

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.03.0389

• 短篇论著 •

## EDTA-K<sub>2</sub> 在血液分析仪血小板检测中的应用及阿米卡星对 EDTA-K<sub>2</sub> 相关的假性血小板减少症的纠正作用

梁 枫\*, 孙奋勇

同济大学附属第十人民医院检验科, 上海 200072

**[摘要]** **目的** 确认乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)是全自动血液分析仪血小板检测的首选抗凝剂,研究 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝剂致假性血小板减少的原因,寻找纠正 EDTA-K<sub>2</sub> 相关的假性血小板减少症(EDTA-PTCP)的方法。**方法** 纳入 2015年6月至2016年6月我院健康志愿者 25 例,采集的血标本分别用 EDTA-K<sub>2</sub>、枸橼酸钠和肝素钠抗凝剂进行抗凝。纳入同期我院确诊的 EDTA-PTCP 患者 10 例,采集的血标本分别用 EDTA-K<sub>2</sub>、EDTA-K<sub>2</sub> + 阿米卡星抗凝。健康志愿者和 EDTA-PTCP 患者的血标本均同时用全自动血液分析仪及血小板手工计数。**结果** 健康志愿者 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血标本的血小板计数和手工血小板计数在 30 min 内差异无统计学意义( $P > 0.05$ );枸橼酸钠、肝素钠抗凝血标本的血小板计数和手工血小板计数在 5、15、30、60 min 时差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。EDTA-PTCP 患者的 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血标本在 0、30、60、90 min 时的血小板计数均低于手工血小板计数( $P < 0.01$ )。在 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血标本中加入阿米卡星后,血小板计数随着时间延长而逐渐增加,90 min 时与手工血小板计数相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** EDTA-K<sub>2</sub> 的抗凝效果优于枸橼酸钠、肝素钠抗凝剂,是全自动血液分析仪血小板检测的首选抗凝剂。EDTA-PTCP 患者的血标本在使用 EDTA-K<sub>2</sub> 作为抗凝剂时,可以用阿米卡星纠正。

**[关键词]** 假性血小板减少症;依地酸;柠檬酸钠;肝素钠;阿米卡星

**[中图分类号]** R 588.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)03-0389-04

## Application of EDTA-K<sub>2</sub> in detecting platelet and corrective effect of amikacin on patients with EDTA-K<sub>2</sub>-associated pseudothrombocytopenia

LIANG Feng\*, SUN Fen-yong

Department of Laboratory Medicine, the 10<sup>th</sup> People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

**[Abstract]** **Objective** To confirm the role of dipotassium ethylene diamine tetraacetate (EDTA-K<sub>2</sub>) as the preferred anticoagulant in platelet counting using automatic hematology analyzer, and to explore the cause of pseudothrombocytopenia (PTCP) induced by EDTA-K<sub>2</sub> and the corrective measures for EDTA-K<sub>2</sub>-associated PTCP (EDTA-PTCP). **Methods** Blood specimens were collected from 25 healthy volunteers admitted to our hospital from Jun. 2015 to Jun. 2016 and were separately anticoagulated with the anticoagulant EDTA-K<sub>2</sub>, sodium citrate and heparin sodium; blood specimens were also collected from 10 patients with EDTA-PTCP in our hospital and were separately anticoagulated with EDTA-K<sub>2</sub> or EDTA-K<sub>2</sub> + amikacin. Blood platelet in healthy volunteers and EDTA-PTCP patients was tested by automatic hematology analyzer and manual platelet counting. **Results** In healthy volunteers, there was no significant difference in the platelet counts between automatic hematology analyzer and the manual platelet counting with EDTA-K<sub>2</sub> anticoagulation for 30 min ( $P > 0.05$ ); and a significant difference in the platelet count was noted between automatic hematology analyzer and the manual platelet counting in the blood specimens with sodium citrate or heparin sodium anticoagulation for 5, 15, 30 and 60 min ( $P < 0.01$ ). The platelet count by automatic hematology analyzer was significantly lower than that by manual platelet count in the blood specimens of EDTA-PTCP patients with anticoagulation for 0, 30, 60, 90 min ( $P < 0.01$ ); after adding amikacin, the platelet count increased with the prolongation of time in these patients with EDTA-K<sub>2</sub> anticoagulation, and there was no significant difference between

**[收稿日期]** 2016-08-19 **[接受日期]** 2016-09-18

**[作者简介]** 梁 枫,临床医学检验主管技师。

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-61815263, E-mail: liuzzz6@126.com

automatic hematology analyzer and manual platelet count at anticoagulation 90 min ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Anticoagulation effect of EDTA-K<sub>2</sub> is superior to sodium citrate and heparin sodium, and EDTA-K<sub>2</sub> can be used as the preferred anticoagulant in platelet detection using automatic hematology analyzer. Amikacin can correct EDTA-PTCP in the patients with anticoagulation of EDTA-K<sub>2</sub>.

[Key words] pseudothrombocytopenia; edetic acid; sodium citrate; heparin sodium; amikacin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(3): 389-392]

血小板在人体中参与止血、凝血,血小板指标对某些疾病的变化具有显著的提示作用,因此血小板检测对疾病诊疗和预后很重要。目前国内外大部分医院采用血液分析仪对血小板进行检测计数,检测前一般先用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)对血标本进行抗凝处理。伴随着全自动血液分析仪被各大实验室所熟知,作为高效、实用型的抗凝剂,EDTA-K<sub>2</sub>也开始被各大医院实验室普遍运用。EDTA-K<sub>2</sub>抗凝的血标本血细胞计数准确性高,但在一部分人群中,EDTA-K<sub>2</sub>抗凝剂会使血小板聚集黏附,产生EDTA-K<sub>2</sub>相关的假性血小板减少症(EDTA-PTCP),而且这种现象日益增多<sup>[1-2]</sup>。EDTA-PTCP的发生是因为EDTA-K<sub>2</sub>改变了血小板的构象或功能,使血小板聚集,这种现象会导致临床上增加患者原本不必要的检查,甚至耽误患者的诊疗<sup>[3]</sup>。为此,本实验对EDTA-K<sub>2</sub>的抗凝效果进行了研究,并探讨了纠正EDTA-PTCP的策略。

## 1 资料和方法

1.1 检验仪器与材料 Sysmex XE-2100型全自动血液分析仪购于希森美康医用电子(上海)有限公司。EDTA-K<sub>2</sub>抗凝管、枸橼酸钠抗凝管、肝素钠抗凝管均购于碧迪医疗器械(上海)有限公司。阿米卡星(规格:0.1 g/mL)由上海信谊金朱药业公司赞助。

1.2 血小板首选抗凝剂的确认 纳入2015年6月至2016年6月我院的健康志愿者25例,其中男性13例、女性12例,年龄20~81岁,平均(43.2±18.6)岁。所有志愿者的血小板直方图均正常。排除骨髓生成血小板不足、白血病、再生障碍性贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿、巨幼细胞贫血等血小板减少性疾病;排除肿瘤疾病、心脑血管疾病、肾脏疾病、肝脏疾病和免疫相关性疾病等。

分别用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝管、枸橼酸钠抗凝管、肝素钠抗凝管采集健康志愿者的血液标本,再分别于5、15、30、60 min时用全自动血液分析仪计数血小

板数量。同时按照《全国临床检验操作规程(第4版)》完成血小板手工计数。

1.3 EDTA-PTCP的纠正 纳入同期我院确诊的EDTA-PTCP患者10例,其中男性4例、女性6例,年龄17~69岁,平均(40.3±16.7)岁。所有患者的血常规检测结果显示血小板减少,其他指标均正常;皮肤、黏膜无出血迹象,肝脏、脾脏和淋巴结无肿大,没有可以引起血小板数量减少的疾病。

用EDTA-K<sub>2</sub>真空抗凝管采集EDTA-PTCP患者的血液标本各2支,其中1支在采集即刻加入6.5 mg/mL阿米卡星,放置解离0、30、60、90 min后,用全自动血液分析仪计数血小板。同时按照《全国临床检验操作规程(第4版)》完成血小板手工计数。

1.4 统计学处理 应用SAS 9.2软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 EDTA-K<sub>2</sub>是全自动血液分析仪血小板检测最适宜的抗凝剂 由表1可见,5~30 min时健康志愿者EDTA-K<sub>2</sub>抗凝血标本的血小板计数和手工血小板计数差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而枸橼酸钠、肝素钠抗凝的血液标本血小板计数与手工血小板计数相比,在任意时间点差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果说明EDTA-K<sub>2</sub>是全自动血液分析仪血小板检测最适宜的抗凝剂。

2.2 阿米卡星可以纠正EDTA-PTCP 由表2可见,用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝的血液标本在任意时间点的血小板计数均低于手工血小板计数,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );在EDTA-K<sub>2</sub>抗凝血标本中加入阿米卡星后,血小板计数随着时间延长而逐渐增加,90 min时的血小板计数和手工血小板计数差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而在其他时间点差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表1 健康志愿者血液标本的血小板计数

×10<sup>9</sup>, L<sup>-1</sup>, n=25,  $\bar{x} \pm s$ 

检测方法	5 min	15 min	30 min	60 min
全自动血液分析仪				
EDTA-K <sub>2</sub> 抗凝剂	222.35±43.09	228.53±45.15	224.87±43.36	221.37±42.98**
枸橼酸钠抗凝剂	212.45±44.49**	209.63±44.15**	174.68±42.39**	151.35±43.97**
肝素钠抗凝剂	187.67±44.29**	178.64±43.18**	147.65±45.37**	141.77±43.58**
手工计数 <sup>a</sup>	226.25±44.91	226.25±44.91	226.25±44.91	226.25±44.91

<sup>a</sup>: 按照《全国临床检验操作规程(第4版)》完成血小板手工计数. EDTA-K<sub>2</sub>: 乙二胺四乙酸二钾. \*\*P<0.01 与手工计数比较

表2 EDTA-PTCP 患者的血小板计数

×10<sup>9</sup>, L<sup>-1</sup>, n=10,  $\bar{x} \pm s$ 

检测方法	0 min	30 min	60 min	90 min
全自动血液分析仪				
EDTA-K <sub>2</sub>	17.33±9.66**	42.11±17.05**	60.44±15.85**	78.11±15.99**
EDTA-K <sub>2</sub> +阿米卡星	17.33±9.66**	54.33±43.09**	120.56±26.50**	168.56±23.77
手工计数 <sup>a</sup>	171.78±17.56	171.78±17.56	171.78±17.56	171.78±17.56

<sup>a</sup>: 按照《全国临床检验操作规程(第4版)》完成血小板手工计数. EDTA-K<sub>2</sub>: 乙二胺四乙酸二钾; EDTA-PTCP: EDTA-K<sub>2</sub>相关的假性血小板减少症. \*\*P<0.01 与手工计数比较

### 3 讨论

3.1 EDTA-K<sub>2</sub>、枸橼酸钠、肝素钠 3 种抗凝剂对全自动血液分析仪检测血小板的影响 作为血标本的常用抗凝剂,EDTA-K<sub>2</sub>、枸橼酸钠、肝素钠 3 者的作用机制各不相同. EDTA-K<sub>2</sub> 和枸橼酸钠都是钙离子螯合剂,可以结合钙离子,形成水溶性复合物,从而使钙离子失去血液凝固作用,阻止血液的凝固. EDTA-K<sub>2</sub> 还可以抑制血小板的聚集,使血标本中的血小板以单个个体的形式分散存在,因此 EDTA-K<sub>2</sub> 对血小板的计数没有影响. 枸橼酸钠属碱性物质,可以使血小板聚集,致使血小板计数值减少. 肝素钠的抗凝机制主要是作用在凝血酶的形成途径中,使凝血活酶与凝血酶减少,同时肝素钠还可以使纤溶酶激活,阻止血液凝固<sup>[4-5]</sup>. 但是肝素钠可引起白细胞聚集和血小板减少,所以不适合用于白细胞分类和血小板计数. 本研究健康志愿者的结果也表明,EDTA-K<sub>2</sub> 是全自动血液分析仪检测血小板最适宜的抗凝剂.

3.2 EDTA-PTCP 发生的原因 PTCP 发生的原因相当复杂,主要包括以下几方面:(1)患者自身所患疾病,如脓毒血症、自身免疫性疾病、肿瘤、高镁血症和需要抗血小板治疗的疾病等;(2)患者服用的相关药物,如抗生素、奥氮平等;(3)标本采集过程顺利与否、标本放置的温度环境、标本放置的时间等;(4)血小板体积增大、脆性增加等;(5)抗凝剂引起的血小板减少<sup>[6]</sup>.

EDTA-K<sub>2</sub> 引起的血小板计数减少占 PTCP 的 90% 以上<sup>[7-8]</sup>, EDTA-PTCP 发生的原因也非常复

杂. 随着学者们对血小板功能研究的不断深入,人们总结出了 EDTA-PTCP 发生的相关因素.

(1)EDTA-PTCP 与抗凝时间和抗凝温度有关,而且随着时间的延长,血小板聚集更加明显,血小板计数进一步减少<sup>[9]</sup>. (2)EDTA-PTCP 发生与患者自身疾病有关,患者所接受的治疗对此也会有影响. 文献报道有些治疗药物可以影响 EDTA-PTCP,如抗生素、中药、奥氮平、放(化)疗药物等<sup>[10-11]</sup>,但也有研究表明基础疾病和治疗方案对 EDTA-PTCP 没有影响<sup>[12]</sup>,这个观点还有待考证. (3)住院患者发生 EDTA-PTCP 的例数往往比门诊患者多,此外,部分疾病治疗后,EDTA-K<sub>2</sub> 相关的血小板凝集现象也随之消失,提示 EDTA-PTCP 可能与患者是否住院接受治疗 and 所患疾病的严重程度有关. (4)全自动血细胞分析仪以其快速、简便、精密度好和准确性高的优点被临床实验室广泛用于全血细胞的分析,然而由于它的分析原理是依赖于细胞大小,所以当血小板在体外发生黏附聚集时,血细胞分析仪无法辨识聚集的血小板而将其误认为白细胞或者红细胞,不仅影响血小板的计数,而且导致红/白细胞计数的不准确,从而有可能导致错诊或者漏诊的发生<sup>[13]</sup>.

3.3 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝剂使血小板计数减少的机制 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝剂使血小板计数减少的机制目前还未研究清楚. 有研究称,血小板表面存在与 EDTA-K<sub>2</sub> 相关的隐蔽性抗原,EDTA-K<sub>2</sub> 可以改变血小板的构型,使隐蔽性抗原出现;隐蔽性抗原激活 5-羟色胺、花生四烯酸、磷脂酶、内源性钙离子和凝血酶原等作用物质,进而活化血小板纤维蛋白原受体,导致血小板在纤维蛋白原的作用下凝集成

块<sup>[11-13]</sup>。EDTA-K<sub>2</sub>可引起冷抗血小板自身抗体,这种抗体可以结合血小板膜糖蛋白,而膜糖蛋白可与淋巴细胞或单核细胞上的对应受体结合,导致血小板在单核细胞或淋巴细胞周围聚集。随着时间的延长,这种聚集程度会逐渐增加。因此导致全自动血细胞分析仪不能准确辨别血小板,致使血小板计数值降低<sup>[14-15]</sup>。另外,有些疾病比较危重,比如自身免疫相关性疾病、败血症、肝脏疾病、恶性肿瘤、传染性单核细胞增多症、烧伤烫伤等,伴有EDTA-PTCP的可能性会比较大。此外,奥氮平、抗生素等药物可能会改变血小板的表面构象,使血小板对EDTA-K<sub>2</sub>的敏感性上升,从而产生EDTA-PTCP<sup>[13]</sup>。有研究还表明,EDTA-PTCP的产生除了与抗血小板抗体有关,也可能与抗心磷脂等其他自身抗体有关<sup>[16]</sup>。

3.4 纠正EDTA-K<sub>2</sub>相关的血小板假性减少的首选方法 目前,实验室在遇到EDTA-PTCP患者时,通常采取的措施是重复采血,首先排除由其他原因如抽血不当等造成的PTCP。但是重复抽血复检不仅会造成时间人力的浪费,而且还会增加患者的痛苦。也有用枸橼酸钠抗凝剂作复检,但是枸橼酸钠的抗凝效果不稳定,有报道称枸橼酸钠抗凝血血小板的稳定性随时间延长而降低<sup>[17]</sup>。手工计数法则是血小板计数的金标准。本研究发现阿米卡星能纠正EDTA-K<sub>2</sub>引起的PTCP,阿米卡星能抑制血小板聚集并解离聚集血小板,其机制可能与血小板膜表面标记物CD62p的表达有关。本研究将阿米卡星加入到EDTA-PTCP患者的EDTA-K<sub>2</sub>抗凝血标本中,发现能够在不重复抽血的基础上纠正由EDTA-K<sub>2</sub>引起的PTCP,可作为纠正EDTA-PTCP的首选方法。加入阿米卡星的EDTA-K<sub>2</sub>抗凝血标本在90 min时的全自动血液分析仪血小板计数与手工血小板计数的差异无统计学意义,表明阿米卡星对于纠正EDTA-K<sub>2</sub>假性血小板减少与血小板手工计数有相似的效果。

然而,研究中我们也观察到在1例EDTA-PTCP患者的抗凝血标本中阿米卡星无法将聚集的血小板分散,从而未起到纠正的作用。推测这可能与EDTA-PTCP的发生机制有关。目前对于EDTA-K<sub>2</sub>引起PTCP的机制尚未完全明了,可能的原因之一是EDTA-K<sub>2</sub>作为抗凝剂,可产生免疫介导的冷抗血小板自身抗体,该抗体能够直接作用于血小板膜糖蛋白Ⅲb/Ⅲa,抗体的Fc段可与单核细胞或淋巴细胞膜上的Fc受体结合,出现卫星现象<sup>[16]</sup>。

EDTA-PTCP患者人数在临床检验中日渐增多,已经引起学者们的高度重视。本研究结果显示阿米卡星在大部分情况下能够纠正EDTA-K<sub>2</sub>抗凝

剂所引起的假性血小板减少,一定程度上减少了因为重复抽血而造成的时间成本的浪费,也减少了患者的痛苦。

## [参考文献]

- [1] 李艳,孙家祥. EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝剂致血小板假性减少的原因及纠正方法探讨[J]. 海南医学, 2013, 24: 3187-3189.
- [2] 全德胜,杨静,沈国强. 抗凝剂EDTA导致血小板假性减少现象的分析[J]. 实验与检验医学, 2015: 102-103.
- [3] 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: 733-737.
- [4] 梁培松,王结珍,杨山虹,孙各琴,陈颖,韩登科. 纠正EDTA-K<sub>2</sub>抗凝剂致假性血小板减少方法的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34: 2448-2449.
- [5] 邝妙欢,陆霄云,钟义富,刘万里. 假性血小板减少的相关因素[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(S2): 121-124.
- [6] 周小棉,邹晓. 假性血小板减少症研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30: 1065-1067.
- [7] 刘爱华. EDTA-K<sub>2</sub>抗凝剂依赖性血小板减少的分析与解决方案[J]. 国际检验医学杂志, 2014: 3277-3279.
- [8] 毛维玉,霍梅,叶素丹,龚文波. EDTA依赖的假性血小板减少的实验分析与对策[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22: 1345-1347.
- [9] WENZEL F, LASSHOFER R, ROX J, FISCHER J, GIERS G. Transient appearance of postoperative EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a patient after gastrectomy[J]. Platelets, 2011, 22: 74-76.
- [10] 郑军. EDTA依赖性假性血小板减少症的临床相关因素探讨[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36: 489-490.
- [11] 张建萍. EDTA依赖性假性血小板减少症及检测方法分析[J]. 重庆医学, 2010, 39: 2782-2784.
- [12] 张辉,李亚伟,李炳芝. 加强乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少症的认识及对策[J]. 检验医学与临床, 2008, 5: 316-317.
- [13] 欧洋华. 乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少症发病机制的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20: 1942-1944.
- [14] 崔俊林,曹娟. 乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37: 105-106.
- [15] 刘君,刘紫云. 10例EDTA-K<sub>2</sub>抗凝致假性血小板减少分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33: 1212-1214.
- [16] 董敏,方颖,王永才. 纠正EDTA抗凝剂依赖引起的假性血小板减少的方法学探讨[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4: 68-69.
- [17] 王伟,王海梅,杨萍,李杰. EDTA-K<sub>2</sub>和枸橼酸钠同时依赖的假性血小板减少病例分析[J]. 中华全科医学, 2013, 11: 786-787.

[本文编辑] 商素芳