

• 短篇论著 •

EDTA 依赖性假性血小板减少症的不同检测方法比较

蔡丽秀¹, 张蛟鲨¹, 张 锦¹, 包艾平¹, 付 阳^{2△}

1. 四川省成都市双流区第一人民医院/四川大学华西空港医院医学检验科, 四川成都 610200; 2. 四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041

摘 要:目的 寻找解决乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少症(EDTA-PTCP)快速、准确的复检方法。方法 收集 18 例 EDTA-PTCP 患者标本,采用手工法、仪器稀释法、仪器稀释阻抗法测血小板法(PLT-I)、仪器稀释光学法测血小板法(PLT-O)检测不同时间点的血小板数量。以手工法为标准,评价其他 3 种方法的准确率。**结果** PLT-I 中最准确的方法为采血后 0~5 min 内上机检测,准确率为 77.8%。PLT-O 中最准确的方法为采血后 0~5 min 内上机检测,准确率为 100.0%,其次为采血后 20 min 内上机检测及仪器稀释后 0~5 min 内采用 PLT-O 检测,准确率均为 77.8%,采血后 1 h 内检测准确率为 56.0%。PLT-O 准确率高于 PLT-I。**结论** 针对不是急查血小板计数的 EDTA-PTCP 患者,推荐采血后 0~5 min 内采用 PLT-O 上机检测;对于静脉穿刺较难的婴幼儿和重症患者,推荐采集末梢血仪器稀释后采用 PLT-O 上机检测;对于急查血小板计数患者,推荐采血后 1 h 内采用 PLT-O 上机检测。

关键词:乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少症; 光学法测血小板法; 血小板聚集

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.23.024

中图法分类号:R446.1;R558+.2

文章编号:1673-4130(2021)23-2931-04

文献标志码:A

血小板计数在血栓和出血性疾病的诊断和治疗中有重要价值。国际血液学标准化委员会推荐使用乙二胺四乙酸(EDTA)作为血常规检测的抗凝剂,因其对血细胞的形态和血小板计数影响很小,因此被广泛使用^[1]。然而 EDTA 也有其弊端,有时会导致血小板聚集,因为仪器对聚集的血小板不能确认,造成 EDTA 依赖性假性血小板减少症(EDTA-PTCP)^[2]。这种血小板假性减少现象若没有及时发现并纠正,临床上则可能采取非必要的骨髓穿刺、激素治疗或施行脾脏切除术等治疗方案^[3]。因此,工作中能及时发现 EDTA-PTCP 患者并准确进行血小板计数复检尤为重要。本研究对成都市双流区人民医院医学检验科工作中发现的 18 例 EDTA-PTCP 患者,采用不同血小板计数方法评价其准确性,为实验室寻找快速、准确的 EDTA-PTCP 复检方法提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2020 年 5—8 月成都市双流区第一人民医院 18 例 EDTA-PTCP 患者标本,其中男 6 例,女 12 例;年龄 2~78 岁,平均 46 岁。分别来自住院部 9 例(50.0%),门诊 4 例(22.2%),体检科 5 例(27.8%)。

1.2 纳入标准 (1)血小板计数 $\leq 70 \times 10^9/L$; (2)EDTA 抗凝标本血小板计数随着时间的推移呈进行性减低; (3)外周血涂片血小板聚集。

1.3 仪器与试剂 (1)中国迈瑞(BC-6900)全自动血

细胞分析仪及原装试剂; (2)日本 Olympus CX23 显微镜; (3)EDTA-K₂ 抗凝真空采血管及无抗凝剂的红色真空管、子弹头(康健医疗用品有限公司,中国江苏); (4)血小板计数溶血剂(凯诺威生物科技有限公司,中国成都); (5)瑞氏-吉姆萨染液(贝索公司,中国珠海)。

1.4 方法

1.4.1 手工法 准确采集所有患者末梢血 20 μL ,擦去管外余血,加至 380 μL 的血小板计数溶血剂中,充分混匀后室温静置,待完全溶血后再次混匀,充入 2 个计数池内,静置 10~15 min,待血小板下沉后显微镜下计数 2 个计数池内的血小板数量,取平均值。

1.4.2 仪器稀释法 抽取所有患者静脉血 2 mL 于无抗凝剂的真空管中,立刻吸取 40 μL 血液加入 140 μL 的迈瑞 BC-6900 全自动血细胞分析仪稀释液中,1~18 例标本采用仪器稀释阻抗法测血小板法(PLT-I)上机检测,10~18 例标本额外再采用仪器稀释光学法测血小板法(PLT-O)上机检测,记录血小板数量。因仪器稀释法在本实验室为采血稀释后 0~5 min 内上机检测,所以未进行时间分组。

1.4.3 PLT-I 采集所有患者 EDTA-K₂ 抗凝全血标本,充分混匀后分别于不同时间点(0~5 min, 20 min, 1 h, 2 h)采用 PLT-I 检测血小板,记录 4 个时间点的血小板计数结果。

1.4.4 PLT-O 对 1.4.3 中采集的血液标本于 1 h 内采用 PLT-O 检测血小板,记录 1 h 内 PLT-O 的血

[△] 通信作者, E-mail: fuyang827@126.com.

血小板计数结果。补充实验:10~18 例标本补充了 PLT-O 的检测时间点,在 0~5 min、20 min、1 h、2 h 内采用 PLT-O 检测血小板,记录 PLT-O 检测的血小板计数结果。对每份标本进行涂片染色,并观察血小板聚集情况。

1.5 统计学处理 将数据录入 WPS 中进行整理,计算各种方法与手工法之间的偏差,以 $\frac{|y-x|}{x} \times 100\%$ 计算,其中 x 为手工法计数血小板结果, y 为其他方法计数血小板结果,当偏差 $\leq 12.5\%$ 时认为计数准确,并计算各种方法的准确率。采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料采用重复测量方差进行分析。

2 结 果

2.1 18 例标本不同检测方法在不同时间点血小板计数结果比较 随着时间的推移,EDTA-K₂ 抗凝管 PLT-I 血小板检测数量呈进行性下降,但下降程度与时间存在个体差异,1 h 内 PLT-O 检测血小板计数明显高于 PLT-I,见图 1。

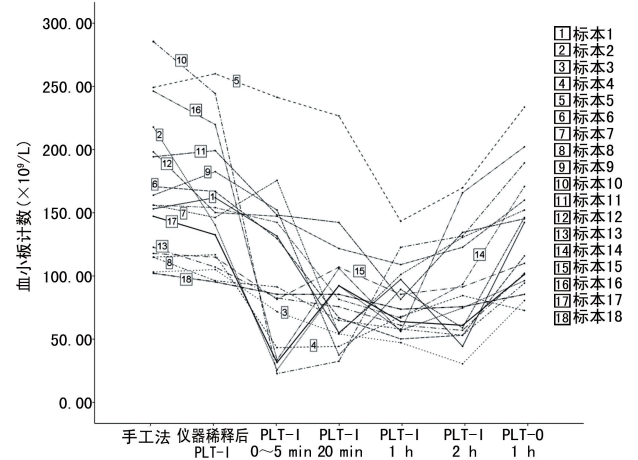


图 1 18 例标本不同检测方法在不同时间点血小板计数结果比较

2.2 不同检测方法血小板计数的准确率比较 准确率最高的方法是用 EDTA-K₂ 抗凝管全血 0~5 min 内采用 PLT-I 上机检测,准确率为 77.8%;其次是仪器稀释法,准确率为 72.0%;EDTA-K₂ 抗凝全血 1 h 内 PLT-O 的准确率也较高,为 61.0%。EDTA-K₂

抗凝全血 1 h 内的准确率 PLT-O 明显高于 PLT-I。见表 1。

表 1 不同检测方法血小板计数的准确率比较(%,n=18)

检测方法	0~5 min	20 min	1 h	2 h
手工法	—	—	100.0	—
仪器稀释法	72.0	—	—	—
PLT-I	77.8	50.0	5.5	0.0
PLT-O	—	—	61.0	—

注:—表示无数据;手工法为金标准。

2.3 补充实验中 10~18 例标本手工法与 PLT-O 血小板计数结果比较 补充实验中 10~18 例 EDTA-K₂ 抗凝标本 PLT-O 血小板计数随时间呈进行性下降,随着血小板聚集程度加重,PLT-O 准确检测血小板的能力呈下降趋势,见图 2。

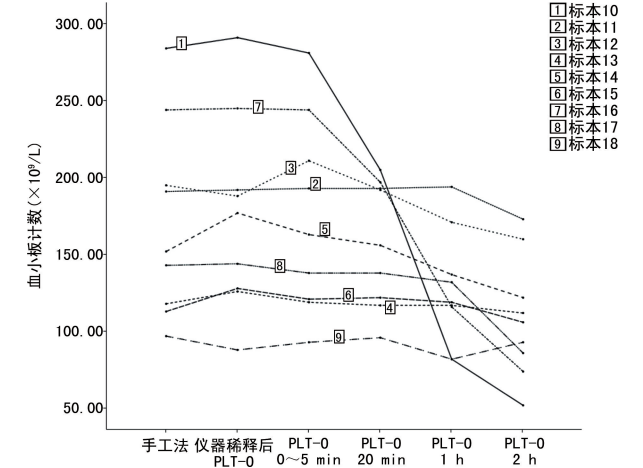


图 2 补充实验中 10~18 例标本手工法与 PLT-O 血小板计数结果比较

2.4 外周血涂片镜检结果 通过外周血涂片镜检,所有 EDTA-K₂ 抗凝全血标本随时间推移均发生血小板聚集,且聚集程度随时间呈加重趋势,见图 3。

2.5 PLT-O 不同时间点准确率比较 补充实验中 10~18 例标本准确率最高的方法是用 EDTA-K₂ 抗凝管采全血后 0~5 min 内采用 PLT-O 上机检测,准确率为 100.0%,其次为采血后 20 min 内上机检测及仪器稀释后 0~5 min 内采用 PLT-O 检测,准确率均为 77.8%,见表 2。

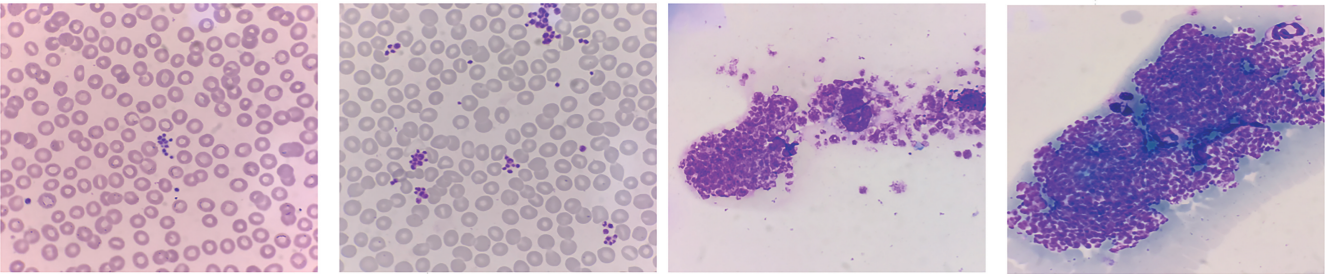


图 3 EDTA-K₂ 抗凝全血血小板聚集情况(瑞氏-吉姆萨染色,×1 000)

2.6 血小板形态 通过外周血涂片镜检发现第 2 例 EDTA-PTCP 住院患者血小板形态异常,随着病情恢

复,血小板未再发生聚集,形态也恢复正常,其余 17 例患者血小板形态均正常,见图 4。

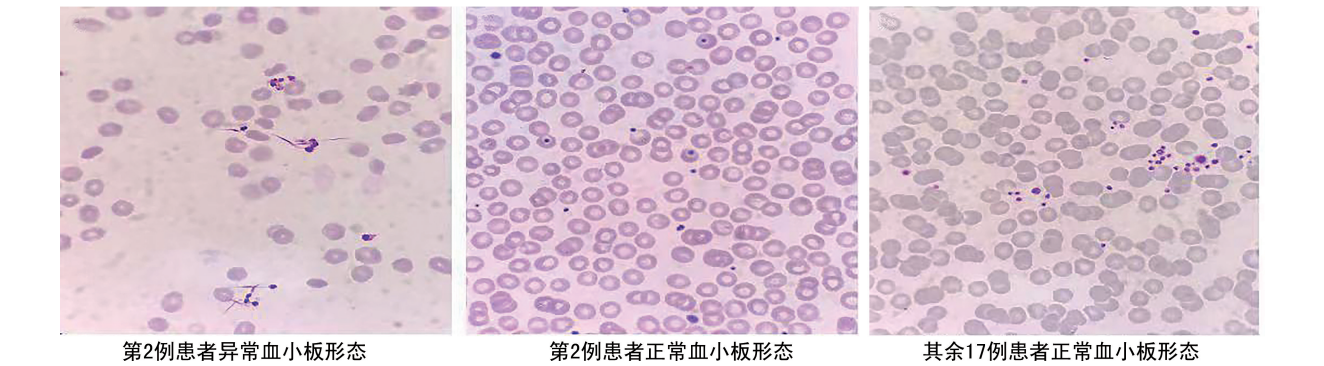


图 4 EDTA-PTCP 患者血小板形态(瑞氏-吉姆萨染色×1 000)

表 2	PLT-O 不同时间点准确率比较(%, n=9)			
检测方法	0~5 min	20 min	1 h	2 h
手工法	—	—	100.0	—
仪器稀释后 PLT-O	77.8	—	—	—
PLT-O	100.0	77.8	56.0	44.4

注:—表示无数据;手工法为金标准。

3 讨 论

EDTA-PTCP 似乎与年龄和性别无关,是否与特定的疾病和药物相关也无明确结论,存在于健康受试者和各种疾病患者中^[4-6]。本研究中住院患者占 50.0%,门诊患者占 22.2%,体检者占 27.8%,最小年龄为 2 岁,最大年龄为 78 岁,存在于各种疾病患者中。但部分 EDTA-PTCP 患者因血小板还未明显聚集已上机检测,导致无法及时发现,特别是门诊患者。成都市双流区第一人民医院要求 30 min 内审核报告,从图 1 可以看出,部分患者采血后 30 min 内已上机检测,其血小板计数大于 100×10⁹/L,这部分患者很难被发现,所以实际发生率可能更高。

目前,EDTA-PTCP 的发生机制并不明确,主要有以下原因:(1)与自身抗体相关。自身抗体与血小板上的隐匿性抗原结合,导致血小板发生聚集,这种自身抗体可以是抗血小板抗体,也可以是抗心磷脂抗体。(2)与血小板上的隐匿性抗原相关。EDTA 与 Ca²⁺螯合,导致血小板的结构发生改变,暴露出隐匿性抗原,抗原与抗血小板抗体结合,导致血小板聚集。(3)与血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 相关。GPⅡb/Ⅲa 之间存在神秘表位,GPⅡb/Ⅲa 需要 Ca²⁺保持其二聚体结构,EDTA 与 Ca²⁺螯合导致其结构发生变化,从而导致表位暴露在 GPⅡb 上,与抗血小板抗体结合发生聚集。但 EDTA 依赖性抗体并不特异,除 EDTA-PTCP 外,也观察到 EDTA 依赖性白细胞聚集^[11]。尽管目前的研究从不同角度阐述了各自的理

论,但尚不能全部解释其发生机制。从图 4 可以看出,第 2 例 EDTA-PTCP 患者血小板形态异常,随着病情的恢复,当血小板未再发生聚集时血小板形态恢复正常,但无法明确是否与用药或者其他治疗相关。

针对 EDTA-PTCP 目前提出了诸多解决方法,主要分为两类。第一类是不需要二次采血的方法,主要有加入阿米卡星及振荡法等,加入阿米卡星能较好地解聚血小板,但等待解聚的时间较长,且灵敏度和特异度存在个体差异^[7-10];抽血后 1 h 内加入 6.5 mg/mL 阿米卡星能有效解聚血小板,但文献^[11-12]的标本仅有 2 例,是否存在不能解聚的情况还需进一步研究;振荡法比较简便快速,但不能解聚血小板的概率高,且振荡后破碎红细胞也会对血小板的测定造成干扰^[13]。第二类是需要二次采血的方法,主要有手工法、仪器稀释法、抗凝剂替代法等,目前手工法仍是血小板计数的金标法,缺点是操作复杂、耗时长;仪器稀释法准确,但因无抗凝剂的参与,采血稀释过程中容易发生血液凝固导致血小板减低^[10];抗凝剂替代法是目前最常用的方法,但多种抗凝剂依赖的患者不能采用此法。根据近来报道,迈瑞血细胞分析仪网织通道检测血小板效果较理想,迈瑞 BC-6800 和 BC-6900 全自动血细胞分析仪 PLT-O 具有血小板解聚功能^[14],血小板聚集标本与反应溶液(解离试剂)在 42℃的恒温条件下混合,然后在 1 400 r/min 的高速涡旋中进行搅拌,在剧烈振荡中对血小板聚集的物理结构进行机械破坏,并通过检测系统逐一检测。在这种情况下,血小板聚集迅速有效地解离,血小板使用光学方法被准确计数,通过此方法能较好地解决 EDTA-PTCP,但目前的研究并未对 PLT-O 进行时间分组^[15-16]。

本研究在前阶段实验中发现,即使采用 PLT-O 检测血小板,其计数仍会随着时间呈下降趋势,所以进行了补充实验,在 10~18 例标本中对 PLT-O 进行

了时间分组,最终发现 PLT-O 优于 PLT-I,而 PLT-O 中,采血后 0~5 min 内采用 PLT-O 上机检测的准确率为 100.0%,故针对接受二次采血的非急重症患者,推荐使用此法。未加抗凝剂的仪器稀释后 PLT-O 虽然准确率为 78.0%,10~18 例标本中有 2 例偏差大于 12.5%,但均为 PLT-O 大于手工法,考虑这其中存在随机误差,故对于静脉穿刺较难的婴幼儿和重症患者,采集末梢血仪器稀释后采用 PLT-O 为一种较好的方法。PLT-O 随着标本放置时间延长,准确率呈下降趋势,这似乎与血小板聚集的严重程度相关,当血小板聚集特别严重时 PLT-O 准确率较低。18 例标本 1 h 内 PLT-O 准确率为 61.0%,但全部标本血小板计数均大于 $70\times 10^9/L$,2020 年中华医学会内科学会发布的《中国成人血小板减少症诊疗专家共识》指出,腰椎穿刺需要 $PLT\geq 40\times 10^9/L$,肝脏活检需要 $PLT\geq 50\times 10^9/L$,肾活检需要 $PLT\geq 100\times 10^9/L$,牙科手术需要 $PLT\geq (30\sim 50)\times 10^9/L$,一般大手术需要 $PLT\geq 50\times 10^9/L$ 。故对于急需手术的患者,采血后 1 h 内采用 PLT-O 上机检测血小板仍为较好的一种方法,既为手术争取了时间,也不易导致误诊。

本研究通过镜检发现,部分患者即使采血后立即上机检测同样发生了血小板聚集,而采血后 0~5 min 内 PLT-O 准确率为 100.0%,PLT-I 为 77.8%,PLT-O 在一定程度上解决了这一问题,但因为病例有限,是否存在采用此法不能解决的患者还有待进一步收集数据验证。本研究对迈瑞-6900 全自动血细胞分析仪 PLT-O 进行时间分组实验,因 EDTA-PTCP 个体差异较大,用均值和标准差来对比血小板计数不能准确反映出方法的准确性,故本研究最终采用准确率来评估方法的准确性。但本研究最准确的方法仍不能避免二次采血,如何能快速、准确又不需要二次采血的解决这一问题还需继续研究。

综上所述,对于 EDTA-PTCP 患者,最准确的检测血小板计数的方法为采血后 0~5 min 内采用 PLT-O 上机检测,可有效缩短检测时间及减少误诊的方法为 1 h 内采用 PLT-O 上机检测。所以本科室针对 EDTA-PTCP 患者制订了以下复检方案:针对不是急查血小板计数的 EDTA-PTCP 患者,采血后 0~5 min 内采用 PLT-O 上机检测;对于静脉穿刺较难的婴幼儿和重症患者,采集末梢血仪器稀释后采用 PLT-O 上机检测;对于急查血小板计数的患者,采血后 1 h 内采用 PLT-O 上机检测。

参考文献

[1] 钟小婷,马祥波,胡志愿,等. EDTA 依赖性假性血小板减少症的临床相关因素分析[J/CD]. 临床检验杂志(电子

版),2020,9(3):360-361.
[2] CHAE H,KIM M,LIM J,et al. Novel method to dissociate platelet clumps in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia based on the pathophysiological mechanism[J]. Clin Chem Lab Med,2012,50(8):1387-1391.
[3] 刘伟丽,朱宁,丁健. 自身免疫性疾病合并 EDTA 依赖性假性血小板减少症 2 例及文献复习[J]. 浙江医学,2017,39(21):1913-1915.
[4] 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,2003,99(4):817-823.
[5] LIPPI G,PLEBANI M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact [J]. Clin Chem Lab Med,2012,50(8):1281-1285.
[6] 李盛龙,赵丹. 乙二胺四乙酸盐依赖性假性血小板减少症研究进展[J]. 基层医学论坛,2012,14(19):2551-2553.
[7] 常菁华,王剑飏. EDTA 依赖性假性血小板减少的实验室解决思路[J]. 检验医学,2014,29(7):733-737.
[8] 张莉. 阿米卡星在 EDTA 依赖性假性血小板减少的探讨[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(2):269-270.
[9] 黄小红,林晋,郜秋芳,等. EDTA 依赖性血小板假性减少的分析与处理[J]. 实验与检验医学,2018,36(1):46-48.
[10] 赵凯华,周雄辉,刘强,等. 两种药物对 EDTA 依赖性血小板聚集的抑制作用比较[J]. 西南国防医药,2013,23(6):15-16.
[11] 巫小莉,周小棉,邓稳德,等. EDTA 抗凝剂依赖性假性血小板减少症血小板计数的研究[J]. 实用医学杂志,2007,23(4):578-580.
[12] 张伟红,周小棉,巫小莉,等. 抗凝剂依赖假性血小板减少症凝血血小板解离及机理研究[J]. 现代医院,2010,10(2):24-27.
[13] 罗磊,朱建锋,王蓓丽,等. 震荡法在纠正 EDTA 依赖的假性血小板减少中的应用[J]. 中国临床医学,2018,25(1):100-102.
[14] LIN J,LUO Y L,YAO S Y,et al. Discovery and correction of spurious low platelet counts due to EDTA-dependent pseudothrombocytopenia[J]. J Clin Lab Anal,2015,29(5):419-426.
[15] DENG J,CHEN Y,ZHANG S,et al. Mindray SF-cube technology:an effective way for correcting platelet count in individuals with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia[J]. Clin Chim Acta,2019,502(12):99-101.
[16] 周振忠,汪永强,袁平宗,等. 网织红细胞检测通道检测 EDTA 依赖性假性血小板减少症患者血小板的准确性[J]. 检验医学与临床,2019,16(18):2677-2679.