

• 个案分析 •

1 例急性白血病患者多次血小板输注无效原因分析与解决思路

屈爱春¹, 郭平^{1△}

1. 山西医科大学第一医院检验科, 山西太原 030001; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验科, 上海 200025

关键词:急性白血病; 多抗凝剂依赖的血小板假性减少; 血小板计数**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2022.03.028**中图法分类号:**R733.7**文章编号:**1673-4130(2022)03-0381-04**文献标志码:**C

血小板作为正常人外周血中最小的有形成分,在血栓和止血、伤口修复、炎症和癌症的发展中发挥着重要的生理功能^[1]。造成血小板计数减少的主要原因包括血液系统疾病引起的病理性减少^[2]及体外因素导致的假性减少^[3]。临床上对血小板计数过低的血液病患者多采取血小板输注的方法,以降低出血风险^[4]。血液病合并多抗凝剂依赖的血小板假性减少十分罕见,若未及时发现并纠正血小板计数易引发临床过度医疗。本文通过分析 1 例急性白血病患者血小板反复输注无效的原因,探寻多抗凝剂依赖情况下血小板聚集的应对策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,男,68 岁,因反复发热半月,发现全血细胞减少 10 d 前往当地医院就诊。查体:重度贫血貌,言语含糊,双下肢轻度水肿,右侧肢体肌力 4 级,余未见明显异常。完善相关检查,结合骨髓细胞形态学、分子生物学及细胞遗传学检查提示急性髓系白血病伴 BCR-ABL 基因阳性。预备接受化疗前患者血常规结果提示贫血、血小板计数减少,临床遂予以血小板输注,但效果不佳,血小板计数始终维持在 $20 \times 10^9/L$ 左右。治疗期间患者并无出血表现,为明确血小板输注无效原因至上海交通大学医学院附属瑞金医院就诊。

1.2 仪器和试剂 BC-6800 PLUS 全自动血细胞分析仪及配套试剂购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;XN-90000 全自动血细胞分析仪、SP-10 推染片机及配套试剂购自日本希森美康株式会社。0.1 g/mL 阿米卡星注射液购自上海信谊金朱药业有限公司;乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝真空采血管、枸橼酸钠抗凝真空采血管、肝素抗凝真空采血管购自碧迪医疗器械(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及制片 采集患者 EDTA-K₂、枸橼酸钠和肝素抗凝血标本,分别于采集后立即、30 min、1 h、2 h、4 h 使用推染片机制作外周血涂片,镜检观察血涂片中血小板形态及分布情况。

1.3.2 血小板估算方法 肝素抗凝标本采集后立即涂片,计数体尾交界处 20 个油镜视野下红细胞和血小板的数量。血小板估算结果 = (镜下血小板计数/镜下红细胞计数) × 血细胞分析仪红细胞计数。重复 3 次取平均值。

1.3.3 血小板计数 BC-6800 PLUS 全自动血细胞分析仪使用光学法(PLT-O 通道)进行血小板计数;XN-90000 全自动血细胞分析仪使用电阻抗法(PLT-I 通道)进行血小板计数;采用核酸荧光染色法(PLT-F 通道)进行血小板计数。

1.3.4 阿米卡星血小板解聚试验 在 EDTA-K₂ 抗凝血中加入一定量阿米卡星注射液,使终浓度达到 6.5 mg/mL。分两种方法加入。方法一:采血后立即加入,在即刻、30 min、1 h、2 h、使用仪器 PLT-I 通道及 PLT-F 通道分别计数血小板;方法二:在采血后立即、30 min、1 h、2 h 分别加入阿米卡星,混匀后静置 10 min,使用仪器 PLT-I 通道及 PLT-F 通道分别计数血小板。

不同抗凝标本在不同仪器检测通道中的血小板计数结果:在不加阿米卡星的前提下,使用仪器 PLT-I 通道、PLT-O 通道及 PLT-F 通道对 EDTA-K₂、枸橼酸钠和肝素抗凝血标本的血小板进行计数,检测时间点设为采集后立即、30 min、1 h、2 h、4 h。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件对数据进行处理和分析,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

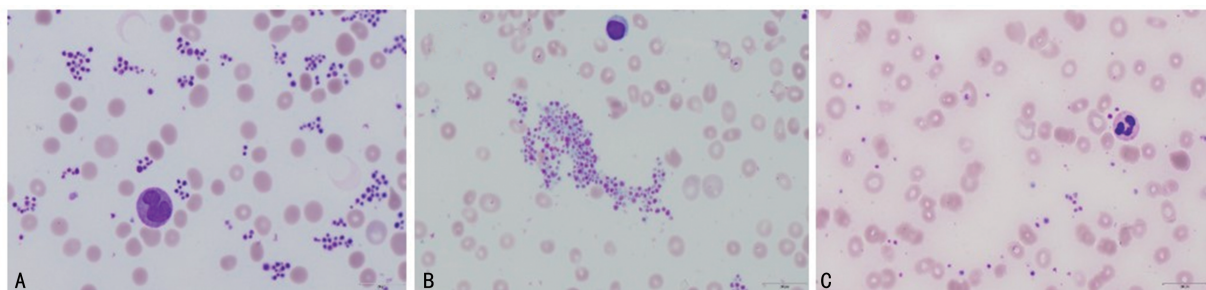
2.1 不同抗凝标本各时间点外周血涂片镜检结果

△ 通信作者, E-mail: 823400541@qq.com。

本文引用格式: 屈爱春, 郭平. 1 例急性白血病患者多次血小板输注无效原因分析与解决思路[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(3): 381-

EDTA-K₂ 与枸橼酸钠抗凝标本采集后即刻涂片,镜下可见大量血小板聚集;肝素抗凝标本采集后即刻涂片,镜下见血小板散在分布,少量聚集。30 min 后 3

种抗凝剂在各时间点均可观察到血小板成片聚集。证实患者存在多抗凝剂依赖的血小板假性减少。见图 1。



注:A 为 EDTA-K₂ 抗凝血即刻涂片镜检;B 为枸橼酸钠抗凝血即刻涂片镜检;C 为肝素抗凝血即刻涂片镜检。

图 1 不同抗凝标本外周血涂片镜检结果(×1 000)

2.2 血小板估算结果 肝素抗凝血采集后即刻涂片,计数体尾交界处 20 个油镜视野下红细胞和血小板的数量分别为 1 840 个和 386 个,仪器红细胞计数结果为 $1.64 \times 10^{12}/L$ 。根据上述公式可得血小板估算结果为 $344 \times 10^9/L$ 。重复 3 次取平均值,该患者血小板估算结果为 $340 \times 10^9/L$,略高于正常参考区间。

2.3 阿米卡星血小板解聚试验 在采血后立即加入阿米卡星,并在不同时间点使用仪器 PLT-I 通道及 PLT-F 通道进行检测,结果显示血小板计数无明显变化。在采血后不同时间点加入阿米卡星,并使用仪器 PLT-I 通道及 PLT-F 通道进行检测,结果显示血小板计数轻微升高,但低于参考区间。见表 1、2。

表 1 阿米卡星血小板解聚试验检测血小板计数结果(×10⁹/L)

| 检测通道 | 即刻 | | 30 min | | 1 h | | 2 h | |
|-------|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 方法一 | 方法二 | 方法一 | 方法二 | 方法一 | 方法二 | 方法一 | 方法二 |
| PLT-I | 4 | 4 | 9 | 15 | 10 | 28 | 12 | 38 |
| PLT-F | 14 | 14 | 8 | 39 | 8 | 62 | 8 | 65 |

2.4 不同抗凝标本仪器 PLT-I 通道、PLT-F 通道、PLT-O 通道血小板计数结果 使用仪器 PLT-I 通道进行检测,EDTA-K₂ 和枸橼酸钠抗凝标本在各时间点的血小板计数结果均明显低于参考区间;肝素抗凝标本在即刻检测时血小板计数处于参考区间内,随后逐渐下降,4 h 后稳定在参考区间下限附近。使用仪器 PLT-F 通道进行检测,各抗凝标本的血小板计数结果均高于同一时间点 PLT-I 通道检测结果,并随时间延长逐渐下降。使用仪器 PLT-O 通道进行检测,EDTA-K₂ 抗凝标本的血小板计数结果在 4 h 内均高于参考区间;枸橼酸钠抗凝标本的血小板计数结果随时间延长缓慢降至参考区间下限;肝素抗凝标本血小板计数在即刻、30 min 高于参考区间,1 h 后降至参考

区间内。PLT-O 通道 EDTA-K₂ 抗凝标本各时间点检测结果与镜下估算结果较符合。且 3 种抗凝标本的 PLT-O 通道血小板计数结果与 PLT-I 通道、PLT-F 通道相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),PLT-O 通道的血小板计数结果高于相同抗凝条件下另外两通道的计数结果。同时结果显示以健康人 EDTA-K₂、枸橼酸钠及肝素抗凝血作为对照,其血小板计数结果在不同血小板检测通道下的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、3。

表 2 不同抗凝标本仪器 PLT-I 通道、PLT-F 通道、PLT-O 通道血小板计数结果(×10⁹/L)

| 检测通道 | 抗凝剂 | 即刻 | 30 min | 1 h | 2 h | 4 h |
|-------|---------------------|-----|--------|-----|-----|-----|
| PLT-I | EDTA-K ₂ | 35 | 45 | 46 | 52 | 36 |
| | 枸橼酸钠 | 17 | 15 | 15 | 12 | 25 |
| | 肝素 | 230 | 129 | 145 | 95 | 107 |
| PLT-O | EDTA-K ₂ | 409 | 407 | 393 | 387 | 377 |
| | 枸橼酸钠 | 337 | 288 | 185 | 175 | 102 |
| | 肝素 | 409 | 343 | 308 | 293 | 241 |
| PLT-F | EDTA-K ₂ | 134 | 99 | 83 | 73 | 53 |
| | 枸橼酸钠 | 74 | 61 | 79 | 21 | 29 |
| | 肝素 | 318 | 191 | 159 | 117 | 80 |

表 3 健康对照不同抗凝标本仪器 PLT-I 通道、PLT-F 通道、PLT-O 通道血小板计数结果(×10⁹/L)

| 检测通道 | 抗凝剂 | 即刻 | 30 min | 1 h | 2 h | 4 h |
|-------|---------------------|-----|--------|-----|-----|-----|
| PLT-I | EDTA-K ₂ | 222 | 226 | 222 | 228 | 221 |
| | 枸橼酸钠 | 222 | 225 | 219 | 201 | 206 |
| | 肝素 | 229 | 230 | 217 | 212 | 202 |
| PLT-O | EDTA-K ₂ | 226 | 218 | 233 | 235 | 228 |
| | 枸橼酸钠 | 241 | 239 | 232 | 224 | 204 |
| | 肝素 | 243 | 237 | 227 | 227 | 221 |
| PLT-F | EDTA-K ₂ | 214 | 212 | 218 | 210 | 211 |
| | 枸橼酸钠 | 234 | 221 | 201 | 208 | 199 |
| | 肝素 | 234 | 212 | 208 | 197 | 193 |

3 讨 论

本研究患者因急性髓系白血病于外院就诊时血常规提示贫血伴血小板严重减少但接受血小板输注无效前来就诊。为明确血小板减少原因,顺利采集患者 EDTA-K₂、枸橼酸钠及肝素抗凝血后在不同时间点推片镜检。结果显示在 EDTA-K₂、枸橼酸钠及肝素 3 种抗凝剂的外周血涂片中均观察到了血小板聚集现象。肝素抗凝标本在即刻推片时镜下血小板以散在分布为主,根据 3 次血小板估算结果知目前患者血小板计数高于参考区间,可能与近期多次血小板输注有关。因此该患者血小板反复输注无效的原因为多抗凝剂依赖的血小板假性减少。

临床上急性白血病患者因骨髓恶性细胞克隆性增殖导致正常造血受抑,引起外周血红细胞、血小板计数降低的情况十分常见。当这类患者血小板计数过低时,往往通过接受血小板输注降低出血风险。但当血小板反复输注无效时,务必注意是否存在抗凝剂依赖的血小板假性减少这一特殊现象。该现象主要发生于 EDTA-K₂ 抗凝标本,偶见于枸橼酸钠、肝素抗凝标本^[5],多抗凝剂依赖的血小板假性减少更是罕见^[6]。在恶性肿瘤(包括血液系统肿瘤)患者中该现象的出现概率高于其他患者,但其机制还有待探索^[7]。目前公认的假说是 EDTA-K₂ 抗凝血中钙离子水平的降低、血小板膜表面电荷数量的改变及标本离体后温度的下降可能影响了血小板 GP II b/III a 复合物的构象,导致隐蔽抗原的暴露^[8]。当血液中存在与之对应的自身抗体时引起血小板的体外聚集^[9]。但枸橼酸钠及肝素依赖的血小板假性减少的原因目前尚不明确。

对于 EDTA-K₂ 依赖的血小板假性减少,目前的解决方案是改用枸橼酸钠或肝素抗凝血重新检测^[10]。但对于多抗凝剂导致的血小板聚集,需要寻找替代方案。研究显示氨基糖苷类抗菌药物阿米卡星可以在一定程度上解决该问题^[9]。但就本研究患者而言,采取同一时间点添加阿米卡星后作用不同时间或不同时间点添加阿米卡星后反应相同时间的策略都无法有效纠正血小板计数结果。SAKURAI 等^[11]在首次报道氨基糖苷类抗菌药物可阻止血小板假性减低中时注意到其研究对象入院前的血小板计数结果均正常,而血小板假性减低的现象在住院使用抗菌药物后的 4~10 d 发生。因此推测机体可能产生了针对这类抗菌药物的自身抗体并与血小板表面抗原存在交叉反应,故而引起血小板聚集。而氨基糖苷类抗菌药物的添加恰好起到中和作用。所以临床工作中使用阿米卡星并非总是有效的原因可能与患者体内是否存在针对氨基糖苷类抗菌药物的自身抗体有关,即抗体

存在时有效,抗体缺失可能无效。笔者回顾了该患者入院期间的用药情况,并未发现使用氨基糖苷类抗菌药物的记录。

传统的血细胞分析仪计数血小板的原理基于电阻抗法,即根据颗粒经过计数小孔时产生的脉冲信号数量进行计算并依据电信号的大小区分红细胞与血小板,在多数情况下使用该方法的检测结果准确可靠^[12]。但当标本中出现巨大血小板、破碎红细胞、小红细胞及冷球蛋白等干扰因素时,阻抗法血小板计数结果往往存在偏差,此时基于核酸荧光染色原理的 PLT-F 通道更适用于上述情况^[13]。但当面对多抗凝剂依赖的血小板假性减少,PLT-I 通道与 PLT-F 通道受检测原理所限无法纠正血小板计数。本研究结果显示 3 种检测模式中只有 PLT-O 通道可以纠正 EDTA-K₂ 抗凝标本血小板假性减少的计数结果,且纠正结果与镜下估算结果相近,受时间因素影响较小。PLT-O 通道解聚血小板的原理是基于加热、抑制血小板活化及高速搅拌等理化手段对血小板聚集结构的弱化作用。血小板解聚后通过荧光染色,激光检测三维分析,达到纠正血小板计数的效果。目前对 EDTA-K₂ 依赖的血小板假性减低已显示出较好的解聚效果^[14],但血液病合并的多抗凝剂依赖的血小板假性减少现仅这 1 例报道,对该病例的研究显示该方法可以取得较好的解聚效果,今后在获得更多病例数后将进一步验证该结果。

临床工作中对于血小板低于参考区间且出现血小板直方图分布异常的情况,应在排除采血原因后及时推片镜检。如镜下观察到血小板聚集应考虑抗凝剂依赖的血小板假性减少的可能。对出现血小板聚集的标本尤其是多抗凝剂依赖的血小板假性减少,如果常规手段无法解决,采用迈瑞的 PLT-O 通道进行检测或能得到更接近患者真实情况的结果,在节约医疗资源的同时避免了重新采血带来的困扰,适合在实际工作中开展。

参考文献

- [1] FRANCO A T, CORKEN A, WARE J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer [J]. *Blood*, 2015, 126(5): 582-588.
- [2] KRISHNEGOWDA M, RAJASHEKARAI AH V. Platelet disorders: an overview [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2015, 26(5): 479-491.
- [3] LEE E J, LEE A I. Thrombocytopenia [J]. *Prim Care*, 2016, 43(4): 543-557.
- [4] SOLVES ALCAINA P. Platelet transfusion: and update on challenges and outcomes [J]. *J Blood Med*, 2020, 11: 19-26.

- [5] ZANDECKI M, GENEVIEVE F, GERARD J, et al. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets [J]. *Int J Lab Hematol*, 2007, 29(1):4-20.
- [6] KOVACS F, VARGA M, PATAKI Z, et al. Pseudothrombocytopenia with multiple anticoagulant sample collection tubes [J]. *Interv Med Appl Sci*, 2016, 8(4):181-183.
- [7] OHASHI-FUKUDA N, INOKUCHI R, SATO H, et al. Poorer prognosis with ethylenediaminetetraacetic acid-dependent pseudothrombocytopenia: a single-center case-control study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(15):e674.
- [8] GRANT R A, ZUCKER M B. EDTA-induced increase in platelet surface charge associated with the loss of aggregability. Assessment by partition in aqueous two-phase polymer systems and electrophoretic mobility [J]. *Blood*, 1978, 52(3):515-523.
- [9] ZHOU X, WU X, DENG W, et al. Amikacin can be added to blood to reduce the fall in platelet count [J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(4):646-652.
- [10] 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.
- [11] 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(4):817-823.
- [12] ZHANG L, XU J, GAO L, et al. Spurious thrombocytopenia in automated platelet count [J]. *Lab Med*, 2018, 49(2):130-133.
- [13] TANTANATE C, KHOWAWISETSUT L, PATTANAPANYASAT K. Performance evaluation of automated impedance and optical fluorescence platelet counts compared with international reference method in patients with thalassemia [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(6):830-836.
- [14] DENG J, CHEN Y, ZHANG S, et al. Mindray SF-Cube technology: an effective way for correcting platelet count in individuals with EDTA dependent pseudo thrombocytopenia [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502:99-101.

(收稿日期:2021-05-11 修回日期:2021-10-10)

(上接第 370 页)

- [26] KARPISHEH V, NIKKHOO A, HOJJAT-FARSANGI M, et al. Prostaglandin E2 as a potent therapeutic target for treatment of colon cancer [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2019, 144:106338.
- [27] ECHIZEN K, HIROSE O, MAEDA Y, et al. Inflammation in gastric cancer: interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(4):391-397.
- [28] LORDAN R, TSOUPRAS A, ZABETAKIS I. The Potential role of dietary platelet-activating factor inhibitors in cancer prevention and treatment [J]. *Adv Nutr*, 2019, 10(1):148-164.
- [29] AMIRI M, YOUSEFNIA S, SEYED FOROOTAN F, et al. Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers [J]. *Gene*, 2018, 676:171-183.
- [30] JU J, WANG N, WANG J, et al. 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate inhibits proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells by independently regulating CRABP2 and FABP5 [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12:997-1008.
- [31] OHATA T, YOKOO H, KAMIYAMA T, et al. Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(5):1049-1061.
- [32] LIU G, KUANG S, CAO R, et al. Sorafenib kills liver cancer cells by disrupting SCD1-mediated synthesis of monounsaturated fatty acids via the ATP-AMPK-mTOR-SREBP1 signaling pathway [J]. *Faseb J*, 2019, 33(9):10089-10103.
- [33] KAWAGUCHI K, SENGU S, KUBOTA C, et al. High expression of fatty acid-binding protein 5 promotes cell growth and metastatic potential of colorectal cancer cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(3):190-199.
- [34] GAO Y, NAN X, SHI X, et al. SREBP1 promotes the invasion of colorectal cancer accompanied upregulation of MMP7 expression and NF- κ B pathway activation [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):685.
- [35] CARBONETTI G, CONVERSO C, CLEMENT T, et al. Docetaxel/cabazitaxel and fatty acid binding protein 5 inhibitors produce synergistic inhibition of prostate cancer growth [J]. *Prostate*, 2020, 80(1):88-98.
- [36] NI K, WANG D, XU H, et al. miR-21 promotes non-small cell lung cancer cells growth by regulating fatty acid metabolism [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:219.

(收稿日期:2021-05-08 修回日期:2021-09-15)