

米度医疗 LDT (凝血)服务手册

2024

实验室自建检测（LDT）概述：

目前实验室开展的项目通常使用官方已批准的检验方法、试剂盒、检验设备。然而，随着循证医学和个体化精准医学的发展，针对性检测需求越来越多，**实验室自建检测（Laboratory Developed Test, LDT）**为这些检测项目提供了一种可行方式，其具有本地化、个体化特点，也是试剂、设备开发以及商品化的途径之一。

实验室自建检测（LDT）是个体化精准医学时代以及检验医学发展进入新阶段的标志之一。



LDT 开展条件:



某疾病的诊断、治疗和预后监测等缺乏性能更佳的实验室检查。



国际或国内高质量文献显示某检查项目已成熟，但尚未获得国内医疗器械注册证。



基础研究显示某标志物的检测技术和临床意义趋于成熟，且具有临床需求，可进行本地化应用。

建议先开展小范围临床应用研究，积累一定数据后，经科学性评审，再进行 LDT。

具体应用案例:



血友病诊疗:

1. 血浆 VWF 胶原结合试验 (vWF : CB) —— **VWD 分型诊断试验指标之一**
2. VWF 前导肽 (vWFpp) —— **VWD 分型诊断试验指标之一**
3. VWF 瑞斯托霉素辅因子活性 (vWF : RCo) —— **VWD 诊断试验指标之一**
4. 血管性血友病因子裂解酶 (ADAMTS13) —— **缺乏或活性降低是 TTP 的主要病因之一**

推广方向: TOP100 医院、血友病诊疗中心



新型口服抗凝药（DOACs）监测

1. 沙班类（利伐沙班、阿哌沙班、艾多沙班）——Xa 因子抑制剂

- ✓ 利伐沙班是拥有最多适应症的 NOACs，被批准用于非瓣膜性房颤卒中预防、深静脉血栓与肺栓塞治疗与预防、髌膝关节置换术后抗凝，在美国和欧盟还获批用于冠状动脉疾病和外周动脉疾病的预防。
- ✓ 阿哌沙班在我国仅批准用于髌膝关节术后抗凝
- ✓ 艾多沙班被批准用于非瓣膜性房颤卒中预防和深静脉血栓的防治

2. 达比加群——直接凝血酶 IIa 因子抑制剂

- ✓ 蝰蛇度凝血时间（ECT）：ECT 结果与达比加群血药浓度呈剂量以来的线性相关。
- ✓ 稀释凝血酶时间（dTT）：dTT 可有效监测达比加群酯，实验原理与 TT 相近。

推广方向：心内/外科、骨科、血管外科、神经内/外科



凝血监测指标

1. 凝血酶原片段 1+2（F1+2）——100%反映凝血酶产生量，从想评价凝血酶产生量的观点出发，准确性优于 TAT。
2. 凝血因子 XIII 活性——获得性缺乏常见，多因自身抗体导致。

LDT检测和IVD的区别:

	LDT 服务	IVD 试剂产品
服务/产品性质	检测服务 LDT 作为服务包仅在我们的实验室提供	医疗器械(第三类) IVD 产品是一套试剂, 是 LDT 检测流程中的关键部分
管理及监管机构	国家卫健委监控 LDT 检测服务(包括员工资格、实验室环境、设备、在我们实验室进行的检测流程的安全性)	国家药监局监管医疗器械的注册、生产、销售、质量标准
国家药监局批准	不需要	需要
临床试验	不需要	产品注册时需要
特点	节约成本(作为 IVD 研发一部分的同时产生收入) 快速获取 创新性及灵活性	
营销模式	在患者临床需求的驱动下, 我们直接向医生推荐的个人患者客户及合作医院提供 LDT 服务, 促销活动主要以直接面向患者的渠道进行	我们将 IVD 产品销售给中国的医院和其他医疗机构。我们计划开展更多的学术推广活动, 以提高医院和其他医疗机构的市场渗透率, 因为我们期望得到医疗专业人员的广泛认可并可能被广泛采用
目标客户	LDT 服务旨在通过各种渠道(其中包括医院)满足患者伴随诊断检测的临床需求	我们 IVD 产品的主要目标客户是医院和其他医疗机构, 特别是拥有 NGS 实验室有能力在自身实验室进行检测流程的医院及医疗机构

项目检测方法:



血浆 VWF 胶原结合试验 (vWF : CB)

原理: 待测血浆 37°C 5min 快速复溶, 用 PBS 作 1:20 稀释后取 100uL 加至已用胶原包被的微孔板。25°C1h, 用 PBS 洗 3 次, 加入 HRP 结合的抗人 vWF 100uL, 25°C1h, PBS 洗 4 次, 加入三甲氧苯丙胺 (TMB) 100uL, 25°C 5min 后加入 100uL 2mol/L H₂SO₄, 30min 内读取 450nm 处吸光度值 (A)。从标准曲线上查得相应的胶原结合 vWF 比值。



VWF 前导肽 (vWFpp)

原理：用辣根过氧化物酶标记单克隆抗体 SZ175。在冻干的磷酸缓冲液 (PBS) 中加入 500ml 的超纯水，准备 1mg 纯化后的单抗 SZ175 (IgG) (存放于 0.5-1.0ml PBS 中)，用 100 μ l 超纯水重悬 1mg 冻干状态的 EZ-Link Plus 活化的过氧化物酶，并将其直接与 IgG 溶液混合。在通风橱内，迅速将氰基硼氢化钠加入上述混合物，在室温条件下孵育 1h，加 20 μ l 的 Quenching Buffer 在室温下反应 15 min。透析纯化偶联后的抗体以脱盐，存放于含浓度 10mg/ml BSA 的储存液里，与等体积的甘油混合，分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。利用 ELISA 双抗体夹心法构建 VWFpp 抗原检测试剂盒。将特异性抗体 SZ176 结合到固相载体上形成固相抗体，然后和待检血浆中相应的 VWFpp 抗原结合形成免疫复合物，洗涤后再加辣根过氧化物酶标记的抗体 HRP-SZ175，与免疫复合物中抗原结合形成酶标抗体-抗原-固相抗体复合物，加底物显色，判断抗原含量。



VWF 瑞斯托霉素辅因子活性 (vWF : RCo)

原理：在瑞斯托霉素存在的条件下，vWF 通过与血小板膜糖蛋白 Ib (GPIb) 相互作用可使正常血小板发生凝聚。洗涤并固定的正常血小板加入瑞斯托霉素和待测样品，可以从血小板凝聚的程度来计算样品中 vWF : Rcof 的活性。



凝血酶原片段 1+2 (F1+2)

原理：以抗 F1+2 抗体包被酶标板，加入标准品或样品后，在加入过氧化物酶标记的第二抗体，与游离 F1+2 抗原决定簇结合。H₂O₂ 与发色基质间的酶促反应用硫磺终止，溶液颜色的深浅与样品中 F1+2 含量呈正比。



血管性血友病因子裂解酶 (ADAMTS13)

原理 (残余胶原结合法) : 取 50 μ l 患者血浆标本或正常混浆标本或已知 ADAMTS13 缺乏患者血浆标本加入 Ther-mo10000 MW 微量透析管置于含 1.5 M 尿素的低盐低渗 Tris-HCL 缓冲液 37 $^{\circ}$ C透析过夜, 次日记录透析后标本量, 以 PBS1:20 稀释, 取 100 μ l 稀释的透析后血浆标本加至包被了 5 μ g/ml Ⅲ型胶原溶液的酶标板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时后洗板 6 次, 再加入辣根过氧化物酶(HRP) 结合的羊抗人 VWF 抗体稀释液 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后洗板 6 次, 加入 TME 显色剂 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后加入硫酸终止液, 观察溶液颜色是否变黄, 变色提示 ADAMTS13 缺乏, 否则正常, 同时用酶标仪在 450 nm 波长比色, 记录结果。



凝血因子 XIII 活性

原理: 根据未经因子 XIIIa 作用的纤维蛋白单体聚合物可以溶解于 2% 单碘 (氯) 醋酸或 5mol/L 尿素溶液的原理, 以受检血浆对缺乏因子 XIII 基质血浆的纠正成都能来测定受检血浆中因子 XIII 的活性。

文献目录:

文献名称	文献内容	文献出处
《血管性血友病诊断与治疗中国指南（2022年版）》	VWD 分型诊断试验： 1. 血浆 VWF 多聚体分析。 2. 瑞斯托霉素诱导的血小板聚集（RIPA）。 3. 血浆 VWF 胶原结合试验（VWF:CB）。 4. 血浆 VWF 与 FVIII 结合活性（VWF:FVIII）。 5. 去氨加压素（DDAVP）。 6. VWF 前导肽（VWFpp）测定。 7. VWF 基因测序	中华血液学杂志 2022 年 1 月第 43 卷第 1 期
《血管性血友病的分子机制及诊治研究进展》	VWF 瑞斯托霉素辅因子测定（VWF:Rco）是历年来检测 VWF 活性的“金标准”。VWFpp/VWF 抗原（VWF:Ag）可以反映体内 VWF 的清除情况。健康人 VWFpp/VWF:Ag < 3.0, VWFpp/VWF:Ag 增加提示 VWF 清除增强。	检验医学与临床 2023 年 6 月第 20 卷第 12 期
《血管性血友病的诊断和治疗进展》	VWF 胶原结合试验（vWF:CB）、VWF 前导肽（vWFpp）、VWF 瑞斯托霉素辅因子活性（vWF:RCo）在血管性血友病分型中起到了重要的作用。	血栓与止血学 2020 年第 26 卷第 6 期
《血栓性血小板减少性紫癜诊治进展》	ADAMTS13 严重缺乏（活性 < 10%）作为 TTP 主要诊断标准。	临床血液学杂志 2021 年 34 卷 1 期
《口服抗凝药的实验室监测》	DOACs 在复杂临床情况下的安全隐患问题需要引起注意，需要进行实验室监测以确保治疗的有效性和安全性。	中华心血管病杂志 2019 年 10 月第 47 卷第 10 期
《直接口服抗凝药实验室监测进展》	直接口服抗凝药（DOACs）用药期间发生血栓形成、大出血、急诊手术，肝肾功能不全等情况时需要监测 DOACs 抗凝效果。	中国检验医学杂志 2017 年 7 月第 40 卷第 7 期
《日本 DIC 诊断标准》	TAT、SF 或者 F1+2 大雨标准范围的 2 倍上限记 1 分	日本血栓止血学会
《凝血、纤溶系统分子标志物和临床检验》	F1+2 100% 反映凝血酶产生量，从想评价凝血酶产生量的观点出发，准确性优于 TAT。	凝血、纤溶系统分子标志物和临床检验



CONTACT US

 咨询热线 / **0760-87886006**

地址：中山市火炬开发区祥兴路 6 号数贸大厦
北翼 7 层 711 卡、712 卡、713 卡
网址：www.miduyl.com