

• 论 著 •

# 离心条件对凝血三项检测结果的影响及分析

马学斌, 白璐, 赵强元

(中国人民解放军海军总医院检验科, 北京 100048)

**摘要:**目的 验证该实验室常规凝血检测离心条件并探讨建立优化离心条件。方法 以该院体检者及住院患者为研究对象,分为常规组、标准组、提速组。应用不同离心条件离心获得乏血小板血浆(PPP),进行常规凝血项目凝血酶原时间(PT)、国际标准化比率(INR)、纤维蛋白原(FIB)、活化部分凝血活酶时间(APTT)的检测;其次对不同血小板含量的标本采用常规条件和标准条件离心后,检测血浆中剩余血小板含量。结果 常规组和提速组的凝血常规各项检测结果与标准组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );血小板浓度低于  $500\times 10^9/L$  时,常规条件和标准条件离心后 PPP 100%合格,血小板浓度高于  $500\times 10^9/L$  时合格率降低为 64%。结论 目前的常规离心条件可以满足常规凝血检测,对特殊类型凝血检测及血小板浓度高于  $500\times 10^9/L$  的标本,需要严格按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)的要求进行离心处理。

**关键词:**凝血检测; 离心条件; 乏血小板血浆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)19-2672-03

## Analysis the effect of different centrifugal conditions on the results of coagulation

MA Xuebin, BAI Lu, ZHAO Qiangyuan

(Department of Clinical Laboratory, Navy PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

**Abstract:** Objective To verify the effect of different centrifugal conditions on coagulation and ascertain the optimum centrifugal time for coagulation testing in the laboratory. Methods Navy General hospital check-up and hospitalized patients were divided into three groups which were conventional group, standard group and speed up the group respectively according the different centrifugation conditions. The platelet poor plasma (PPP) was harvested in the three different groups. The PT, INR, FIB and APTT were tested and the results were compared and analyzed. Samples with different platelets were centrifuged in normal condition or standard condition, after that, the residual platelet in plasma was detected. Results There was no significant difference of the PT, INR, FIB and APTT results among the routine group, speed group and the standard group. The results of PPP was qualified 100% in samples which platelets were less than  $500\times 10^9/L$  with routine conditions and standards of centrifugal conditions. However, the qualified result of PPP was dropped to 64% in those samples which platelets were higher than  $500\times 10^9/L$  with routine and standards of centrifugal conditions. Conclusion The conventional centrifugation conditions can meet clinical routine coagulation testing requirements, the special types of coagulation assays or the samples which platelets count are more than  $500\times 10^9/L$  should centrifuge in accordance with the requirements of the CLSI centrifugal processing.

**Key words:** coagulation testing; centrifugal conditions; platelet-poor plasma

凝血检测已广泛应用于患者凝血因子和凝血功能的诊断,出血和血栓性疾病的诊断,抗凝药物和因子替代治疗的监测,以及特异性和非特异性抗凝物质的筛查等<sup>[1]</sup>。凝血检测结果的准确性受多种因素的影响,其中检验前处理程序尤为重要<sup>[2]</sup>。枸橼酸钠抗凝的全血标本在进入分析前,需以一定的速度和时间离心而获得乏血小板血浆(PPP)。《全国临床检验操作规程(第3版)》规定活化部分凝血活酶时间(APTT)检测要求 3 000 r/min 离心 10 min,凝血酶原时间(PT)低速分离血浆即可。根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)指南于 2015 年制定的《中华人民共和国卫生标准汇编·临床检验标准卷》为 1 500 g 离心 15 min。本实验室根据第 3 版要求采用 3 000 r/min 离心 10 min,但能否满足新的国家标准,尚未进行验证;同时为有效缩短凝血标本检测的周转时间(TAT),对提高离心转速缩短离心时间是否可行也需作进一步的验证。本研究探讨不同离心条件对常规凝血检测项目的检测结果影响,包括:凝血酶原时间(PT)、国际标准化比率(INR)、APTT、纤维蛋白原(FIB)。对本实验室现行的离心条件进行验证,并进一步建立适合本室条件的凝血项目最佳离心条件。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 11 月 1 日至 12 月 30 日该院健康体检者为研究对象,入选标准:(1)基本健康,既往无出血、血栓性疾病。(2)无心、肺、肝、肾和血液系统疾病史。共 40 例,男 26 例,女 14 例,年龄 23~80 岁,平均年龄( $62\pm 5$ )岁,进行不同浓度血小板 PPP 验证。选取该院住院患者,根据不同血小板浓度进行分组。

**1.2 仪器与试剂** 美国 Instrumentation Laboratory 公司的 ACL-TOP700 全自动凝血分析仪及配套试剂、质控品;日本西森美康 XE-2100 全自动血细胞分析仪及配套试剂、质控品;美国 Beckman DL 电动离心机,离心半径 12.5 cm。所有仪器均在良好状态下进行实验。

## 1.3 方法

**1.3.1 不同离心条件对凝血项目的检测结果** 空腹状态下,用含  $10^9$  mmol/L 枸橼酸钠 0.3 mL 的真空采血管采集受检者静脉血 2.7 mL,轻轻颠倒混匀后,送到实验室。共收集 40 份标本,将每份平均分为 3 份,每份 1 mL,分为常规组、标准组、提速组,分别按不同的离心条件进行离心。常规组按照第 3 版

要求 3 000 r/min 离心 10 min,标准组按照《中华人民共和国卫生标准汇编·临床检验标准卷》要求 1 500 g 离心 15 min,根据本实验室离心机的离心半径(12.5 cm)换算离心转速为 3 302 r/min 离心 15 min,提速组使用 3 600 r/min 离心 5 min。应用美国 Instrumentation Laboratory 公司生产配套冻干粉质控品,复溶后分杯-20℃冻存,每天早晨常规实验前取出,室温放置 15 min 溶解平衡后,混匀上机检测,质控在控下进行实验。PT 和 APTT 均为凝固法;INR 采用 PT 衍生计算法;FIB 为 Clauss 法。所有标本均在采集后 4 h 内完成离心和上机检测。

**1.3.2 常规条件离心后 PPP 验证** 筛选同时检测全血细胞分析和凝血常规的标本,根据血小板检测结果分为 3 组:(100~300)×10<sup>9</sup>/L 组,(300~500)×10<sup>9</sup>/L 组,(500~800)×10<sup>9</sup>/L 组,每组 20 例,将凝血标本平均分成 2 份,按常规离心条件(3 000 r/min,10 min)和标准离心条件(3 302 r/min,15 min)平行进行离心后,检测 PPP 中剩余血小板含量。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间样本均数比较使用单因素方差分析,多组间两两比较应用 *q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 不同离心条件对凝血三项检测结果的影响** 常规组离心条件 3 000 r/min 换算离心力为 1 238 g,离心 10 min,提速组

3 600 r/min 换算离心力为 1 782 g 离心 5 min,标准组 1 500 g 离心 15 min。3 组离心后进行检测,3 组间 PT、INR、FIB、APTT 两两比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。说明目前应用的离心条件及提速离心条件均能满足常规标本的检测要求。见表 1。

| 表 1 不同离心条件下凝血检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ ) |          |            |           |           |            |
|----------------------------------------|----------|------------|-----------|-----------|------------|
| 组别                                     | <i>n</i> | PT(s)      | INR       | FIB(g/L)  | APTT(s)    |
| 常规组                                    | 40       | 10.82±0.38 | 0.99±0.36 | 3.43±0.56 | 31.38±2.27 |
| 标准组                                    | 40       | 10.84±0.47 | 0.99±0.4  | 3.41±0.62 | 31.62±2.33 |
| 提速组                                    | 40       | 10.91±0.44 | 0.99±0.39 | 3.42±0.65 | 31.47±2.29 |

**2.2 常规离心条件下 PPP 的验证结果** 血小板浓度(100~300)×10<sup>9</sup>/L 组和(300~500)×10<sup>9</sup>/L 组,常规离心条件下 PPP 中剩余血小板分别为(5.00±2.05)×10<sup>9</sup>/L 和(6.35±2.56)×10<sup>9</sup>/L,2 组 PPP 剩余血小板浓度均低于 10×10<sup>9</sup>/L;血小板(500~800)×10<sup>9</sup>/L 组,常规离心条件下 PPP 中有部分剩余血小板高于 10×10<sup>9</sup>/L,不合格标本占总例数的 36%,而标准离心条件下 PPP 中剩余血小板全部低于 10×10<sup>9</sup>/L。见表 2。

表 2 离心后 PPP 的验证结果( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                             | <i>n</i> | 常规条件离心后 PPP 剩余血小板(×10 <sup>9</sup> /L) | PPP 合格率(%) | 标准条件离心后 PPP 剩余血小板(×10 <sup>9</sup> /L) | PPP 合格率(%) |
|--------------------------------|----------|----------------------------------------|------------|----------------------------------------|------------|
| (100~300)×10 <sup>9</sup> /L 组 | 20       | 5.00±2.05                              | 100        | 2.45±2.01                              | 100        |
| (300~500)×10 <sup>9</sup> /L 组 | 20       | 6.35±2.56                              | 100        | 3.26±2.76                              | 100        |
| (500~800)×10 <sup>9</sup> /L 组 | 14       | 10.85±7.04                             | 64         | 6.35±3.08                              | 100        |

3 讨 论

凝血常规检测结果的准确性与检测流程的标准化、室内质量控制及实验前多种因素显著相关,离心制备 PPP 是其中最关键的步骤,因而离心条件的验证对标准化检测流程,提高检测的准确性具有十分重要的临床意义。

《全国临床检验操作规程(第 3 版)》规定 APTT 检测要求 3 000 r/min,离心 10 min,PT 低速离心分离血浆即可,其他项目无明确要求。由于各医院所用离心机品牌不同,型号不同,有效离心半径也不同,因而在相同转速条件下,获得相对离心力不相同,而相对离心力才是离心沉降的决定性因素。有研究表明,血小板磷脂与蛋白成分共同促进凝血酶原酶与凝血酶的形成,使整个凝血过程加速 2×10<sup>8</sup> 倍<sup>[3]</sup>。推测血小板可使内源性凝血途径提速近 1 000 倍,如果离心时间不够,血小板未完全沉降,相应凝血的磷脂催化表面增加,从而严重影响检测结果。

CLSI 建议常规凝血检测项目及特殊凝血检测项目离心获得合格的 PPP,即血浆中血小板浓度低于 10×10<sup>9</sup>/L,要求离心速度为 1 500 g,离心时间不少于 15 min<sup>[4]</sup>。《中华人民共和国卫生标准汇编·临床检验标准卷(2015 年版)》采纳 CLSI 的离心条件,作为我国凝血项目检测的国家标准。

有研究报道,以 CLSI 推荐的 1 500 g 为金标准,应用不同的离心力(3 000、1 500、1 000、500 g)离心分离获得 PPP,然后

检测各组离心后 PPP 中剩余血小板,结果显示,离心力为 1 000 g 获得的剩余血小板与 1 500 g 离心比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05);而离心力为 3 000 g 分离的剩余血小板显著低于 1 500 g 离心;离心力为 500 g 的剩余血小板显著高于 1 500 g 离心<sup>[5]</sup>。本研究使用常规离心条件获得 PPP,进行凝血项目检测结果与标准离心条件下检测结果比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),与上述研究结果具有一致性。

本研究探讨提高离心速度缩短离心时间对凝血检测结果的影响。紧急情况下,常规凝血项目的检测时间不能满足临床急诊。本组将离心速度提高至 3 600 r/min,离心时间缩短至 5 min 获得 PPP 进行凝血检测,结果表明该结果与标准离心条件下获得的凝血检测结果比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),是紧急情况下缩短 TAT 的有效、可行方法,与有关文献报道一致<sup>[6-7]</sup>。

根据 CLSI 建议,不同凝血检测项目对血浆中残存血小板的要求不同。PT 和 APTT 检测低于 200×10<sup>9</sup>/L 即可,而特殊类型凝血检测项目(蛋白 S)则必须要求血浆中血小板浓度低于 10×10<sup>9</sup>/L。有研究显示,1 次离心可满足常规凝血项目,而特殊类型项目则需要经过 2 次离心才能达到小于 10×10<sup>9</sup>/L<sup>[8]</sup>。有学者研究报道,离心机工作时加速键的“开”或者“关”也是影响 PPP 中剩余血小板的重要因素,建议凝血标本离心时选择“关”<sup>[9]</sup>。依据 CLSI 标准,普通凝血 4 项检测在常规离

心条件下可达到要求。特殊类型项目需增加离心条件或者进行 2 次离心,达到合格。由于特殊类型项目的检测试剂昂贵,本组未进行检测结果比对,仅以离心后 PPP 水平验证离心效果。

某些患者血小板含量非常高,常规离心后是否能满足检测要求。本研究选取血小板含量不同的患者凝血标本,按常规及标准条件离心后,检测 PPP 中剩余血小板含量,结果显示,血小板 $(100\sim300)\times10^9/L$ 和 $(300\sim500)\times10^9/L$ 时,PPP 中剩余血小板均在 $10\times10^9/L$ 以下,而当血小板高于 $500\times10^9/L$ 时,PPP 中剩余血小板仅有 64% 小于 $10\times10^9/L$ ,有 36% 的标本离心后 PPP 中剩余血小板高于 $10\times10^9/L$ ,按标准条件离心后血小板全部低于 $10\times10^9/L$ 。因此对于常规凝血项目检测,用常规离心条件的 PPP 水平可接受,但如果是特殊类型凝血项目,如狼疮抗凝物检测等,则需要严格按照标准要求的离心条件进行离心,获得标准的、可满足检测的 PPP<sup>[10]</sup>。

参考文献

[1] Scridon A, Cerban RC. Laboratory monitoring; a turning point in the use of new oral anticoagulants[J]. Ther Drug Monit, 2016, 38(1):12-21.

[2] D'audigier C, Delassasseigne C, Robert A, et al. Underestimation of plasma level of factor V coagulant activity and fibrinogen concentration together with prolonged prothrombin time, activated partial thromboplastin time and thrombin time can result from pre-analytical very low Calcium level in citrated sample tube[J]. Int J Lab Hematol, 2016, 38(1):50-53.

[3] 佟广辉, 张晓平, 佟威威, 等. 不同离心条件下对不同人群凝血常规检测结果的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(18):3303-3306.

(上接第 2671 页)

Mild type 2 diabetes mellitus improves remote endothelial dysfunction after acute myocardial infarction[J]. J Diabetes Complications, 2015, 29(8):1253-1260.

[5] 张鹏, 路慎国, 郑洪华. 糖尿病心脏病的发病机制研究[J]. 中国当代医药, 2012, 19(24):18-19.

[6] Gerstein HC, Miller ME, Ismail-Beigi F, et al. Effects of intensive glycaemic control on ischaemic heart disease: analysis of data from the randomised, controlled ACCORD trial[J]. Lancet, 2014, 384(9958):1936-1941.

[7] Pham I, Cosson E, Nguyen MT, et al. Evidence for a specific diabetic cardiomyopathy: an observational retrospective echocardiographic study in 656 asymptomatic type 2 diabetic patients[J]. Int J Endocrinol, 2015, 20(15):503-505.

[8] Chaudhary AK, Aneja GK, Shukla S, et al. Study on diastolic dysfunction in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and its correlation with glycosylated haemoglobin

[4] Adocok DM, Hoefner DM, Koeke-Marchant K, et al. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline, 5th edn[M]. PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

[5] Lippi G, Rossi R, Ippolito L, et al. Influence of residual platelet count on routine coagulation, factor VIII, and factor IX testing in postfreeze-thaw samples[J]. Semin Thromb Hemost, 2013, 39(7):834-839.

[6] Watanabe Y, Kawahara Y, Hanada D, et al. Examination of the sample centrifugation time for emergency coagulation test[J]. Rinsho Byori, 2012, 60(11):1035-1039.

[7] 王贞, 靳岩, 马晓露, 等. 改变离心条件制备乏血小板血浆凝血试验结果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(19):2589-2591.

[8] Suchsland J, Friedrich N, Grotevendt A, et al. Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2014, 52(8):1187-1191.

[9] Daves M, Giacomuzzi K, Tagnin E, et al. Influence of centrifuge brake on residual platelet count and routine coagulation tests in citrated plasma[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2014, 25(3):292-295.

[10] Gosselin RC, Dwyre DW. Determining the effect of freezing on coagulation testing: comparison of results between fresh and once frozen-thawed plasma[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2015, 26(1):69-74.

(收稿日期:2016-02-25 修回日期:2016-04-20)

(HbA1c)[J]. J Clin Res, 2015, 9(8):20-22.

[9] 刘海莲, 温志震, 王淑红, 等. 心肌肌钙蛋白 I、超敏 C 反应蛋白和肌酸激酶同工酶联合检测对急性心肌梗死早期诊断的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23):3258-3259.

[10] Chenevier-Gobeaux C, Bonnefoy-CudrazÉ A, Charpentier S, et al. High-sensitivity cardiac troponin assays: answers to frequently asked questions[J]. Arch Cardiovasc Dis, 2015, 108(2):132-149.

[11] 陈嘉雯, 彭淑莹. 超敏肌钙蛋白 I 在急性心肌梗死早期诊断中的应用价值[J]. 国际医药卫生导报, 2014, 20(7):959-961.

[12] Melissa JG. International expert committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes[J]. Diabetes Care, 2009, 32(7):1327-1334.

(收稿日期:2016-03-23 修回日期:2016-05-18)