

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 08. 020

4 种活化部分凝血活酶时间试剂因子敏感性的量化评估及临床应用探讨

王 威,何晓璇,全晓宁,刘 哲,邓 凯,王 刚[△]

(西安交通大学第一附属医院检验科,西安 710061)

摘 要:目的 量化评估 4 种活化部分凝血活酶时间(APTT)试剂的 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ 敏感性,分析其临床适用范围。方法 采用美国临床和实验室标准化协会(CLSI) H47-A2 的 APTT 试剂敏感性评估方法,检测由标准血浆和单因子缺乏血浆配制的<1%~100%不同因子水平混合血浆的 APTT 值。APTT 试剂敏感性由非线性回归曲线与正常参考区间上限的交叉点确定,并用百分活度(%)表示。结果 试剂 A(上海太阳生物技术有限公司,鞣花酸)的因子敏感性为 FⅧ 54.0%,FⅨ 37.3%,FⅪ 56.5%,FⅫ 36.4%;试剂 B(上海太阳生物技术有限公司,白陶土)的因子敏感性为 FⅧ 25.6%,FⅨ 16.5%,FⅪ 23.8%,FⅫ 18.6%;试剂 C(西门子公司)的因子敏感性为 FⅧ 42.9%,FⅨ 30.0%,FⅪ 45.3%,FⅫ 28.4%;试剂 D(思塔高公司)的因子敏感性为 FⅧ 26.1%,FⅨ 17.6%,FⅪ 19.1%,FⅫ 21.0%。结论 4 种 APTT 试剂的内源性因子敏感性差异较大。试剂 A 适用于亚临床型血友病 A、B 的筛查;试剂 C 适用于术前筛查;试剂 B 和试剂 D 适用于内源性单因子缺乏的确证试验。

关键词:APTT 试剂; CLSI H47-A2; 内源性凝血因子; 敏感性

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)08-1118-04

Intrinsic pathway factor responsiveness and clinical application of four APTT reagents

WANG Wei, HE Xiaoxuan, TONG Xiaoning, LIU Zhe, DENG Kai, WANG Gang[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the responsiveness to single factor levels of four APTT reagents, and analyze the different scopes of clinical application. **Methods** We evaluated, according to the recommendation of the CLSI H47-A2 guideline, the responsiveness to single factor levels of four APTT reagents by using factor-deficient plasmas spiked with a calibration plasma to produce individual factor activities ranging from <1% to 100%. The APTT responsiveness in percent activity(%) could be determined from the intersection of the curve and the upper limit of the APTT normal reference range for that APTT reagent. **Results** APTT responsiveness of SUNBIO(ellagic acid) was as follows: FⅧ 54.0%, FⅨ 37.3%, FⅪ 56.5%, FⅫ 36.4%; APTT responsiveness of SUNBIO(kaolin) was as follows: FⅧ 25.6%, FⅨ 16.5%, FⅪ 23.8%, FⅫ 18.6%; APTT responsiveness of Siemens Dade Actin was as follows: FⅧ 42.9%, FⅨ 30.0%, FⅪ 45.3%, FⅫ 28.4%; APTT responsiveness of STAO[®]-PTTA was as follows: FⅧ 26.1%, FⅨ 17.6%, FⅪ 19.1%, FⅫ 21.0%. **Conclusion** The responsiveness of the tested APTT reagents to single factor deficiency is highly variable. SUNBIO(ellagic acid) is suitable for assisting diagnosis of subclinical hemophilia A and B; Siemens Dade Actin is suitable for preoperative screening; SUNBIO(kaolin) and STAO[®]-PTTA is suitable for identifying single intrinsic pathway factor deficiencies.

Key words: APTT reagents; CLSI H47-A2; intrinsic pathway factor; responsiveness

活化部分凝血活酶时间(APTT)可以反映内源性凝血途径和(或)共同途径的因子缺乏,并且在多因子缺乏或者明显的单因子缺乏时表现为时间延长,但当因子缺乏时,APTT 是否延长及延长的程度取决于 APTT 试剂对内源性凝血因子的敏感性。不同的 APTT 试剂对内源性凝血因子的敏感性不同,这种差

异不仅来源于 APTT 试剂所采用的激活剂以及磷脂种类的不同,还来源于试剂各组分的浓度差异^[1-2]。那么,实验室如何评估 APTT 试剂对内源性凝血因子 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ 的敏感性,如何做到标准化评估操作,临床如何应用因子敏感性不同的试剂,这些均是实验室亟待解决的问题。美国临床和实验室标准化

协会(CLSI)在 H47-A2 文件中将 APTT 试剂敏感性定义为 APTT 升高到已建立的正常参考区间上限时的因子水平^[3]。在我国,实验室工作人员已注意到不同品牌的 APTT 试剂对同一份标本的检测结果不尽相同,但很少深究造成差异的原因,以及这种差异可能导致的临床后果^[4-5]。国内前期研究中,虽然评估了不同 APTT 试剂的因子敏感性,但并未给出详细的定量的内源性因子敏感性结果^[1]。本研究采用 CLSI 提供的 APTT 试剂敏感性的评估方法,量化评估本实验室可获得的 4 种不同 APTT 试剂的因子敏感性,分析其不同的临床适用范围,以及 H47-A2 未提及的 FⅢ对 APTT 结果的影响,期望筛选出适用于术前筛查及单因子缺乏患者筛查的试剂。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器:日本 Sysmex CS5100 全自动血凝仪;法国恩塔高(STAGO)-R 全自动血凝仪。试剂 A:APTT 测定试剂盒(CS-5100 适用),上海太阳生物技术有限公司生产,接触激活物为鞣花酸;试剂 B:APTT 测定试剂盒(STAGO 适用),上海太阳生物技术有限公司生产,接触激活物为白陶土;试剂 C:APTT 测定试剂盒(Siemens Dade Actin),西门子(Siemens)生产,接触激活物为鞣花酸;试剂 D:APTT 测定试剂盒(STAO®-PTTA),STAGO 公司生产,接触激活物为硅土。4 种 APTT 试剂组分中所含的磷脂种类均为兔脑磷脂。所有 APTT 试剂的说明书均注明适用于相关仪器。CaCl₂ 来自于相应的 APTT 试剂厂家,浓度均为 0.025 mmol/L。

1.2 标本来源 冻干标准血浆、冻干乏Ⅲ因子血浆、冻干乏Ⅸ因子血浆、冻干乏Ⅺ因子血、冻干乏Ⅻ血浆均来自于 SIEMENS。整个研究过程中,均使用同一批号的冻干血浆。健康人血浆标本来自 20~48 岁的 30 例男性和 30 例女性捐献者(问卷调查排除饮食、药物、疾病等影响因素),平均年龄 28.6 岁。标本采用 0.109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝,2 000×g 离心 15 min 收获血浆,无溶血、脂血、黄疸。

1.3 方法 冻干标准血浆及乏因子血浆恢复至室温后,每支加入 1 mL 蒸馏水复融。标准血浆及单因子缺乏血浆的 FⅢ、FⅨ、FⅪ、FⅫ因子活性,采用 Siemens Dade Actin 试剂和相应 Siemens 乏因子血浆试剂在 CS-5100 仪器进行检测。APTT 因子敏感性评估参照 CLSI H47-A2 相关指南进行^[3]:用商品化的单因子缺乏血浆与标准血浆按比例配制出不同单因子活性的混合血浆,因子活性范围为<1%~100%,由此可以得到单因子活性为 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、<1%的 11 份标本。每份标本一式 3 份均用 4 种不同的 APTT 试剂,在相应的仪器上进行检测,测定结果取平均值,且每

管间差异(CV%)须小于 5%。60 例健康捐献者的标本分离的新鲜血浆分别用 4 种不同 APTT 试剂进行检测,所得 APTT 检测结果用于计算各 APTT 试剂的正常参考区间^[2]。APTT 试剂敏感性为达到正常参考区间上限的最大因子浓度。正常参考区间上限定义为 APTT 测定结果的均值加 2s^[2,6]。所有标本均在 4 h 内完成测定。

1.4 统计学处理 APTT 试剂测定不同因子水平的混合血浆,所得的 APTT 均值分别与相应的凝血单因子活性拟合非线性回归曲线,曲线与正常参考区间上限交叉点的百分活度(%)即相应因子的敏感性^[3]。所有数据的统计学处理采用 GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA)软件。

2 结 果

2.1 标准血浆与乏因子血浆内源性因子活性结果 标准血浆与乏因子血浆的 FⅢ、FⅨ、FⅪ、FⅫ因子活性,见表 1。标准血浆的因子活性均在正常参考范围内。乏因子血浆除去特定的因子活性<1%外,其余因子活性均在正常参考范围内,但低于标准血浆的因子活性。

表 1 冻干标准血浆及乏因子血浆的 FⅢ、FⅨ、FⅪ、FⅫ活性(%)				
试剂	FⅢ	FⅨ	FⅪ	FⅫ
标准血浆	101.1	101.9	92.3	103.9
注射血浆 FⅢ	<1.0	72.1	73.5	74.5
注射血浆 FⅨ	77.4	<1.0	73.4	75.1
注射血浆 FⅪ	82.7	68.1	<1.0	68.9
注射血浆 FⅫ	87.8	78.7	78.1	<1.0

2.2 4 种不同 APTT 试剂的内源性因子敏感性 4 种不同 APTT 试剂的正常参考范围上限:试剂 A 为 37.0 s;试剂 B 为 41.1 s;试剂 C 为 40.1 s;试剂 D 为 44.2 s。相应因子的敏感性为非线性回归曲线与正常参考区间上限交叉点的百分活度(%)。4 种 APTT 试剂的 FⅢ、FⅨ、FⅪ、FⅫ敏感性,见表 2。4 种 APTT 试剂 FⅢ敏感性范围为 25.6%(试剂 B)~54.0%(试剂 A);FⅨ敏感性范围为 16.5%(试剂 B)~37.3%(试剂 A);FⅪ敏感性范围为 19.1%(试剂 D)~56.5%(试剂 A);FⅫ敏感性范围为 18.6%(试剂 B)~36.4%(试剂 A)。试剂 A 对 FⅢ、FⅨ、FⅪ、FⅫ均表现为最高敏感性,且对 FⅢ、FⅪ表现为超敏感(>50%)。试剂 B 对 FⅢ、FⅨ、FⅫ均表现为最低敏感性,且对 FⅨ、FⅫ敏感性均低于 20%。试剂 D 对 FⅢ、FⅨ、FⅪ、FⅫ均表现为低敏感性(<30%),对 FⅨ敏感性低于 20%,但对 FⅢ、FⅨ、FⅫ的敏感性高于试剂Ⅱ。试剂 C 对 FⅢ、FⅨ、FⅪ表现为适中的敏感性(>30%~<50%),对 FⅫ表现为低敏感性(<

30%)。

表 2 4 种不同 APTT 试剂的内源性途径因子敏感性(%)

APTT 试剂分组	FⅧ敏感性	FⅨ敏感性	FⅪ敏感性	FⅫ敏感性
试剂 A	54.0	37.3	56.5	36.4
试剂 B	25.6	16.5	23.8	18.6
试剂 C	42.9	30.0	45.3	28.4
试剂 D	26.1	17.6	19.1	21.0

3 讨 论

本研究应用 CLSI H47-A2 指南实现了对 APTT 试剂因子敏感性的量化评估,研究表明 4 种不同的 APTT 试剂的内源性因子敏感性差异较大。因此,临床应用中应根据不同的目的选择相应的 APTT 试剂。CLSI H47-A2 指出:APTT 所在检测系统(试剂/仪器组合)在 FⅧ、FⅨ、FⅪ 低于 0.3 U/mL(30% 因子活性)时,应当表现为时间异常延长,理想状态下,试剂对因子的敏感性应该在 30%~45%^[3]。本研究中,试剂 A 与试剂 C 对 FⅧ、FⅨ、FⅪ 的敏感性均≥30%,符合 CLSI 指南要求。由于这两种试剂对 FⅧ、FⅨ有较高的敏感性,均可用于亚临床型血友病 A、B^[7]的筛查,但试剂 A 优于试剂 C。在我国,多数实验室的 FⅧ、FⅨ活性的检测是在标准曲线的基础上,根据 APTT 的检测结果换算得到血浆中凝血因子的活性值^[8]。如果应用对 FⅧ、FⅨ不敏感的 APTT 试剂,在检测 FⅧ、FⅨ轻度缺乏的标本时,不会出现 APTT 的延长,从而导致所获得的因子活性值在正常范围内,得到一个假阴性结果。因此,试剂 B 与试剂 D 并不适用于轻型或亚临床型血友病的筛查,但可作为中度或重度单因子缺乏的确证试剂应用于临床。

遗传性 FⅪ缺陷症在临床较为罕见。FⅪ水平高低与出血的严重程度不呈正比,无明显的自发性出血倾向^[9-10]。但在外伤或手术中,某些缺乏 FⅪ的患者,FⅪ的水平高于 30 IU/dL,也会有明显的出血,部分患者 FⅪ的水平即便达到 40 IU/dL,也会出现严重的出血及低凝血酶生成^[11]。由此可见,术前筛查需要 FⅪ敏感的 APTT 试剂,用于检出 FⅪ轻度缺乏的患者,预防术中的出血。笔者认为,用于术前筛查的 APTT 试剂,FⅪ敏感性应至少达到 40%(40 IU/dL),才能满足筛查试验的要求。本研究中试剂 A 与试剂 C 符合要求。

根据 CLSI 指南,试剂 A 与试剂 C 均可作为合格的术前筛查试剂应用于临床。但是,笔者认为适用于术前筛查的 APTT 试剂,不仅要考虑其对内源性因子 FⅧ、FⅨ、FⅪ的敏感性,也需要考虑 FⅫ的影响。FⅫ属于接触激活因子,是体外模拟内源性凝血途径的启动因子,在 APTT 试验中占有重要的地位。FⅫ活性

的减低不会引起明显的出血现象,有研究报道:遗传性 FⅫ缺陷的患者,FⅫ:c 为 2%,FⅫ:Ag<1%时也未见明显出血^[12]。所以,术前筛查应当选择对 FⅫ的敏感性尽可能低的 APTT 试剂,以避免 FⅫ轻度缺乏导致的 APTT 延长,误导临床医生给患者进行后续的确证试验,延误患者治疗。试剂 A 的 FⅫ敏感性是本研究中最高的,比试剂 C 高 8%。因此,作为术前筛查的试剂,试剂 A 并不合适。试剂 B 与试剂 D 虽然 FⅫ敏感性低(<25%),但对 FⅧ、FⅨ、FⅪ的敏感性也很低(<30%)。因此,这两种试剂也不适用于术前凝血项筛查。试剂 C 对 FⅧ、FⅨ、FⅪ、FⅫ的敏感性处于相对适中的范围,适用于术前筛查。

不同的 APTT 试剂对内源性凝血因子的敏感性不同,激活剂是其中很重要的影响因素。本研究中的 4 种 APTT 试剂,试剂 A 因子敏感性高于试剂 B,试剂 D 敏感性最低,与文献报道不一致^[10],此结果可能与试剂的其他组分浓度有关。磷脂的种类和浓度亦会影响 APTT 检测结果^[6],在本研究中,4 种试剂所用磷脂虽均为兔脑磷脂,但磷脂浓度未知,因此 APTT 试剂对因子的敏感性不同是否是由于不同磷脂浓度造成的,还需要进一步研究。

对 APTT 试剂可以用于普通肝素的监测、狼疮抗凝物质检测及内源性因子缺乏检测,本研究仅关注了其中的一个方面。目前,几乎所有厂家的 APTT 试剂说明书均未标注出 APTT 试剂的适用范围,以及对因子、肝素、狼疮抗凝物质的敏感性。如何在众多 APTT 试剂中选择合适的试剂,并将 APTT 检测的效用最大化,还需要检验工作者加强对试剂的了解,根据不同的临床需求选择相应的试剂,并对所选择的试剂进行评估。

参考文献

[1] 王学锋,胡晓波,程胜利,等. APTT 检测试剂敏感性的比较[J]. 中华血液学杂志,2001,22(3):159-160.

[2] TOULON P,ELOIT Y,SMAHI M,et al. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies[J]. Int J Lab Hematol,2016,38(4):389-396.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. One-stage prothrombin time(PT) test and activated partial thromboplastin time(APTT) test; approved guideline-second edition; H47-A2[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2010.

[4] 林敏,徐伟鹏,邓小燕. 活化部分凝血活酶时间标准化报告方式的可行性探讨[J]. 检验医学与临床,2015,12(12):1778-1779.

[5] 高艳新,朱玉洁,李慕芳,等. 两种不同试剂对 SD 大鼠血凝四项检测结果的比对[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(10):21-23.

(下转第 1124 页)

淋巴细胞及非淋巴细胞合成,来源较为广泛,且其分泌受到多种因素调节。IL-6 与 TNF 一样,是重要的炎症反应和免疫调节因子,参与机体对感染和组织损伤的应答反应,能够促进中性粒细胞在炎症部位的聚集,加强自然杀伤细胞(NK)的裂解能力,协同集落刺激因子(CSF)刺激骨髓源细胞生长分化,抑制细胞凋亡等。促炎性细胞因子在受到手术创伤刺激后会快速增加,而 IL-6 作为关键分子,大部分患者术后 IL-6 的血清水平均显著上升,且其能够反映患者创伤的严重程度。IL-10 是一种多功能的负性调节因子,与肿瘤细胞、炎症细胞、免疫细胞等的生物调节有关,其能够抑制 IL-6 的分泌,从而发挥抗炎作用,减轻炎症反应。文献报道,IL-6 和 IL-10 水平与机体炎症程度基本呈正相关,而本研究结果显示,术后两组患者的 IL-6 和 IL-10 水平均显著上升但观察组上升幅度明显小于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),可见与传统开腹手术相比,使用腹腔镜进行手术可使人体的应激炎症反应程度有效降低^[15]。

综上所述,采用腹腔镜治疗老年胆囊结石并发胆囊炎患者能够明显改善手术效果,减少并发症发生率,提高临床疗效,降低炎症反应程度,值得在临床上推广应用。

参考文献

- [1] CARLLINE T. Hepatic artery pseudoneurysm following laparoscopic cholecystectomy[J]. Am J Surg, 2010, 199(1):10-11.
- [2] 马瑞斌,徐彦辉,柯颖,等.腹腔镜胆囊切除术与小切口胆囊切除术治疗老年胆囊结石的疗效比较[J]. 中国现代医生, 2015, 53(4):36-38.
- [3] VAN ERPECUM K T. pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones;an update[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011, 35(4):281-287.
- [4] JAGANNATHAN V, ROBINSON-RECHAVI M. The challenge of modeling nuclear receptor regulatory networks in mammalian cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011,

334(1/2):91-97.

- [5] 张献毅,杨华,龙胜林,等.胆囊摘除术后患者白介素 6、白介素 10 以及 TNF- α 水平变化研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(8):89-91.
- [6] SALANI R, BRISTOW R E. Surgical management of epithelial ovarian cancer[J]. Clin Obstet Gynecol, 2012, 55(1):75-95.
- [7] 和寿杰.腹腔镜微创疗法与开腹手术治疗胆囊结石并胆囊炎的疗效对比分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2014, 24(6):134-136.
- [8] XUE P, NIU WQ, JIANG ZY, et al. A Meta-Analysis of apolipoprotein E gene epsilon 2/epsilon 3/epsilon 4 polymorphism for gallbladder stone disease[J]. PLoS One, 2012, 7(9):e45849.
- [9] KHIANGTE E, NEWME I, PATOWARY K, et al. Single-port laparoscopic cholecystectomy in sites inverses totalis using the E. K. glove port[J]. J Minim Access Surg, 2013, 9(4):180-182.
- [10] 陈至生,张铭.腹腔镜与小切口胆囊切除术治疗胆囊疾病的疗效比较[J]. 实用临床医学, 2013, 14(7):64-65.
- [11] 杨正府,陈健.小切口胆囊切除术与腹腔镜胆囊切除术治疗胆囊结石的临床效果比较[J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(13):3103-3104.
- [12] 刘晓,黄汉涛,刘家盛,等.胆囊切除术后患者 IL-6、IL-10 及 TNF- α 水平的变化及意义[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(22):4330-4332.
- [13] 孙尔维,李漓. TNF- α 作用的两面性[J]. 生理科学进展, 1997, 28(3):18.
- [14] 闫长红,许艳春.腹腔镜胆囊切除术对患者血清 IL-6、IL-10、TNF- α 水平的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(4):469-471.
- [15] KRICKER J A, TOWNE C L, FIRTH S M, et al. Structural and functional evidence for the interaction of insulin-like growth factors(IGFs) and IGF binding proteins with vitronectin[J]. Endocrinology, 2003, 144(7):2807-2815.

(收稿日期:2017-09-12 修回日期:2017-11-19)

(上接第 1120 页)

- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition: C28-A2 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2000.
- [7] 彭黎明,邓承祺.现代血栓与止血的实验室检测及其应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:139.
- [8] 成斐,王学锋,周文宾,等.凝血因子Ⅷ和Ⅸ实验室检测现状调查与分析[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(3):203-206.
- [9] 周娜,欧阳建,周荣富,等.两例遗传性凝血因子Ⅺ缺乏症患者的基因分析[J]. 血栓与止血学, 2016, 22(3):307-310.

- [10] 戴利亚,张德亭,谢海啸,等.一个遗传性凝血因子Ⅺ缺陷症家系的基因分析[J]. 温州医科大学学报, 2015, 45(5):376-380.
- [11] MARTINUZZO M, BARRERA L, RODRIGUEZ M, et al. Do PT and APTT sensitivities to factors' deficiencies calculated by the H47-A2 2008 CLSI guideline reflect the deficiencies found in plasmas from patients? [J]. Int J Lab Hematol, 2015, 37(6):853-860.
- [12] 戴利亚,张德亭,林杰,等.新的纯合子 Leu519Arg 导致的遗传性凝血因子Ⅺ缺陷症家系分析[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(7):466-469.

(收稿日期:2017-08-28 修回日期:2017-11-03)