

出血性疾病诊断治疗中实验室检测项目的应用建议

中华医学会检验分会 卫生部临床检验中心 中华检验医学杂志编辑委员会

为了在出血性疾病的诊断和治疗中科学、合理地应用实验室检测项目,中华医学会检验分会、卫生部临床检验中心和中华检验医学杂志编辑委员会共同决定制定出血性疾病诊断治疗中实验室检测项目的应用建议,并委托中华医学会检验分会的《临床疾病实验室检测项目应用建议》编写组负责起草制定。本应用建议在制定过程中,通过多种方式广泛征求相关临床专家和检验医学工作者的意见,作为修改的一个重要参考依据。

本应用建议最后经中华医学会检验分会和卫生部临床检验中心组织专家进行讨论修改后,由中华医学会检验分会、卫生部临床检验中心和中华检验医学杂志编辑委员会共同发布。

由于医学科学技术发展迅速,本应用建议将适时修订,以适应医学发展和临床应用的需要。

本应用建议分 2 个部分:(1) 出血性疾病(简称出血病)诊治中常用的实验室检测项目;(2) 实验室检测项目在出血病诊治中的应用。

一、出血病诊治中常用的实验室检测项目

出血病是一组以自发性或轻微外伤后出血难止为特征的疾病,按病因可分为遗传性和获得性两类。实验室检测在出血病的诊断、鉴别诊断、病情监测和疗效观察中起重要作用。常用的检测项目包括:一期止血缺陷的检测、二期止血缺陷的检测、纤溶亢进的检测以及特殊的检测等。

(一) 一期止血缺陷的检测^[1]

用于检测血管结构/功能或血小板数量/功能异常所致的出血病,可分为筛查试验和诊断试验两类。

筛查试验

1. 血小板计数(blood platelet count, BPC)^[2]:

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2013.11.002

基金项目:国家临床重点专科建设资助项目

通信作者:王学锋(200025 上海交通大学附属瑞金医院检验科),电子信箱:13641653074@139.com

BPC 是指计算单位容积血液中血小板的数量,目前多采用血液分析仪法,特殊情况下也采用显微镜下人工计数法,流式细胞术为其检测的金标准。参考范围为 $(100 \sim 300) \times 10^9/L$ 。

分析前因素:采血过程是否顺利,反复静脉穿刺可以导致血小板活化,致使 BPC 假性减少;抗凝剂选择 肝素抗凝血不能用于 BPC;EDTA 钾盐抗凝血标本,在少数患者可引起血小板聚集,致血小板假性减少;储存时间影响 BPC 标本应保存于室温,低温可激活血小板,储存时间过久可导致 BPC 偏低。因此,标本应置室温,2 h 内完成检测。

建议 1 BPC 静脉采血应该做到一针见血;若穿刺不顺利,则应该及时改变采血部位。

建议 2 推荐采用 EDTA 钾盐抗凝,玻璃试管应该硅化或采用塑料试管;若 BPC 明显减低,应该查看血常规检测中的直方图并进行外周血推片镜检,以复核 BPC。

建议 3 若有证据显示待检患者血液中血小板计数因 EDTA 钾盐导致假性减少,可以使用手指末梢血液显微镜下人工计数血小板,或改变抗凝剂采血检测血小板。

建议 4 检测前肉眼观察试管中是否有细小凝块,若存在应重新抽血检测。

建议 5 流式细胞术检测 BPC 的敏感性和特异性均较佳,特别是在 $BPC \leq 20 \times 10^9/L$ 的标本复检时有重要价值。

分析中因素:首先需要保证检测系统状况正常,仪器、试剂配套,室内、室间质控合格。

分析后因素:使用三分群血液细胞分析仪时,应注意小红细胞或大血小板对 BPC 的影响,注意血小板直方图的变化。检测结果异常的标本可以制备血涂片染色镜检,观察血小板数量(正常可见 8 ~ 15 个/油镜视野),无大量的血小板凝块或大型血小板等。异常增高的红、白细胞碎片可干扰 BPC 准确性;注意血液细胞分析仪的异常提示,必要时采用显

显微镜下人工镜检法。

2. 出血时间测定(bleeding time, BT):BT 是指皮肤毛细血管被刺破后,从自然出血到自然止血所需的时间。反映皮下毛细血管的结构、舒缩功能以及血小板数量、功能等情况。BT 是一期止血的重要筛查试验,目前推荐用模板刀片法(template bleeding time,TBT),有助于发现血小板与血管壁功能缺陷导致的出血倾向。TBT 的参考范围为(6.9 ± 2.1) min。

分析前因素:检测部位位于肘部屈侧下方,3~4 cm 处,避开血管、伤口、水肿、溃疡和瘢痕组织。

分析中和分析后因素:出血器的长轴与上肢平行,用血压计维持检测上臂血压在 40 mm Hg(儿童 20 mm Hg,1 mm Hg = 0.133 kPa),每 30 s 用无菌滤纸擦拭伤口吸入流出的血液,直至出血停止(TBT 超过 20 min 可以停止检测)。该法受多种因素的影响,如年龄、性别、血型、血细胞比容、皮肤温度、皮肤水肿、皮肤瘢痕等;也受某些药物(如阿司匹林、氯吡格雷等)的影响。TBT 敏感性、特异性均较差,更缺乏质量控制,不能作为高凝状态、术前出血风险和术后出血的评估指标。

建议 6 Duke 法 BT 检测已放弃用,BT 检测应该规范使用模板刀片法(出血器测定法,TBT)。

建议 7 一期止血缺陷患者 BT 检测存在异质性,必要时可以重复检测。

血小板计数和出血时间测定用于一期止血缺陷出血病的筛查,其结果见图 1。

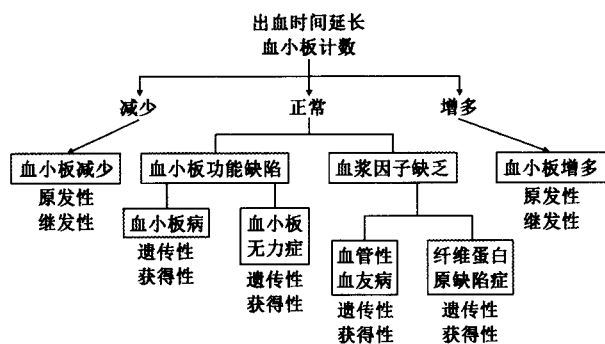


图 1 BT 和 BPC 用于一期止血缺陷出血病的筛查

诊断试验^[3-4]:用于一期止血缺陷出血病诊断的项目繁多:(1)血小板数和功能缺陷:常用血小板膜糖蛋白抗体检测和血小板功能试验等;(2)血管壁缺陷:常用血管性血友病(von Willebrand disease,vWD)相关试验和凝血酶调节蛋白(thrombomodulin,

TM)测定等。目前常用的有:

1. 血小板聚集试验(platelet aggregation test, PAgT):PAgT 是一种血小板功能检测试验,应选择不同种类和不同浓度的诱导剂,有助于与血小板聚集功能相关的一期止血缺陷性出血病的诊断。

分析前因素:除 BPC 需正常外,若用光学法检测,需要患者空腹采血;阻抗法检测则无此限制。含柠檬酸三钠的塑料采血管中应该含有避免血小板活化的试剂。

建议 8 使用含柠檬酸、茶碱、腺苷和双嘧达莫(CTAD)的塑料管或真空采血管。

建议 9 标本应该储存于 18~24℃,禁止存放于冰箱中。

建议 10 检测前需要检查试管中有无小凝块。

建议 11 采血量 9~12 ml。

分析中因素:每次检测中,应该保证测试条件一致,以免结果出现波动。不同种类和不同浓度的诱导剂,对疾病的诊断有重要意义,应该有选择地组合应用。检测的小试管应该在 18~24℃ 保存。采血后标本静置 30 min,可以使血小板恢复到原有的反应性。

建议 12 不同仪器、各种试剂的不同浓度的测定值有较大差异,建立自身实验室的参考范围有重要意义。

建议 13 使用后剩余试剂不得再次使用。血小板聚集诱导剂,需要小包装分装保存。

建议 14 采血后标本静置 30 min,3 h 内必须完成检测。

建议 15 离心条件 50 × g,30 min(加盖)。

建议 16 富含血小板血浆(PRP)的 BPC 必须达到(100~300) × 10⁹/L。

建议 17 PRP 加入反应管后需要在 37℃ 孵育 10 min,搅拌子的转速应该在 800~1200 r/min。

分析后因素:血小板聚集率的变化,受到很多因素的影响。分析结果时需要注意患者的饮食因素如进食含抗血小板功能的食物、服用抗血小板药物以及其他的病理和生理状态影响血小板的功能等情况。另外,BPC 的降低,也是影响 PAgT 的重要原因。

2. 流式细胞术(flow cytometry,FCM)检测血小板膜表面糖蛋白(glycoprotein,GP):利用荧光标记不同的抗血小板膜糖蛋白单克隆抗体,通过 FCM 检测血小板膜上各种 GP 的表达与否(如巨血小板综

合征缺乏 GPIb-V-IX 的表达,血小板无力症缺乏 GP II a/III a 的表达),以诊断血小板黏附和聚集功能缺陷性疾病。

分析前因素:使用硅化的柠檬酸三钠真空采血管,顺利抽取静脉血,轻轻颠倒混匀后立即送检。标本应注意保温,避免血小板冷激活。

建议 18 采血 30 min 内检测。

分析中和分析后因素:血小板离体后极易被激活。因此,加样、混匀动作要轻柔。质量控制:(1)阴性对照:非特异荧光的强弱取决于抗体浓度、单克隆荧光抗体特异性和纯度,应与试管抗体相对应。在多色分析时,同型对照应与其他抗体同时使用,以避免补偿造成的误差;(2)血小板体外活化试验:使用正常人活化标本作为阳性质控,正常人未活化标本作为阴性质控;(3)血小板自身抗体检测:使用含有已知血小板抗体的血清与待检血小板孵育,作为阳性质控;不含血小板抗体的血清与待检血小板孵育,作为阴性质控;(4)血小板表面抗原缺失:如巨血小板综合征血小板表面 CD42a/CD42b 缺失或异常,血小板无力症血小板表面 CD41/CD61 缺失或异常,使用正常人标本做阴性对照,抗体的同型对照做阳性对照。

3. 血小板膜糖蛋白(GP)特异性自身抗体检测^[5]:特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)自身抗体的检测有多种方法,单克隆抗体俘获特异血小板抗原检测(monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen, MAIPA)是国际推荐的方法,其敏感性和特异性均较好(表 1)。

表 1 MAIPA 与 PAIgG 检测对 ITP 诊断的比较(%)

组别	敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	有效率
MAIPA	42	97	96	50	63
PAIgG	83	32	67	53	64

建议 19 自身抗体检测方法较多,参考范围不一,各实验室需建立自己的参考范围。

4. 血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF)相关检测^[6]:vWF 由血管内皮细胞分泌,其量的缺乏或质的缺陷,可导致 vWD 的发生。vWD 临床分为:1 型、2 型(2A、2B、2N、2M)和 3 型。

诊断试验:(1)vWF 抗原(vWF: Ag)检测:较为常用的是酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫比浊法检测。

在 1 型 vWD 患者 vWF: Ag 呈中度降低,与 vWF 瑞斯托霉素辅因子(vWF: Rcof)相平行。在 vWD 中 vWF: Ag 异常检出率约为 40%。(2)vWF 瑞斯托霉素辅因子(vWF: Rcof)检测:vWF: Rcof 可反映 vWF 与 GP I b-IX-V 复合物的相互作用,是目前标准的 vWF 活性(vWF: A)的检测方法。vWD 患者的异常检出率 > 50%,其敏感性和特异性较 vWF: Ag 为佳。但检测结果变异性较大,可能与血型不同有关。(3)vWF: Rcof/ vWF: Ag 比值:正常人比值 > 0.7; vWD 患者:1 型和 2N 型的比值同正常人;2A、2B、2M 型的比值 < 0.7;3 型不用该比值。(4)FVIII 促凝活性(FVIII: C)检测:vWD 患者,除 vWF 水平减低外,FVIII: C 水平也可减低,故 FVIII: C 检测也是诊断 vWD 的指标之一。

分型试验:(1)vWF 多聚体检测:vWF 的分子结构由二聚体或多聚体构成,一般采用 SDS-凝胶电泳法检测。1 型 vWD 患者血浆中各种不同相对分子质量的多聚体都存在,属正常;多数 2A 型和 2B 型患者分别是大、中相对分子质量和大分子多聚体缺乏;2M 和 2N 多聚体正常;3 型则各种相对分子质量多聚体完全缺乏。多聚体检测是 vWD 分型的重要手段。(2)瑞斯托霉素诱导的血小板聚集试验(ristocetin-induced platelet agglutination, RIPA):由于 vWD 患者缺乏 vWF: Rcof,瑞斯托霉素(1.0 ~ 1.2 mg/L)加入患者富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)中,血小板无聚集反应,故大部分 vWD 患者(1 型、2A 型、2B 型、2M 型)的 RIPA 减低,3 型则缺如;但是 1 型 vWD 患者(约 30%)RIPA 可正常。2B 型 vWD 患者用低浓度(< 0.6 mg/L)瑞斯托霉素即可致血小板聚集活性增高。(3)vWF 与胶原结合试验(vWF: CB):vWF 的胶原结合域在 A3 区,血管受损后 vWF 立即与胶原结合(初期止血反应)。该试验是用 ELISA 检测 vWF 与胶原结合的能力,表现为高相对分子质量 vWF(功能性 vWF)优先与胶原结合的特点。在缺乏高相对分子质量 vWF 的患者中,本试验反应不佳;计算 vWF: Ag/ vWF: CB 比值可反映 vWF 量和质的关系,有助于 1 型和 2A 型 vWD 的鉴别(2 型的 vWF: Ag/ vWF: CB 比值 > 2.0);对于 vWF 水平改变,vWF: CB 最为敏感。(4)vWF 与 FVIII 结合试验(vWF: FVIII B):vWF 的 FVIII 结合域在 D 区,反映 vWF 与 FVIII 的结合能力。免疫法检测,参考范围:vWF: FVIII B 为 (924 ± 216) U/L; vWF: FVIII B/ vWF: Ag 比值为 1.10 ± 0.24。在 1 型和 3 型 vWD 时,vWF: FVIII B/ vWF: Ag 比值正常,在 2N

型 vWD 则降低。

建议 20 vWF 由血管内皮细胞合成与分泌,检测的影响因素较多:剧烈运动等可以使其分泌增加,O 型血患者其水平较 A、B 和 AB 血型者为低。结果分析时须引起注意。

(二)二期止血缺陷的检测^[7]

指凝血活性减低/抗凝物质增多所致的出血病。可分为筛查试验和诊断试验两类。

分析前因素:采血针直径必须足够,以避免血小板和凝血系统的激活。采血必须顺利,避免同一部位反复穿刺,以免在试管中启动凝血系统。血液淤滞,可以导致穿刺局部的 FVIII 和 vWF 浓度升高,造成凝血时间假性缩短。下述各检测项目,均采用 0.109 mol/L 的柠檬酸三钠溶液作为抗凝剂,与全血的比例为 1:9(v/v)。若血细胞比容过高或过低,将会明显影响检测结果。肝素、乙二胺四乙酸、氟化钠或促凝剂(含分离胶)对凝血试验有干扰。因此,所采血液需要避免与上述物质接触。采血量应该是试管体积的 90%,过少的采血量,将使凝血试验出现错误结果。采血后,应该至少轻柔地将试管颠倒混匀 3~6 次。过度震荡试管,将导致溶血、凝血启动及血小板活化。

建议 21 成人采血,静脉显露良好,25 ml 以下的采血量使用 20G 或 21G 针头,25 ml 以上的采血量使用 19G 针头;儿童或成人细小静脉采用 23G 针头,但避免加压。

建议 22 检测前若血细胞比容(haematocrit, Hct)过低(<29%)和过高(>50%),建议采用公式
抗凝剂量(ml) = (100 - Hct) × 血液量(ml) × 0.001 85。

建议 23 压脉带使用时间不应超过 1 min,避免剧烈拍打抽血部位。

建议 24 若 1 次采血需要进行多项检测,凝血检测的血液应该在第 2 管采集。

建议 25 采血量达到规定的刻度线。

建议 26 血液离心前,应该仔细检查试管中是否有微小血凝块。

建议 27 避免过度震荡试管。

建议 28 溶血标本不得用于检测。

分析中因素:首先需要保证检测系统状况正常,仪器和试剂配套,室内和室间质控合格。光学法原理的检测设备,若遇严重脂血和黄疸患者,可能影响检测结果。若贫血血小板血浆(platelet-poor plasma,

PPP)中 BPC > $10 \times 10^9/L$,血小板可以释放出膜磷脂酰丝氨酸,后者可以中和狼疮抗凝物质的活性,使相应病理状态的检测受到影响。血小板可以释放纤维蛋白原、FV、FVIII 和 vWF,这些物质可以使凝血活性假性增高。此外,血小板 α 颗粒中所释放的血小板第 4 因子(PF4),可以中和肝素的活性,使 APTT 缩短。

建议 29 严重脂血和黄疸标本,可以使用机械法原理的仪器检测。

建议 30 各实验室可以自行采血制备质控品,以观察与待检血浆相同条件制备下的质控结果的稳定性。

分析后因素:不同检测试剂及其纯度、设备、稀释液的 pH 值对同一标本的结果可能会有较大差异,在分析结果时应该引起注意。

建议 31 不同实验室应该遵循仪器-试剂配套的原则,制定各自特定检测项目的参考范围。

筛查试验

1. 血浆凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)测定:PT 和 APTT 分别是外源和内源凝血系统的筛查试验,二者组合应用对整个凝血系统有重要的筛查价值。肝素治疗对 PT、APTT 的结果可以产生明显影响,部分试剂中含有 Polybrene(1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物),可中和肝素的抗凝效应。

狼疮抗凝物质(lupus anticoagulant, LA)主要是一些针对磷脂-蛋白质复合物的 IgG 型免疫球蛋白,LA 可以延长磷脂依赖的 APTT。一些组织凝血活酶对狼疮抗凝物质敏感,使 PT 结果延长,从而影响到抗磷脂综合征患者对华法林抗凝结果的监测。

建议 32 若不能立即检测,分离 PPP 后,PT 检测标本可以存放于 2~4 °C,24 h 内完成检测。

建议 33 若不能立即检测,分离 PPP 后,APTT 检测标本可以存放于 2~4 °C,4 h 内完成检测。

建议 34 若患者在接受普通肝素治疗,必须在 1 h 内分离血浆,并在 4 h 内完成 PT 或 APTT 检测。

建议 35 PPP 的血小板计数必须 < $10 \times 10^9/L$ 。

建议 36 离心条件 1500 × g,15 min(加盖)。

建议 37 临床对接受普通肝素治疗患者的标本应该有明显的标识,实验室在报告结果时也应该注明结果可能受到肝素的影响。

建议 38 INR 监测抗磷脂综合征患者对华法林抗凝的靶值可以设定在 2.5 ~ 3.0 之间,或使用发色底物法检测凝血 X 的活性。

建议 39 实验室应该配备不同磷脂含量的 APTT 试剂,以分别应对肝素监测、凝血因子缺陷性疾病以及存在 LA 的患者。

2. 凝血酶时间(thrombin time, TT)和游离肝素时间(free heparin time, FHT)测定:在受检血浆中加入“标准化”的凝血酶溶液(1 U/ml)后,血浆凝固所需要的时间称为 TT。延长的 TT 加入甲苯胺蓝/鱼精蛋白溶液后,TT 变为正常或缩短 > 5 s 称为游离肝素时间或称甲苯胺蓝/鱼精蛋白纠正试验阳性。

3. 混合纠正试验(mixing study):首先,用游离肝素时间(FHT)排除标本中肝素和类肝素的存在,然后通过用正常混合血浆与待检血浆 1:1 混合,即时检测和 37 °C 温育一段时间(2 h)检测 APTT,观察延长的 APTT 是否被纠正,用以判断 APTT 的延长是凝血因子真性减少或是由狼疮抗凝物质、凝血因子抑制物存在所致(图 2)。

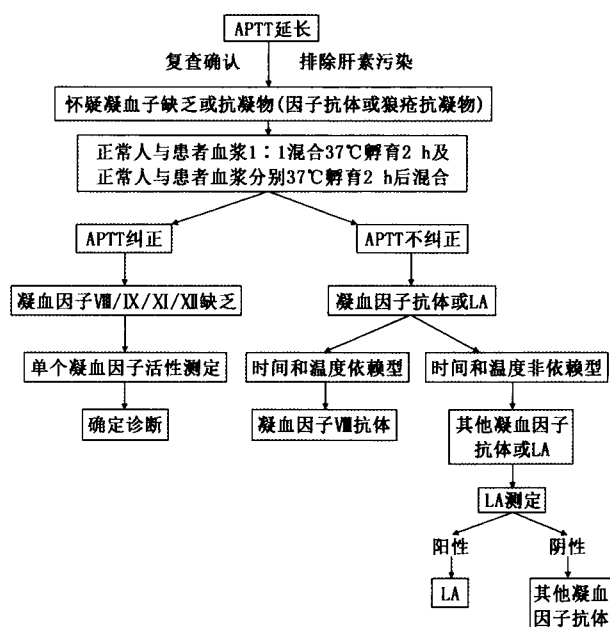


图 2 混合纠正试验的临床应用

诊断试验

1. 凝血因子促凝活性测定(factor coagulant activity, F:C):直接检测 F:C,可以对二期止血缺陷作出明确的诊断与鉴别诊断。分析结果时需要注意鉴别存在相应凝血因子抑制物对检测结果的干扰。据报道,不同实验室间 F:C 检测值的变异可以达到

80%。分析前、分析中及分析后需注意的事项同上述二期止血的检测。

建议 40 凝血因子活性检测, F VII 需要在 18 ~ 24 °C,其他因子在 18 ~ 24 °C 或 2 ~ 4 °C,4 h 内完成检测。

建议 41 凝血因子活性检测,标本保存在 -20 °C,应于 2 周内检测;标本保存在 -70 °C,应于 6 个月内检测。标本取出后在 37 °C 中必须迅速融化,并在 1 h 内完成检测。

建议 42 凝血因子活性检测采用多点稀释(至少 3 点),若不同稀释度的结果连线与标准曲线平行,则抑制物为阴性;反之,待检血浆中可能存在相应凝血因子的抑制物。建议使用与仪器相匹配的试剂。

建议 43 使用的乏因子基质血浆相应凝血因子的活性必须 < 1%。

建议 44 凝血因子活性检测,必须使用不同凝血因子水平的质控品,检测结果应该与预期值相符。

2. 纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)含量测定^[8]:目前, Clauss 法作为 WHO 推荐的方法,常规用于 Fg 的检测。需要注意的是 Clauss 法的检测原理与 TT 相同,但其使用凝血酶的浓度是 TT 的 25 倍,待检样本进行了 10 倍稀释,肝素(< 0.6 U/ml)和 FDP(< 1 mg/L)不影响检测的结果。部分单位使用双缩脲比色法、免疫法及由 PT 衍生法,各种方法的比较见表 2。

建议 45 Fg 检测采用市售商品化的试剂并进行质量控制。若采用自制试剂检测 Fg,需要对凝血酶含量进行严格的标定。

建议 46 Fg 检测中的凝血酶试剂容易氧化失活,严格按照说明书推荐的条件保存,一旦配置要尽早使用。

3. 凝血因子抑制物和 LA 测定:两者分别使用 Bethesda 法和市售的商品化试剂盒检测。

(三)纤维蛋白溶解活性的检测

机体内存在天然的纤维蛋白溶解(纤溶)系统,有溶解血凝块、恢复血流的作用。临床检测可分为筛查试验和诊断试验两类。

1. 筛查试验:D-二聚体(D-Dimer, D-D)和纤维蛋白(原)降解产物[fibrin(ogen) degradation product, FDPs]的组合检测可以综合判断纤溶系统的活性。正常人体内纤溶系统的活性在不同年龄、妊娠不同孕期等一些情况下差异显著,用一个固定值来判断

表 2 血浆纤维蛋白原主要检测方法的比较

方法	与参考方法的相关性			精密度 CV(%)	灵敏度	最低检出值 (g/L)	准确性(相对误差%)		
	低值	正常	高值				低值	正常	高值
Clauss 法	好	0.92	好	3.89	高	0.1	好	好	好
双缩脲比色法	差	0.96	差	4.68	低	0.5	差	35.43 ^a	差
免疫法	差	0.995	差	3.71	较高	0.18	差	27.95 ^a	差
PT 衍生法	0.695 ^a	0.815 ^a	0.966 ^a	2.88 ^a	较高	0.6	差	3.59 ^a	好

注:^a 与 Clauss 法比较

所有待检样本的纤溶活性是不科学的。

理论上,FDPs 是由于纤溶活性亢进降解纤维蛋白和纤维蛋白原所产生的降解产物的总称,D-D 是纤溶活性亢进仅降解交联纤维蛋白的降解产物;实际上,纤溶活性亢进可以同时降解交联纤维蛋白和纤维蛋白原。因此,在判断 FDPs 和 D-D 时,必须结合临床出血、其他检测和动态判断才具价值。

建议 47 建立不同生理状态(如正常老年人、妊娠不同周龄)人群 DD 和 FDP 的参考范围。

2. 优球蛋白溶解时间(euglobulin clot lysis time,ELT):ELT 是纤溶系统一个经典的筛查试验。若试验能在 2 h 内完成,ELT 特异性较好但敏感性差,参考范围为 90~120 min。但本试验影响因素较多,需要引起重视。ELT<120 min 为纤溶活性亢进,>10 h 为纤溶活性减退。低纤维蛋白原血症和因子 XⅢ缺乏症,可以影响 ELT 的检测结果。前者所形成的纤维蛋白较少,后者形成的凝块质量较差,被纤溶酶降解的速率更快。

建议 48 可以用新鲜正常人血浆作为阴性对照,将前者加入链激酶作为阳性对照。

建议 49 在 ELT>10 h 样本,加入链激酶,若 ELT 仍旧延长,说明患者体内的纤溶酶原消耗殆尽;而 ELT 明显缩短,说明体内纤溶酶原含量下降。

建议 50 ELT 时间缩短的患者,需要排除低纤维蛋白原血症和凝血因子 XⅢ缺乏症所致的假阳性。

3. 诊断试验:目前,常规可供选择的试验有纤溶酶原(plasminog, PLG)、组织型纤溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator, t-PA)、尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase type plasminogen activator, u-PA)、纤溶酶原激活剂抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、α2-抗纤溶酶(α2-antiplasmin, α2-AP)和纤溶酶-抗纤溶酶复合物(plasmin-antiplasmin coplex, PAP)检测等,这些检测的活性或抗原分别使用发色底物或酶联免疫吸附试验。由于 t-PA 的水平受到运动和昼夜变化的影响,必须严格控制采血的条件。血小板内含有大量

的 PAI-1,采血后立即离心,以免血小板中的 PAI-1 释放到血液中影响检测结果。

建议 51 采血前患者必须休息 15 min 以上,尽量缩短采血时压脉带的使用时间。

建议 52 血浆分离后,60 s 内迅速用醋酸缓冲液酸化后立即离心,上清液可以保存在-70℃待测。

建议 53 PAI-1 检测,需要注意 PRP 中尽量减少血小板的数量,以避免血小板释放 PAI-1 对 t-PA 和 PAI-1 检测结果的影响。

二、实验室检测项目在出血病中的应用

(一) 特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)

ITP 是一种原发性或由免疫因素介导的血小板破坏增多所引起的临床综合征,国际 ITP 工作组将其改称为“免疫性血小板减少”(immune thrombocytopenia)。临床上可分为原发性和继发性两类。诊断原发性 ITP,必须排除继发性 ITP。其实实验室检查如下:

1. 血液分析:血小板减少,出血时间延长,血块退缩不良,束臂试验(阳性)。

2. 血小板形态:体积增大、形态变异、颗粒减少、染色过深。

3. 骨髓检查:巨核细胞增多/正常,以幼稚型巨核细胞增多/正常,伴成熟障碍。

4. 血小板抗体:推荐单克隆抗体俘获血小板特异抗原检测(monoclonal antibody immobilization of platelet antigen assay, MAIPA),诊断的敏感性和特异性较高,直接用于检测抗血小板 GPⅡb/Ⅲa、GPIb/Ⅸ的特异性抗体。有助于免疫性和非免疫性血小板减少症的鉴别,但不能鉴别特发性和继发性血小板减少症。

5. 其他检测有:网织血小板(reticular platelet, RP)计数升高、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)增高,但这些不作为常规检测指标。

(二) vWD 的实验室检测^[9]:vWD 是由于患者体内的 vWF 基因分子缺陷而造成血浆中 vWF 数量

减少或质量异常所引起的出血病。其实实验室检测见表 3。

(三)血小板无力症(Glanzmann's thrombasthenia, GT)的实验室检测^[10]:GT 是一种遗传性血小板功能缺陷性疾病,其特点是由于血小板膜蛋白 GP II b (α II b、CD41) 和 (或) GP III a (β3、CD61) 的数量和 (或)质量异常而引起血小板对多种生理激动剂的诱聚反应缺乏或明显降低。

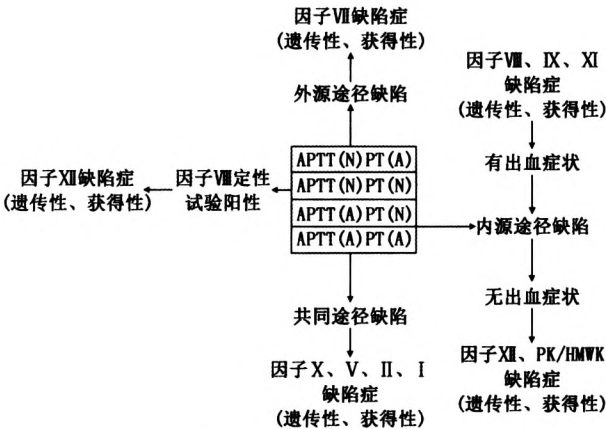
1. 筛查试验:(1)BPC 正常;(2)BT 明显延长;(3)末梢血涂片上血小板分散、不聚集;(4)PFA-100CT 明显延长。

2. 血小板功能试验:(1)PAgT:对 ADP、肾上腺素、胶原、凝血酶和花生四烯酸等诱聚无反应或反应减低;对瑞斯托霉素诱聚反应正常或减低;(2)血块收缩试验:绝大部分(80%)表现为退缩不良;(3)血小板释放反应:对肾上腺素和低浓度 ADP 反应减低;对高浓度的凝血酶和胶原反应正常;(4)血小板玻璃珠滞留试验:缺乏或减低;(5)血小板促凝活性:不同程度异常。

3. 血小板 GP II b/III a 和 αVβ3 受体检测:(1)GP II b/III a 含量检测:含量减少或缺乏(变异型可正常)。(2)αVβ3 含量检测:GP III a 缺陷引起的血小板无力症时降低,GP II b 缺陷时正常或增高;因而检测 αVβ3 可以用来判断是否累及 GP III a。(3)纤维蛋白原结合试验:降低或缺乏。

(四)遗传性凝血因子缺陷症的实验室检测
遗传性凝血因子缺陷症包括各种凝血因子血浆水平的减低/缺乏,临床上主要以关节、肌肉、内脏出血和皮肤瘀斑等为主要表现。以血友病 A(凝血因子 VIII 缺乏症)和血友病 B(凝血因子 IX 缺乏症)较为

常见。筛查试验见图 3。



N: 正常; A: 异常; PK: 激肽释放酶原; HMWK: 高相对分子质量激肽原
图 3 APTT 与 PT 组合检测用于二期止血缺陷的筛查

诊断试验:凝血因子促凝活性测定(F:C)可以发现相应凝血因子的活性缺陷。例如:内源途径缺陷测定 FVIII:C、FIX:C 和 FXI:C;外源途径缺陷测定 FVII:C;共同途径缺陷测定 FX:C、FV:C、FII:C 和 Fg;测定 FXIII 定性试验或抗原含量可以明确 FXIII 缺陷。

(五)病理性抗凝物质增多的实验室检测^[11]
病理性抗凝物质直接抑制某一特定性凝血因子及其凝血反应,或与凝血因子非活性部位结合使其清除率增加;或存在针对多种凝血因子及不同凝血阶段的获得性凝血因子抑制物。

1. 凝血因子抑制物:FVIII抑制物是临床最常见的引起出血的凝血因子抑制物。主要见于血友病 A 患者反复接受血液/血制品而产生的同种抗体或由某种疾病产生的自身抗体(获得性)所引起。其实实验室诊断:(1)筛查试验:PT、TT 正常,APTT 延长且

检测项目	1 型 (vWF 量减少)	2 型(vWF 结构异常)				3 型 (vWF 量缺如)
		2A	2B	2M	2N	
遗传方式	AD	AD/AR	AD	AD/AR	AR	AR
PLT	N	N	↓/N	N	N	N
TBT	N/↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑
APTT	N/↑	N/↑	N/↑	N/↑	↑	↑↑↑
PFA-100CT	N/↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑
vWF: Ag	↓/↓↓	↓	↓	↓	↓/N	O
vWF: Rco	↓/↓↓	↓↓/↓↓↓	↓↓	↓↓	N/↓	O
FVIII: C	N/↓	N/↓	N/↓	N/↓	↓↓	↓↓↓
vWF: Rco/ vWF: Ag	>0.5~0.7	<0.5~0.7	<0.5~0.7	<0.5~0.7	>0.5~0.7	O
RIPA(1.1~1.5 mg/L)	多数↓,30%N	↓↓	多数↓	↓	N	/
LD-RIPA(<0.6 mg/L)	/	/	↑↑↑	/	/	/
vWF 多聚体	N	异常	异常	N	N	O

注:AD:常染色体显性遗传,AR:常染色体隐性遗传;↓、↓↓、↓↓↓:相对减低;↑、↑↑、↑↑↑:相对增高;N:正常;O:缺如

不能被正常血浆纠正, FⅧ: C 的水平随孵育时间的延长呈进行性下降。(2) FⅧ抑制物定量: 即 Bethesda 法或 Nijmegen 法测定, 抗体滴度增高。

2. 类肝素抗凝物质增多: 类肝素抗凝物质增多见于 SLE, 也可见于肝病、流行性肾综合征出血热、急性白血病、浆细胞恶性疾病、肿瘤、DIC、器官移植后、药物、老年人等。类肝素抗凝物质可以加速包括 FXIa、FIXa、FXa、FⅦa 和 FⅡa(凝血酶)等凝血因子的灭活; 此外, 类肝素抗凝物质还可加剧纤溶系统的活化使血液呈高纤溶状态。其实实验室诊断如下: (1) 筛查试验: APTT、PT、TT 均延长且不能被正常血浆纠正, 但延长的 TT 可被甲苯胺蓝/鱼精蛋白纠正。爬虫酶时间正常。(2) 血浆肝素浓度测定, 即抗活化凝血因子 X(A FXa) 检测法可以直接定量血浆中肝素的含量。

(六) 依赖维生素 K 凝血因子缺乏症的实验室检测

依赖维生素 K(VitK) 凝血因子缺乏症是由于

VitK 缺乏导致依赖 VitK 凝血因子合成减少所引起的有出血倾向的疾病, 又是临床上常见的复合性凝血因子缺乏症。导致 VitK 缺乏的常见原因是肝功能衰竭、阻塞性黄疸、新生儿颅内出血、吸收不良/腹泻综合征、鼠药中毒以及抗凝剂(华法林)过量等。常见情况: (1) APTT 和 PT 延长: 依赖 VitK 的凝血因子活性降低于正常人的 30% ~ 35% 可出现 APTT 和 PT 的延长; (2) VitK 的血浆浓度减低: 成人患者 <100 ng/L 新生儿脐血 <50 ng/L; (3) VitK 依赖的凝血因子活性降低: 如 FⅡ: C、FⅦ: C、FIX: C 和 FX: C 均 <50%; (4) VitK 依赖的抗凝蛋白降低: 如蛋白 C(PC) 和蛋白 S(PS)。

(七) 肝脏疾病所致出血的实验室检测^[12]

出血是肝脏疾病的常见症状, 也是肝病患者死亡的重要原因之一, 约 85% 的肝病患者有一项以上的止血血栓实验结果异常, 15% 的患者有出血倾向。肝病出血涉及一期、二期止血、血小板和纤溶异常, 直接或间接引起的复合性凝血因子缺乏。

表 4 主要肝脏疾病血栓与止血检验的结果

检验项目	急性肝炎	慢性肝炎	重症肝炎	肝硬化	原发性肝癌	肝叶切除
凝血试验						
APTT	N/↑	↑	↑↑	↑/N	↑/N	↑
PT	N/↑	↑	↑↑	↑/N	↑/N	↑
TT	N/↑	↑	↑↑	↑/N	↑↑/N	↑
HPT	N/↓	↓	↓↓	↓	↓	↓
凝血因子						
赖 VK 因子活性	N	↓/↓↓	↓↓	↓↓	↓/不定	↓
Fg 和 FV: C	N/↑	N/↓	↓	↓/↓↓	↓/不定	↓
FⅧ: C	N/↑	↑/N	↑↑	↑↑	↑	↑
vWF: Ag	↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑
抗凝试验						
AT	N/↓	↓	↓↓	↓	↑/N	↓
PC 和 PS	N/↓	↓	↓↓	↓↓	↓/N	不定
类肝素物质	N	N/↑	↑↑	↑	↑	N/↑
HC-Ⅱ	N/↓	↓	↓↓	↓	↓	↓
纤溶试验						
ELT	N	N/↓	不定	↓	不定	↓
t-PA	↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↑
PAI	↓	↓	↓↓	↓↓	↓	↓
PLG	N	↓	↓↓	↓	↓	↓
α2-PI	N	↓	↓	↓	↓	↓
FDP	N/↑	N/↑	↑↑	↑↑	↑	↑
D-D	N/↑	N/↑	↑	↑	↑	↑/N
血小板试验						
PLT	N	N/↓	↓	↓	不定	↓
血小板功能	N/↓	↓/N	↓	↓/N	↓/N	N
膜糖蛋白	N	↓	↓	↓	↓	不定
BT	N	N	↑	↑	N	N

注: ↑, 增高或延长; ↑↑, 明显增高或延长; ↓, 减低或缩短; ↓↓, 明显减低或缩短; N, 正常; HPT, 肝促凝血酶原激酶试验; HC-Ⅱ, 肝素辅因子Ⅱ

其实验室检测见表 4。

(八) 弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 的实验室检测^[13]

DIC 是在某些疾病的基础上,形成一种复杂的病理生理过程,临床上出现血栓-出血综合征。诊断 DIC 时必须排除原发性纤溶症(表 5)。

表 5 DIC 与原发性纤溶症的鉴别

检测项目	DIC	原发性纤溶症
BPC	↓,或进行性↓	N
PT/APTT	↑,或进行性↑	N
Fg	↓,或进行性↓	明显↓
ELT	↓,或进行性↓	明显↓
TEG	继发性纤溶形态	原发性纤溶形态
3P	(+)	(-)
PLG	↓,或进行性↓	明显↓
FDPs	(+)/↑	(+)/↑
D-D	(+)/↑	(-)/轻微↑
血涂片上红细胞碎片	>10%	不见

注:TEG:血栓弹力图;↓:减低;↑:增高/延长

其实验室检测如下:

1. DIC 诊断标准:(1)血小板 $< 100 \times 10^9/L$ 或进行性下降;(2)纤维蛋白原 $< 1.5 g/L$ 或呈进行性下降,或 $> 4.0 g/L$;(3)3P 试验阳性或 FDP $> 20 mg/L$ 或 D-二聚体水平升高(阳性);(4)凝血酶原时间(PT)缩短或延长超过对照值 3 s 以上或呈动态变化;APTT 延长超过对照值 10 s 以上或呈动态变化;(5)外周血破碎红细胞比例 $> 10\%$ 。

2. 重症肝病并发 DIC:(1)血小板 $< 50 \times 10^9/L$;(2)纤维蛋白原 $< 1.0 g/L$;(3)血浆因子 VIII:C $< 50\%$ (必备条件);(4)PT 延长超过对照值 5 s 以上或呈动态性变化;(5)3P 试验阳性或血浆 FDP $> 60 mg/L$ 或 D-二聚体水平升高。

3. 急性白血病并发 DIC:(1)血小板 $< 50 \times 10^9/L$ 或呈进行性下降;(2)血浆纤维蛋白原含量 $< 1.8 g/L$;(3)PT 延长超过对照值 5s 以上或呈动态性变化;(4)3P 试验阳性或血浆 FDP $> 60 mg/L$ 或 D-二聚体水平升高。

编写组成员:孙蒂(北京和睦家医院检验科),彭明婷(卫生部临床检验中心),王建中(北京大学第一医院检验科),郝晓柯(第四军医大学西京医院检验科),崔巍(北京协

和医院检验科),李莉(上海交通大学附属第一人民医院检验科),李智(上海同济大学杨浦区中心医院检验科),辛晓敏(哈尔滨医科大学附属第一医院检验科),王兰兰(四川大学华西医院检验科),王蓓丽(复旦大学附属中山医院检验科)

(王学锋 王鸿利 执笔)

参 考 文 献

[1] 王学锋. 出血性疾病的检测//王学锋,王鸿利. 血栓与止血的检测与应用. 上海:世界图书出版公司,2002:325-326.

[2] Hippel TG. Routine testing in Hematology//Rodark BF, Fritsma GA, Doig K. Hematology Clinical Principles and Applications. 3rd ed. Philadelphia:Elsevier Saunders,2007:160-174.

[3] Paul Harrison. Test of platelet function//Nigel Key, Michael Makris, Denise O'Shaughnessy, et al. Practical Hemostasis and Thrombosis 2 edition. New York:Wiley-Blackwell,2009:37-47.

[4] Dyszkiewicz-Korpanty Am, Frenkel EP, Sarode R. Approach to the assessment of patelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood palte aggregation methods. Clin Appl Tromb Hemost, 2005, 11: 25-35.

[5] Chong BH, Keng TB. Advances in the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. Seminar Hematol, 2000, 37: 249-260.

[6] Budder U, Drewke E, Mainusch K, et al. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. Semi Thromb Haemost, 2002, 28:173-190.

[7] CLSI. CLSI document H21-A4 Collection, Transportation and Processing of Blood Specimens for testing Plasma based Coagulation Assay. 4th ed. Wayne, PA:CLSI,2003.

[8] CLSI. CLSI document H30-A2 Procedure for the Determination of Fibrinogen in Plasma. 2nd ed. Wayne, PA:CLSI,2001.

[9] Favaloro EJ, Bonar R, Kershaw G, et al. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease: use of multiple function assays reduces diagnostic error rates. Lab Hematol,2005;11:91-97.

[10] Nair S, Ghosh K, Kulkarni B, et al. Glanzman's thrombasthenia: updated. Platelets,2002,13:387-393.

[11] Green D. Spontaneous inhibitor to coagulation factors. Clin Lab Haematol, 2000, Suppl 1:21-25.

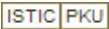
[12] Ragni MV. Liver disease, organ transplantation, and hemostasis//Kitchens CS, Alving BM, Kessler CM. Consultative Hemostasis and Thrombosis. Philadelphia: Sauders, 2002: 489-491.

[13] Feinstein DI, Marder VJ, Colman RW. Consumptive thrombohemorrhagic disorders//RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, et al. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 2001: 1197-1234.

(收稿日期:2013-02-05)

(本文编辑:唐栋)

出血性疾病诊断治疗中实验室检测项目的应用建议

作者: [中华医学会检验分会](#), [卫生部临床检验中心](#), [中华检验医学杂志编辑委员会](#)
作者单位:
刊名: [中华检验医学杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Laboratory Medicine](#)
年, 卷(期): 2013, 36(11)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhyxjy201311002.aspx