

利用凝固曲线分析与手工法检测快速识别1例 Fibrinogen Longmont

Rapid identification of a case of Fibrinogen Longmont using coagulation curve analysis and manual testing

徐向东 (Xu Xiangdong), 唐宁 (Tang Ning)*, 王雄 (Wang Xiong), 廖庆 (Liao Qing), 冯家立 (Feng Jiali), 张闽霞 (Zhang Minxia)^{1*}

华中科技大学同济医学院附属同济医院, 武汉 430000

Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

摘要: Fibrinogen Longmont 是异常纤维蛋白原血症中比较独特的一种, 既往常因光学法异常而磁珠法正常的检测结果被发现。通过一个案例我们观察到 Fibrinogen Longmont 患者的凝固曲线与典型的低纤维蛋白原血浆凝固曲线存在明显区别: 手工法检测可明显观测到凝块的透明特性; 样本血浆与正常血浆的混合实验也出现明显的抑制效应。这些实验室表现可能有助于 Fibrinogen Longmont 的筛查。

关键词: Fibrinogen Longmont; 凝固曲线; 手工法

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1009-6213(2024)03-0131-04

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6213.2024.03.007

1 简介

纤维蛋白原是在肝脏产生的由三对多肽链组成的 340 kDa 糖蛋白。目前已经发现了 400 多种先天性纤维蛋白原异常基因^[1], 其中 Fibrinogen Longmont 是比较独特的一种。Fibrinogen Longmont 变异中 β 链的第 166 号氨基酸由 Arg (精氨酸) 变为了 Cys (半胱氨酸), 进而导致纤维蛋白丝的横向交联障碍, 产生了可凝固并且透明的纤维蛋白凝块^[2]。因此多数 Fibrinogen Longmont 是因为光学法异常而磁珠法正常的检测结果而被发现^[3], 近日我们也发现了一例这样的患者。仔细分析其凝固曲线之后发现 Fibrinogen Longmont 患者的凝固曲线与典型的低纤维蛋白原凝固曲线存在明显区别; 手工法检测可明显观测到凝块的透明特性; 样本血浆与正常血浆的混合实验也出现明显的抑制效应, 这些实验室表现可能有助于 Fibrinogen Longmont 的筛查。

2 病例介绍

患者, 女, 59 岁, 因“发现低钾血症半年, 发现右肾上腺占位 5 个月”入院, 在术前筛查中送检了凝血相关检测 (沃芬 ACL TOP 750 血凝仪及配套试剂, 光学法)。发现纤维蛋白原 (FIB) Clauss 法检测小于

0.35 g/L (线性范围下限), 凝血酶原时间衍生法检测也小于 0.6 g/L (线性范围下限), D-二聚体、纤维蛋白原降解产物正常。患者的肝功能是完全正常的, 自述既往无出血病史。外科医生考虑可能是遗传性低纤维蛋白原血症并推迟了手术, 计划提高纤维蛋白原水平至 1.0 或 1.5 g/L 之上再进行手术, 遂连续进行了 3 d 的血制品输注, 但效果并不理想 (表 1)。在患者的血栓弹力图检测结果中, MA 值正常, 与 FIB Clauss 法检测结果并不相符^[4]。另外查看病例发现患者 12 年前曾做过甲状腺切除术, 术中及术后并未发生严重出血事件。因此我们怀疑 FIB 检测结果是否可靠, 并仔细查看了他的凝固曲线, 发现其与典型的低纤曲线存在明显差异。

2.1 凝固曲线分析

患者 FIB 凝固曲线与典型的低纤曲线存在明显差异, 虽然两者吸光度变化 (纵坐标) 均明显低于正常对照血浆, 但患者的 FIB 凝固时间 (横坐标) 明显缩短, 甚至短于正常对照血浆, 而典型低纤曲线的凝固时间是明显延长的 (图 1-图 3)。

换用磁珠法 (STA-R MAX 血凝仪及配套试剂) 检测, FIB 结果为 5.85 g/L (Ref 2~4 g/L), 但使用 STA-R 试剂在 ACL TOP 仪器检测, 结果仍然小于检测下限。

* 通讯作者: 唐宁, Email: tonyjesus@126.com; 张闽霞, Email: 764180047@qq.com

表 1 血制品输注记录及相关检测结果

输注血制品	住院当天	输注第 1 d		输注第 2 d		输注第 3 d		参考区间
		1 g 纤维蛋白原+300 mL FFP+2.5 U CP		1 g 纤维蛋白原+4 U CP		1 g 纤维蛋白原+4 U CP		
PT (s)	10.5	10.1	/	/	10.4	9.4~12.5		
APTT (s)	31.5	33.5	/	/	35	25~38		
FIB-C (g/L)	<0.35	<0.35	/	/	<0.35	1.9~4.0		
TT (s)	18.8	20.7	/	/	19.1	11~17		
FIB-RP (g/L)	<0.6	0.99	/	/	/	2.76~4.71		
K (min)	/	/	/	/	0.8	1~3		
ANGLE	/	/	/	/	83.2	58~78		
MA	/	/	/	/	65.6	50~70		

注:PT:凝血酶时间,APTT:活化部分凝血活酶时间,FIB-C:FIB Clauss 法;TT:凝血酶时间,FIB-RP:FIB PT 衍生法;FFP,新鲜冰冻血浆;CP,冷沉淀。

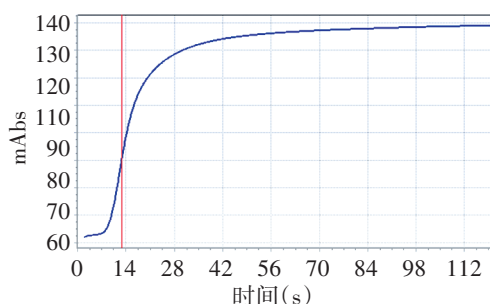
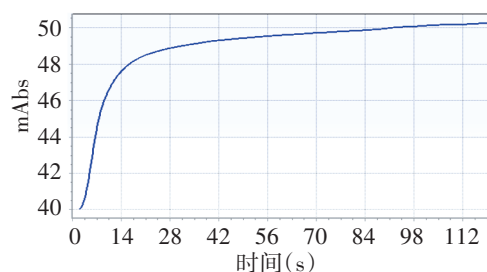
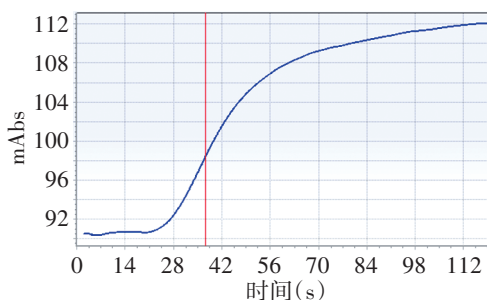


图 1 正常对照血浆(浓度为 3.06 g/L)FIB 检测凝固曲线



注:凝固时间很短,但因 $\Delta mAbs$ (纵坐标吸光度变化)小于 15 被仪器判断为检测失败

图 2 Fibrinogen Longmont 患者血浆 FIB 检测凝固曲线



注:凝固时间延长,同时 $\Delta mAbs$ (纵坐标吸光度变化)低但高于仪器检测失败判断阈值

图 3 典型的低纤血浆 FIB 检测凝固曲线

2.2 手工法检测

通过对患者的检测曲线进行分析,以及光学法与磁珠法结果表现不一致,我们怀疑在反应过程中形成了透明但可凝固的纤维蛋白凝块,因此进行了手工法 FIB 的检测(500 μ L 用因子稀释液进行 1:10 稀释后的血浆加入 250 μ L FIB 试剂),发现患者的纤维蛋白凝块相比于正常对照的确更加透明疏松(图 4)。

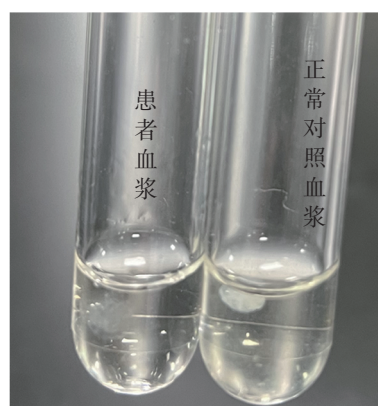


图 4 手工法 FIB 检测:相比于正常对照血浆,患者血浆生成的凝块更加透明、疏松

2.3 正常血浆混合试验

将患者血浆与正常混合血浆(NPP, FIB 浓度 3.06 g/L)进行 1:1 混合后,使用 ACL TOP 仪器进行 FIB 检测,结果仍然测不出(吸光度变化小于 15,仪器判断检测失败),表现出明显的抑制效应。

2.4 基因检测

最后进行了 FIB 基因检测,证实存在 B β 166Arg->Cys 突变(图 5),该突变为遗传性异常纤维蛋白原

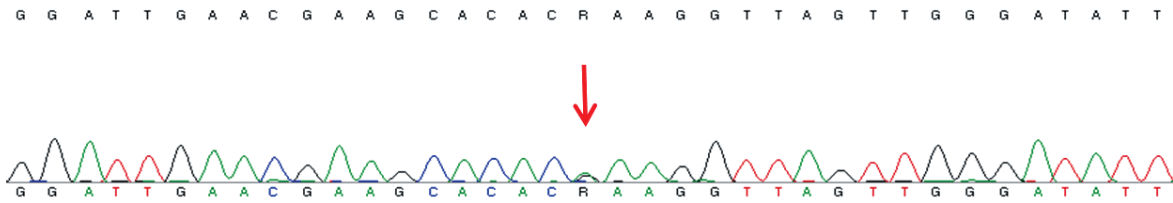


图5 FGB c.586C>T, p.Arg196Cys 杂合突变(反向测序峰图)

血症中的一种,即 Fibrinogen Longmont。

基因结果出来一周后,患者再次送检了凝血四项检测, FIB 光学法检测仍然小于 0.35 g/L,但结合磁珠法及病人的甲状腺手术史和血栓弹力图结果综合考虑后,外科医生对其进行了腹腔镜肾上腺病损切除术(未输血制品),术中并未发生严重出血,术后几天腹膜后引流管也一直通畅,第 1 d 和第 2 d 只引流出少量暗红色液体,与正常的术后情况并无区别。

3 讨论

Jennings 等^[5]2017 年进行了多中心的比对实验,将 Fibrinogen Longmont 血浆发给 86 个实验室(62 个英国 NEQAS 和 24 个 PRO-RBDD 中心)进行检测,39% 的实验室回报了正常或偏高的检测结果。随后他们进行了单中心的研究,将不同品牌的试剂放在不同仪器并使用不同的波长检测,结果发现在 Sysmex(希森美康)CS2100 仪器上得出了正常的检测结果(与试剂品牌或波长无关),而在 Sysmex(希森美康)CA660 和沃芬 ACL TOP 仪器上均得出了明显偏低的检测结果^[5]。然而在 Becky Leung 等^[1]的报告病例中,使用 STAGO 的凝血酶试剂在 ACL TOP 仪器上检测出了偏高的 FIB 结果。不同的实验结果也许是 Fibrinogen Longmont 血浆中的 FIB 浓度与试剂中凝血酶强度综合作用的结果,当凝固实验过程中的吸光度变化超出仪器所要求的最低吸光度变化阈值时,便可能检测出正常或偏高的结果。

Grimley^[6]和 Becky Leung^[1]报告的病例均没有出血或血栓表现,与我们这例患者类似。然而在 Lefkowitz 等^[3]报道的家系中先证者、先证者其中一个哥哥及其母亲均有轻到中度的出血表现(鼻出血、牙龈出血或分娩时大出血),但她的另外两个哥哥没有。因此 Fibrinogen Longmont 的临床表现是不确定的,评估其出血风险需要结合病史或血栓弹力

图检测等进行综合评估。不过及时发现 Fibrinogen Longmont 是有意义的,对于无出血史的患者来说,明确纤维蛋白原减低的原因可以在一定程度上避免频繁的血制品输注,而对于有难以解释的出血表现的患者来说,明确原因才能进行针对性止血治疗。

对于光学法无法测出的纤维蛋白原结果,有必要仔细查看凝固曲线。ACL TOP 的 FIB 检测结果是将凝固吸光度变化 37% 阈值时的凝固时间带入标准曲线计算后取得的。Fibrinogen Longmont 的凝固时间明显短于典型的低纤血浆,但因其生成的凝块非常透明,凝固过程吸光度变化($\Delta mAbs$)低,当 $\Delta mAbs$ 低于检测仪器要求的最低阈值时,仪器便会判断检测失败,进而误报一个假性的低值结果。如果 $\Delta mAbs$ 大于最低阈值,也许仪器会得到一个相对正常的检测结果。

有了初步怀疑之后,手工法可以帮助实验室更加直观的证实自己的判断, Fibrinogen Longmont 与 FIB 试剂反应生成的凝块更加的疏松透明。

Lounes KC 等人^[2]推测纤维蛋白原分子中 D 区与 E 区之间的一段螺旋区域可能对纤维蛋白的聚合(特别是原纤维的聚合)起到重要作用。另外两种异常纤维蛋白原 Fibrinogen Lima^[7]、Fibrinogen Niigata^[8]与 Fibrinogen Longmont 的突变位点均位于该区域。从本例患者血浆与正常血浆的混合实验来看, Fibrinogen Longmont 在混合血浆中起到一定的抑制效应,可能 Fibrinogen Longmont 与正常纤维蛋白原分子之间也因为该区域的改变而存在一定的聚合障碍。

作者贡献声明 徐向东负责实验操作、论文撰写,冯家立、廖庆负责数据整理,王雄、唐宁老师负责研究指导及论文修改,张闽霞负责统计分析、论文修改

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Leung B, Beggs J, Mason J. Fibrinogen Longmont: A clinically heterogeneous dysfibrinogenemia with discrepant fibrinogen results influenced by clot detection method and reagent[J]. TH Open, 2022, 6(1):e18-e20.
- [2] Lounes K C, Lefkowitz J B, Henschen-Edman A H, et al. The impaired polymerization of fibrinogen Longmont (Bbeta166Arg-->Cys) is not improved by removal of disulfide-linked dimers from a mixture of dimers and cysteine-linked monomers[J]. Blood, 2001, 98(3):661-666.
- [3] Lefkowitz J B, Deboom T, Weller A, et al. Fibrinogen Longmont: a dysfibrinogenemia that causes prolonged clot-based test results only when using an optical detection method [J]. Am J Hematol, 2000, 63(3):149-155.
- [4] Peng H T, Nascimento B, Beckett A. Thromboelastography and thromboelastometry in assessment of Fibrinogen deficiency and prediction for transfusion requirement: A descriptive review [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018:7020539.
- [5] Jennings I, Kitchen S, Menegatti M, et al. Potential misdiagnosis of dysfibrinogenemia: Data from multicentre studies amongst UK NEQAS and PRO-RBDD project laboratories[J]. Int J Lab Hematol, 2017, 39(6):653-662.
- [6] Grimley C, Hill M, Westby J, et al. Appearances can be deceptive: a family with dysfibrinogenemia, Fibrinogen Longmont that causes discrepant clotting times depending on the clot detection mechanism used, but appear not to bleed[J]. Haemophilia, 2006, 12: 130.
- [7] Maekawa H, Yamazumi K, Muramatsu S, et al. Fibrinogen Lima: a homozygous dysfibrinogen with an A alpha-arginine-141 to serine substitution associated with extra N-glycosylation at A alpha-asparagine-139. Impaired fibrin gel formation but normal fibrin-facilitated plasminogen activation catalyzed by tissue-type plasminogen activator[J]. J Clin Invest, 1992, 90(1):67-76.
- [8] Sugo T, Nakamikawa C, Takano H, et al. Fibrinogen Niigata with impaired fibrin assembly: an inherited dysfibrinogen with a Bbeta Asn-160 to Ser substitution associated with extra glycosylation at Bbeta Asn-158 [J]. Blood, 1999, 94(11):3806-3813.

(收稿日期:2024-03-08)

(本文编辑:钱婷婷;本文审校:叶絮)