

临床检验选编

(内部资料 仅供参考)

上海第二医学院附属瑞金医院检验科

1976年3月

临 床 检 验 选 编

(内部资料 仅供参考)

上海第二医学院附属瑞金医院检验科

1976年

前 言

为了以实际行动永远高举和坚决捍卫毛主席的伟大旗帜，在英明领袖华主席抓纲治国的战略决策指引下，我们在党委领导下，充分调动群众，将文化大革命以来新开展的和经过改进的临床检验项目选编成册，供医务人员参考。

由于我们学习马列和毛主席著作不够，实际经验不足，难免存在着不少缺点和错误。我们诚恳地希望同志们提出批评、指正。

本册在编印过程中，曾请上海第二医学院正常人体学教研组、我院儿科实验室和中国人民解放军 171 医院及江西新华印刷厂的大力协助，对此表示感谢！

上海第二医学院附属瑞金医院检验科

一九七七年六月

目 录

血液细胞学方面

一、出血性疾病的检验方法	(1)
(一) 血小板粘附试验	(1)
(二) 血小板凝聚试验	(2)
(三) 血小板第3因子有效性试验	(3)
(四) 凝血酶元时间测定	(4)
(五) 白陶土部分凝血活酶时间测定(KPTT)	(6)
(六) 凝血活酶生成试验(T.G.T.)	(7)
(七) 凝血酶时间测定	(11)
(八) 纤维蛋白元定量	(12)
(九) 优球蛋白溶解试验	(13)
(十) 血浆鱼精蛋白副凝固试验(3P试验)和乙醇胶试验	(14)
(十一) 纤维蛋白降解产物对流免疫电泳测定	(15)
(十二) 血浆素元测定	(17)
二、组织化学染色法	(21)
(一) 白细胞硷性磷酸酶染色法	(21)
(二) 白细胞酸性磷酸酶染色法	(22)
(三) 非特异性酯酶染色法	(22)
(四) 细胞内外铁染色法	(24)
(五) 苏丹黑脂类染色法	(25)
(六) 硝基四氮唑蓝试验(NBT试验)	(25)
(七) 性染色质染色法	(26)
(八) 关于中性粒细胞鼓槌体诊断性别的标准	(27)
(九) 血液细胞荧光染色法	(27)
三、溶血性贫血方面的试验	(29)
(一) 酸溶血试验	(29)
(二) 糖溶血试验	(30)
(三) 热溶血试验	(31)
(四) 冷热双相溶血试验	(31)
(五) 红细胞渗透脆性及37℃孵育24小时脆性试验	(32)
(六) 红细胞自溶试验及纠正试验	(35)

细菌血清学方面

一、细菌的鉴定	(37)
(一) 肠杆菌种的分类和鉴定	(37)
(二) 不发酵糖类的革兰氏阴性杆菌鉴定法	(41)
(三) 结核杆菌荧光检查法	(43)
(四) 常见霉菌的培养与鉴定	(46)
(五) 霉菌对药物敏感性试验	(52)
(六) 中草药培养基	(54)
二、血清学试验及肿瘤诊断试验	(56)
(一) 乙型肝炎表面抗原测定 (HBsAg)	(56)
(二) P-DAB 试验	(62)
(三) 四环素延缓排泄抑菌试验	(63)

生化方面

一、酶类测定	(65)
(一) 乳酸脱氢酶同工酶醋酸纤维电泳法	(65)
(二) 血清肌酸磷酸激酶测定 (CPK)	(68)
(三) 血清亮氨酸氨基肽酶测定 (LAP)	(71)
(四) 血清脂肪酶测定	(74)
(五) 红细胞 NADH 黄递酶缺乏的快速鉴定法	(75)
(六) 红细胞葡萄糖 6 磷酸脱氢酶测定 (G·6·PD)	(77)
二、脂类测定	(79)
(一) 血清甘油三酯测定 (Tg)	(79)
(二) 血清胆固醇邻苯二甲醛直接显色法	(81)
(三) 血清脂蛋白琼脂糖电泳法	(82)
(四) 血清酯蛋白醋酸纤维电泳法	(84)
三、酸碱平衡: 血液整套分析测定	(86)
(一) 血液实际 pH 值测定	(86)
(二) 血液二氧化碳分压测定 (PCO ₂)	(88)
(三) 标准碳酸氢盐 (S. B)	(88)
(四) 缓冲硷 (B. B)	(89)
(五) 硷过多或硷不足 (BE 或 BD)	(90)
四、氨基酸及其代谢产物	(95)
(一) 尿中氨基酸氮简易滴定法	(95)
(二) 苯酮尿症简易诊断法三种	(96)
(三) 尿黑酸试验三种	(98)
(四) 尿中黑色素定性试验四种	(99)

(五) 尿中胱氨酸和高胱氨酸定性试验三种	(100)
(六) 血氨测定	(103)
五、血红蛋白方面	(105)
(一) 血红蛋白溶液的制备	(105)
(二) 胎儿血红蛋白抗硷性试验	(106)
(三) 血红蛋白稳定性试验	(108)
(四) 血红蛋白电泳	(109)
(五) Hb—A ₂ 定量	(111)
(六) 血清结合珠蛋白定量	(111)
(七) 尿中肌红蛋白分光光度鉴定法	(113)
六、其他生化简易快速试验法	(115)
(一) 血浆葡萄糖微量直接比色法	(115)
(二) 血浆尿素氮微量直接比色法	(116)
(三) 血浆肌酐微量直接比色法	(117)
(四) 血清钙微量直接比色法	(118)
(五) 血清无机磷微量比色法	(119)
(六) 尿中利眠宁定性试验	(120)
(七) 米糖吸收和排泄试验	(121)
(八) 血清蛋白利凡诺沉淀试验	(123)
(九) 血清蛋白醋酸纤维电泳法	(124)
(十) 酸性粘多糖定性试验	(126)

免 疫 学 方 面

一、体液免疫试验	(129)
(一) 血清抗核(DNA)因子测定间接血凝试验法	(129)
(二) 血清抗核(DNA)因子对流免疫电泳法	(132)
(三) 类风湿因子乳胶因定试验	(133)
(四) 免疫球蛋白 G (IgG) 的提纯	(134)
(五) 抗 IgG 抗血清的制备	(136)
(六) IgG 单向免疫扩散定量法	(137)
二、细胞免疫试验	(139)
(一) 淋巴细胞转化试验 (LCT)	(139)
(二) T 玫瑰花试验 (RFC)	(143)

血液细胞学方面

一、出血性疾病的检验方法

(一) 血小板粘附试验

(或血小板滞留试验)

原 理:

完整的小血小板有粘附于非生理性接触面如玻璃、酵母、硫酸钡微粒等的物理作用。血管壁破裂后暴露的结缔组织似对血小板有特异的亲和性。这个试验具有直接测定血小板功能的特异性。血小板粘附性低的患者临床上就易于出血,相反血小板粘附性增加的患者常并发血栓形成。但是应该着重指出当血液通过玻璃柱过滤时某些血小板的损失不仅由于粘附,而且也由于血小板释放ADP而引起的血小板凝聚作用所致。使得血小板的粘附与凝聚无法截然分开,因而提议把血小板粘附试验改名为血小板滞留试验为妥。

材 料:

- 1、玻珠:无油脂,其直径为0.3—0.5毫米(大0.5毫米或小于0.3毫米均弃之),用蒸馏水洗干净后,在60度下烘干(温度太高,玻珠要变形)。
- 2、玻珠量:1.5克/每支。
- 3、塑料管:内径3毫米,长度9.4厘米,装玻珠后玻珠柱长度7.8—8厘米。分四等分。
- 4、塑料接头:内径2毫米,长2.8厘米,一端用纯尼龙布(孔0.05毫米大小)加胶水封口。
- 5、7号针头、小试管、滴管、均要涂硅。
- 6、1毫升针筒。

装配:将玻珠1.5克置于一根内径3毫米,长9.4厘米的塑料管内,两端用贴好尼龙布封口的塑料接头塞住,每一个玻珠柱只用一次。

操 作:

用止血带缚在臂上,将针头刺入肘前静脉内。当血液接触玻珠柱端时,立即开动马表,掌握血液通过玻珠柱的速度,玻珠柱分四等分,血液通过每一段的速度为5秒,共20秒。血液通过整个玻珠柱后,再继续用同样速度抽血6—7秒,然后拔出针头。分别在玻珠柱前及后的塑料接管处吸血10立方毫米作血小板计数。

计算:粘附率的公式:

$$\text{血小板粘附率}\% = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A = 粘附前的血小板数, B = 粘附后的血小板数

附 注:

1、要严格掌握血液通过玻珠柱的速度，速度对本试验影响极大，如太快，粘附率降低；如太慢，粘附率升高。

2、采血时选择病人静脉很重要，不能选太粗的静脉，弹性太足的静脉，否则血流太快，速度无法控制，或者象这样的静脉可不搏止血带。相反，静脉太细也不行，血流速度太慢，也影响实验结果。

3、为了减少技术误差，粘附前后血小板均要计数两次取平均值。

4、除玻珠对血小板有粘附作用外，其它用具如针头、试管、滴管等要涂硅，要尽量避免对血小板有粘附作用。

5、装配时，尼龙布涂胶水不能太多，否则把尼龙布孔塞住，则血液通不过。

6、塑料接头用后，可用鸡毛拭涤，鸡毛较柔软，不会磨损塑料接头表面。血迹冲洗干净，再用蒸馏水洗净后，在60℃烘干。

7、抗凝血液去除了钙离子后，用本法测得血小板粘附率为0%，而注射肝素抗凝剂（每公斤体重3毫克）后则无影响。

8、病人血清呈乳白色时，血小板粘附率相对增加。

临床意义：

血小板滞留试验正常值：

75例正常人的平均值：62.65%

标准差： $\pm 8.61\%$

正常值范围：45.3—79.8%

1、血小板粘附率增加：见于心肌梗死发作后48小时内、静脉血栓、大动脉阻塞、糖尿病、高 β 脂蛋白血症、动脉粥样硬化、多发性硬化症、高血压病等。

2、血小板粘附率减低：见于血小板衰弱症、血管性假血友病、尿毒症、血小板病、骨髓纤维化、多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症，以及许多流血时间单独延长的疾病。有时在先天性纤维蛋白缺乏症或遗传性毛细血管扩张症中也可见减低。

（二）血小板凝聚试验

原理：

凝聚是指血小板互相粘着的能力。在损伤的血管部份，先发生血小板粘附，后发生血小板凝聚。大致上主要是由于损伤的组织及红细胞释放出ADP或由于胶原、凝血酶或肾上腺素使血小板本身释放内源性ADP而产生血小板凝聚作用。本试验是在富于血小板的枸橼酸盐血浆中加入二磷酸腺苷（ADP）后观察血小板是否很快凝聚。

材料：

1、M/15磷酸盐缓冲液（PH7.2）：由下面二液混合而成。

M/15磷酸氢二钠（9.47克/升）72毫升

M/15磷酸二氢钾（9.08克/升）28毫升

2、ADP储存液：ADP（二磷酸腺苷）钠盐分子量493，称取ADP 25毫克加M/15磷酸盐缓冲液（PH7.2）5毫升，相等于5毫克/毫升，保存在-20度低温冰箱内，可用3—6个月。

3、ADP应用液：

用M/15磷酸盐缓冲液将ADP储存液（5毫克/毫升）稀释成不同浓度，配成第一管

1.000微克/毫升，第二管200微克/毫升，第三管40微克/毫升，第四管8微克/毫升，第五管1.6微克/毫升，第六管0.32微克/毫升，第七管0.064微克/毫升，第八管0.0128微克/毫升。

血小板悬液的制备：

用硅化注射器取患者血液3.6毫升放入含有3.8%枸橼酸钠0.4毫升的硅化试管内，混合，立即离心，800转/分钟，10分钟取上混悬液，即为血小板悬液。

操作：（试管肉眼观察法）：

1、取血小板悬液0.2毫升，放入硅化试管内，37℃预热30秒钟，再加ADP（1,000微克/毫升）0.1毫升。开动秒表，倾斜试管观察混合液中有否血小板的粒状凝聚现象形成。以不同浓度的ADP溶液与患者的血小板悬液，同样操作，观察到不凝聚一管为止。

2、放在日光灯或天然光线下，直接肉眼观察，记录血小板凝聚最早出现的时间。当肉眼观察不清时，把混合液滴在硅化玻片上用高倍镜进行观察，看有无凝聚现象。同时滴血小板悬液（未加ADP溶液）在玻片另一端作为对照。

附注：

1、采血要顺利，由于采血不迅速，及离心速度未掌握好，制成的血小板悬液本身呈少量凝聚。一般血小板悬液的浓度在20万—30万/mm³左右。

2、正常人的血小板悬液加入ADP（1000微克/ml）后，在15秒内就出现肉眼可见的粗大凝聚，整个过程需要10—60秒。与血小板悬液中血小板数多少有关，越多凝聚越快越明显。正常人一般在ADP浓度0.32—0.064微克/毫升，也就是在第6管或第7管开始不凝聚。

临床意义：

1、血小板凝聚试验升高：见于手术后，静脉滴注葡萄糖后，糖尿病，静脉栓塞，高β脂蛋白血症，多发性硬化症。

2、血小板凝聚降低或不凝聚：血小板衰弱症，血管性假血友病，某些获得性血小板病如尿毒症的出血倾向等。血小板衰弱症中任何浓度的ADP或其他的凝聚因子都不导致血小板凝聚。

（三）血小板第3因子有效性试验

原理：

血小板第3因子是内在凝血系统的重要成份，血小板功能有缺陷时凝血发生异常。本试验是利用正常人和病人的血小板以及正常人和病人的血浆相互配合，以白陶土作为活化剂，再测定复钙凝固时间，比较各组的差异而得知血小板第3因子是否有缺陷。

材料：

- 1、抗凝剂：3.8%枸橼酸钠溶液
- 2、4%白陶土生理盐水悬液
- 3、0.035M氯化钙溶液：无水氯化钙3.9克加蒸馏水至1,000毫升。
- 4、2%硅油：硅油2毫升加石油醚至100毫升。
- 5、涂硅试管、滴管、注射器。

操作：

1、涂硅：试管及滴管用清洁液浸泡后，冲洗干净，烘干，用2%硅油加入需要涂硅试管内静置3—5分钟后，倒去，放烘箱烘干250℃ 2—4小时，可反复使用5—6次。

2、 血小板悬液制备:

用涂硅注射器静脉取血3.6毫升,注入3.8%枸橼酸钠溶液0.4毫升的涂硅试管内(血液与抗凝剂比例为9:1),混合后立即以800转/分离心10分钟,取上层混悬液,即是血小板多血浆(在室温保存),余血再用3000转/分离心10分钟,作为血小板少血浆。正常人与病人都一样做。

3、分别计数血小板多、少血浆的血小板数(病人的及正常人的),分别用本人的血小板少的血浆来稀释校正血小板多的血浆使达到血小板大致相等的浓度。校正后再重复计数血小板数,一般要求血小板多者校正到20—25万/mm³左右,血小板少者1—2万/mm³左右。

4 以下表方式将血浆作相互混合试验:

组 别	病 人 血 浆		正 常 人 血 浆		结 果
	血小板多	血小板少	血小板多	血小板少	
(一)	0.1毫升			0.1毫升	秒
(二)		0.1毫升	0.1毫升		秒
(三)	0.1毫升	0.1毫升			秒
(四)			0.1毫升	0.1毫升	秒

以上各组混和后,各管加入4%白陶土悬液0.2毫升,放37℃水浴内,20分钟(其间振摇数次)后加0.035M氯化钙溶液0.2毫升,立即开动马表,记录出现纤维丝即为凝固时间。

附 注:

1、抽好血与抗凝剂混和后,应立即离心,时间延长再离心得到的血小板悬液中血小板数显著减少。

2、校正血小板后一定要重新计数一次,血小板数多或少要影响实验结果。

3、血小板悬液内不能混有红细胞。

4、判断结果时,要严格掌握出现纤维丝才算凝固时间。四组要一样判断。

临床意义:

第一组比第二组的检验结果延长5秒以上有临床价值,表示血小板第3因子有效性有缺陷。

第三组与第四组作对照用,第三组还可用于观察有否血凝因子缺乏,正常时血小板数字变化的影响比异常时较不显著。

血小板第3因子活性与血清胆固醇呈比例。

血小板第3因子有效性有缺陷时见于血小板病、尿毒症、骨髓增生症群、巨球蛋白血症、播散性红斑性狼疮、先天性心脏病、急性白血病、再障恶性贫血等。

(四) 凝血酶元时间测定(PT)

凝血酶元主要在肝脏内合成,同维生素K的供给有直接影响,而维生素K的吸收同肠道内胆汁的多少有关。

原 理:

在血浆中加入过量的组织凝血活酶(兔脑粉)和适量的钙,观察其凝固时间,据此来估

计患者血浆中凝血酶元的含量，血浆中因子V和因子Ⅷ的含量也可影响其结果。

试 剂：

1、 1.34%草酸钠溶液，

2、 M/40氯化钙溶液

无水纯氯化钙

1.11克

蒸馏水加至

400毫升

3、 生理盐水

4、 兔脑粉制备：

取新鲜兔脑5—10只，去净血管及软脑膜，用自来水缓缓冲洗后，将水份吸去，置于研钵中，加入约五倍量的丙酮，将脑质研磨，如此反复更换丙酮6—7次。每次研磨5分钟左右，使脑质内水份脂肪除去，且使脑质被捣成适当粗细的颗粒为止。将最后一次脑质置于新更换的滤纸上，待丙酮滤过后，置37℃干温箱中半小时，使丙酮完全蒸发，再置于干燥器中2天（须新换干燥剂，如用石灰须注意防止石灰粉混入脑质内）。待脑质变干后，分装于小试管内，每管150毫克，加盖软木塞，用石蜡封口，保存于冰箱内备用。（如兔脑粉达到标准质量时，凝血酶元时间正常对照为 12 ± 1 秒）。

5、 组织凝血活酶浸液的制备：

将上述150毫克兔脑粉加入0.9%生理盐水2.5毫升，混合后置37℃水温箱内半小时，每隔10分钟摇匀一次。试验时需混和，吸其混悬液作试验。此浸液新鲜配制为佳，勿超过48小时，用后应放冰箱内保存。

操 作：

1、 于小试管内加1.34%草酸钠溶液0.2毫升。

2、 加入患者血液1.8毫升，混和，离心分离血浆（此血浆须尽快完成试验，未试验前必须放在冰箱内）。

3、 取小试管二只，各放血浆0.1毫升及组织凝血活酶浸液0.1毫升

4、 将试管浸于37℃水温箱内1—2分钟（切勿超过4分钟，以免凝固加速），再迅速加入已加温的M/40氯化钙溶液0.1毫升混和。此时立即开动马表，且将试管轻轻摇动，约10秒时，将试管取出轻轻侧动观察凝结情况，如果管内液体流动缓慢将要停止流动时立即记录所需时间，此即为凝血酶元时间。

临床意义：

1、 正常值： 12 ± 1 秒 比正常对照延长3秒以上有诊断意义。

2、 凝血酶元时间延长：见于凝血酶元、及因子V、Ⅶ、X等单独缺乏或合并减少。先天性缺陷常常单一因子缺乏。获得性缺陷常为合并减少。在合并减少中，时间的延长并不表示诸因子的累加结果，而是减少最严重的因子决定着时间延长的程度。其它尚可见于纤维蛋白元显著减少，DIC和抗凝物质增加等。继发性凝血酶元复合体减少（因子ⅦXⅡ），依次减少见于维生素K缺乏症、肝病、及口服抗凝剂后。最主要的是Ⅶ因子减少。在SLE、异常蛋白血症中时见抗凝物质的存在，致使凝血酶元时间延长，加正常血浆后仍延长，属于抗凝血活酶物质。FDP和fdp也可能是抗凝血活酶物质，故凝血酶元时间也延长，且可使正常血浆的凝血酶元时间延长。

(五) 白陶土部分凝血活酶时间测定

白陶土部分凝血活酶时间测定简称KPTT,系Kaolin Partial Thromboplastine time的缩写。

原理:其实际意义是白陶土脑磷脂血浆复钙时间,是内源系统较为理想的过筛试验。

脑磷脂可以加速因子X的活化及凝血酶元转变为凝血酶,但又因脑磷脂不能纠正血友病的缺陷,故仅是部份的凝血活酶(脑组织的生理盐水浸液可以纠正)。

由于脑磷脂可以代替血小板第3因子故不能反映血小板的变化。

加入白陶土悬液是为了经一定时间孵育,使接触因素一致化,以充分激活血浆中的因子Ⅻ.Ⅺ.这便缩短了血浆凝固时间,使正常范围缩小,并避免由于试管洗涤不彻底所致激活作用减弱所产生的变异。

本试验操作简便、迅速、敏感性高、重复性好,可用以检查内源性凝血系统的所有凝血因子,尤其是AHG,PTC,Ⅺ,并可与凝血酶元时间测定同时进行,是出血性疾病的常规过筛试验之一。且可作为血友病治疗和抗凝药物治疗过程中的观察指标。但由于本试验缺乏特异性,故对KPTT,延长病例应进一步作其他检查以鉴别血凝障碍的类型。

试剂:

1. 部份凝血活酶的制备:

取1.2克干燥兔脑粉加入25毫升丙酮,室温放置2小时后离心,弃去上清液,将沉淀置室温中干燥,然后放于玻璃烧瓶内。加入25毫升氯仿,连续震荡2小时,用滤纸滤去沉淀,淡黄色之滤出液置100毫升烧杯中,在室温中蒸发成暗黄色腊状物,将其刮入玻璃研钵中,用12毫升生理盐水研磨成均匀之乳剂(乳白色),然后分装为0.25,0.5或1毫升之安瓿,保存于-20℃冰箱中备用,或冷冻干燥后备用。

2. 4%白陶土生理盐水悬液:

白陶土2克混悬于50毫升生理盐水中,存于玻璃瓶内,室温保存,用前摇匀。

3. 白陶土部份凝血活酶悬液:

上述部分凝血活酶按1:50用巴比妥缓冲液稀释(巴比妥11.75克,氯化钠14.67克,0.1N盐酸430毫升,蒸馏水加至2000毫升),加入等量的4%白陶土悬液,混合而成。在4℃冰箱中可保存约2周。

每次试验前,用正常血浆测KPTT应在31—43秒之间,如超过43秒以上,要重新配制。

4. M/40氯化钙溶液。

操作:

1. 被检血浆:静脉取血1.8毫升,注入内含0.2毫升1.34%草酸钠溶液的试管内,混和后以3000转/分离心5分钟,分离出血浆。应及时测定,否则必须置冰箱。

2. 病人血浆0.1毫升,再加入白陶土部份凝血活酶悬液0.1毫升,摇匀放37℃水浴孵育3分钟,其间轻轻振摇。

3. 加入M/40氯化钙溶液0.1毫升,开动秒表,水浴中不断振摇。至30秒钟时取出试管,轻轻倾斜观察,白陶土颗粒聚集变粗,出现纤维丝时,记录时间。通常混合液随即凝固成块,每份标本均重复一次,取二次均值的结果报告之。

附注:

1. 采血时间超过3小时, 孵育时间少于3分钟, 以及缓冲液PH大于或小于7.3时, 均可使测定结果不稳定, 应严加控制。放置时间超过4小时, 约延长4—7秒, 个别可达10秒。孵育时间少于2分钟, 凝固时间延长, 因白陶土激活Ⅺ及Ⅻ的作用尚未完全。

2. 如正常对照延长, 则应检查试剂质量。由于配制时间过长需要重新配制白陶土部份凝血活酶悬液, 一般可用二周, 故每次均应先做正常对照。

3. 人脑浸液亦可作部份凝血活酶时间, 操作同前。

临床意义:

1. 正常值: 男: 37 ± 3.3 秒 (31.5—43.5)

女: 37.5 ± 2.82 秒 (32—43秒)

一般以31.5—43.5秒为正常范围。

2. 延长: 比正常延长7秒以上大致有意义。相差10秒或以上有病理价值, 在纤维蛋白元, 凝血酶元, 因子V、X、Ⅺ、AHG、PTC、PTA减少、以及有肝素抗凝物质时均见延长或纤维蛋白元降解产物的增多, 一般可反映凝血因子10—20%的水平。

(1) AHG减少至30—40%时KPTT可延长至109.5秒。

(2) PTC减少至68%时KPTT可延长至88秒。

(3) 应用双香豆素等药物治疗时, 凝血酶元、Ⅺ、X、PTC减少, 如仅作凝血酶元时间测定, 不能获知PTC活动度的变化, 同作KPTT则可提供良好观察指标, 它可反映PTC的下降。

(4) 若KPTT与PT同时延长, 可提示I、Ⅱ、V、X缺乏, 但正常吸附血浆可以纠正, 表示V下降, 如KPTT延长而PT正常, 正常吸附血浆又可纠正, 则提示AHG下降。

(5) 血中有抗凝血活酶生成物质(如异常蛋白血症及胶原性疾病)时KPTT延长, 血中肝素增多或FDP增加时也可延长。

(6) 血小板减少性紫癜症及Ⅺ、Ⅻ缺乏时, KPTT可正常。

3. 缩短: 小于正常值3秒以上。

有时AHG及V增加, 幼年儿童、DIC高凝血期、试验时抽血不佳或血浆含有较多血小板时。

(六) 凝血活酶生成试验

(Thromboplastin Generation Test)

(简称TGT)

原理: 在血凝因子、血小板第3因子及钙的共同作用下, 形成内源性凝血活酶。在试管中, 将吸附血浆、血清及血小板悬液等量加入钙溶液, 混合后即形成凝血活酶。在凝血活酶的催化下, 使凝血酶元变成凝血酶, 凝血酶再使纤维蛋白元变成纤维蛋白。从混合液使基质血浆(含有凝血酶元、纤维蛋白元)凝固所需的时间, 可反映出凝血活酶的活动度。将患者标本同正常人标本进行各种组合, 即可确定患者的某些血凝因子及血小板的缺陷, 本试验比凝血酶元消耗试验更敏感, 有助于发现轻型血友病。

试验中在第一阶段先去除了凝血酶元, 因此所观察到的凝血活酶生成同凝血酶的出现基本上不相混淆。在实际操作中吸附血浆尚可含有少许凝血酶元, 因此还有些凝血酶形成, 使吸附血浆中纤维蛋白元凝固, 致在孵育混合液中可形成细的稀疏的凝块, 此凝块可用木签挑去。

试 剂:

- 1 枸橼酸钠3.8%溶液
- 2 草酸钠1.34%溶液
3. 硫酸钡粉末
4. 硅油: 2毫升硅油用石油醚稀释至100毫升(V/V)(本试验所用硅油系上海树脂厂批号201CS3.5)

准备工作:

1. 正常人血小板悬液及基质血浆。

(1) 在三只16×100毫米的涂硅试管(或涂石蜡)内各加3.8%枸橼酸钠溶液1毫升。

(2) 用涂硅(或涂液体石蜡)针筒迅速抽取正常人血液27毫升, 平均分装3只试管, 每管9毫升混匀抗凝, 立即离心。

(3) 用1000转/分离心10分钟, 吸出上层含血小板的血浆置于另2只涂硅试管内然后划一个刻度(在吸取上层含血小板血浆时应尽量避免吸入红细胞), 再以3000转/分离心10分钟。

(4) 吸出上层血浆, 这就是正常人基质血浆, 置冰箱内备用。(基质血浆内含凝血酶元及纤维蛋白元)。

(5) 将血小板沉淀先轻轻用玻棒搅匀, 然后加少量盐水再搅匀, 再加盐水到原来划刻度处, 用3000转/分离心10分钟, 洗涤二次, 最后一次加盐水到原血浆刻度处的1/3容积, 如即正常人血小板悬液。如血小板不均匀, 可放冰箱片刻, 可使悬液均匀。

(6) 计数血小板, 并调节至每立方毫米的悬液含有血小板在20—30万之间。

2、正常吸附血浆及血清(简称正吸浆及正清)

(1) 抽正常人血液6.5毫升。

正常人血液4.5毫升加1.34%草酸钠溶液0.5毫升, 混合离心, 分离血浆, 此为正常血浆。

正常人血液2毫升凝固后置37℃水浴2小时分离血清, 此为正常血清。

(2) 正常吸附血浆:

正常血浆2毫升加硫酸钡200毫克, 置37℃水浴中, 不断搅拌15分钟, 自水浴中取出, 离心3000转/分钟, 30分钟吸出上层血浆, 此为正常吸附血浆。置于冰水中保存, 不超过5小时。

(3) 稀释正常吸附血浆(应用前作1:5用生理盐水稀释)

正常吸附血浆1毫升加生理盐水5毫升。

(4) 稀释正常血清

作1:10稀释(正常血清1毫升加10毫升生理盐水), 一小时后再应用。

3、病人吸附血浆和血清:

制备与稀释方法均与正常人相同。

4、病人血小板悬液

若诊断血小板质的缺陷, 则应用时制备病人血小板悬液, 制备方法同前, 但病人的和正常人的血小板悬液都要分别调节到20万, 10万, 5万, 2.5万, 1.25/立方毫米进行比较。

吸附血浆, 血清, 血小板悬液稀释目的在于提供一个对发现有关凝血因子缺陷的敏感水平, 但若用以检查抗凝物质, 则吸附血浆以不稀释为佳。

操 作:

1. 取相同口径的小试管6只, 每管加M/40氯化钙溶液0.1毫升, 置37℃水浴内。

2. 另取一小试管顺次加 1 : 5 稀释吸附血浆0.3毫升、1 : 10 稀释血清0.3毫升、血小板悬液0.3毫升, 混匀, 放入37℃水浴 1—2 分钟, 再加入预热到37℃ 的 M/40 氯化钙溶液0.3毫升, 混和, 立即开动秒表, 记录时间。

3. 于45秒时吸取上述混合液0.1毫升加入已准备的第一只有氯化钙试管内, 于60秒时加基质血浆 (已预温到37℃) 0.1毫升, 立即开动第二只秒表, 观察凝固时间。

4. 每隔一分钟重复一次, 分别记时, 通常作 6 管, 以最短凝固时间作为本试验中最有价值的读数。如作到第 6 管, 凝血活酶继续在形成, 则要再作第 7、8 管, 直至曲线向上, 做到不再缩短, 而延长为止 (凝血活酶形成达高峰后, 可能受凝血活酶灭活因子的作用而使凝血活酶不稳定, 于是渐趋减少)。

5 各种交叉配组试验: 按上述操作步骤 1—4, 将下列配组进行同样的试验。

1 : 5 稀释吸附血浆	+	1 : 10 稀释血清	+	血小板悬液
正吸浆 0.3ml	+	正清 0.3ml	+	正血小板 0.3ml
病吸浆 0.3ml	+	正清 0.3ml	+	正血小板 0.3ml
正吸浆 0.3ml	+	病清 0.3ml	+	正血小板 0.3ml
病吸浆 0.3ml	+	病清 0.3ml	+	正血小板 0.3ml
正吸浆 0.3ml	+	正清 0.3ml	+	病血小板 0.3ml
病吸浆 0.3ml	+	病清 0.3ml	+	病血小板 0.3ml

以上所用的一切血浆和血清制品 (除血小板悬液外) 应保存于冰水浴内, 随用随取以防变质。

凝血活酶标准曲线:

1. 准备冰水浴, 选取小试管 8 只, 在第二管至第八管各事先加生理盐水0.5毫升, 在第一管内加 1 : 5 稀释正吸浆0.3毫升, 再加 1 : 10 稀释正清0.3毫升及正常人血小板悬液0.3毫升, 置37℃水浴中 1—2 分钟, 加0.025M 氯化钙溶液0.3毫升 (简称凝血活酶混合液) 立即开动秒表, 混和, 等 6 分钟整, 移入冰浴中, 吸出0.5毫升置于第二管内, 然后从第二管连续稀释至第八管。

2. 另取 8 只小试管, 各加0.025M 氯化钙溶液0.1毫升, 然后从低浓度至高浓度的凝血活酶混合液分别加0.1毫升, 再加基质血浆0.1毫升, 立即记时, 按次序记录各管的凝固时间, 共 8 次, 得出相当于凝血活酶活动度100% (未稀释混合液), 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56% 0.78% 的结果。举例如下:

操作结果 \ 试 管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
凝血活酶混合液	不稀释	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
基质血浆凝固时间(秒)	10"	12"	16"	22"	28"	33"	44.5"	58"
凝血活酶活动度(%)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78

以基质血浆凝固时间作纵座标, 以凝血活酶的活动度作横座标, 绘成凝血活酶稀释标准曲线 (每次均需重新绘制)。

将病人所得结果同正常曲线作比较便可查出其活动度(%)。

临床意义:

1. 正常值: 在4—6分钟内基质血浆凝固时间9—11秒。

2. 病人标本的基质血浆凝固时间至少比正常值延长5秒, 表示异常。本试验最为敏感, 对诊断轻型血友病有帮助。

3. AHG缺乏时病人吸附血浆的结果异常; PTC缺乏时病人血清的结果异常。PTA, XII缺乏时同时用病人吸附血浆及血清合并作试验时方发现异常, 如单独同患者吸附血浆或血清则结果大致正常。

4. V、X缺乏时凝血活酶生成异常, 特别表现为生成延迟, 如用缺乏该因子的血浆作为基质血浆, 凝血活酶生成障碍才明显, 加正常吸附血浆在孵育混合液内可纠正V、X缺乏, 加血友病人吸附血浆可纠正V缺乏, 若PT正常则可排除V、X缺乏。

5. 检查血小板病时应用的血小板悬液, 血小板数20万, 10万, 5万, 2.5万/立方毫米调节后均要计数1次, 病人与正常人血小板悬液要一样稀释, 方可作比较, 在血小板数2.5万/立方毫米时最敏感。

6. 检查抗凝物质先混合等量的病吸浆和正吸浆, 置37℃15分钟后做, 血清也同样如此。

7. 血清及吸附血浆均要稀释, 稀释似乎是为了找一个对血凝因子缺陷敏感的水平, 用不稀释的材料可有利于发现抗凝物质。它的作用在稀释后大大下降, 但这方面只适用于血浆。血清不稀释有困难, 因为血清中有一种破坏已形成的凝血活酶的因子, 这个因子在稀释后1小时破坏, 故1:10稀释血清可在稀释后1小时应用。

交叉配组试验的结果分析见下表:

凝血活酶来源			结 果 分 析				
吸附血浆 ($\frac{VII}{V}$)	血 清 ($\frac{VII}{IX}$)	血小板 悬液 (PF_3)	$\frac{VII}{V}$ 缺乏症	$\frac{IX}{X}$ 缺乏症	$\frac{XII}{XII}$ 缺乏症	血小板病	抗凝物质 (抗凝血活酶物质)
①正常人	正常人	正常人	正 常	正 常	正 常	正 常	正 常
②病 人	正常人	正常人	异 常	正 常	近似正常	正 常	正常或异常
③正常人	病 人	正常人	正常或增快	异 常	近似正常	近似正常	正常或异常
④病 人	病 人	正常人	异 常	异 常	异 常	近似正常	异 常
⑤正常人	正常人	病 人	正 常	正 常	正 常	异 常	正 常
⑥病 人	病 人	病 人	异 常	异 常	异 常	异 常	异 常
备 注			V 缺乏 则PT延长	X 缺乏 则PT延长			抗凝物质不存在时, 提示 $\frac{VII}{IX}$ 合并缺乏

说明: (1)上表的左小半是各种交叉配组试验的配组情况来表示内源性凝血活酶的来源。

(2)表中③的配组就是正常人的1:5稀释吸附血浆0.3ml+病人的1:10稀释血清0.3ml+正常人的血小板悬液0.3ml等, 余类同。

(3)上表的右大半是试验结果, “正常”=使基质血浆凝固时间在正常范围之内。

“异常”=使基质血浆凝固时间延长, 超过正常范围至少5秒钟。

附注：由于制备血小板悬液手续繁复，可用人脑浸出液来代替。

人脑粉制备：

制备人脑粉同兔脑粉步骤一样，人脑要求死后不满14—24小时，全身无感染，局部无出血，无肿瘤的人脑。除尽血管，减少各种血凝因子的影响。人脑浸出液制备方法如下：

人脑粉2克，加丙酮40毫升，置室温中2小时，离心，弃去上清液。再用丙酮洗涤数次（约共3次）直至胆固醇完全去掉（胆固醇反应阴性）。然后在室温中将1克干燥人脑粉，浸入50毫升氯仿内，置室温中2小时，应不断摇动，混和后过滤。让滤液自然蒸发去除氯仿，得到胶状物质约300毫克。然后加10毫升生理盐水制成混悬液，分装安瓶，每瓶约0.2—0.3毫升，放在-20℃低温冰箱中保存，（可保存一年）。使100%正常值在10—12秒之间。

轻型AHG缺乏症或PTC缺乏症，如用正常人血小板悬液作凝血活酶生成试验，可呈正常结果，这主要由于正常血小板吸附着因子Ⅲ及Ⅺ所致。在这种情况下，可用脑磷脂（人脑）代替血小板混悬液，即可得到异常结果。

（七）凝血酶时间测定

原 理：

在凝血酶作用下使纤维蛋白元转变成纤维蛋白，于血浆中加入标准化的凝血酶溶液，血浆凝固所需的时间即凝血酶时间。当血中肝素或抗凝血酶增加时，它们可中和凝血酶，使凝血酶活性减低。

材 料：

凝血酶的制备：将正常人血浆（3.8%枸橼酸钠溶液一份加正常人血液九份所分离的血浆）100毫升，用冷蒸馏水（0℃—5℃）稀释至1000毫升，徐徐加入2%醋酸溶液调节至pH 5.3（约需3.2毫升），此时全部溶液呈混浊状态，置冰箱内过度。

次日，将底层沉淀物用离心法收集之，全部沉淀物溶解于25毫升生理盐水中，用2%碳酸钠溶液校正至pH 7（约2滴）再加3毫升0.25M氯化钙溶液（2.78克%），混匀后静置于室温中10分钟，待纤维蛋白全部凝固，用玻棒移去形成的纤维蛋白，等2小时使所有凝血酶充分形成。这种粗制的凝血酶，在室温下加等量丙酮，离心沉淀后，沉淀物再加25毫升生理盐水，等10分钟，再离心一次，上清液即纯粹的凝血酶。从这种方法获得的凝血酶效价约为200单位/毫升，它相当于最高浓度（每毫升1000单位）的原始凝血酶溶液的 $\frac{1}{5}$ 。剩下的沉淀物，可再加一次生理盐水，可以得到浓度较淡的凝血酶。

凝血酶的单位测定：取0.2毫升之新鲜草酸盐抗凝血浆放37℃水浴中保温15秒，加0.1毫升之凝血酶溶液，用秒表记录其凝固时间，结果查表。（用上法制备之凝血酶，先用生理盐水稀释10倍，即浓凝血酶0.1毫升加生理盐水0.9毫升，作滴定用）。

1. 凝血酶单位与凝固时间之关系

活 力	“足力”	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$
☆凝血酶之浓度(%)	100	50	20	10	5	2.5	1	0.5
+ 单位/毫升	50	25	10	5	2.5	1.25	0.5	0.25
凝固时间秒	3	4	7	11	18	33	80	180

☆：以生理盐水稀释

+：近似值。