

WS/T 220—2002

前 言

凝血因子和凝血机制是血栓与止血发生和发展的重要组成部分。一般来说,内源性途径的凝血因子活性采用活化的部分凝血活酶时间(APTT)测定;外源性途径、共同途径的凝血因子活性采用凝血酶原时间(PT)测定。测得的凝固时间可以通过查对已知凝血因子活性的参考曲线而转化为凝血因子活性单位。

定量地分析内、外源凝血因子活性是一个重要的临床工具,因为因子分析可以从病人血样中获得以下有价值的信息:① 确证某个凝血因子缺乏;② 回答凝血筛选试验正常,但临床疑有出血性疾病的问题;③ 凝血因子治疗的监测;④ 早期动脉粥样硬化的风险评估。

影响 APTT、PT 测定的因素均要影响一步法凝血因子活性的测定。除此之外,参考曲线的制备、病人样本测得值的评估,都将导致实验结果的差异,使得室间标准化困难,本标准参考美国国家临床检验标准委员会(NCCLS)H48-A 文件所推荐的凝血因子活性测定标准,标准中推荐的技术就是为了减少这些错误的根源,改善实验室内部、实验室之间的精密性。

本标准从 2002 年 7 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准起草单位:四川省临床检验中心。

本标准主要起草人:杨明清、腾飞鹏。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

WS/T 220—2002

若受检血浆检测结果满足线性、平行和可读性,则可以查对参考曲线得到因子活性水平。

报告前,应乘以稀释倍数,以测定值的平均值报告。超出参考曲线值以外的结果亦可报告以大于或小于相应的可读值报告,但应与临床表现相符合。参考曲线的斜率和截距均可以通过直线回归分析计算出来,然后用来计算受检血浆的凝血因子活性。

12 误差来源

一步法凝血因子活性测定受到分析前、分析中、分析后的误差根源所影响,现列举如下:

12.1 标本或与标本有关的问题

- 12.1.1 标本采集超过或不到试管划线;
- 12.1.2 使用非规定的抗凝剂(如 EDTA 或草酸盐)、抗凝剂的浓度、用量不准确;
- 12.1.3 血样有凝块、溶血、黄疸、或脂血样品、混浊样品;
- 12.1.4 血样本混匀不当,剧烈混匀,产生气泡;
- 12.1.5 采血器或贮血管不洁,或受到污染;
- 12.1.6 使用非规定,不适当的收集管;
- 12.1.7 病人服用抗凝药物(肝素、华法令等);
- 12.1.8 配制试剂,未采用 I 级试剂级水或厂家规定的适当用水;
- 12.1.9 质控血浆的采集、处置与贮存未与试验血浆相同;
- 12.1.10 急性炎症反应、纤维蛋白原升高可使采用 PT 测定的凝血因子活性不准确(因 PT 缩短);
- 12.1.11 红细胞压积(PCV)超出 20%~55%可使血浆的抗凝水平不合适;

12.2 与试剂有关的问题

- 12.2.1 试剂已被污染;
- 12.2.2 复溶时,稀释液加量不准;
- 12.2.3 复溶时,使用非规定的稀释液;
- 12.2.4 在运输或贮存过程中,因处置不当(如血浆反复冻融)而导致试剂变质;
- 12.2.5 所用试剂超过了复溶后的稳定期,或超过了原试剂稳定期;
- 12.3 分析前误差:包括延迟检测或使用不标准的方法运送、处理及贮存测试标本。

12.4 分析误差

- 12.4.1 错误输入(定标时)参考血浆数值;
- 12.4.2 使用曲线的平台区解释结果;
- 12.4.3 描图错误;
- 12.4.4 不正确的孵育或活化时间;
- 12.4.5 仪器操作方法不正确;
- 12.4.6 仪器故障:如灯泡有问题、温度不准、试剂溅出、试剂加入不准(量少)及电子干扰;
- 12.4.7 不正确的稀释;
- 12.4.8 -70°C 冰冻血浆超过一年的贮存期、或者不适当的贮存;
- 12.4.9 乏因子基质血浆含有 >0.01 单位/mL(1%)的凝血活性,或含有凝血因子抑制物,或者一个或更多的凝血因子活性 $<50\%$ 。

12.5 分析后结果解释错误

- 12.5.1 未辨认出两条曲线缺乏平行;
- 12.5.2 未辨认出两条曲线缺乏线性;
- 12.5.3 采用推断的方法得到参考曲线范围之外的数据。

中华人民共和国卫生行业标准

凝血因子活性测定 总则

WS/T 220—2002

Determination of coagulant factor activities

—General guideline

1 范围

本标准规定了总的凝血因子活性测定的技术要求(除去纤维蛋白原),并不涵盖采用发色底物法检测血浆凝血因子的方法,以及通过抗原特性来定量分析凝血因子的水平。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

NCCLS H48-A 凝血因子活性测定总则

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 活化的部分凝血活酶时间测定 activated partial thromboplastin time test, APTT

内源性途径凝血因子活性筛选试验。在加入一定量的部分凝血活酶、活化剂、氯化钙后,测定血浆凝固,形成纤维蛋白所需要的秒数。

3.2 凝血酶原时间测定 prothrombin time test, PT

评估外源性凝血因子、共同途径凝血因子活性状况的筛选试验。在加入组织凝血活酶,最佳氯化钙浓度后,测定血浆凝固形成纤维蛋白所需的秒数。

3.3 参考曲线 reference curve

定量地反映凝血因子活性与纤维蛋白形成所需时间之间的相互关系的一条曲线,从这个线段中,分析过程所测得的时间可以转化为凝血因子活性单位。

3.4 参考血浆 reference plasma

已知凝血因子活性的柠檬酸钠抗凝的正常混合血浆,该血浆可以自备,亦可从厂商处购买,用于制备参考曲线。

3.5 乏因子血浆 factor-deficient plasma

血浆缺乏所要分析的凝血因子。

3.6 质控血浆 control plasma

使用一批柠檬酸钠抗凝的血浆来监测实验室内试验系统的稳定性。试验系统包含:试剂、仪器、稀释液、移液管或加样器。正常的质控血浆的测定值应落在参考范围之内,异常质控血浆由于其凝血因子含量低,其测得值应落在参考范围之外。

3.7 缓冲液 buffered saline

具缓冲作用的盐水(pH=7.4 ± 0.15 mol/L 氯化钠溶液),如咪唑或其他适合的试剂。

中华人民共和国卫生部 2002-04-20 批准

2002-07-01 实施

4 原理

凝血因子活性是通过其纠正乏因子血浆所致的凝固时间延长的能力而测得。对稀释的受检者血浆与乏因子血浆的混合物所测得的 APTT 或 PT 值与受检者血浆的凝血因子活性成负相关。稀释已知凝血因子活性的血浆与乏因子血浆的混合物被用来建立参考曲线,该曲线能将受检者血浆的 APTT、PT 值转化为活性单位。

5 设备

半自动或全自动血凝仪。

6 样本收集、运输及贮存

6.1 样本收集

血样应由经专门培训的医技人员抽取。抽血时,患者应处于平静和空腹状态,剧烈运动可使因子Ⅷ活性增加,APTT 明显缩短,其作用可持续 30 min,而脂血可使因子Ⅷ活化,同时干扰以光学法为原理的凝血仪的检测结果,此时可改用手工或电子机械式凝血仪测定。

建议使用塑料双注射器技术或真空采血系统,采集血样推荐用 21G1.5 或 20G1.5 针头,一针见血,减少组织损伤,用高质量带塞塑料管或硅化玻璃管收集血样。使用 109 mmol/L 柠檬酸钠(血与抗凝剂之比为 9:1)作为凝血因子检测的抗凝剂,红细胞比积过大(>55%)或过小(<20%)可影响测定结果,推荐用式(1)得出柠檬酸钠用量:

$$V = 0.00185 \times V_1 \times (1.00 - a) \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中: V ——柠檬酸钠用量;

V_1 ——血量, mL;

a ——红细胞压积。

用采血器以最少的停滞期抽出静脉血、注入试管,立即混合 10 次,不能产生泡沫,或溶血,尽快以 2 000~2 500×g 离心 30 min,以便获得乏血小板血浆。

6.2 样本的运输

标本可以放在冰水或干冰中运送、低温可使Ⅴ、Ⅷ因子稳定,但可激活Ⅶ因子。故应根据检测目的选择运送方式。

6.3 样本的贮存

血浆标本原则上应立即检测、室温放置应在 2 h 内检测,2℃~4℃ 4 h 内检测。若在这个时间内不能检测,则应将血浆贮存在-20℃可保存 2 周,-70℃可保存 6 个月。实验前于 37℃快速解冻,轻轻颠倒混匀备用。

7 试剂和材料

7.1 APTT 试剂: APTT 试剂为部分凝血活酶及接触因子激活剂的混合物,激活剂可以是白陶土、硅胶、鞣花酸或其他适当物质,当凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ低于 0.3 u/mL(30%因子活性)时,APTT 试剂/仪器结合测定应能测出异常的延长结果。检测凝血因子缺乏时,建议使用鞣花酸为激活剂的 APTT 试剂盒。磷脂来源、浓度、缓冲液的种类及添加剂的有无均影响 APTT 测定,所以,更换 APTT 试剂盒时,应做相关性分析。

7.2 凝血活酶:凝血活酶试剂除稳定性、重复性等要求应符合规格外,其敏感度亦是非常重要的指标,即不仅在正常人血浆测定保持在一定正常范围内(如 11 s~13 s),而对抗凝治疗来讲,重要的一点对抗凝药所致的凝血缺陷有足够的敏感性。国际标准化指数(ISI)≈1,ISI 值越大,则其敏感性越低。因凝血活酶来源有人、兔、牛、猴等脑或其他组织,其敏感度相差很多,所以对每批凝血活酶制品,均应定出 ISI,

WS/T 220—2002

以便使所得结果有可比性。

7.3 乏因子血浆:在乏因子血浆中,单独某个凝血因子活性应低于 0.01 单位/mL(1%);但其他凝血因子活性应高于 0.5 单位/mL(50%);纤维蛋白原含量应高于 1.0 g/L,乏因子血浆若从严重遗传性因子缺乏病人中获取,其血浆中不能含有凝血因子的抑制物及狼疮抗凝物。同时,必须贮存在 -70°C 冰箱或冻干保存。

7.4 参考血浆:参考血浆应是至少 20 个以上健康男女各半的混合血浆,年龄 18~55 岁,未服用任何药物(女性须非妊娠,非月经期),凝血因子活性应保持在 $(1 \pm 0.2)\text{u/mL}$,同时应采用世界卫生组织(WHO)的原级或次级标准进行校正。

氯化钙溶液浓度:25 mmol/L。

8 测定方法

8.1 内源性途径的凝血因子活性测定:因子Ⅷ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ、PK、HMW 活性测定用 APTT 测定。

APTT 测定条件

APTT 操作温度:试验应在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 进行操作。

试验进行前血浆标本的预温时间不得长于 10 min,按照厂家叙述的该厂专门的 APTT 试剂制备及处置的方法进行操作。

接触激活时间:指血浆和 APTT 试剂一起孵育的时间,严格标准化接触激活时间,是非常重要的。因接触激活时间是根据所用的仪器特别是试剂而不同的,必须按照厂家的说明严格执行。在手工方法使用秒表或同样准确的计时装置。

APTT 试验步骤:APTT 是二期试验。第一期将一份 APTT 试剂及一份柠檬酸钠血浆混合,同时开动一计时装置,准确计时,在推荐的激活时间终点开始第二期:即加入预温的氯化钙,同时开动另一计时器,记下形成凝块所需的时间。

APTT 终点:纤维凝块形成即为 APTT 终点,终点可用手工法、半自动或全自动法以多种光学或机电方法进行测定,APTT 通常进行双份测定,并以其均值报告测定结果。由于半自动及全自动方法测定精密度的改善,如能达到质量标准的要求,亦可测定一份直接报告。

8.2 外源性途径的凝血因子测定:因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ采用 PT 测定。测得的凝固时间可以通过查对已知凝血因子活性的参考曲线或代入回归方程,得其凝血因子活性。

PT 测定条件

测定温度 $36.5^{\circ}\text{C} \sim 38.5^{\circ}\text{C}$,上述各试剂及被测血浆,均应预温至此一温度。但凝血活酶试剂预温不可超过 30 min;测定血浆预温一般不宜超过 10 min。

所用试管及加样器等接触血浆的器具均应为塑料制品或硅化玻璃管。

吸取柠檬酸钠患者抗凝血浆一份,乏因子血浆一份,加入一小试管中,加入凝血活酶试剂一份,混匀后置 37°C 水浴中。再加入氯化钙溶液一份(也可先将凝血活酶试剂与氯化钙溶液等量混合后加入 0.2 mL)。立即混匀并开动秒表。试管仍浸于水浴中,至约 10 s 时,自水浴中取出,迅速在纱布上擦去试管外水滴,在明亮处不断倾斜试管(至 90°),在流动状态下观察有无纤维蛋白形成。一旦见到纤维蛋白(同时将出现液体流动减慢),立即停表,记录时间。每次测定二管,求平均数。

本试验的最后混合液的 pH 应为 7.2~7.3;大部分商品凝血活酶试剂均用含缓冲剂的溶液配制。

每批均应同时做正常和异常对照,方法应与测定标本完全相同。

8.3 凝血因子的自动化测定

凝血因子分析可以采用全自动凝血仪,仪器采用统计程序制备参考与受检血浆曲线、计算受检血浆凝血因子浓度和分析曲线线性的可接受性。一些程序可以通过修正曲线,测定落在参考曲线线性限制以外的受检稀释血浆。这些程序应该得到有关部门的批准。制造商应确保试验系统的准确与精密性达到可接受的程度,同时,他们的程序能测出许多抑制物的存在。

9 参考范围

对于每一个凝血因子,实验室应当根据所用仪器、试剂、采血方法及所用抗凝剂测定本室的参考范围。试剂批号、仪器、标本采集方式变换时应重新建立正常参考值。参考值应以相同的单位打印在每一个报告单上,每年应重新测定参考值。

10 质量控制

10.1 质控材料:正常和异常质控血浆。

10.2 质控频率:每一批试验前均应分析正常质控血浆和异常质控血浆,记录结果并统计出均值与标准差,并做质控图。如工作量大,每做40份标本均应做质控。正常血浆质控结果应落在控制线内,否则应检查试剂,质控血浆及仪器。所有的解决步骤均应做好记录。

10.3 可接受的不精密密度:因为受检血浆及参考血浆的多步稀释,以及因子测定涉及多个酶反应,导致结果差异较大。所以,正常质控血浆的变异系数(CV)可以在5%~10%之间。

10.4 全面的质控程序:实验室应当制定可行的质控方案,满足质控管理机构的要求,富有经验的工作人员应检查和分析质控结果,评价趋势,漂移以及失控结果,定期检查质控材料,了解分析系统的长期变化。

若使用多个分析系统测定凝血因子,则以建立一种质控机制,以确保系统在测定病人标本时得到可接受的类似的结果。这些研究应该每半年进行一次。

每个实验室应将可接受的试验方案递交相关的检查和资格认定机构登记注册。

11 制备因子分析曲线步骤

凝血因子测定的基本方法是APTT或PT,其标本是稀释的受检者血浆与乏因子血浆的混合物。手工操作应制备两种参考曲线:扩展参考曲线及工作参考曲线。扩展参考曲线是为实验室的特殊分析系统建立线性范围,应该在建立凝血因子分析程序之前制备,当试剂批号、参考血浆及仪器改变时应重建。而工作参考曲线应该在每一批试验的同时,做具有稀释点少,各点落在扩展曲线线性区的特点,受检血浆凝固时间通过查工作参考曲线而获得活性单位,同时,工作参考曲线亦对检测系统是否正常提供参考。

11.1 扩展参考曲线的制备

参考血浆应至少用缓冲液稀释7次,稀释后的血浆应放置在冰水中,或放于0℃~4℃条件下,以免因子失活。采用对倍的稀释方法,其最低稀释倍数是1:2.5或1:5,为了最大限度地减少系统误差(因吸管引起),所有的稀释均应单独稀释,根据所要分析的凝血因子特性,选择APTT或PT测定稀释完毕的试验血浆。试验血浆是由0.1 mL稀释后的参考血浆与0.1 mL乏因子血浆所组成,其总体积为0.2 mL根据测定结果与对应的稀释度在双对数坐标纸上作图,图应形成“S”型曲线,两端扁平,中间呈线性。(见图1、图2)。

11.2 工作参考曲线的制备

至少做三个以上稀释度在扩展参考曲线直线段上的点,参考血浆应该使用与扩展参考曲线相同的批号。X轴标注凝血因子活性单位,Y轴标注凝固时间,其最低稀释倍数作为1单位/mL(100%)(见图3)。(亦可以标注已定值的参考血浆数值)

11.3 受检血浆曲线的制备

受检血浆曲线的制备与工作参考曲线制备相同,多点稀释受检血浆的目的是为了评估受检血浆与工作参考曲线的平行程度。受检血浆稀释应根据检测的凝血因子而定,例如:检测血浆前激肽释放酶应做1:80的稀释或者更高,目的是为了得到一个可接受的斜率的曲线。其他凝血因子的稀释一般按1:10~1:40稀释。受检血浆测得值的描点与工作参考曲线同。

注:当凝血因子自动化测定时,仪器采用统计程序制备参考与受检血浆曲线、计算受检血浆凝血因子浓度和分析曲线线性的可接受性。

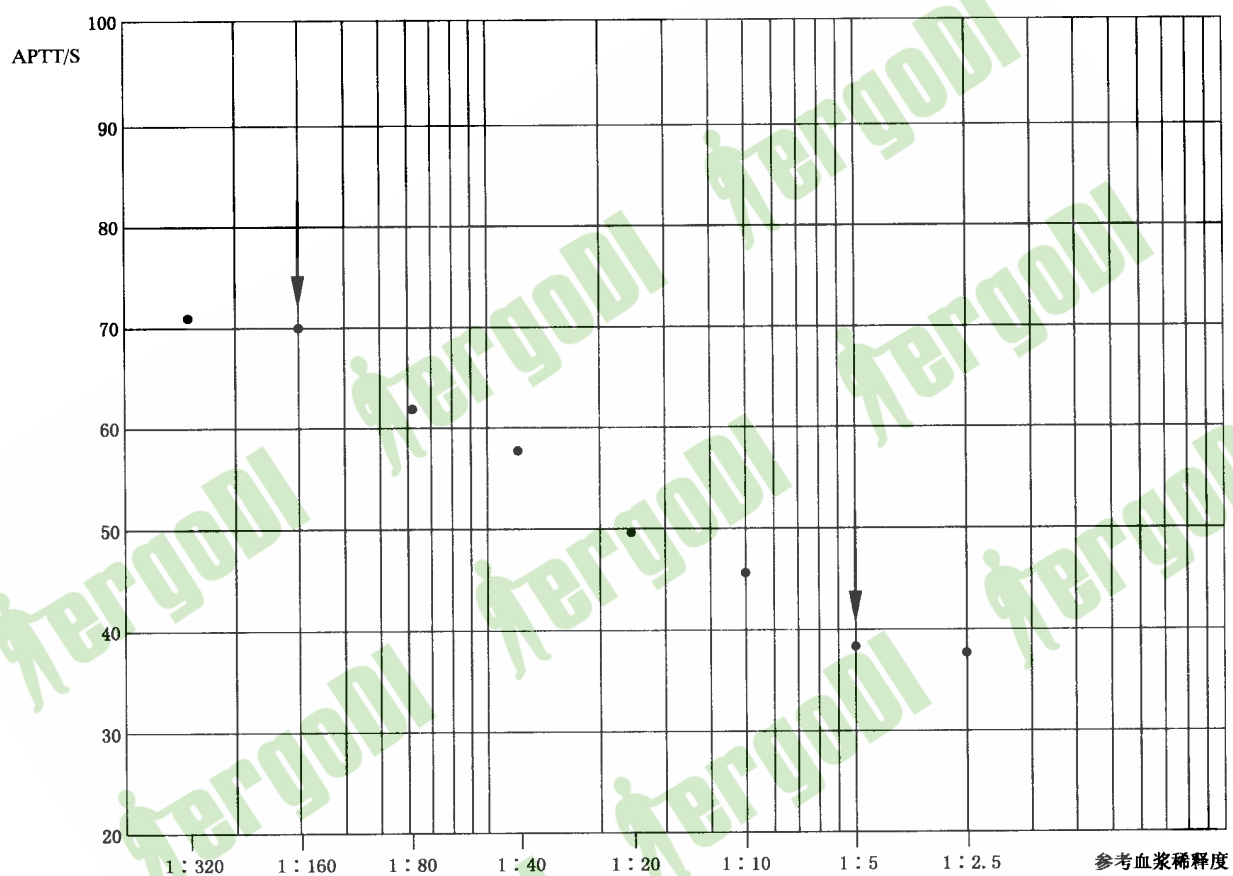


图 1 凝血因子分析扩展参考曲线
(对数-线性关系)

注：箭头所指限定线性区间。

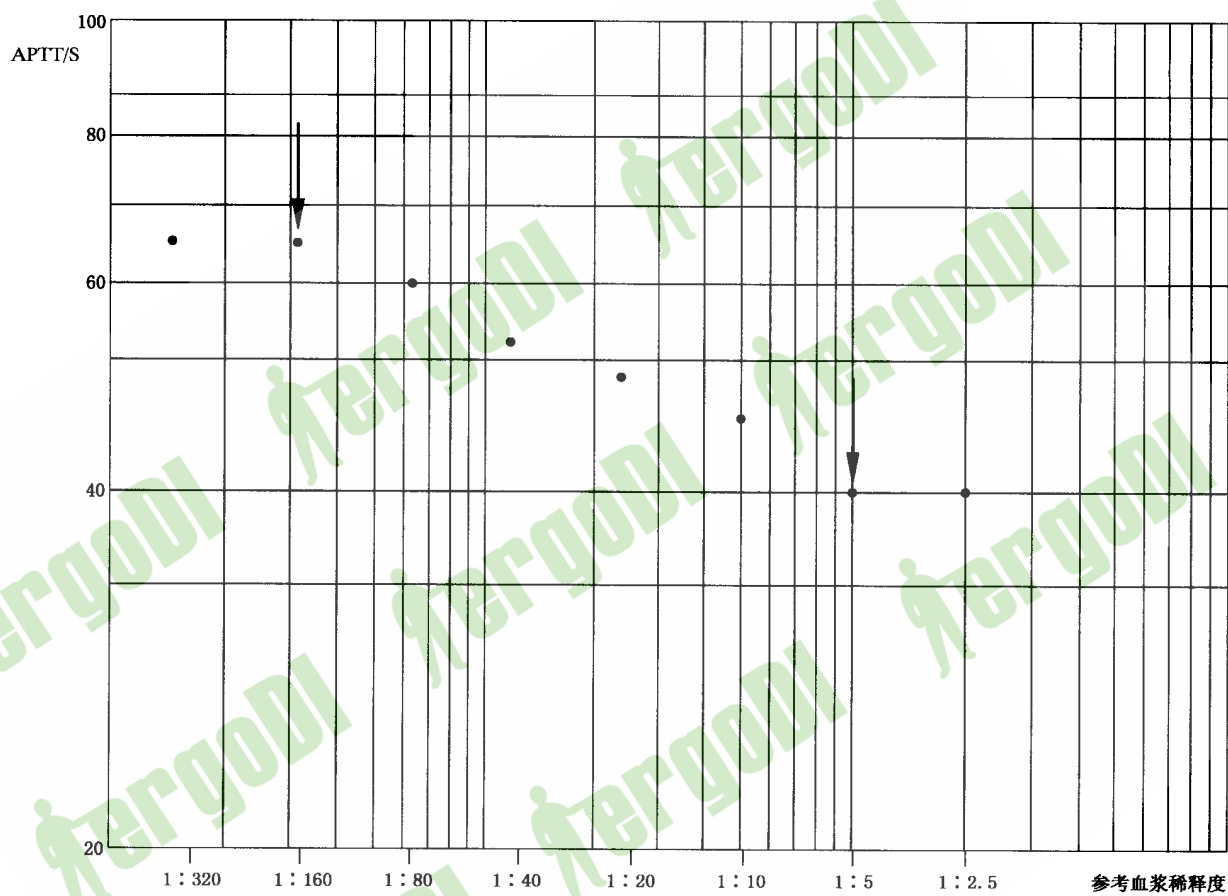


图 2 凝血因子分析扩展参考曲线
双对数关系

注：箭头所指限定线性区间。

WS/T 220—2002

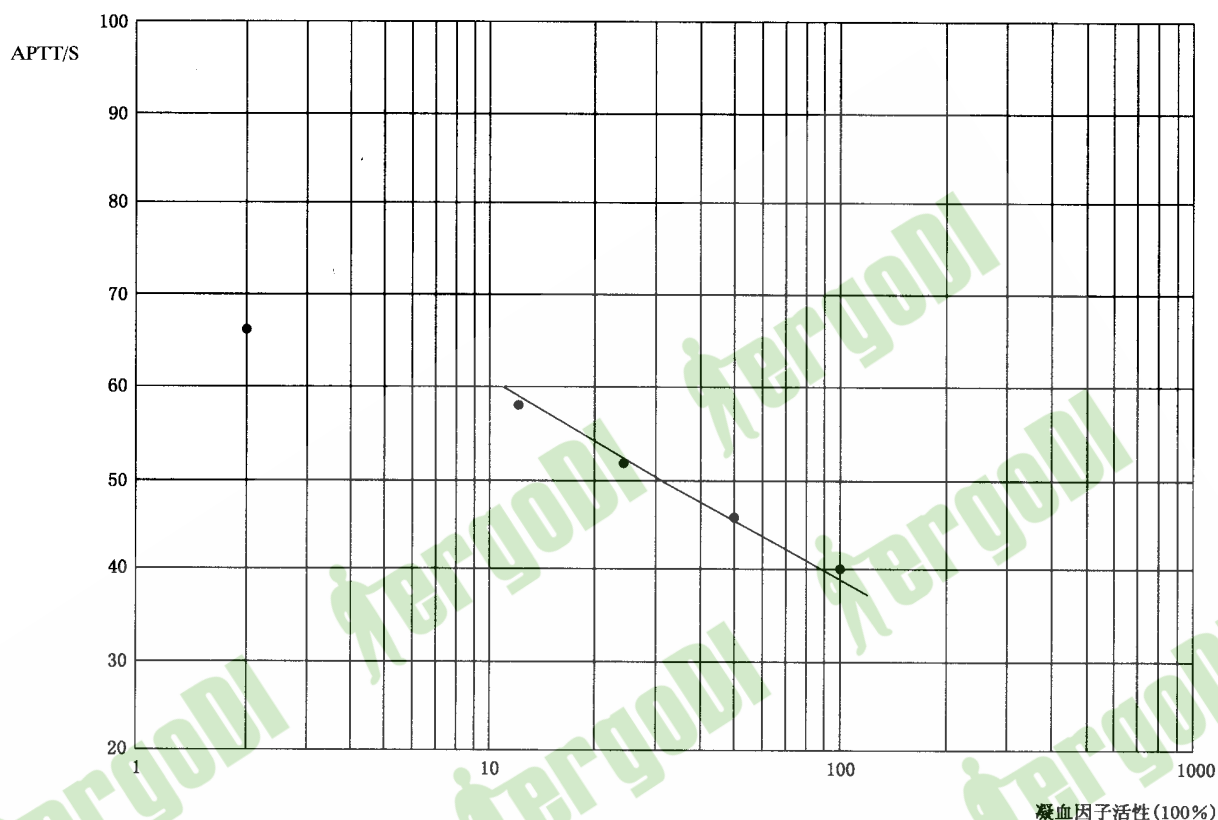


图3 凝血因子分析工作参考曲线
(对数-线性关系)

11.4 结果分析

工作参考曲线与病人血浆曲线应该检查整个曲线的形状,平行状况以及线性,整个曲线至少有三个点落在已经确立的线性范围。

工作参考曲线应有良好的线性,曲线的斜率应该足够敏感,即是说:连续对倍稀释后作 APTT 测定时,管间凝固时间平均差别应该至少有 3 s,PT 至少有 2.5 s。工作参考曲线的两个端点应能包括受检血浆的凝固时间,以便能通过查对参考曲线而获得实验结果。在需要的时候,可以进一步稀释参考血浆或病人血浆,使曲线得以延伸,使其在可读范围内得出实验结果。

落在工作参考曲线内的多个试验结果应当形成一条与工作参考曲线平行的直线。至少一个试验结果应当落在工作参考曲线以内,它与邻近的点(即使在可读范围之外),所形成的直线应当平行于参考曲线。

若以上的情况不存在,应该考虑以下可能性:

a) 若两个或更多的两个邻近的点形成一条平行于参考曲线的直线,但没有实验结果落在可读范围之内,进一步稀释参考血浆或受检血浆则可能产生可读结果(见图 4)。

b) 若仅一个试验结果落在可读范围,同时与邻近点形成的直线不平行于参考曲线,则应稀释受检血浆,以便获得可读结果。

c) 若受检血浆与参考血浆各自的曲线不呈平行,而一个以上的结果落在已知的线性范围内;那么应当怀疑血中有抑制物存在(见图 5)。在报告结果时,以最高稀释度报告,同时应说明由于血中疑有抑制物,结果可能不可靠。

WS/T 220—2002

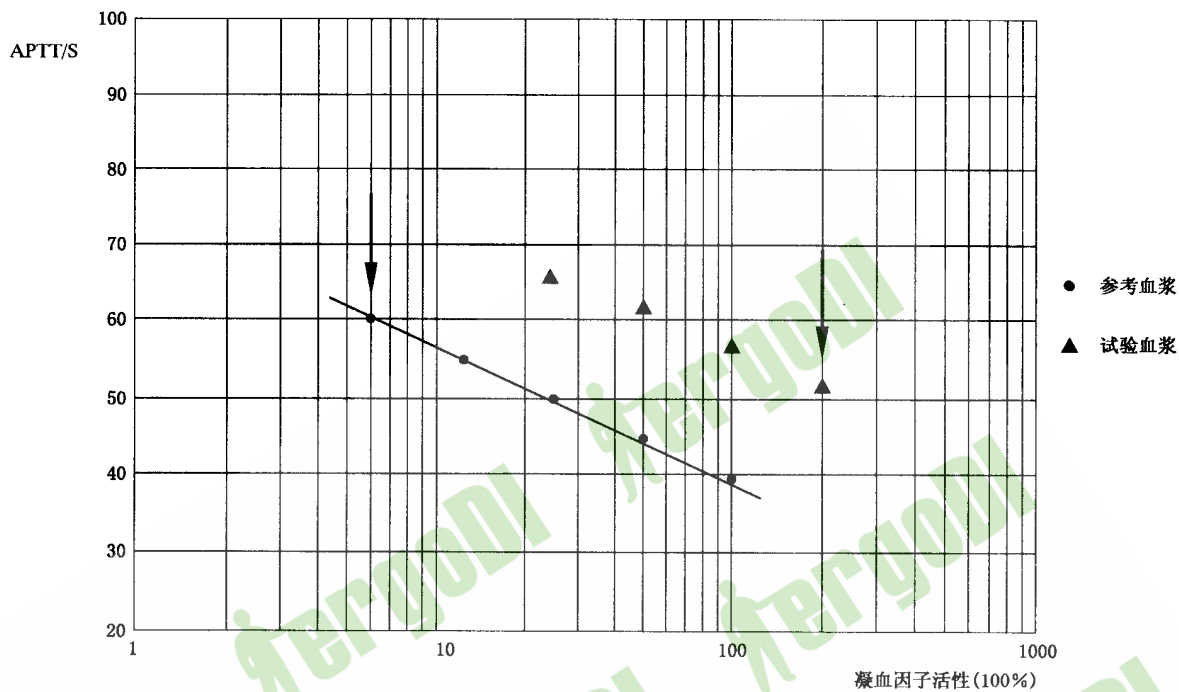


图 4 凝血因子分析举例

注：试验血浆各点平行于参考曲线，但超出可读范围。稀释参考血浆或试验血浆使测定值落在可读范围。

d) 若所有的实验结果均落在线性范围之外，同时出现类似的试验结果(不考虑稀释所造成影响)，这个现象提示所有的试验结果均位于“S”曲线的平台区，这是典型的严重凝血因子缺乏状态(见图 5)。在这种情况下，进一步稀释参考血浆到(0.01~0.02)单位/mL(1%~2%)，再进行测定。若这个病人血浆更延长，则病人结果可以低于这个凝血因子活性报告。

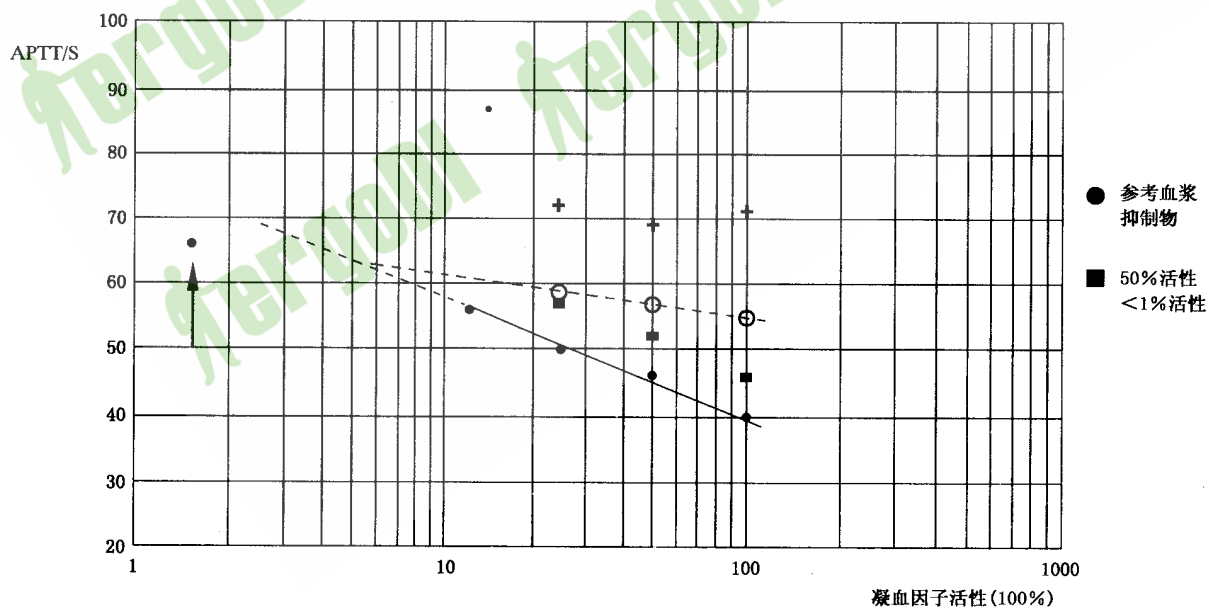


图 5 凝血因子分析举例

(对数-线性关系)

注：箭头所指的点表示进一步的稀释，用来评价超出实验线性的测定值。超出该点的所有测定值表示<1.5%活性。