

不同离心条件和抗凝剂对凝血功能检测结果的影响

左 灿¹, 王艳兰¹, 李海英², 卿之驹^{1△} (1. 中南大学湘雅二医院检验科, 长沙 410011; 2. 湖南中医药大学第一附属医院检验科, 长沙 410007)

【摘要】 目的 探讨不同离心条件和抗凝剂对凝血功能检测结果的影响。**方法** 采用不同的离心速度和离心时间、两种不同的抗凝剂, 用 STA-R 型全自动凝血仪分别测定其凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、抗凝血酶Ⅲ活性(ATⅢ)、纤维蛋白原(Fib)、D-二聚体(D-D)和纤维蛋白(原)降解产物(FDP)。**结果** 与 3 000 r/min 离心 10 min 组测定结果比较, 除 3 000 r/min 离心 5 min 组 PT、TT、ATⅢ、Fib 的差异无统计学意义外($P>0.05$), 其余各组的凝血功能检查结果差异均有统计学意义($P<0.05$)。与枸橼酸钠抗凝血检测结果相比, 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血使 PT、APTT、TT 延长, ATⅢ活性增高($P<0.05$), 而 Fib、D-D、FDP 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 3 000 r/min 离心 10 min 为凝血功能检测的最佳离心条件, 且测定 Fib、D-D、FDP 时临床可用 EDTA-K₂ 抗凝血替代, 其余均必须使用枸橼酸钠抗凝血。

【关键词】 凝血功能; 离心条件; 枸橼酸钠; 乙二胺四乙酸二钾

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.030 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)17-2560-03

Influence of different centrifugation conditions and anticoagulants on detection results of coagulation function ZUO

Can¹, WANG Yan-lan¹, LI Hai-ying², QING Zhi-ju^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

【Abstract】 Objective To explore the influence of different centrifugal conditions and anticoagulants on the detection results of blood coagulation function. **Methods** The prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin time(APTT), thrombin time(TT), antithrombin Ⅲ (AT Ⅲ), fibrinogen(Fib), D-dimer(D-D) and fibrin degradation products (FDP) by STA-R type full automatic blood coagulation analyzer, which were detected by adopting different centrifugal speeds and time and two different kinds of anticoagulant. **Results** Compared with the detection results in the 3 000 r/min 10 min centrifugation group, the blood coagulation function test results had statistically significant differences among other centrifugal condition groups ($P<0.05$), except PT, TT, AT Ⅲ and Fib in the 3 000 r/min 5 min centrifugation group had no statistical differences($P>0.05$). Compared with the detection results of sodium citrate anticoagulation, the anticoagulation by using ethylenediamine tetraacetic acid dipotassium(EDTA-K₂) prolonged PT, APTT, TT and increased the AT Ⅲ activity($P<0.05$), while Fib, D-D and FDP had no statistical differences($P>0.05$). **Conclusion** The best centrifugal condition for blood coagulation function detection is 3 000 r/min centrifuging for 10 min, and in the determination of Fib, D-D and FDP, EDTA-K₂ anticoagulation can replace, while the others must use sodium citrate anticoagulation.

【Key words】 coagulation function; centrifugal conditions; sodium citrate; ethylenediamine tetraacetic acid dipotassium

随着现代医疗技术的进步和发展, 凝血功能检测越来越广泛地应用于临床。目前, 凝血功能已作为常规检测指标应用于患者手术前准备、抗凝药物剂量的监测、出血性疾病或血栓性疾病的初步诊断与疗效评估^[1]。而伴随着全自动凝血仪的广泛使用, 凝血功能检测变得更快、简便、准确和可靠的同时, 也使标本前处理的重要性日益突出。其中, 离心条件对凝血功能检测质量至关重要^[2]。与此同时, 由枸橼酸钠抗凝的真空采血管所造成的标本采集比例不符及血液凝固在临床上尤为常见, 而重新对患者采血不仅增加了患者的痛苦, 更耽误时间。乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝的血常规检查在临床上更为常见, 同样作为抗凝血, 其是否可用于凝血功能检测这一设想给了作者启发。本研究旨在寻求凝血功能检测的最佳离心

条件, 并以枸橼酸钠和 EDTA-K₂ 两种抗凝血对 60 例门诊随机病例进行凝血功能检测对比, 以探讨不同抗凝剂对凝血功能的检查结果是否具有影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2013 年 12 月至 2014 年 4 月在中南大学湘雅二医院门诊就诊的患者 60 例, 以 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝管采集静脉血 1.8 mL、EDTA-K₂ 抗凝管采集静脉血 2 mL, 充分混匀, 以 3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆, 并于室温下 2 h 内检测。健康志愿者 30 例, 各顺利采血 7.2 mL, 每人份血样分别放于 4 支 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝管中(每支 1.8 mL), 使抗凝剂与血液的比例为 1:9。充分混匀后, 分别以 3 000 r/min 离心 5 min, 1 000、2 000、3 000 r/min

各离心 10 min 分离血浆,并于室温下 2 h 内检测。

1.2 仪器与试剂 一次性使用真空采血管[109 mmol/L 枸橼酸钠(1:9)抗凝管和 EDTA-K₂ 抗凝管];低速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);STA-R Evolution 全自动血凝仪(法国 Diagnostic Stago 公司生产);凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、抗凝血酶Ⅲ活性(ATⅢ)、纤维蛋白原(Fib)、D-二聚体(D-D)的检测均采用该公司提供的原装配套试剂盒;纤维蛋白(原)降解产物(FDP)检测试剂由日本积水株式会社提供。

1.3 凝血功能检测 将所收集的 plasma 标本置于 STA-R 型全自动血凝仪上进行凝血功能的检测。其中,PT、APTT、TT、Fib 的检测采用凝固法,ATⅢ的检测采用发色底物法,D-D 和 FDP 的检测则采用免疫比浊法。按照标准操作规程(SOP)检测,先检测质控品,观察是否在控,然后再进行临床标本分析。

1.4 统计学处理 试验数据采用 SPSS18.0 进行统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同离心条件组之间的比较采用单因

素方差分析,两种抗凝剂的组间比较则采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同离心条件下凝血功能检测结果的比较 对 30 例健康志愿者的 4 管枸橼酸钠抗凝血以不同条件离心后,其凝血功能检测结果分析如下:相同离心速度、不同离心时间条件下,PT、TT、ATⅢ、Fib 的差异无统计学意义($P > 0.05$),APTT、D-D 和 FDP 则差异有统计学意义($P < 0.05$);而相同时间、不同离心速度的条件下,凝血功能各项检查结果的差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 两种抗凝剂凝血功能检测结果的比较 对 60 例门诊随机患者的不同抗凝血进行凝血功能检测,其结果分析如下:EDTA-K₂ 抗凝血的 PT、APTT、TT、ATⅢ均高于枸橼酸钠抗凝血($P < 0.05$),而两者 Fib、D-D、FDP 检测结果的差异则无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 1 不同离心条件凝血功能检测结果比较 ($n=30, \bar{x} \pm s$)

离心条件	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	ATⅢ(%)	Fib(g/L)	D-D($\mu\text{g/mL}$)	FDP($\mu\text{g/mL}$)
3 000 r/min 离心 10 min	12.98 \pm 0.66	38.86 \pm 4.78	15.86 \pm 0.70	104.00 \pm 4.88	2.77 \pm 0.60	1.33 \pm 0.58	5.47 \pm 2.27
1 000 r/min 离心 10min	13.58 \pm 0.71*	50.82 \pm 5.11*	16.91 \pm 0.86*	119.04 \pm 8.35*	2.33 \pm 0.49*	1.56 \pm 0.70*	5.95 \pm 2.46*
2 000 r/min 离心 10 min	13.46 \pm 0.69*	46.97 \pm 4.99*	16.38 \pm 0.78*	109.48 \pm 6.46*	2.54 \pm 0.53*	1.48 \pm 0.64*	5.79 \pm 2.38*
3 000 r/min 离心 5 min	13.11 \pm 0.69	43.36 \pm 4.91*	16.02 \pm 0.73	106.70 \pm 5.69	2.69 \pm 0.56	1.42 \pm 0.61*	5.62 \pm 2.19*

注:与 3 000 r/min 离心 10 min 测定结果比较,* $P < 0.05$ 。

表 2 两种抗凝剂凝血功能检测结果比较 ($n=60, \bar{x} \pm s$)

抗凝剂	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	ATⅢ(%)	Fib(g/L)	D-D($\mu\text{g/mL}$)	FDP($\mu\text{g/mL}$)
枸橼酸钠	13.75 \pm 2.50	44.05 \pm 12.45	20.07 \pm 7.64	91.49 \pm 14.90	3.49 \pm 1.11	2.02 \pm 0.98	7.84 \pm 2.46
EDTA-K ₂	24.80 \pm 4.28*	60.72 \pm 13.57*	36.02 \pm 8.40*	104.66 \pm 16.42*	3.40 \pm 1.03	2.08 \pm 1.01	7.93 \pm 2.41

注:与枸橼酸钠抗凝血测定结果比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

凝血功能是指机体在血管受损时所具有的,由凝血因子按照一定顺序相继激活而生成凝血酶,最终使纤维蛋白原变成纤维蛋白,而促使血液凝固的能力。凝血功能检查是判断机体止血与凝血系统病理变化、术前筛查出凝血性疾病的重要指标,是目前临床用于诊断与观察血栓形成、抗凝治疗疗效的常用检测方法,多用于术前了解患者有无凝血功能的异常,有效地防止在术中及术后出现出血不止等意外情况,从而获得最佳的手术效果^[3-4]。

PT、APTT、TT、ATⅢ、Fib、D-D、FDP 7 项凝血功能检测指标是目前临床上判断出血性疾病类型的主要诊断指标。其中,PT 主要反映外源性凝血系统的功能,可反映血浆中凝血酶原及凝血因子 V、Ⅶ、Ⅹ水平的变化,是监测口服抗凝药物疗效的首选指标^[5]。APTT 是内源性凝血因子缺乏最可靠的筛选试验,可反映血浆中凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ水平的变化,可以作为普通肝素治疗的首选监护指标^[6]。TT 主要是对血中循环抗凝物质的筛查,实际上反映了血浆中 Fib 的含量,可用于溶栓治疗的监测。ATⅢ作为丝氨酸蛋白酶抑制家族的一员,是由肝脏产生的凝血系统中最重要抗凝因子,在体内有着非常重要的抗凝调节作用^[7]。Fib 则是血浆中含量最高的一种糖

蛋白,作为重要的凝血因子,是参与止血和血栓形成的主要物质,亦可作为纤溶筛查的指标^[8]。D-D 是纤溶酶作用于交联纤维蛋白的一种特异性降解产物,是诊断活动性纤溶较好的指标,也可作为溶栓药物的治疗监测指标^[9-10]。FDP 是纤维蛋白或纤维蛋白原在纤溶酶的作用下,被分解后所产生的降解产物的总称,主要反映纤维蛋白溶解系统的功能状况。

在实际进行凝血功能检测的操作过程中,由于急诊或样本量大等,容易造成许多不规范的操作,从而引起一些系统性的误差。尤其是在某些分工合作的医院,其检测项目分工很细,通常每人只需完成某一个步骤,因此,为了保证检测结果的准确性,必须建立统一的操作规范,严格进行室内质量控制。从表 1 可知,离心条件对凝血功能的检测具有明显的影响,标本离心条件不同时,检测结果会不一致,因此,合适的离心速度和离心时间是保证凝血功能检测结果准确的必要条件。而目前,国内外基于此点的研究不在少数,但其结果报道不尽相同。高长风^[11]认为 APTT 的最适离心速度是 3 000 r/min,PT 最合适的离心速度则为 2 000 r/min;朱忠勇^[12]则推崇 PT、APTT、TT 均在相对离心速度 2 000~3 000 r/min 离心 30 min 的情况下检测。而本研究结果显示,除 PT、TT、ATⅢ、Fib 检测时 3 000 r/min 离心 5 min 和 10 min 的结果差异无统计学意义

外,其余各组的凝血功能检查结果均具有显著差异,与 Watanabe 等^[13]的报道结果一致。这说明了当离心时间过短或离心速度不够时,血浆便得不到彻底的分离,致使血浆中仍残留有部分的血小板,未达到凝血功能检测所需要的血小板血浆的水平,从而激活某些内、外源性凝血因子,导致结果偏差^[14]。一般说来,APTT 检测要求贫血小板血浆,以避免血小板活化对试验造成干扰,PT 检测的要求则相对低一些,而 TT 等的检测则并未提及具体的离心要求。综上所述,进行凝血功能检测时,应以 APTT 的离心条件为准,即 3 000 r/min 离心 10 min 应为凝血功能检测的最佳离心条件。在此前提下,严格按照标准操作规程执行,做好试验的质量控制,进而可提高检验结果的准确性和可靠性。

而目前临床上由枸橼酸钠抗凝的真空采血管所造成的抗凝剂与血液标本的比例不符、血液凝固等问题给检验工作带来了巨大困扰。其可能由临床采血时操作不甚熟练造成,主要的原因是采血不畅,尤其见于儿科、烧伤和休克等患者。为了确保试验结果的准确性,做好分析前质量控制,目前常用的处理措施是通知临床重新采集合格标本送检。但对患者进行重新采血不仅加剧了患者的痛苦,更耽误了检测的时间,极有可能造成患者病情的延误。而血常规检测作为临床诊断的基本项目之一,其使用的 EDTA-K₂ 抗凝血也最为常见,在枸橼酸钠抗凝血标本不合格的情况下,其是否可替代用于凝血功能检查为本研究的主要内容。由表 2 可知,EDTA-K₂ 抗凝血所测得的 PT、APTT、TT 和 ATⅢ与枸橼酸钠抗凝血检测结果之间的差异有统计学意义($P < 0.05$),而其 Fib、D-D、FDP 的差异则无统计学意义($P > 0.05$),与方晓琳等^[15]的研究结果一致。究其原因,不同抗凝剂对凝血功能检测结果的影响,主要是由其各自的作用机制不同所造成。血液在离体后会迅速发生变化,其中许多凝血因子变得很不稳定。枸橼酸钠作为钙离子的快速螯合剂,不仅可与血液中钙离子结合形成可溶性螯合物,从而有效地阻止血液凝固,并且能够保护 V 因子和Ⅷ因子的活性,因此 109 mmol/L 的枸橼酸钠被指定为凝血项目的专用抗凝剂^[16]。EDTA-K₂ 则主要与血液中钙离子结合成螯合物以阻止血液凝固,但对凝血因子的保护性相对较差,因此会导致 PT、APTT、TT 延长,ATⅢ活性增高,而对 Fib、D-D、FDP 的检测结果无明显影响^[17]。由此可见,临床上测定 PT、APTT、TT 和 ATⅢ时必须采用 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝,而进行 Fib、D-D 和 FDP 检测时,则可用 EDTA-K₂ 抗凝。

综上所述,影响凝血功能检测结果的因素很多,因此要求检验人员在检测的全过程中都必须予以注意。在明确各影响因素的前提下,严格按照操作规范进行检测,本着最大程度为患者着想的原则,尽量减轻患者痛苦,保证检验结果的准确性和可靠性。

参考文献

- [1] 陆明清,石展鹰,卢丹华. 凝血功能实验结果影响因素和质量控制[J]. 实用医技杂志,2010,17(2):155-156.
- [2] 董菊子,胡秦妮,杨淑娟,等. 标本放置和离心时间对 PT、

APTT 检测结果的影响[J]. 临床军医杂志,2013,41(4):400-401.

- [3] 杨辅直,李伟生,苏格妍,等. 危重新生儿凝血功能障碍与 DIC 及其适时干预的临床观察[J]. 广东医学杂志,2009,30(9):1360-1362.
- [4] Tripodi A, Caldwell SH, Hoffman M, et al. Review article: the prothrombin time test as a measure of bleeding risk and prognosis in liver disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2007, 26(2):141-148.
- [5] Jae JK, Hui NP, Jin KJ, et al. Safety and convenience of continuous warfarin strategy during the periprocedural period in patients who underwent catheter ablation of atrial fibrillation[J]. J Cardiovas Electrophysiol, 2010, 21(6):620-625.
- [6] 吴家明. 肝实质损害患者凝血、抗凝和纤溶指标检测及临床意义[J]. 临床检验杂志,2007,22(6):463.
- [7] 罗春华. 凝血功能四项、TF、ATⅢ对原发性肝癌的诊断意义[J]. 社区医学杂志,2011,9(12):3-4.
- [8] Mehrdad A, Henry A, Schnaars, et al. Determination of plasma fibrinogen concentrations in beagle dogs, cynomolgus monkeys, new zealand white rabbits, and sprague-dawley rats by using claus and prothrombin-time-derived assays[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50(6):864-867.
- [9] 黄培荣. 血液流变学与凝血功能检测对预防脑血栓的临床意义[J]. 检验医学与临床,2013,10(6):702-703.
- [10] Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AW, et al. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(2):296-304.
- [11] 高长凤. PT、APTT 试验的影响因素[J]. 现代医药卫生杂志,2005,21(24):3363-3364.
- [12] 朱忠勇. 凝血功能测定标准化[J]. 中华医学检验杂志,2006,21(5):308.
- [13] 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.
- [14] 丁立新,张晋敏,赵春娥. 影响凝血实验结果准确性因素分析[J]. 河北联合大学学报:医学版,2012,14(5):634-635.
- [15] 方晓琳,黎永新,马洁. 两种抗凝剂对凝血三项测定结果的影响[J]. 现代医院杂志,2007,7(6):79-80.
- [16] 宋红宝,徐建华,孔繁军. 血凝试验需要注意的问题[J]. 中国医药指南,2012,10(17):679-680.
- [17] 李圃. 抗凝剂差异与凝血酶原时间关系探讨[J]. 华西医学,2008,23(4):752-754.

(收稿日期:2015-03-15 修回日期:2015-04-10)