·论　著·

血小板聚集影响因素在血细胞计数中的临床应用

胡恩亮，赵　媛，王　妍，樊爱琳，郑善銮
（第四军医大学第一附属医院检验科，陕西西安 710032）

摘　要：目的　分析血小板聚集影响因素，为降低血小板聚集所致血小板假性减低、实验室规避报告风险及减低误诊误治提供依据。**方法**　对血小板小于 80×10^9/L、小于 125×10^9/L 合并直方图提示血小板凝集标本进行推片、瑞氏-吉姆萨染色后显微镜下观察是否聚集，并采用统计软件 SPSS 18.0 进行统计分析。**结果**　乙二胺四乙酸依赖性血小板减少症（EDTA-PTCP）共计 184 例，占 0.444‰，其中门诊患者 101 例，占 0.244‰，住院患者 66 例，占 0.159‰，体检者 17 例，占 0.041‰；多重抗凝剂依赖性血小板假性减少共计 3 例，占0.007‰，假性血小板聚集共计 25 例，占 0.060‰。**结论**　血小板聚集的发现依靠镜检，原因主要来源于 EDTA-PTCP，假性聚集主要来源于采样因素，需加强业务技能培训。

关键词：血小板聚集；　抗凝剂；　假性血小板减少；　乙二胺四乙酸二钾；　乙二胺四乙酸依赖性血小板减少症
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.012　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2016)06-0749-03

Clinical application of platelet aggregation for white blood cell count

Hu Enliang, Zhao Yuan, Wang Yan, Fan Ailin, Zheng Shanluan
(*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi* 710032, *China*)

Abstract: Objective　To analyze the cause of platelet aggregation in blood specimens, so as to provide basis for reducing platelet aggregation, and avoiding false positive of platelet count, false report, misdiagnosis and mistreatment. **Methods**　The blood specimens which platelet was below 80×10^9/L, below 125×10^9/L with histogram hinted platelet aggregation, were smeared, stained with Wright-Giemsa, and observed by microscope for platelet morphological changes. The data between each groups were calculated and analyzed by statistical software SPSS version 18.0. **Results**　A total of 184 cases of ethylenediaminetetraacetic acid dependent pseudothrombocytopenia(EDTA-PTCP) were found, accounted for 0.444‰ totally, including 0.244‰ of out-patients (101 cases), 0.159‰ of hospitalized patients (66 cases), and 0.041‰ of health examination personnel (17 cases). 3 cases of multi-dependent pseudothrombocytopenia and 25 cases of pseudo platelet aggregation were found, and accounted for 0.007‰ and 0.060‰ respectively. **Conclusion**　The discovery of platelet aggregation which caused mainly by EDTA-PTCP, still relies on microscopy, and pseudo platelet aggregation comes mainly from sampling, so it needs to strengthen the skills training.

Key words: platelet aggregation;　anticoagulants;　pseudothrombocytopenia;　ethylenediamineteraacetic acid dipotassium-salt;　thylenediaminetetraacetic acid dependent pseudothrombocytopenia

血细胞分析是临床常规检测项目，其对于临床疾病的诊断、治疗及疗效观察起着非常重要的价值。而在临床工作过程中，血小板计数又成为最容易出现误差甚至是错误的环节，在临床检验工作中，血小板假性减低常造成临床的判断失误甚至误诊误治，给患者及家庭可能造成极大精神和经济负担。其中血小板聚集造成的血小板假性减低最为隐匿，极易出现纰漏，需重点防患。血小板聚集常见原因有乙二胺四乙酸（EDTA）依赖性血小板聚集，假性血小板聚集，多重抗凝剂依赖性血小板聚集等。EDTA 依赖性血小板聚集指在一些特殊情况下，乙二胺四乙酸二钾（EDTA-K_2）可以引起血小板聚集，从而导致血小板检测结果的假性偏低，即 EDTA 依赖性血小板减少症（EDTA-PTCP）[1-2]。在血小板聚集标本中，EDTA-PTCP 发生率最高，其发生原因极其复杂，据报道，肿瘤、自身免疫疾病、败血症、抗血小板治疗的患者在低温环境下，均可能发生 EDTA-PTCP[3]。EDTA-PTCP 发生率极低，临床报道发生率大约为 0.07%～0.20%[4-5]，但一旦发生极易造成误诊、误治，给临床诊治带来很大的麻烦，严重时甚至会导致患者接受不必要的 PLT 输注。因此，及时发现并处理血小板聚集，为临床提供准确的检测结果非常重要。

1　资料与方法

1.1　一般资料　2014～2015 年西京医院门诊、住院患者及体检者 414 038 例，收集其中的血小板聚集标本 209 份。

1.2　仪器与试剂　XE2100 五分类血细胞分析仪、XN3000 五分类血细胞分析仪、SP10 推片机均由日本 sysmex 公司生产，仪器经定期校准，各项指标均正常，室内质控在控。日本 Olympus CX-21 双目显微镜，牛-鲍氏血细胞计数板。溶血剂、稀释液、清洗液均为日本 sysmex 公司生产的仪器配套进口试剂；1%草酸铵稀释液（自配）；EDTA-K_2 真空抗凝采血管、枸橼酸钠真空抗凝采血管、肝素真空抗凝采血管均由广州阳普公司生产；瑞氏-吉姆萨染液由深圳贝索公司生产。

1.3　方法

1.3.1　镜检　临床检验工作中，对血小板小于 80×10^9/L、125×10^9/L 合并直方图提示血小板凝集标本进行推片、瑞氏-吉姆萨染色后显微镜下观察是否聚集，筛出聚集标本，更换抗凝剂重新采样后上机检测，并涂片、染色、镜检，同时按照原卫生部《临床检验操作规程》（第 3 版）草酸铵法血小板镜检要求进行复

作者简介：胡恩亮，男，检验技师，主要从事血液学检验研究。

检[6]。

1.3.2　分组　将抗凝剂由 EDTA-K_2 更换为枸橼酸钠不聚集者定义为 EDTA-PTCP 组（A 组），将 EDTA-K_2、枸橼酸钠和肝素抗凝血标本显微镜下均聚集者定义为多重抗凝剂依赖性血小板假性减少组（实施无抗凝全血快速上机测定及光镜法计数，B 组），将重新采样后血小板不聚集者定义为假性血小板聚集组（C 组）。

1.4　统计学处理　采用 SPSS18.0 对 3 组数据进行配对 t 检验分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　　果

共完成 414 038 例患者及体检者血细胞分析标本，日均 1 134 例，血小板聚集 209 例，占 0.505‰，其中 EDTA-PTCP 共计 184 例（门诊患者 101 例，体检 17 例，住院患者 66 例），占 0.444‰；多抗凝剂依赖性血小板假性减少共计 3 例，占 0.007‰；假性血小板聚集共计 25 例，占 0.060‰，见表 1。EDTA-PTCP 组占血小板聚集主要组成部分，分析 EDTA-PTCP 组来源，门诊发现率高于住院患者，见表 2。EDTA-PTCP 组通过更换抗凝剂（将 EDTA-K_2 更换为枸橼酸钠）的方法，检测结果与光镜法比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）；多抗凝剂依赖性血小板假性减少组通过不抗凝的方法，检测结果与光镜法比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）；A 组中光镜法与 EDTA-K_2 抗凝比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；B 组中光镜法与 EDTA-K_2 抗凝及枸橼酸钠抗凝比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

表 1　血小板聚集原因分析统计结果

组别	数量（n）	发生率（‰）
A 组	184	0.444
B 组	3	0.007
C 组	25	0.060
聚集数	209	0.505

表 2　EDTA-PTCP 来源分布

分类	分布情况[n（%）]	发生率（‰）
住院	66（35.9）	0.159
门诊	101（54.9）	0.244
体检	17（9.2）	0.041

表 3　血小板光镜法与仪器法计数结果比较（$\times 10^9$/L）

组别	仪器法			光镜法
	EDTA-K_2 抗凝	枸橼酸钠抗凝	未抗凝	
A 组	66.1±35.2	101.5±41.3	N/A	98.1±41.6*
B 组	27.1±25.2	36.1±31.2	66.5±19.2	69.5±33.8#
C 组	49.1±35.2	167.1±35.1	N/A	175.3±15.9

N/A：不适用；*：$P<0.05$，与 EDTA-K_2 抗凝比较；#：$P<0.05$，与 EDTA-K_2 抗凝、枸橼酸钠抗凝比较。

3　讨　　论

EDTA-PTCP 自 1969 年被 Gowland 等[7]报道以来，逐渐受到临床的重视。EDTA-PTCP 是指在体外 EDTA 抗凝全血中，由于 EDTA 诱导血小板膜表面隐蔽抗原的暴露或者对抗原的修饰，导致血浆中预存的循环自身抗血小板抗体与之发生抗原抗体反应，出现血小板聚集而使血小板分析仪不能正确计数，造成血小板计数假性减低的一种现象[8-10]。本研究发现，血小板聚集的发生率可达 0.505‰，其中 EDTA-PTCP 占 0.444‰，多重抗凝剂依赖性血小板假性减少占 0.007‰，而假性血小板聚集占 0.060‰，说明 EDTA-PTCP 是占血小板聚集主要原因，以门诊发生率最高，因此，在临床工作中给予特别关注，保证每份标本的检测结果准确无误。

EDTA-PTCP 引发的血小板假性减低最为隐匿，容易引发医疗差错，临床解决方法通常为更换抗凝剂，如枸橼酸钠、肝素等，临床常用枸橼酸钠。在本研究中，EDTA-PTCP 引发的血小板假性减低，更换枸橼酸钠抗凝后检测，与光镜法比较差异无统计学意义（$P>0.05$），枸橼酸钠抗凝血上机检测，镜检确认无血小板聚集后，综合抗凝剂的稀释倍数换算并修正血小板结果可以有效解决 EDTA-PTCP 引发的血小板假性减低。对于多重抗凝剂依赖性血小板假性减少，为避免血小板对抗凝剂依赖性的假性减低，通过不抗凝的方法，检测结果与光镜法比较两者差异无统计学意义（$P>0.05$），也可以有效解决多重抗凝剂依赖性血小板假性减少，经临床验证，结果准确，效果良好。假性血小板聚集现象主要来源于抽血原因，培训操作人员强化业务技能培训，按规定操作。

目前，虽然光镜法为参考方法，但程序复杂、人员要求高、精密度欠佳、误差大等影响因素不可控制，故临床上常被仪器检测所替代，仅在怀疑标本可能存在问题时采用该法进行复检。血细胞分析仪应用于临床省时、省力、重复性好，可在短时间内完成大量检测，大大缩短临床报告时间，但它尚不能代替镜检[11]。工作人员过分依赖血细胞分析仪，忽视细胞形态学检测的重要性[12]，因此，需要建立一整套可参照的人工镜检标准及形态学质量控制制度，加强形态学工作的顺利展开。

为减少血小板聚集对临床误判，现将原有血小板复检规则（初次血小板小于 80×10^9/L 时涂片镜检）增加 1 条，即当直方图报警提示血小板聚集且血小板小于 125×10^9/L 时涂片镜检，后经验证满足临床需求。

显微镜检查是避免因血小板聚集造成血小板假性减低的有力解决方法，细胞形态学诊断涉及很多学科，必须结合临床，因此，细胞形态工作者不但需要提高细胞形态学检验水平，还需加强临床知识的学习，加强与临床医生的沟通和交流[13]。临床上遇到无症状和诱因的血小板计数减低，应注意考虑血小板聚集的可能性，检验医师应及时发现并纠正假性计数结果，避免误诊、误治。应定期评估风险并制定解决方案，追踪改进效果，减低报告风险，提高实验室检测水平。

参考文献

[1] Kocum TH, Katircibasi TM, Sezgin AT, et al. An unusual cause of mismanagement in an acute myocardial infarction case: pseudothrombocytopenia[J]. Am J Med, 2008, 26(6): 740.

[2] Lau LG, Chng WJ, Liu TC. Transfusion medicine illustrated. Unnecessary transfusion due to pseudothrombocytopenia[J]. Transfusion, 2004, 44(6): 801.

[3] Wu W, Guo Y, Zhang L, et al. Clinical utility of automated platelet clump count in the screening for ethylene diamine tetraacetic acid dependent pseudothrombocytopenia[J]. Chin Med J, 2011, 124(20): 3353-3357.

（下转第 753 页）

3 讨　论

IFCC 下属机构 C-STFT 希望通过颁布统一的血清盘，采用 APTM 作为血清盘标定值，同时执行分阶段递进的实验方案，实现 TSH 检测结果的一致性。迈瑞公司参与 C-STFT 一致性研究计划的流程包括 3 个阶段。第一阶段：测试 C-STFT 第一部分血清盘（健康者标本），上报检测结果后，C-STFT 结合参与研究的各厂家系统检测结果，对检测结果可靠性和一致性进行评估。第二阶段：结合第一部分血清盘检测结果，修正主校准曲线，检测 C-STFT 第二部分血清盘（全范围标本），上报检测结果后，C-STFT 结合参与研究的各厂家系统检测结果，对系统修正后的检测结果一致性进行再评估。第三阶段：在第一阶段和第二阶段检测结果通过的情况下，检测第三部分血清盘（患者标本），C-STFT 结合参与研究的各厂家系统检测结果，评估 TSH 测试结果一致性程度，证实概念的可行性。第四阶段，检测 C-STFT 在北美收集的 120 例表观正常者标本，对参考范围进行研究。C-STFT 如果对各厂家参考范围比对结果满意，有望在 2018 年实现全球范围 TSH 检测系统一致性。大分子蛋白质结构的复杂性使检测结果很难实现标准化，而由于生产厂家普遍采用的国际标准品或企业内部标准品往往存在基质效应、分析物差异等问题，使得检测结果的一致性很难达到预期水平。C-STFT 推出包含健康者标本和病理标本的全范围真实临床血清盘[8]，作为溯源链中的一个等级，解决了标准品的“人造性”；同时采用 APTM 作为血清盘的定值，既建立了统一的溯源标准，又直接保证了各生产厂家检测系统对临床标本检测结果的可比性。分阶段递进实验方案（Step-Up approach）的贯彻，进一步加强了一致性结果的可靠性[2]。当然，检测结果标准化/一致性实验计划的成功执行，离不开权威机构，如 IFCC 的支持和推进，也离不开各主要生产厂家的支持与合作。这些都是可供国内相关机构和体外诊断系统生产厂家借鉴的宝贵经验。

目前，迈瑞公司检测系统已顺利通过 IFCC 首期标本检测结果一致性要求，为进入下一步 C-STFT 全范围临床标本检测奠定了基础。

参考文献

[1] Thienpont LM, van Houcke SK. Traceability to a common standard for protein measurements by immunoassay for in-vitro diagnostic purposes[J]. Clinica Chimica Acta, 2010, 411(23): 2058-2061.

[2] van Uytfanghe K, Linde A, Thienpont LM. A “Step-Up” approach for harmonization[J]. Clinica Chimica Acta, 2014, 432(1): 62-67.

[3] Thienpont LM, van Uytfanghe K, van Houcke S. Standardization activities in the field of thyroid function tests: a status report[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(11): 1577-1583.

[4] Thienpont LM. A progress report of the IFCC committee for standardization of thyroid function tests[J]. Eur Thyroid J, 2014, 16(3): 109-116.

[5] Stockl D, van Uytfanghe K, van Aelst S, et al. A statistical basis for harmonization of thyroid stimulating hormone immunoassays using a robust factor analysis model[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(8): 965-972.

[6] van Houcke SK, Van Aelst S, Van Uytfanghe K, et al. Harmonization of immunoassays to the all-procedure trimmed mean-proof of concept by use of data from the insulin standardization project [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(5): 103-105.

[7] 闫玉峰，张娟，李可，等. IFCC 促甲状腺激素（TSH）国际溯源和检测一致性系列研究（一）[J]. 国际检验医学杂志，2016，37(4)：496-497.

[8] Van Houcke SK, Thienpont LM. “Good samples make good assays”-the problem of sourcing clinical samples for a standardization project[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(5): 967-972.

（收稿日期：2015-12-16）

（上接第 750 页）

[4] Payne BA, Pierre RV. Pseudothrom bocytopenia: a laboratory artifact with potentially serious consequences[J]. Mayo Clin Proc, 1984, 59: 123-125.

[5] Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T, et al. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia[J]. Br J Haematol, 1997, 99: 817-823.

[6] 叶应妩，王毓三，申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京：东南大学出版社，2006：136-143.

[7] Gowland E, Kay HE, Spillman JC, et al. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA[J]. Am J Clin Pathol, 1969, 22(4): 460-464.

[8] Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, et al. Spurious counts and spurious results on hematology analysers a review. Part Ⅰ platelets[J]. Int J Lab Hematol, 2007, 29(1): 4-20.

[9] Bragagni G, Bianconcini G, Brogna R, et al. Pseudothrombocytopenia: clinic comment on 37 cases[J]. Minerva Med, 2001, 92(1): 13-17.

[10] Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinic and epidemiological stydy of 11 cases, with 10-year follow-up[J]. Am J Hematol, 1995, 50(2): 103-109.

[11] 王能勇，俞安清，陈效琴. 血常规涂片在诊断血液病中的重要性[J]. 实用医技杂志，2008，15(31)：4379-4380.

[12] 丛玉隆. ISO15189 认可现场评审引发的对细胞形态学检验问题的思考[J]. 中华检验医学杂志，2008，31(7)：725-728.

[13] 顾兵. 检验与临床的沟通案例分析 200 例[M]. 北京：人民卫生出版社，2011：140.

（收稿日期：2015-11-18）