

抗凝剂 EDTA-K₂ 引起的血小板减少原因分析

丁邦显, 刘思景(湖北省武汉市妇女儿童医疗保健中心 430016)

【摘要】 目的 探讨抗凝剂乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)引起血小板减少的相关过程及原因。方法 利用 Sysmex XE2100 全自动血液分析仪对 EDTA-K₂ 与枸橼酸钠两种抗凝剂的血液标本进行血小板(PLT)与白细胞(WBC)的检测,并与 Sysmex KX-21 血液分析仪稀释模式及人工镜检的检测结果进行对比和统计学分析,同时对 EDTA-K₂ 及枸橼酸钠两种抗凝血在 5、30 和 60 min 的 PLT 与 WBC 数值进行对比和统计学分析,并对 EDTA-K₂ 抗凝血与未抗凝末梢血涂片进行染色,对比观察 PLT 数目和形态变化。结果 EDTA-K₂ 抗凝血的 PLT 与 WBC 数值与枸橼酸钠抗凝血以及 KX-21 稀释模式和人工镜检的结果对比,差异有统计学意义($P < 0.01$),EDTA-K₂ 抗凝血在 5 min 时的 PLT 与 WBC 值与 30 min 及 60 min 的值之间差异有统计学意义($P < 0.01$),EDTA-K₂ 抗凝血涂片较未抗凝的末梢血涂片明显出现了大量 PLT 聚集以及卫星现象。结论 EDTA-K₂ 能促进 PLT 聚集而导致 PLT 假性减少,其作用过程在彼此接触后 5 min 内发生,30 min 内全部完成。

【关键词】 血小板假性减少; 乙二胺四乙酸二钾; 枸橼酸钠

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.19.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)19-2357-02

Study on the reduction of blood platelet caused by anticoagulant EDTA-K₂ DING Bang-xian, LIU Si-jing (Center for Women and Children Health Care, Wuhan, Hubei 430016, China)

【Abstract】 Objective To discuss the related process and the reason about the reduction of blood platelet caused by anticoagulant EDTA-K₂. **Methods** By using automated hematology analyzer-Sysmex XE2100, we measured the value of WBC and PLT that from the samples which used anticoagulant sodium citrate and EDTA-K₂ separately. Then we compared and statistically analyzed the results that from the dilution model of sysmex KX-21 and manual scope checking. We compared the value of WBC and PLT that from two kind of anticoagulant specimens in 5, 30 and 60 min. Then we made smears with anticoagulant and no anticoagulant separately, and observed the changes in number and morphology of PLT. **Results** Compared the value of WBC and PLT from EDTA-K₂ anticoagulant with that from diluted model KX-21 and the results of microscopic, the difference was significantly different ($P < 0.01$). the difference of the value of WBC and PLT from EDTA-K₂ anticoagulant in 5, 30, 60 min was significantly different ($P < 0.01$). Compared with those without anticoagulation, EDTA-K₂ anticoagulant smear had obviously been a lot of blood smears PLT aggregation, and satellite phenomenon. **Conclusion** EDTA-K₂ can promote PLT aggregation and cause the reduction of PLT, and the process takes place within 5 min, and complete within 30 min.

【Key words】 pseudo-reduced of PLT; EDTA-K₂; sodium citrate

目前,全自动血液分析仪已得到越来越广泛的应用,大大方便了临床全血细胞计数的检测,提高了检测的准确度和精确度。而抗凝剂的选择对于自动分析仪的结果有比较重要的影响。国际血液学标准化委员会(ICSH)1993 年建议,将乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)作为血常规检验的抗凝剂,并得到广泛应用^[1]。EDTA-K₂ 抗凝剂具有对血液标本中的细胞形态影响非常小,并可抑制血小板的聚集等优点^[2]。但它有时候又能引起血小板的黏附与聚集,使全自动血液分析仪无法对它们进行准确识别,从而造成检测值大大低于真实。这种由 EDTA-K₂ 引起的血小板假性减少的现象被称为 EDTA 依赖性假性血小板减少症(EDTA dependent pseudothrombocytopenia, EDTA-PTCP)^[3]。据国外报道,EDTA-PTCP 的发生率为 0.07%~1%,而国内报道为 0.77%^[4]。

本实验对 1 例血小板假性减少的患者进行血液标本采样。同时用 EDTA-K₂、枸橼酸钠两种抗凝剂及末梢血稀释的方式留取标本,分别通过全自动分析仪,人工显微镜计数及涂片染色等方法计数和观察患者血小板,分析血小板减少及白细胞升高的原因。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,女,22 岁,因宫外孕收入院。入院前门

诊血常规结果示:WBC $7.5 \times 10^9/L$, PLT $20 \times 10^9/L$,凝血相结果正常,无异常出血体征。入院后血常规 PLT $22 \times 10^9/L$,后更换抗凝剂枸橼酸钠后检测 PLT $183 \times 10^9/L$,草酸铵法人工计数 PLT $192 \times 10^9/L$ 。

1.2 实验仪器 日本 Sysmex XE2100 全自动血液分析仪, Sysmex KX-21 血液分析仪,日本 Olympus CX-21 显微镜,改良牛鲍氏计数盘。

1.3 实验试剂 EDTA-K₂, 枸橼酸钠,冰醋酸稀释液(白细胞稀释液),草酸铵稀释液(血小板稀释液),瑞氏-姬姆萨复合染色液,生理盐水。

1.4 方法

1.4.1 不同抗凝剂和方法间的比较 分别采集 EDTA-K₂ 和枸橼酸钠两种抗凝的患者静脉血标本各 2 mL,30 min 后按仪器标准操作规程在 XE2100 全自动血液分析仪上进行检测,并记录相应的 PLT 和 WBC 的数值;采集 20 μL 患者末梢血,加入到含 0.5 mL 的生理盐水的 EP 管中,净置 30 min 后,作为稀释模式的标本按 KX-21 稀释模式的标准操作规程在 KX-21 的稀释模式通道中检测,并记录 PLT 和 WBC 的数值;分别用草酸铵稀释液及冰醋酸稀释液按《全国临床检验操作规程》^[5],稀释患者末梢血,通过人工显微镜检的方法分别计数标本的

PLT 及 WBC 数值,并记录。注明:Sysmex XE2100 与 Sysmex KX-21 两种血液分析仪均通过卫生部质量控制检测,同时符合室内质控标准,两者之间的结果具备可比性。

1.4.2 不同时间段的比较 分别将 EDTA-K₂ 与枸橼酸钠两种抗凝的血液标本于采集后 5、30、60 min 3 个时间段按仪器标准操作规程用 XE2100 全自动血液分析仪进行检测,并记录相应的 PLT 和 WBC 的数值。以上各种方法均分别检测 5 次。

1.4.3 抗凝与未抗凝血涂片的比较 分别用患者即采末梢血和 EDTA-K₂ 抗凝的静脉血制成血液涂片,干燥后使用瑞氏染色法进行染色,显微镜下观察。

1.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 采用 EDTA-K₂ 抗凝后仪器检测的 PLT 和 WBC 的数值与枸橼酸钠抗凝、末梢血稀释法及人工镜检这 3 种方法得到的数值相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$),而枸橼酸钠抗凝仪器法与末梢血稀释法以及人工镜检这 3 种方法所得的 PLT 和 WBC 的数值相互比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 标本采集后 30 min 不同抗凝剂及不同检测方法时 PLT 与 WBC 的计数 ($\bar{x} \pm s$)

项目	仪器法		末梢血 稀释模式	人工镜检
	EDTA-K ₂	枸橼酸钠		
PLT($\times 10^9/L$)	24.0 \pm 3.0	183.0 \pm 6.0	177.0 \pm 13.0	190.0 \pm 10.0
WBC($\times 10^9/L$)	7.8 \pm 0.3	5.3 \pm 0.1	4.9 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2

2.2 EDTA-K₂ 抗凝血分别在 5、30 和 60 min 3 个时间段所测定的 PLT 和 WBC 的数值相互比较,5 min 结果与 30 及 60 min 之间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$),30 min 与 60 min 间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);枸橼酸钠抗凝血在 5、30 和 60 min 3 个时间段所测定的 PLT 和 WBC 的数值相互比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),EDTA-K₂ 与枸橼酸钠两种抗凝血在 5 min 时间段所测定的 PLT 和 WBC 的数值比较,差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见表 2。

表 2 EDTA-K₂ 与枸橼酸钠两种抗凝剂不同时间段的 PLT 与 WBC 计数结果 ($\bar{x} \pm s$)

项目	EDTA-K ₂			枸橼酸钠		
	5 min	30 min	60 min	5 min	30 min	60 min
PLT($\times 10^9/L$)	87.0 \pm 4.0	24.0 \pm 2.0	22.0 \pm 2.0	188.0 \pm 7.0	182.0 \pm 4.0	183.0 \pm 5.0
WBC($\times 10^9/L$)	5.7 \pm 0.3	6.9 \pm 0.2	7.0 \pm 0.2	5.4 \pm 0.3	5.5 \pm 0.2	5.7 \pm 0.3

2.3 对即采末梢血与 EDTA-K₂ 抗凝血 2 种涂片染色油镜镜检发现,未抗凝血的涂片内血小板散在分布,未见明显聚集现象,PLT 整体数目呈正常范围;EDTA-K₂ 抗凝血涂片内可见到明显的聚集及卫星现象。

3 讨 论

对于 EDTA-K₂ 引起的假性 PLT 减少的患者,当其血液分析标本采用传统的 EDTA-K₂ 抗凝时,其 PLT 测定值大大低于其真实值,导致 PLT 减少的过程是在 EDTA-K₂ 与血液标本接触后 5min 内即开始发生,而全过程则在 30 min 内全部完成。涂片镜检发现该类标本中 PLT 之间发生明显聚集现象甚至卫星现象,而采用枸橼酸钠抗凝时的 PLT 值并未受到影响。

EDTA-K₂ 作为常用的血液分析抗凝剂,的确具有别的抗凝剂无法相比的优点,但对有些患者的血液标本却起到促进 PLT 聚集的作用。这种 EDTA 依赖性假性血小板减少症 (EDTA-PTCP) 的发生是由于在以 EDTA-K₂ 作为抗凝剂的前提下出现的免疫介导的血液中冷抗血小板自身抗体,使血小板互相发生聚集现象^[6]。EDTA 依赖的冷抗血小板自身抗体还能直接作用于血小板膜糖蛋白 II b/III a 上,与血小板结合后的自身抗体的 Fc 端又可与淋巴细胞或单核细胞膜上 Fc 受体结合,出现卫星现象^[7],抗凝时间越长,室内温度越低,血小板聚集呈卫星现象越严重,PTCP 的发生也越频繁^[8]。另外,EDTA 可导致血小板活化,因而改变血小板膜表面某种隐匿性抗原构象^[9],这些外露的抗原与存在血浆中的自身抗体结合从而激活细胞膜中的磷脂酶 A₂ 和磷脂酶 C,水解血小板膜磷脂并释放花生四烯酸、胶原、凝血酶原、内源性钙离子等活性物质,这些活性物质能活化纤维蛋白原受体,促使血小板与纤维蛋白原聚集。血液分析仪对于 PLT 的检测主要以电阻抗法为原理,根据 PLT 体积的大小产生的不同的脉冲来计数,而当

PLT 发生聚集及卫星现象时,其体积增大以至仪器无法识别,导致 PLT 测定结果大大偏低。甚至把一些体积大小与 WBC 相似的 PLT 聚集体误识别为 WBC,因此往往出现 WBC 数值比真实值高的现象。有研究表明,在 EDTA-PTCP 患者血清中抗心磷脂抗体和抗血小板抗体的阳性率以及免疫球蛋白 IgG 和 IgM 水平都明显高于健康人,证明 EDTA-PTCP 的发生与某些自身免疫疾病有关^[10],化疗后的恶性肿瘤患者 EDTA 依赖性血小板假性减少症的发生率也会增高。研究还发现,EDTA-PTCP 可随着疾病的好转而好转直至消失。临床检验工作中,如果遇到这种 PLT 不明原因减少的患者,一定要结合其病情慎重对待。必要时最好通过草酸铵稀释法人工计数或者更换抗凝剂如枸橼酸钠等复查血小板,以及进行推片染色,观察其形态。只有全面、综合地应对,才能有效避免由于检验失误给临床诊疗带来不必要的误导。

参考文献

[1] 徐志明,祁慧,李丰平. 乙二胺四乙酸三钾导致血小板假性减少分析[J]. 检验医学与临床,2008,5(9):539-540.
 [2] 窦心灵,何贵山,朱建敏,等. EDTA-K₂ 抗凝剂导致血小板性减少 1 例报道[J]. 中国实验诊断学,2005,9(1):77.
 [3] 涂传清,吴建曾,赵锦,等. EDTA 依赖性假性血小板减少症 1 例[J]. 临床血液学杂志,2006,19(4):246-247.
 [4] Berkman N, Michaeli Y, Or R, et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical study of 18 patients and a review of the literature[J]. Am J Hematol,1991,36(3):195-201.
 [5] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:22. (下转第 2360 页)

的最长时间(见图 1)。

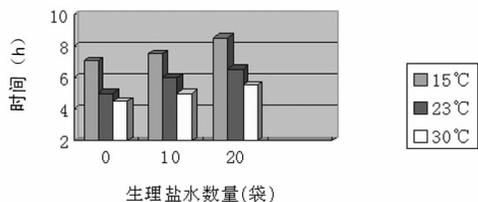


图 1 红细胞运输箱维持预期温度最长时间(不同外环境温度和装量)

2.1.2 当外环境温度为 23℃, 运输箱分别空载、装 10 袋、20 袋生理盐水在不同时间内的温度(见图 2)。

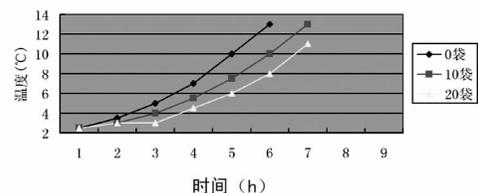


图 2 红细胞运输箱在不同时间的温度(不同荷载)

2.1.3 当外环境温度不同时, 装量为 20 袋的红细胞运输箱在不同时间内的温度(见图 3)。

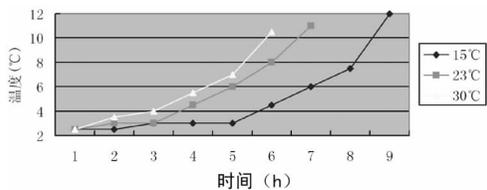


图 3 红细胞运输箱在不同时间的温度(不同外环境温度)

2.2 人工控温的血小板运输箱: 当外环境温度不同时, 在不同时间内的温度(见图 4)。

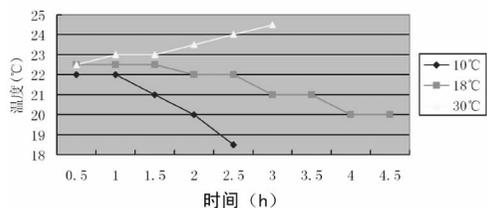


图 4 血小板运输箱在不同时间的温度(不同外环境温度)

3 讨论

由于目前国内还没有完全建立对血液运输工具控制的相

关标准, 本文主要结合工作实际和参考国外的一些验证过程及要求, 建立了对血液运输过程关键环节-温度控制的确认方法^[2-3]。由于外源性控温的血液运输工具温度较易控制和确认, 且此类运输资源有限, 除运血车外, 目前国内较多使用非电源控制的血液运输箱, 所以本文主要介绍人工控温血液运输箱温度控制的确认过程。

本文通过改变外环境温度和荷载两个变量, 检测不同时间内血液运输箱内的温度, 直到超过血液要求的运输温度为止。从图 1 和图 2 可知, 在运输箱材质和控温方式相同, 而外环境和荷载不同的情况下, 运输箱维持该血液允许温度范围的时间差异较大(4.5~8.5 h); 且当外环境温度相同, 血液(已达到保存温度)装量越多运输箱能使用的时间越长。如环境温度均为 23℃, 红细胞运输箱分别空载、装 10 袋、20 袋生理盐水时维持 2~10℃的时间分别为 5、6 和 6.5 h, 相差 1.5 h。但从图 3 和图 4 可知, 在其他条件相同的情况下, 外环境温度改变对运输时间影响最大, 当外环境温度接近血液保存温度时, 运输箱能使用的时间越长; 反之, 则越短。如在装量为 20 袋 200 mL 生理盐水, 当外环境温度在 15、23 和 30℃时, 红细胞运输箱维持红细胞允许温度范围(2~10℃)的时间分别为 8.5、6.5 和 5.5 h, 相差 3 h; 当外环境温度在 10、18 和 30℃时, 血小板运输箱维持血小板允许温度范围(20~24℃)的时间分别为 2.0、4.5 和 2.5 h; 而且时间越长, 单位时间内温度变化越快。提示在实际工作中必须在确认条件下允许的最长时间内运输(因本单位装运血箱的车均为空调车, 可以对外环境进行一定的控制, 所以本文外环境未设置极端温度)。同时, 当因某种原因需要延长运输时间时, 也主要通过适当调整运输箱所处的外环境温度来延长保持血液要求运输温度的时间。

除此之外, 作者也对血液运输箱其他方面进行了确认, 如是否抗压、光滑、整体密闭防渗漏; 是否有以下标志: 血液的品名、血液保存的温度、放置方向、最大承重量; 箱体内壁生物学检测是否未检出致病性微生物和真菌等。且对血液运输人员进行了专门的培训和考核, 合格后方可上岗。通过以上环节保证对血液运输过程有效控制。

参考文献

[1] 苏庆军, 唐茂林, 陈建国. 野战条件下血液运输冷链的维护[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 245-246.

[2] 田纳. 温度芯片在血液运输中的监测与应用[J]. 哈尔滨医药, 2010, 32(2): 44-45.

[3] 鲍红日. 临床血液运输的职责和分工探索[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(5): 73.

(收稿日期: 2011-07-07)

(上接第 2358 页)

[6] 于波海, 范艳玲, 沈伟霞, 等. 乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少症病例分析[J]. 中国自然医学杂志, 2007, 9(1): 68-69.

[7] 郭旭霞, 王立兵, 闫慧. EDTA-K₂ 致假性血小板减少分析[J]. 长治医学院学报, 2007, 21(1): 55-57.

[8] 宓庆梅, 施巍宇, 郝婉莹, 等. EDTA 依赖性假性血小板减少症一例[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(10): 7191.

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

[10] 姚新洁, 李平, 东利平, 等. 乙二胺四乙酸依赖性血小板假性减少症与自身免疫性疾病的关系[J]. 临床血液学杂志, 2008, 21(2): 75-76.

(收稿日期: 2011-05-28)