· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.004

血浆热灭活处理在 Nijmegen 法检测遗传性凝血因子Ⅷ抑制物中的应用*

李 刚, 刘 怡, 吴润晖, 陈振萍[△]

(儿童血液病与肿瘤分子分型北京市重点实验室/教育部儿科重大疾病研究重点实验室/首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心 100045)

摘要:目的 评价血浆样本热灭活处理在 Nijmegen 法检测遗传性凝血因子Ⅷ(FⅧ)抑制物中的应用价值。**方法** 同时应用 Nijmegen 法及增加热灭活步骤的 Nijmegen 法检测 52 例中、重型血友病 A(HA) 患儿血浆中 FⅧ抑制物滴度。以抑制物滴度 ≥ 0.60 BU 判为阳性结果,对两种方法检测结果的阳性率及抑制物滴度水平进行分析。**结果** 两种方法的抑制物阳性率检测差异无统计学意义($P>0.05$),但有 2 例中间型 HA 患儿的血浆用原方法检测为阴性但热灭活处理后检测为阳性。两种方法检测的抑制物滴度水平呈显著的正相关($r=0.9908, P<0.0001$)。在两种方法检测均为抑制物阴性的患儿中,血浆热灭活处理组的抑制物滴度 $[0.37(0.17, 0.48)$ BU]明显高于无热灭活处理组 $[0.12(0.02, 0.34)$ BU],差异有统计学意义($P<0.01$);而在抑制物阳性组,两种方法的检测结果差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 待测血浆样本热灭活处理在 Nijmegen 法检测 FⅧ抑制物检测中的结果可信,且检测前增加血浆热灭活处理步骤可提高检测的灵敏度。

关键词:血友病; 遗传性凝血因子Ⅷ; 抑制物; Nijmegen 法

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)16-2374-03

Analysis of heat-treatment in detection of blood coagulation factor Ⅷ by Nijmegen-Bethesda assay*LI Gang, LIU Yi, WU Runhui, CHEN Zhenping[△]

(Beijing Key Laboratory of Pediatric Hematology Oncology/Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education/Hematology Oncology Center,

Beijing Childrens Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100045, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of heat-treatment of plasma samples in blood coagulation factor Ⅷ (FⅧ) inhibitory by Nijmegen-Bethesda assay. **Methods** Totally 52 samples simultaneous detected by Nijmegen-Bethesda assay and Nijmegen-Bethesda assay with heat inactivation steps. Blood coagulation FⅧ inhibitor ≥ 0.60 BU in children with severe hemophilia A (HA) were positive. The positive rate and inhibitor titer level of the two methods was analyzed. **Results** The positive rates of inhibitors between the two methods was no statistically significant difference ($P>0.05$). However, in two intermediate HA patients, the non-heated samples were negative but positive in heated samples. There was a significant correlation between the two methods ($r=0.9908, P<0.0001$). In children with both methods tested inhibitor negative, the inhibitor titer of the plasma heat inactivation treatment group $[0.37(0.17, 0.48)$ BU] was significantly higher than that of the heat-free inactivation treatment group $[0.12(0.02, 0.34)$ BU]. The difference was statistically significant ($P<0.01$). While in the inhibitor positive group, the difference between the two methods was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** The heat inactivation of the plasma samples to be tested is credible in the detection of FⅧ inhibitors by the Nijmegen-Bethesda method. Increasing the plasma heat inactivation treatment step prior to detection increases the sensitivity of the assay.

Key words: hemophilia; blood coagulation factor Ⅷ; inhibitor; Nijmegen-Bethesda assay

血友病 A(HA)是由于遗传性凝血因子Ⅷ(FⅧ)基因缺陷所致遗传性出血性疾病。中、重型患者主要表现为自发关节出血,且大多在儿童期起病,治疗仍以输注血源性或基因重组 FⅧ制剂为主^[1]。获得性 FⅧ抑制物是目前最严重的并发症,其导致替代治疗无

效、增加治疗难度及费用、甚至增加出血风险^[2]。既往报道 HA 患儿 FⅧ抑制物的发生率为 3.9%~30.0%,FⅧ抑制物监测是 HA 患儿临床替代治疗评估的关键^[3-4]。因此,有必要选择一种兼具灵敏度和特异度高的方法来检测 FⅧ抑制物滴度,以指导临床

* 基金项目:北京市自然科学基金课题(7162059);百特公司资助研究者发起的临床试验(CHN-BS-IIS-2014-024)。

作者简介:李刚,男,副主任技师,主要从事儿童出血实验室诊断方面的研究。△ 通信作者,E-mail:chenzhenping@outlook.com。

早期识别和筛查,避免无效输注,为及早调整治疗方案赢得时机。目前 Nijmegen-Bethesda 法是检测 FⅧ抑制物滴度的金标准,国内开展 FⅧ抑制物定量检测的实验室也多采用改良的 Nijmegen 法,但此方法依然有一定的局限性,如变异系数高及残留内源性或外源性 FⅧ的干扰,尤其是血浆中残余 FⅧ较多时,对抑制物滴度的计算存在一定影响。本研究通过对 Nijmegen 法增加待测血浆热灭活处理过程,分析其对抑制物阳性或阴性患儿血浆的影响,以期进一步提高 FⅧ抑制物检测方法的特异度和灵敏度。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 3 月至 2017 年 7 月于本院血友病门诊接受诊治的重型或中间型 HA 患儿 52 例。依据世界血友病联盟推荐的 HA 严重程度分型标准进行分型^[5]。同时选择 50 例凝血功能正常患儿的血浆作为质控。

1.2 仪器与试剂 所有检测在 ACL TOP500 全自动凝血仪上进行,基于测定活化部分凝血活酶时间(APTT)的一期凝固法检测 FⅧ的活性(FⅧ:C)。乏 FⅧ血浆、定标血浆、正常水平质控血浆及特殊水平质控血浆等试剂均购自美国 IL 公司。

1.3 方法 抽取所有患儿静脉血 2.0 mL,3.2%枸橼酸钠抗凝,2 500 r/min 离心 15 min,分离待测血浆,分装后保存于-80℃冰箱备用。血样处理在 1 h 内完成。所有患儿均接受过外源性 FⅧ输注治疗,且超过 72 h 洗脱期后进行检测。

1.3.1 正常混合血浆制备 50 例凝血功能正常的患儿血浆经同上述方法采集标本混匀后加入固体咪唑,浓度达到 0.1 mol/L,在 4℃条件下,缓慢滴入浓度 0.1 mol/L 的盐酸溶液至 pH 值为 7.4,分装后保存于-80℃冰箱备用。

1.3.2 FⅧ抑制物滴度检测 同一样本分装两等份,分别采用 Nijmegen 法^[6-7]及增加血浆热灭活预处理的 Nijmegen 法平行检测。

1.3.3 血浆热灭活预处理步骤 将患儿血浆在 56℃水浴加热 30 min 后离心取上清液后再行 Nijmegen 法检测 FⅧ抑制物。

1.3.4 抑制物滴度 即受检血浆灭活正常血浆中 FⅧ的能力,以 Bethesda 单位(BU)来计算。1 BU:37℃孵育 2 h 后,中和外源性添加一个单位 FⅧ的 50%的抑制物量。抑制物滴度>5 BU 为高滴度抑制物;≤5 BU 为低滴度抑制物^[8];抑制物滴度<0.6 BU 为阴性;≥0.6 BU 为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件进行统计分析。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验;非正态分布的计量资料采用中位数和四分位数间距 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用秩和检验;对抑制物滴度水平的比较采用配对 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 入组 52 例 HA 患儿,中位月龄为 34(3,150)个月;重型 39 例(75.0%,FⅧ:C<1%)、中间型 13 例(25.0%,FⅧ:C 为 1%~5%)。52 例患儿由原 Nijmegen 法检测无抑制物病史 24 例(46.1%);有抑制物病史 28 例(53.9%)。所有 HA 患儿均采用两种方法进行 FⅧ抑制物滴度检测。

2.2 两种方法检测抑制物的阳性率比较 对两种方法检测抑制物滴度的结果显示,无热灭活处理组中抑制物阴性 24 例,抑制物阳性 28 例,阳性率为 42.3%。热灭活预处理组中抑制物阴性者 22 例,抑制物阳性者 30 例,阳性率为 57.6%。热灭活处理组的阳性率略高于无热处理组,但两种检测方法阳性率差异无统计学意义($P=0.205$)。其中 2 例样本在无热灭活处理组中抑制物滴度均小于 0.6 BU,而进行血浆热灭活处理后抑制物滴度为 0.6、0.7 BU。此样本的血浆 FⅧ:C 为 4.1%、4.5%。

2.3 两种方法检测抑制物滴度水平比较 两种方法检测结果一致的 22 例阴性样本及 28 例抑制物阳性样本滴度值进行比较分析发现,在抑制物阴性组中,血浆热灭活处理组抑制物滴度 $[0.37(0.17, 0.48)$ BU]明显高于无热灭活处理组 $[0.12(0.02, 0.34)$ BU],差异有统计学意义($P<0.01$);在抑制物阳性组中,热灭活处理组抑制物滴度为 24.1(1.69, 95.3) BU,无热灭活处理组为 24.8(1.77, 105.29) BU,二者差异无统计学意义($P>0.05$),且两种方法检测的抑制物滴度水平之间呈明显正相关($r=0.990 8, P<0.000 1$)。

3 讨论

FⅧ抑制物属于 IgG 型抗体,作为一种免疫球蛋白,可抑制 FⅧ:C,其在体外及体内,均具有时间、温度、pH 值依赖性^[9]。部分 FⅧ抑制物可不表现抑制活性,而是通过与 FⅧ抗原的结合形成免疫复合物,免疫复合物的清除缩短了 FⅧ:C 半衰期,从而影响疗效。Bethesda 法是 FⅧ抑制物的定量检测方法,其缺点是当抑制物水平较低时,这种方法对 FⅧ抑制物检测缺乏特异性。Nijmegen 方法在 Bethesda 法基础上进行了改进,对于检测低滴度抗体特异性较好,已成为国际上推荐检测抑制物的标准方法^[6]。但如果血浆中残余的 FⅧ:C 较高时,会影响抑制物检测结果的准确性,且随着小剂量预防治疗的普及,抑制物阳性患者接受免疫耐受治疗同时需监测 FⅧ抑制物的滴度变化观察疗效,能够定量检测抑制物的大型医疗单位逐渐增多,如何准确快速检测抑制物滴度是检验医生需解决的问题。因个体间外源性凝血因子代谢差异,替代治疗后洗脱时间不充分、乏 FⅧ血浆中仍存在少量的 FⅧ等原因均可导致检测结果不准确。世界血友病联盟推荐使用 58℃下将待测血浆热灭活 90 min 来消除血浆中残余的 FⅧ。王健琨等^[10]通过改良 Ni-

jmegen 方法,对待测血浆进行 58 °C 水浴 90 min 预处理,其 FⅧ抑制物检出较原 Nijmegen 方法特异性更高。

针对凝血因子在 56 °C 条件可完全失活而耐热免疫球蛋白即抑制物仍能保持其生物活性这一特点,本研究对 Nijmegen 法增加 56 °C 热灭活 30 min 的预处理步骤,结果提示增加热灭活处理的检测结果可信。抑制物阴性样本增加热灭活过程后滴度水平明显增高,且其中 2 例应用 Nijmegen 方法检测为阴性的样本采用热灭活处理后其结果为阳性,其原因在于热灭活环境下 FⅧ与其他凝血因子同时被灭活,导致检测体系中参与凝集反应蛋白水平降低,基于一期凝固法的 APTT 相应延长,提高了抑制物滴度检测的灵敏度和特异度。DE LIMA MONTALVAO 等^[11]的研究结果也提示 56 °C 下血浆灭活 30 min 可以提高血浆中含有残余 FⅧ抑制物检测的灵敏度。比较两种方法检测抑制物滴度,结果显示,差异无统计学意义($P > 0.05$),主要是由于待测血浆中与 FⅧ相抵抗的免疫球蛋白起主导作用,血浆中残余的凝血因子可以忽略,且灭活前后耐热蛋白并无消耗,在反应体系中仍发挥生物学效应,滴度水平无显著差异。同时证明,Nijmegen 方法增加血浆热灭活预处理步骤对试验结果无影响,不会出现假阴性结果,并且此方法较之前的 58 °C 热灭活 90 min 时间上明显缩短。基于以上结果,建议对于 HA 患儿的血浆样本可通过血浆纠正试验对抑制物滴度进行初步预测,纠正试验提示抑制物阳性且满足 3 d 洗脱期的样本不必灭活凝血因子可直接检测^[12];抑制物阴性及取血前输注凝血因子的样本需增加热灭活过程,提高抑制物检测的灵敏度和特异度,避免假阴性。

随着血友病预防治疗开展,替代凝血因子产品使用量的增加,抑制物检测的重要性得到了临床医生的广泛认可。值得注意的是,Nijmegen 方法检测抑制物滴度建议待测血浆中 FⅧ的水平要低于 5%,如超过 5%则需要通过人为补偿待测混合样本中 FⅧ等方式予以纠正。轻型 HA 患儿自身含有一定量 FⅧ,中、重型 HA 患儿输注因子后未达到洗脱期时间内仍残存 FⅧ。本研究增加凝血因子蛋白灭活过程可避免自身凝血因子干扰抑制物检测。国内不同实验室间的检测结果仍存在较大的差异,其中部分原因可能是由于残余的 FⅧ对试验结果的影响,增加 56 °C 血浆灭活凝血因子过程操作步骤简便,有望成为 Nijmegen

法抑制物检测前期常规开展的必要步骤。

参考文献

- [1] SRIVASTAVA A, BREWER A K, MAUSER-BUNSCHOTEN E P, et al. Guidelines for the management of hemophilia[J]. Haemophilia, 2013, 19(1): e1-e47.
- [2] WALSH C E, JIMENEZ-YUSTE V, AUERSWALD G, et al. The burden of inhibitors in haemophilia patients[J]. Thromb Haemost, 2016, 116(Suppl 1): S10-S17.
- [3] SPENA S, GARAGIOLA I, CANNAVO A, et al. Prediction of Factor VIII inhibitor development in the SIPPET cohort by mutational analysis and Factor VIII antigen measurement[J]. J Thromb Haemost, 2018, 16(4): 778-790.
- [4] 魏琪琪, 李刚, 唐凌, 等. 儿童血友病 A 抑制物产生相关因素横断面分析[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(2): 99-102.
- [5] 胡政斌, 孙新, 何丽雅. 遗传因素与血友病 A 凝血因子抑制物产生的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(3): 957-960.
- [6] DUNCAN E, COLLECUTT M, STREET A. Nijmegen-Bethesda assay to measure factor VIII inhibitors[J]. Methods Mol Biol, 2013, 992: 321-333.
- [7] 李刚, 陈振萍, 甄英姿, 等. 血友病 A 患儿血浆纠正试验与凝血因子 VIII 抑制物相关性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(7): 480-483.
- [8] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组, 中国血友病协作组. 血友病诊断与治疗中国专家共识(2017 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(5): 364-370.
- [9] DIAZ I, BOLLORE K, TUAILLON E, et al. Circulating F VIII-specific IgG, IgA and IgM memory B cells from haemophilia a patients[J]. Haemophilia, 2016, 22(5): 799-805.
- [10] 王健琨, 王华芳, 杨锐, 等. 改良 Nijmegen 法检测血友病因子 VIII 抑制物的探讨[J]. 血栓与止血学, 2010, 16(6): 269-271.
- [11] DE LIMA MONTALVAO S A, TUCUNDUVA A C, DE ALMEIDA SAMBO A L, et al. Heat treatment of samples improve the performance of the Nijmegen-Bethesda assay in hemophilia a patients undergoing immune tolerance induction[J]. Thromb Res, 2015, 136(6): 1280-1284.
- [12] 李刚, 陈振萍, 唐凌, 等. 血浆纠正试验差值在血友病 A 患儿抑制物中的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(23): 3451-3452.

(收稿日期:2017-12-18 修回日期:2018-02-12)