充分离心去除红细胞和白细胞，但不要去除大血小板。应在室温下，而不是 4°C 下离心。
血小板计数	< 100 x 10 ⁹ /l 的低计数可导致反应迟缓、较弱。 > 1000 x 10 ⁹ /l 的高计数可导致反应降低。
pH	< pH 7.7 抑制聚集。 > pH 8.0 增强聚集。
混合速度	< 800 rpm 表示聚集降低。 > 1200 rpm 分解血小板团。
红细胞压积	> 55% 表示由于柠檬酸浓度增加，聚集逐步减少，特别是对S波的抑制。
温度	< 35°C 使所有激动剂的常规剂量的聚集下降，但对低剂量 ADP 的反应上升。
脂血	乳糜微粒增加使聚集下降
比色管污染	可导致明显的自发性聚集。
无搅拌棒	加入聚集剂后无反应。
气泡	聚集前，快速大幅振荡图像笔。血小板计数低也可造成。

血小板聚集体内和体外条件的差异

体外血液检测时：

- 血液抗凝
- 去除红细胞和白细胞
- 未涉及血管成分
- 不涉及凝血
- 选择血小板的人群
- 保留血小板活化和释放产品
- 使用的试剂为非生理性成分和剂量
- 血小板在体外不稳定
- 药物在体外作用较体内更明显或更不明显

参考文献

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, Minford A, Mumford AD, Parapia LA, Perry DJ, Watson SP, Wilde JT, Williams MD; UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UK HCDO. *Br J Haematol* 2006; 135:603–33.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 2009; 7:1029.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92:694–7.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:91–4.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61:950–4.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *Thromb Haemost* 2008; 6:677–83.

40 冻干血浆

简介

冻干（冷冻干燥）可用于制备能较长时间内保持稳定的血浆。例如，这种方法可用于制备冻干 乏FVIII血浆，这种血浆当储存于 -20°C 或更低温度下至少可稳定两至五年，而在 $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ 下足够稳定保存较短时间（最多七天）。

合适的血浆

按 9 份血浆和 1 份抗凝剂的比例与 $0.105 - 0.109\text{M}$ 柠檬酸钠混合的静脉血。以 1700 g 离心 10 分钟，混合收集，并在 -55°C 下保存等待病毒测试结果。确定抗 HIV 1 和 2, 抗 HCV, 和 Hep B SAg 结果为阴性。

材料

- 带有内部硅化的 13 mm 瓶颈的 2 ml 透明中性玻璃管
- 13 mm 冷冻干燥灰色瓶塞
- 13 mm 完全可撕下来的封条

(所有材料均来自于 Diagnostic Reagents 公司，地址：Thame, Oxfordshire, U.K.)

- 冷冻干燥装置 (Supermodulyo 和加塞隔板装置来自于 Life Sciences International 公司，地址：Unit 5, Ringway Centre, Edison Road, Basingstoke, Hampshire, RG21 6YH, U.K.)
- N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES; BDH Laboratory Suppliers, Poole, BD15 1TD, U.K.)

方法

- 1 在 37°C 下迅速解冻血浆。
- 2 充分混匀。
- 3 每 100 ml 血浆加入 0.8 g HEPES。

- 4 混合并让 HEPES 溶解（约 15 至 20 分钟）。
- 5 将空瓶放在不锈钢冻干盘上。
- 6 每个小瓶放入 0.5 ml 血浆。
- 7 每个瓶子塞入橡皮塞，塞子塞至瓶子狭窄隆起部分。确保空气不能进入瓶内。
- 8 在 -70°C 下冷冻至少三个小时。
- 9 开启冻干装置。启动冰箱装置。
- 10 将托盘（最多八个）放入隔板装置。
- 11 将隔板装置放入冻干机顶部空气出口上的透明塑料室。
- 12 启动泵。确保上述两个步骤和本步骤在三至四分钟内完成，以防止血浆解冻。如果发生部分解冻，血浆会发泡并且冻干不佳，必须丢弃。
- 13 通过压力表活动（在几分钟内可见的活动）和光侧手动压下血浆室的稳定性确定真空状态。
- 14 在真空状态下放置五天。
- 15 在真空状态下拧松隔板装置上的把手封闭小瓶。
- 16 让空气通过入口进入。
- 17 解冻并晾干冻干机。
- 18 在 -20°C 下储存冻干血浆，并尽快加盖。
- 19 为了确保冻干血浆的质量，从不锈钢托盘不同位置选取 4 至 6 个小瓶进行检测。检测 PT 和 APTT，其值变异不得超过 6%-8%。

41 血凝仪的评估和使用

简介

如今，世界上大部分地区的凝血实验室均广泛使用自动化仪器。自动化仪器有利于标准化，并方便开展要求特定培训和特殊工作条件进行的检测，从而可使实验室可以提高效率和扩展测试范围。

止血自动化开展相对较迟。基于纤维蛋白凝块目视检测以及在 37°C 下使用培养箱的手动方法曾经只是凝血检测中使用的技术。20 世纪 70 年代，出现了基于光学和机械原理检测纤维蛋白的新型半自动化设备。新近，全自动化仪器在现代化实验室已经变得很普遍。如今，与特定数据处理系统连接的新型设备可进行凝血、发色和免疫学检测。

目前有以下两种方法可供使用：

1. 机械
2. 光学
 - 2.1 光学法
 - 2.2 比浊法
 - 2.3 显色法
 - 2.4 免疫法

机械原理

电磁方法是基于纤维蛋白形成使血浆粘度增加的检测。该原理的两种改良方式已应用于当今的实验室设备。

第一种使用电磁场来检测血浆样本中不锈钢球的运动。不锈钢球呈钟摆运动，以一种固定的运动方式在血浆试剂中从一侧向另一侧摆动。随着纤维蛋白的不断形成，血粘度增大，球体活动延迟。当球的振荡运动达到预定水平时，计时器停止，即为血浆凝固时间。

第二种机械检测方法也使用不锈钢球体，但位于单个点槽内。磁性传感器检测球体的位置，并且旋转时，当液体样本仍为液体时，球体保持倾斜。当纤维蛋白形成时，血栓捕获球体，使其从原来的位置移开。当其移动超出传感器的范围时，电路中断，计时器停止计时 (Thomas et al. 1999)。

光学或分光光度法原理

光学原理

光学系统是基于血块形成引起血浆光密度变化的概念。血块形成时，血浆/试剂的初始光密度值产生变化。监测这些变化，并用来计算发生特定程度变化所需的时间。

比浊原理

有些系统使用比浊原理。在凝血检测中，单色激光光源通过光纤等传输。通过与光路成 90 或 180 度的传感器读取光散射数值，然后测定某个角度下散射光或记录光传输的变化。当光线到达纤维素纤维等不溶性复合物时，以前向分散角度（180 度）和横向分散角度（90 度）进行散射。当散射光或透射光的量达到具体预定水平时，计时器停止。血块形成之前和之后的散射光或透射光的差值通常与纤维蛋白形成的量成正比。

显色原理

该原理基于使用一种生成有颜色的物质，称作载色体，其中对硝基苯胺 (pNA) 最为常用。在 405 nm 处吸光率最高。显色检测原理为 pNA 与短肽连接合成发色底物 (Rodak, 1995)。pNA 与一系列我们要测定的活化凝血因子裂解识别的模拟靶氨基酸序列连接。凝血蛋白裂解位于确定氨基酸序列之间特定定位点的显色底物，并释放 pNA。

黄色强度与 pNA 释放量成正比。在波长为 405 nm 时以光检测方法测得。随着越来越多的 pNA 被裂解、释放，样本的吸光度增加，使溶液光密度发生较大变化 (Rodak, 1995)。

第一种凝血检测仪器只能提供单一定义参数，例如，机械或光学参数。最初的光学仪器只能用单一波长读数（例如，500 nm 或 600 nm），仅用于检测血块形成。最近，有些血凝仪可读取两个或更多波长，通常包括 405 nm，使仪器同时具有检测新反应的能力（发色底物法）。在 20 世纪 90 年代，有些制造商成功地加入了多种检测方法，使实验室在同一台仪器上进行不同方法的检测。

免疫学原理

特定抗体包覆的乳胶微粒一般用于检测抗原。单色光束通过乳胶微粒混悬液。当波长大于悬浮颗粒的直径时，粒子吸收光线减少。然而，当溶液中的抗原与乳胶微粒接触时，可被吸附到微粒抗体上，形成粒子之间的连接，从而产生凝集。当粒子的直径接近于单色光束的波长时，则吸收更多光线。吸光度的增加与凝集成正比，而凝集与样本中的抗原数量成正比。20 世纪 90 年代推上市场的更先进凝血分析仪有此类技术。通常，可使用以上任何自动化仪器在几分钟内完成耗时的免疫学标准检测。

图 41.1. 定义参数的检测方法的优点和缺点

方法	优点	缺点
机械法	<ul style="list-style-type: none"> • 不受脂血或溶血等物理特性的干扰 • 使用标本体积小 • 有些测试可使用全血，无需离心 	<ul style="list-style-type: none"> • 不能观察到血块形成的图形 • 纤维蛋白原含量低的样本，可影响终点法检测
光学法	<ul style="list-style-type: none"> • 可观察到血块形成的图形 • 在有些光学系统上可对溶血/脂血/黄疸进行光学检查 	<ul style="list-style-type: none"> • 受脂血、溶血、高胆红素血症或蛋白质增加等因素的干扰 • 使用完全透明的试剂时，有些系统可出现凝块检测困难 • 由于检测前的延迟，导致凝固时间很短的检测无法进行
比浊法	<ul style="list-style-type: none"> • 通过抗原-抗体反应可检测非常少量的蛋白 	<ul style="list-style-type: none"> • 限制了可进行的测试数量 • 试剂成本高
显色法	<ul style="list-style-type: none"> • 使特定性检测更简单 • 可检测凝血法不能检测的参数 • 增加了检测项目 • 与血凝块分析方法相比提高了精确度 	<ul style="list-style-type: none"> • 受到仪器波长的限制 • 要得到合理的成本-效益比，需要大体积测试样本 • 仪器和试剂成本高
免疫学方法	<ul style="list-style-type: none"> • 可使耗时的手动方法自动化 • 可增加测试数量 	<ul style="list-style-type: none"> • 可进行的测试种类有限 • 仪器成本高 • 试剂成本高

凝血实验室自动化的优点

1. 提升了能力、使工作时间更灵活 (Rodak, 1995)。
2. 改善了检测的重复性。在过去，手工凝血测试结果不准确，有超过 20% 的变异系数；半自动化设备为凝血测试提供了更高的准确性。然而，在手动分配样本和试剂时，检测必须重复进行。有了全自动设备后，精确度有了提高，变异系数达到了 5% 以下，甚至有些测试为 1%。据此指南推荐单次检测，这将降低试剂成本，使检测管消耗量减半。
3. 降低了样本和试剂的成本。
4. 便于数据储存和通过计算机程序恢复系统。
5. 在第一次运行发生错误时，自动重新运行结果。
6. 使运用单个样本进行不同的检测成为可能。

7. 可在封闭试管中取样，从而提高了凝血测试的安全性和效率。这在很大的程度上降低了操作者被试剂喷溅的风险，同时降低了患者样本溢出或标注错误的可能性。有一位制造商提供了获得专利的筛查系统，即在测试前无需离心即可将血浆从红细胞中分离出来。
8. 提供了稀释样本、校准品和对照物的能力。如果初次结果不在检测方法的线性范围内，则仪器可自动进行进一步稀释。如果临床上有要求或由于初步运行结果的原因，无需操作者的干预即可自动增做其它测试。
9. 大多数分析仪含有报警系统，警告操作者超过预先确定数值，主要用于识别设备问题（如：试剂不足、温度故障、样本量过小和质量控制错误）。

应该了解和明白不同方法均有其优点和缺点，以保证测试的精确度和有效性。重要的是要明确获得可信的实验结果是实验室的责任。尽管有预算的限制，实验室还是要选择可产生准确结果的凝血仪器。这些仪器需要定期的技术维护、规范的知识以及系统控制，因为错误或故障一定会影响一些结果。因此，保证分析结果可靠的控制系统是不可少的。

很多实验室有幸在购买设备前进行仪器的评估。如果不可行，则从参考实验室获取足够的信息和意见是非常重要的。

购买前对新的仪器进行评估时，首先要根据以下标准对分析仪进行比较，如：

- 设备成本
- 非活动期和可靠性
- 维修所需时间
- 易于使用
- 在适当的时间内提供充足的维护
- 验证程序和产能
- 一次性耗材的成本
- 使用其它制造商生产的试剂的兼容性
- 加入新测试的可能性
- 培训课程和持续培训支持 (Rodak, 1995)

不同类型设备对多种参数的敏感性会根据机器如何校准以及如何检测终点而有所不同，实验室有不同的需求，最好排列优先顺序。参阅图 41.2 中的示例。

技术的价值正在不断提升，不断增长的日常需求产生使实验室需要有该特性的仪器。这将使实验室向前大步迈进，但前提是有可能以可靠、准确、准确的方式进行测试，并且在较短时间内交付得到更好控制的结果。

自动化具有巨大优势。技术在不断进步，以满足该领域的新发展、减少周转时间，使测试可靠、准确和精确，同时保持质量。

图 41.2. 专用设备的特点

资料来源：Rodak, 1995

特点	描述
随机存取	对于患者样本，可以以任何顺序以及同时进行不同的测试。
样本初级管	血浆样本可直接抽吸到分析仪中的开放性采集管中。
插入塞和关闭的采样管	分析仪用橡胶塞使采集管内的血浆样本处于真空状态。
条形码	通过条形码识别试剂、患者样本或两者同时识别。这减少了手工数据输入。
双向互相性	分析仪查询中央计算机以确定所需的测试数量。操作者无需手动设置程序。
样本指示器	警告操作者关于样本完整性的问题。
液体水平传感器	当测试的样本或试剂不足，或如果执行所需测试时样本真空程度不足时，则警告操作者。
一体化质量控制程序	仪器的计算机程序存储和组织质量控制数据。可能包括 Westgard 规则的完整应用，以提示限值以外的结果。
STAT 能力	让操作者可取消测试验证次序，以在“验证岛”上放置一个新的 STAT 样本。
完整样本的制冷能力	在验证过程中，保存样本、试剂或两者的完整性。
完整样本的储存能力	在任何指定之间均可提示可装载入分析仪的患者样本量。
反射测试能力	使操作者能够设定设备以在特定参数下重复或添加测试。
患者数据储存	分析仪能储存可在任何指定时间回忆的测试结果。可储存血块形成曲线。
试剂体积监测	进行设定测试而试剂不足时警告操作者。
处理	在指定期间内可处理多次测试（一般以每小时测试次数分类）
血块形成曲线	可使操作者看到比色管内的血块形成。有助于检测某些不符合规则的条件或病态状态或测试结果异常失败的位置和溶液。

参考文献

Rodak BF (ed): *Diagnostic Hematology*. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 626–631.

Thomas LC, Sochynsky CL. Multiple measuring modes of coagulation instruments. *Clin Hemost Rev* 1999; 13:8.

其它相关出版物

Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automation analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:269–279.

Sasaki M, Kageoka T, Ogura K et al. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:217–227.

42 分子遗传分析

Ampaiwan Chaunsumrit 教授和 Anne Goodeve 医生目前正在撰写的另一 WFH 实验室科学委员会的出版物涵盖了血友病及同源疾病相关的分子遗传测试各方面涉及的实验室方法。本实验室手册涉及表型分析，可通过 WFH 的网站免费下载，网址：www.wfh.org。

世界血友病联盟

1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010
Montréal, Québec H3G 1T7
CANADA

电话：(514) 875-7944

传真：(514) 875-8916

电子邮件：wfh@wfh.org

网址：www.wfh.org

