

文章编号: 1001-764X(2012)07-481-04

出血性疾病的实验室检测与临床应用

王鸿利(上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025)

摘要: 一期止血缺陷用模板刀片法出血时间(TBT)作为筛查试验, 结合诊断试验, 用于诊断 ITP、VWD 和血小板无力症。二期止血缺陷用 APTT 和 PT 作为筛查试验, 结合诊断试验, 诊断凝血因子缺乏和抗凝物质增多。纤溶亢进用 ELT、FDPs 和 D-D 作为筛查试验, 结合诊断试验, 诊断 DIC 和原发性纤溶症。

关键词: 出血性疾病; 实验室; 检测

中图分类号: S941.41⁺¹ **文献标志码:** A

出血性疾病(简称出血病)是由于遗传性/获得性的原因, 导致患者止(凝)血功能降低、病理性抗凝物质增多或纤溶活性亢进所引起的一类疾病。这类疾病的诊断和鉴别诊断, 除根据病史和出血表现外, 必须依赖实验室检测。本文就出血病的实验室检测与临床应用作一简述。

1 一期止血缺陷的检测与应用

一期止血(血管-血小板型)缺陷所致的出血病, 多以皮肤/黏膜出血、女性月经过多和轻微外伤出血难止为主要表现, 它们的检测与应用如下。

1.1 实验检测

1.1.1 筛查试验 常用血小板计数(PLT)、模板刀片法出血时间(TBT)和血小板功能分析仪(PFA-100)闭孔时间(CT)(PFA-100CT)等检测, 见图 1。

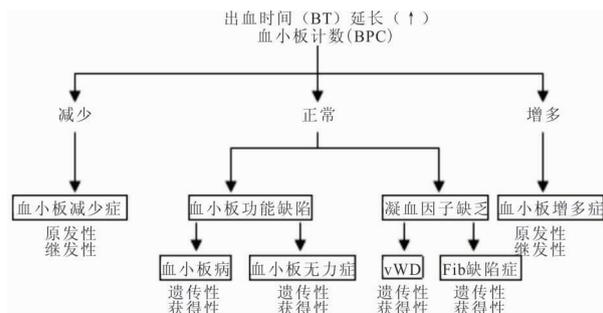


图 1 一期止血缺陷的筛查试验

1.1.2 诊断试验 (1) 血管壁缺陷: 可用血管性血友病(vWD)相关试验, 如血管性血友病因子(vWF)抗原(vWF: Ag)、vWF 瑞斯托霉素辅因子[vWF: Rco, 即 vWF 活性(vWF: A)]和凝血酶调节蛋白(TM)等检测; (2) 血小板缺陷: 血小板相关抗体检测: 如单克隆抗体特异俘获血小板抗原试验(MAIPA); 血小板功能检测: 如血小板聚集试验(PAgT)、血小板 P 选择素以及血小板膜 GP II b/III a、

GP I b/IX-V 复合物检测等。

1.2 临床应用

1.2.1 免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP) 以血小板计数(PLT) $< 100 \times 10^9/L$ 为诊断标准^[1]。分为原发性 ITP(是一种免疫性疾病, 但以不明原因的单纯血小板减少为特征)和继发性 ITP(除原发性 ITP 外, 其他所有形式由免疫介导的血小板减少为依据)。现以原发性 ITP 为例进行叙述。

实验检测包括(1)血小板相关抗体检测: ELISA 法测定血小板相关抗体(PAIGG)有较好的敏感性(80%), 但特异性差(50%)。目前逐渐被 MAIPA(GP II b/III a 敏感性 75%, 特异性 83%; GP I b 敏感性 66%, 特异性 94%)所取代。其有助于免疫性和非免疫性血小板减少的鉴别, 但不能鉴别原发性和获得性血小板减少; (2)骨髓象检查: 常用于中、老年且对激素治疗反应差的患者等; (3)血小板生成素(TPO)测定: 用于鉴别血小板生成减少(TPO 升高)和血小板破坏增多(TPO 正常); 鉴别 ITP 和不典型再障/低增生性骨髓增生异常综合征(MDS)等。

1.2.2 血小板无力症(thrombasthenia) 是一种 GP II b(α II b, CD41) 或 GP III a(β 3, CD61) 的数量/质量异常而引起的血小板对多种生理激活剂反应缺陷/明显减低所致的疾病^[2]。

实验检测包括(1)筛查试验: PLT 正常, TBT 延长, 血涂片上血小板散在不堆集, PFA-100CT 血小板功能分析仪闭孔时间明显延长; (2)诊断试验: 血小板对各种诱导剂(ADP、肾上腺素、凝血酶、胶原、花生四烯酸)无聚集/聚集低下, 而对瑞斯托霉素的凝集反应正常; 血块回缩不良或无回缩; 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; GP II b/III a 含量测定减少/缺如(变异型可正常); GP III a 受体(α V β 3) 试验,

GPⅢa缺陷时可降低,GPⅢb 缺陷时正常;血小板与纤维蛋白原的结合试验降低/缺如;血小板玻璃珠滞留试验减低;血小板α颗粒内纤维蛋白原含量减低。

1.2.3 血管性血友病(von Willebrand disease, vWD)

乃因血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)基因突变导致量的缺乏/质的异常所致^[3,4]。

(1) vWD 的实验检测 1) 筛查试验: 可选用 PFA-100CT 血小板功能分析仪闭孔时间; APTT; 瑞斯托霉素(1.1~1.5 mg/L)诱导的血小板聚集试验(RIPA)。国际标准化出血时间测定器(template-

bleedingtime, TBT)法,因准确性差目前已少用;2) 诊断试验: 世界卫生组织(WHO)推荐 vWF: Ag; vWF: Rco; FⅧ: C; vWF: Rco/vWF: Ag 比值(正常时该比值>0.5~0.7)4项试验^[4];3) 分型试验: vWF 多聚体分析: 多用 SDS-PAGE 法; 低剂量(<0.6 mg/L)瑞斯托霉素诱导的血小板聚集试验(LD-RIPA); vWF 血小板结合试验(vWF: PBA); vWF 胶原结合试验(vWF: CBA); vWF 因子Ⅷ结合试验(vWF: FⅧBA); vWF 基因测序, 尚未被常规应用。(2) vWD 的实验诊断见表 1。

表 1 vWD 的实验诊断^[4]

参数	1 型 vWF 量减少	2 型				3 型 vWF 量完全缺如	PLT 型假性 vWD *
		2A	2B	2M	2N		
遗传方式	AD	AD/AR	AD	AD/AR	AR	AR	AR
PLT	N	N	↓/N	N	N	N	↓
TBT	N/↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
APTT	N/↑	N/↑	N/↑	N/↑	↑	↑↑↑	N
PFA-100CT	N/↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
vWF: Ag	↓/↓↓	↓	↓	↓	↓/N	O	↓/N
vWF: Rco	↓/↓↓	↓↓/↓↓↓	↓↓	↓↓	N/↓	O	↓↓
FⅧ: C	N/↓	N/↓	N/↓	N/↓	↓↓	↓↓↓	N
vWF: Rco/vWF: Ag 比值	>0.5~0.7	<0.5~0.7	<0.5~0.7	<0.5~0.7	>0.5~0.7	O	>0.5~0.7
RIPA(1.1~1.5 mg/L)	多数↓30%N	↓↓	多数↓	↓	N	-	多数N
LD-RIPA(<0.6 mg/L)	-	-	↑↑↑	-	-	-	↑↑↑
vWF: 多聚体	N	异常, 缺中, 大分子	异常, 缺大分子	N	N	O	异常

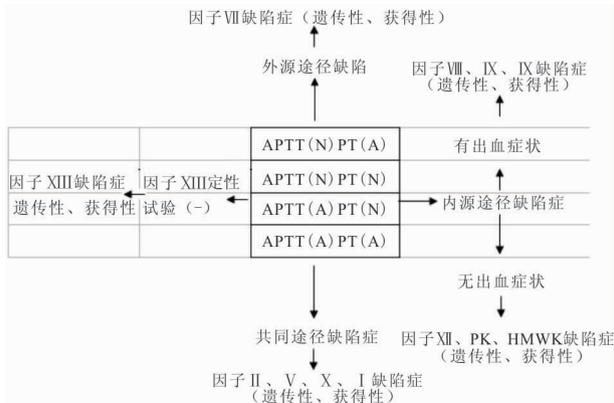
注: ↓、↓↓、↓↓↓、↓↓↓↓, 相对减低程度; ↑、↑↑、↑↑↑ 相对增高程度; N, 正常; O, 缺如; *, vWF 结构正常, 血小板 GPIb-α 基因突变伴大分子多聚体缺乏。

2 二期止血缺陷的检测与应用

二期止血(凝血因子减少或抗凝物质增多型)缺陷所致的出血病检测与应用如下。

2.1 实验检测

2.1.1 筛查试验 (1) 凝血因子缺陷: 常用 APTT 和 PT。见图 2。



注: N, 正常; A, 异常。

图 2 APTT 和 PT 筛查凝血因子缺陷

(2) 病理性抗凝物质增多的筛查试验 用于筛查肝素/类肝素、FⅧ/FⅨ抑制物和狼疮抗凝物等。见图 3。

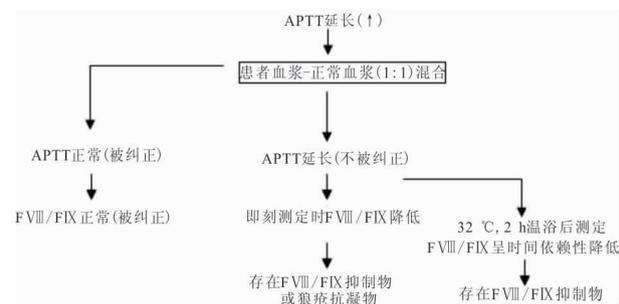


图 3 混合血浆 APTT 纠正试验筛查病理性抗凝物质

2.1.2 诊断试验 (1) 凝血因子促凝活性(F:C)及其抗原含量(F:Ag)测定: 内源凝血途径缺陷主要测定 FⅧ: C/FⅧ: Ag、FⅨ: C/FⅨ: Ag 和 FⅩ: C/FⅩ: Ag 等; 外源途径缺陷主要测定 FⅦ: C/FⅦ: Ag; 共同途径缺陷主要测定 FⅡ: C/FⅡ: Ag、FⅤ: C/FⅤ: Ag、FⅩ: C/FⅩ: Ag 和纤维蛋白原含量(Fib)/纤维蛋白原抗原(Fib: Ag)测定等。(2) 病理性抗凝物质检

测:主要检测 FVIII/FIX 和其他凝血因子抑制物、狼疮抗凝物和血浆肝素浓度等。

2.2 临床应用

2.2.1 血友病 主要见于血友病 A(凝血因子 VIII 缺陷症)和血友病 B(凝血因子 IX 缺陷症);其他凝血因

子缺陷症极少见。(1)临床诊断:符合二期止血缺陷的特点;(2)家系调查:血友病 A/B 呈伴性隐性遗传;(3)实验检测:需与血管性血友病(vWD)、获得性血友病 A 和获得性 vWD 作鉴别,见表 2。

表 2 血友病的诊断和鉴别诊断

参数	血友病 A/B	获得性血友病 A ^[5-6]	vWD	获得性 vWD
临床出血特点	关节、肌肉/内脏	皮肤/黏膜、内脏	皮肤/黏膜、月经过多	皮肤/黏膜、月经过多
遗传方式	伴性隐性	获得性	AD/AR	获得性
BT	N/N	N	↑/N	↑/N
PFA-100CT	N/N	N	↑	↑
APTT	↑/↑	↑↑	↑/N	↑/N
FVIII:C/FIX:C	↓/↓	↓	↓/N	↓/N
vWF: Ag	N/N	N	↓	↓
vWF: Rco	N/N	N	↓	↓
vWF: 多聚体	N/N	N	↓/N	↓/缺乏
FVIIIAb	↑/N	↑	N	N
vWF: Ab	N/N	N	N	↑(占 20%)

注:N,正常;↑,延长;↑↑,明显延长;↓,降低;AR,常染色体隐性遗传;AD,常染色体显性遗传;FVIIIAb,抗凝血因子 VIII 抗体;vWF:Ab,抗 vWF 抗体。

(4)基因诊断^[7] 1)血友病 A:先测 FVIII 内含子 22 倒位和内含子 1 倒位,可测出约 50% 的重型患者;遗传连锁分析,检测 FVIII 基因内、外 8 个 STR 位点,包括 *DXS15*、*DXS52*、*DXS9901*、*DXS1073*、*DXS1108*、*F8civs22*、*F8civs13* 及性别基因位点等;对上述检测尚不能诊断者可直接测序以明确诊断;2)血友病 B:遗传连锁分析,检测 FIX 基因外的 6 个 STR 位点,包括 *DXS8094*、*DXS1211*、*DXS1192*、*DXS102*、*DXS8013*、*DXS1227* 及性别基因位点;对上述检测尚不能诊断者可直接测序以明确诊断。

上述基因诊断多用于血友病 A/B 携带者和产前诊断。上海瑞金医院利用上述基因诊断对 163 例血友病 A/B 携带者和 92 例血友病 A/B 产前诊断,均获成功,未发现漏诊和误诊者。

2.2.2 病理性抗凝物质 常见于肝素/类肝素物质、因子 VIII 抑制物和狼疮抗凝物质等。(1)肝素/类肝素物质:用 TT 延长可被甲苯胺蓝/硫酸鱼精蛋白纠正(游离肝素测定)作为筛查试验,用抗活化因子 X(AF_Xa) 试验作为诊断试验。(2)因子 VIII 抑制物:用混合血浆纠正试验(图 3)作为筛查试验,用 FVIII:C 降低伴 Bethesda 法/Nijmegen 法测定抗体滴度增高作为诊断试验。(3)狼疮抗凝物质:用混合血浆纠正试验(图 3)作为筛查试验;用狼疮抗凝物质(LA)测定作为诊断试验。

3 纤溶活性亢进出血的检测与应用

纤溶活性亢进性出血多见于原发性和继发性纤

溶亢进症。

3.1 实验检测

3.1.1 筛查试验 (1)优球蛋白溶解时间(ELT):是检测整个纤溶活性的一种经典方法。若试验能在 2 h 内完成则特异性较好,敏感性较差。参考范围在 90~120 min。在 ELT < 90 min 示纤溶活性隐性增加, < 70 min 示纤溶活性亢进,ELT > 120 min 无临床意义;(2)纤维蛋白(原)降解产物(FDPs)和 D-二聚体(D-D)测定:理论上,FDPs 是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,D-D 是纤溶活性亢进降解纤维蛋白的降解产物;实际上,纤溶活性亢进可以同时降解纤维蛋白和纤维蛋白原。因此,在判断 FDPs 和 D-D 时,应结合临床出血、其他检测和动态判断才具价值。

3.1.2 诊断试验 (1)纤溶激活试验:常用组织型纤溶酶原激活物(t-PA)、纤溶酶-抗纤溶酶复合物(PAP)和纤溶酶原(PLG)等测定;(2)纤溶抑制试验:常用纤溶酶原激活抑制物-1(PAI-1)、α₂-抗纤溶酶(α₂-AP)和凝血酶激活的纤溶抑制物(TAPI)等测定。

3.2 临床应用

3.2.1 原发性纤溶亢进症(原发性纤溶症) 在某些致病因素作用下,纤溶激活物致使 PLG 明显降低,纤维蛋白原被降解引起明显的纤维蛋白原降低,出现皮肤大片状瘀斑、黏膜和内脏出血。见表 3。

3.2.2 继发性纤溶亢进症 多见于弥散性血管内凝血(DIC),在某些致病因素作用下,通过被激活的接触凝血系统转而激活纤溶系统,使 PLG 降低,纤

维蛋白(原)被降解, 出现出血症状。见表 3。

表 3 原发性和继发性纤溶的实验室检测结果与鉴别^[8]

参数	原发性纤溶症	继发性纤溶症
血小板计数	N	↓, 或进行性↓
PT/APTT	N	延长, 或进行性延长
纤维蛋白原	明显↓	↓, 或进行性↓
3P 试验	(-)	(+)
t-PA	↑	↑/N
PAI-1	↓, N/轻度↑	↑/N
PLG	明显↓	↓, 或进行性↓
α ₂ -AP	↓, N/轻度↑	↑/N
FDPs	明显↑	↑, 或进行性↑
D-D	N/轻度↑	↑, 或进行性↑
ELT	明显↓	↓/N
TEG	原发性纤溶形态	继发性纤溶形态
血涂片	不见破碎红细胞	破碎红细胞 > 10%

注: TEG, 血栓弹力图; N, 正常; ↑, 增高; ↓, 降低。

由于国际血栓止血委员会(ISTH)提出的显性(失代偿性)DIC 诊断标准(2001), FDPs 和 D-D 检测对 DIC 的诊断敏感性为 91%, 特异性为 97%, 故目前许多国家采用 ISTH 的 DIC 诊断标准, 见表 4。

表 4 ISTH(2001) 显性 DIC 实验诊断标准(记分法)

记分	PLT(× 10 ⁹ /L)	延长的 PT(s) 较对照值	Fib(g/L)	FDPs(μg/L)
0	>100	<3.0	>1.5	正常(<10)
1	<100	3.0~6.0	1.0~1.5	轻度↑(10~20)
2	<50	>6.0	<1.0	中度↑(20~40)
3	<50	>6.0	<1.0	显著↑(>40)

注: 积分 > 5 分诊断为 DIC。

4 参考文献

[1] 中华医学会血液学分会. 免疫性血小板减少症[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(9): 647-648.

[2] 李家增, 侯明, 包承鑫. 血小板疾病[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2009.

[3] National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute(NHLBI). the diagnosis, evaluation, and management of von Willebrand disease[M]. Bethesda(MD): U. S. Department of Health and Human Services NIH Publication No. 08-5832; 2007.

[4] 熊立凡, 姚依婷, 王鸿利. 解读血管性血友病的诊断指南[J]. 诊断学理论与实践杂志, 2012, 11(1): 31-35.

[5] Huth-Kuhne A, Baudo F, Collins P, et al. International recommendation on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia[J]. Haematologica, 2009, 94(4): 566-575.

[6] Franchini M, Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors[J]. Blood, 2008, 112(2): 250-255.

[7] 王鸿利. 血友病的基因诊断[J]. 内科理论与实践, 2008, 3(2): 79-81.

[8] 王鸿利, 张利伟, 丁秋兰, 等. 原发性纤溶症的诊断和鉴别诊断[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(1): 2-4.

[9] 张利伟, 王学锋, 王鸿利. 弥散性血管内凝血的诊断指南解读[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(4): 358-360.

(收稿日期: 2012-02-03)

(本文编辑: 许晓蒙, 陈维忠)