

PL-11 血小板聚集仪检测全血血小板聚集功能方法学评价及临床意义

吴小利, 李健, 向代军, 刘一凡, 张洪瑞, 谢尹晶, 唐红卫, 徐菡, 邸平, 王成彬



2011年毕业于大连医科大学医学检验专业, 2011年至今就读于温州医学院临床检验诊断学专业, 在解放军总医院临床检验科完成硕士课题研究, 师从王成彬教授, 主要从事血栓与止血及血小板功能相关研究。曾获辽宁省大学生科技论文挑战杯校级科技论文一等奖、省级三等奖。现已第一作者发表论文2篇。

[摘要] 目的 评价 PLT-11 血小板聚集仪电阻抗原理检测全血血小板聚集功能这一新方法的性能及临床价值。方法

①参照美国临床和实验室标准协会, (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 相关文件, 测试 PL-11 血小板聚集分析仪的日间、批内、批间的不精密度, 准确性, 携带污染率及线性性能。② 选取 2012 年 8 月至 2013 年 2 月到解放军总医院就诊的患者 100 例, 同时采用 PL-11 电阻抗法和临床比较公认的光学比浊法 (light transmittance aggregometry, LTA) 检测血小板聚集功能, 对两种方法进行相关性分析; 分析添加诱聚剂前两次检测的 PLT 的重复性, 用散点图、相关系数表示。结果 ① PL-11 电阻抗法和 LTA 法检测血小板聚集率相关性良好, $r=0.62$, $P<0.01$; ② 2 个时间点的重复性较好, PLT ($r=0.95$, $P<0.01$); ③ 各项检测的结果都符合 CLIA'88 的要求, 其中检测的高值、低值质控品的 PLT、RBC、MCV、MPV 的日间、批内、批间不精密度的 CV $<5\%$, 高值、低值的总变异系数 (coefficient of variable, CV) 分别为 PLT(3.00 & 1.68), RBC(1.63 & 2.16), MCV (1.30 & 0.75), MPV (1.40 & 1.46); RBC、PLT 的携带污染率分别为 1.16%, 1.02%, 均 $<1.5\%$; PLT 在 $40\sim 800\times 10^9/L$ 、RBC 在 $0.3\sim 6.0\times 10^{12}/L$ 的线性良好, r 均 >0.995 ; 准确性实验, 四大参数偏倚符合文件要求。结论 PL-11 血小板聚集仪电阻抗原理检测全血血小板聚集功能的性能良好, 是一种准确、可靠的检测血小板聚集功能的新方法。该仪器具有自动化程度高、操作简便、人为影响因素小等优点。

[关键词] 电阻抗原理; 评估; 血小板聚集功能; PLT

[中图分类号] R446.114.5

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-2775 (2013) 02-0355-05

Evaluation of PL-11 instrument with the principles of electrical impedance method for assessment of platelet function and description its clinical significance

Xiao-li WU^{1,2}, Jian LI¹, Dai-jun XIANG¹, Yi -Fan LIU¹, Hong-rui ZHANG¹, Yin-jing XIE¹, Hong-Wei TANG¹, Han-XU¹, Ping-Di¹, Cheng-bin WANG^{1,2*}

1 Department of Clinical Laboratory, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China

2 School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou, 325035, China

[Abstract] **Objective** The aim of this study is to evaluate the feasibility and clinical value of the PL-11 instrument with principles of electrical impedance, a new method for ADP-induced platelet aggregation detection. **Methods** This study performed on 400 samples, in which included 300 cases continuous selected from patients who came to People's Liberation Army General Hospital for treatment from August 2012 to February 2013 and had anti-platelet drugs used, and other 100 cases were from healthy persons. Intravenous blood samples anticoagulated with Sodium citrate were collected in the morning and detected within 4 hours after blood collection both by the PL-11 instrument and light transmission aggregometry (LTA) which is the gold standard methodology for assessing platelet function and make a comparison between them had been made. Using the scattergram and the correlation coefficient to analysis the repetitive of the first 2 time-points count of PLT that none ADP added. The methodology evaluation was accorded to the methods that recommended by CLSI. All statistical analysis was performed using SPSS17.0 statistical analysis software and excel and the results represented with a coefficient of variation (CV) to evaluate the intra-assay, the inter-assay,

[作者简介] 吴小利, 硕士在读。主要从事血栓与止血及血小板功能相关研究

[作者单位] 100853 北京 解放军总医院临床检验科 (吴小利, 李健, 向代军, 刘一凡, 张洪瑞, 谢尹晶, 唐红卫, 徐菡, 邸平, 王成彬); 325035 温州医学院检验医学院与生命科学学院 (吴小利, 王成彬)

[通讯作者] 王成彬, Email: wangcb301@126.com

the carry-over rate, the accuracy of the PL-11 platelet analyzer instrument. **Results** ① Agreement between ADP-induced light transmission aggregometry (LTA) and PL-11 was good ($r=0.62$, $P<0.01$). ② It had a good respective between the first 2 time-points count of PLT ($r=0.95$, $P<0.01$). ③ Its performance evaluation results was well in line with the documentation requirements. The CV of intra-assay and inter-assay was less than 5%, and the carry-over rate was less than 1.5 %, the accuracy of the PL-11 platelet analyzer was filled with the acquirement of the document and its linearity was good. **Conclusions** In this study, the laboratory capability filled with the acquirement of operating specifications. It is possible for the new instrument PL-11 with principles of electrical impedance used as a new detection method for assessing platelet function.

[Key Words] principles of electrical impedance platelet aggregation function evaluate

引言

血小板功能检测在许多血栓与止血相关疾病的临床诊断和治疗中有重要意义,在围手术期尤为重要,有时甚至危及患者的生命。临床上由于各种血小板功能检测的方法存在其缺点,目前还没有一种方法可作为血小板功能检测的金标准^[1-4],临床上比较公认的是光学比浊法(light transmittance aggregometry, LTA)检测血小板聚集功能^[5,6]。LTA检测血小板聚集功能作为“金标准”受到诸多因素(比如采血方法、药物干扰和难于标准化等)影响和方法学本身(标本量、血浆提取、血小板数量和检测时间等)的限制,临床应用尚不充分。因此,临床迫切地需要更为理想、方便的检测技术^[7]。

本实验评价的南京神州英诺华医疗科技有限公司研发的PL-11自动化血小板聚集功能检测仪,应用电阻抗原理血小板计数减低这一新方法检测全血血小板聚集功能,弥补了传统方法的不足。研究结合美国临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS)的有关文件^[8,9],对PL-11血小板聚集仪进行了系统的方法学评价,希望给临床血小板聚集功能检测提供新的检测方法和参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 PL-11血小板聚集分析仪及其配套试剂和诱聚剂ADP(南京神州英诺华医疗科技有限公司),光学血小板聚集分析仪(540VS,美国Chronolog公司)及配套试剂, Sysmex-XE2100全自动血细胞计数分析仪及配套试剂(日本希森美康公司),枸橼酸钠1:9抗凝管(美国BD公司), EDTA-K2抗凝管(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本选择 连续选取于2012年8月~2013年2月到解放军总医院就诊的患者300例以及健康

体检者和新兵体检者100例,患者年龄分布(17~93),血小板计数($69\sim 825$) $\times 10^9/L$,同一枸橼酸钠抗凝全血标本分别采用LTA、电阻抗两种方法进行检测血小板聚集功能。比较两种方法检测血小板聚集功能的相关性。采用散点图和相关系数用 r 表示。并检测添加诱聚剂前两次检测PLT计数的重复性。

1.2.2 性能评估 参照CLSI的EP5-A2、EP6-A、EP9-A、EP10-A文件推荐的方法。

1.2.2.1 不精密度

① 日间不精密度:选取EDTA-K2静脉抗凝血全血质控品(高、低值水平)各1份,用PL-11血小板聚集分析仪测试,每天重复测2次,取均值,连续20d,计算出RBC、PLT、MCV、MPV的CV%。

② 批间不精密度:选取EDTA-K2静脉抗凝血高、低值水平全血质控品各1份,用PL-11血小板聚集分析仪测试,每天上午、下午各1次,连续20d,计算出RBC、PLT、MCV、MPV的CV%。

③ 批内不精密度:选取EDTA-K2静脉抗凝血高、低值水平全血质控品各1份,用PL-11血小板聚集分析仪连续重复检测20次,计算出RBC、PLT、MCV、MPV的CV%。

1.2.2.2 准确性:参照EP9-A^[10]文件要求选取EDTA-K2抗凝全血质控品(高、中、低值水平)各1份,用PL-11血小板分析仪、Sysmex-XE2100全自动血细胞计数分析仪分别连续检测5次,以Sysmex-XE-2100全自动血细胞计数分析仪检测的结果为靶值,去平均值计算偏倚,偏倚=(测定值-靶值的绝对值)/靶值 $\times 100\%$ 。测定参数应满足1/2CLIA'88水平(PLT $\leq 12.5\%$, MPV $\leq 12.5\%$, RBC $\leq 3.5\%$, MCV $\leq 3.5\%$)。

1.2.2.3 线性:选取EDTA-K2抗凝全血质控品高值1份, Sysmex-XE2100全自动血细胞计数分析仪连续检测5次,以其平均值为理论值,标本依次稀释浓度为100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%,

5%的样本,从低到高各连续重复5次检测取均值,分析要求当天完成并记录。

1.2.2.4 携带污染率:按 CLSI EP10-A 文件要求,选取血小板计数低值($62 \times 10^9/L$)、高值($356 \times 10^9/L$)的 EDTA-K2 抗凝静脉血,高值标本连续重复测定3次,得出 H1、H2、H3;随即测低值标本,得出 L1、L2、L3。根据携带污染率计算公式: $(L1-L3) / (H3-L3) \times 100\%$, 其中的 L1、L3 及 H3、L3 两者相减所得的差取其绝对值,要求携带污染率

$<1.5\%$ 。

1.3 统计学分析

数据分析采用 SPSS17.0 统计分析软件和 Excel,所有计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 K-S 检验进行正态性检测。符合正态分布及方差齐性的计量资料两组间比较选用两独立样本 t 检验。评价线性和相关性时,用相关与回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LTA 和 PL-11 电阻抗法两种方法检测血小板聚集功能比较 两种方法相关性较好, $r=0.62$ 。

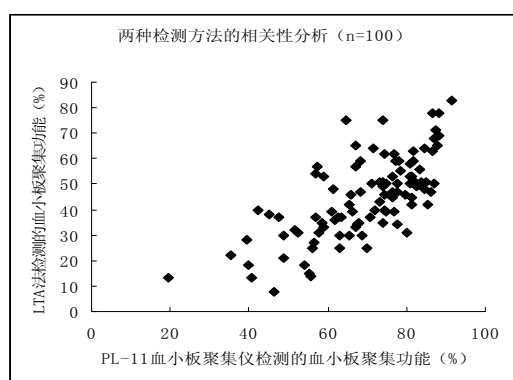


图1 LTA 和 PL-11 电阻抗法两种方法检测血小板聚集功能比较

注: 相关系数 $r=0.62$

2.2 PL-11 检测同一标本添加诱聚剂前两次 PLT 计数的重复性 两次 PLT 计数的重复性较好, $r=0.95$ 。

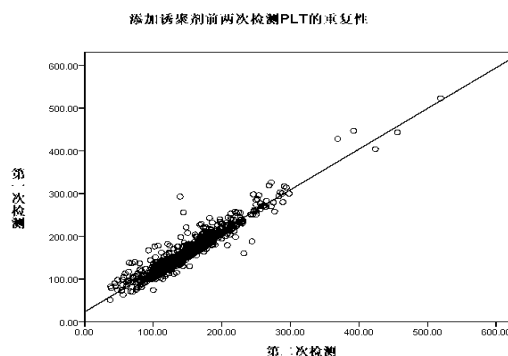


图2 PL-11 检测同一标本添加诱聚剂前两次 PLT 计数的重复性

注: PLT 的相关系数 $r=0.95$, 均 $p < 0.01$

2.3 仪器性能评估

2.3.1 不精密度 表1显示两个不同水平的质控品的批内、批间、天间及总的不精密度,测得质

控品四大参数低值和高值的均值的总变异系数(CV)均小于5%,重复性符合 NCCLS 的要求。

表1 PL-11 血小板聚集仪精密度实验结果

质控物		平均值	CV(%)			
			批内不精密度	批间不精密度	天间不精密度	总不精密度
PLT (×10 ⁹ /L)	低 值	324.05	1.60	1.73	1.86	3.00
	高 值	623.14	0.77	1.92	1.23	1.68
RBC (×10 ¹² /L)	低 值	4.56	1.14	1.69	1.22	1.63
	高 值	5.61	1.20	1.27	1.27	2.16
MCV (fL)	低 值	88.55	0.74	1.55	1.12	1.30
	高 值	94.63	0.37	0.53	0.37	0.75
MPV (fL)	低 值	10.58	1.02	1.41	1.03	1.40
	高 值	11.49	0.87	0.77	0.89	1.46

注: CLSI 的 EP5-A2 文件要求各精密度 $CV < 5\%$ 符合要求

2.3.2 准确性 准确性检测均满足 1/2CLIA'88 水平 (PLT $\leq$ 12.5%, MPV $\leq$ 12.5%, RBC $\leq$ 3.5%, MCV $\leq$ 3.5%)。(表 2)

表 2 PL-11 血小板聚集仪四大参数准确性检测结果 (n=5)

项目	PLT ($\times 10^9$ /L)	MPV (fl)	RBC ($\times 10^{12}$ /L)	MCV (fl)
靶值				
高	578.40	12.70	5.35	94.16
中	221.20	13.62	4.36	86.96
低	76.60	13.12	2.40	77.86
测定值				
高	577.00	12.42	5.36	95.60
中	224.20	13.12	4.50	88.40
低	79.00	13.18	2.44	79.60
偏倚 (%)				
高	0.24	2.22	0.15	1.53
中	1.36	3.70	3.21	1.66
低	3.13	0.43	1.75	2.23

注: 各检测均为 5 次的平均水平, 靶值为 SysmexXE-2100 全自动血细胞计数分析仪检测的结果; 测定值为 PL-11 血小板聚集仪检测的结果

2.3.3 线性 PL-11 电阻抗法检测 PLT 在 40~800 $\times 10^9$ /L (图 3)、RBC 在 0.3~6.0 $\times 10^{12}$ /L (图 4) 的线性良好, 以 PLT、RBC 理论值为 (X), 实际

值为 (Y), 相关系数 R² 分别为 0.9953、0.9994, r 均>0.995, 结果表明, 评估选用的线性范围符合 CLIA'88 规定的要求, 能满足临床实验需求。

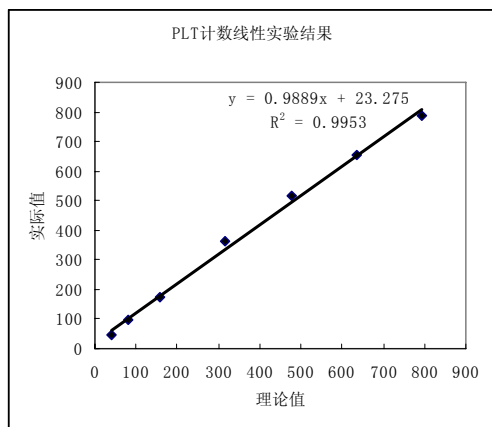


图 3 PLT 线性实验结果

注: PLT 的 R²=0.9953

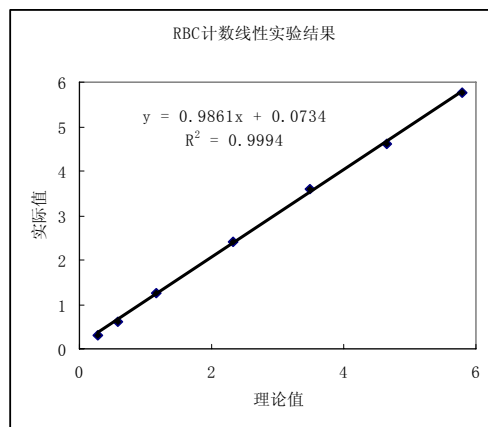


图 4 RBC 线性实验结果

注: RBC 计数的 R²=0.9994

2.3.4 携带污染率 携带污染率 (RBC: 1.16%; PLT: 1.02%), 均<1.5% (表-3), 满足 CLSI 文件

要求。

表 3 PL-11 血小板聚集仪携带污染率实验结果

项目	低值			高值			携带污染 (%)
	L1	L2	L3	H1	H2	H3	
RBC ($\times 10^{12}$ /L)	2.57	2.57	2.59	4.28	4.30	4.31	1.16
PLT ($\times 10^9$ /L)	61	63	64	355	355	358	1.02

注: CLSI 文件要求携带污染率<1.5%, 计算公式: (L1-L3) / (H3-L3) $\times$ 100%

3 讨论

我国医疗人员工作量大、时间长,很多手工实验不能作为急诊甚至常规项目,只能作为特殊检查即局限于周一至周五日间检测。这给医生诊治带来不便甚至导致临床不良事件发生。因此把特殊项目转变成常规项目显得非常重要。

传统血小板聚集功能检测多采用比浊法(light turbidimetric aggregometry, LTA),它是比较公认、临床应用最广泛的检测方法^[5,6]。通过记录富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)加入血小板激活剂后透光度的变化判断血小板聚集程度。但其人工处理耗时长、步骤繁琐,对人员专业要求高,不能满足常规检测的需求。

通过方法学评价,我们认为PL-11电阻抗原理检测全血血小板聚集仪的方法与现有文献报道方法比较有以下特点。①方法稳定:PL-11电阻抗原理检测的低值和高值质控品的批内、批间、日间及总变异均小于5%,在临床可接受范围内。②准确性较好:结合NCCLS文件,与参考方法比较,其准确性在临床可接受范围内,表明该法具有较高的准确度。③线性范围较宽:PLT在 $40 \sim 800 \times 10^9/L$ 、RBC在 $0.3 \sim 6.0 \times 10^{12}/L$ 的线性良好,满足多数临床样本检测要求。④交叉污染小:RBC和PLT的携带污染率均低于1.5%。⑤自动化程度高:全血上机即刻检测。⑥测定速度快:单一测定时间仅需10min,可进行批量检测。⑦样本用量少:仅需500ul全血样本。⑧操作简便易行:不需要人工特殊处理。⑨复测方便:同一标本可进行多次复测($n \leq 5$),不需要额外抽血,避免了门诊、正在手术或准备手术的患者丢失药物或其他必要的时间监测靶点,减少不良临床事件发生。⑩能够应用于急诊、常规检查:自动化、耗时短,所用标本为全血标本不需人工特殊处理上机即刻检测,能使病人和临床医生快速取得检测结果,为临床诊断治疗取得即刻信息。⑪标准化:PL-11血小板聚集仪由于其能够自动化,便于实验室标准化管理和日常质量控制,其参考价值较大,具有较好的可信性。

该方法检测全血标本,优点在于更好的模拟体内血小板聚集的环境。除根据血小板数量变化计算血小板聚集率外还能够提供RBC、PLT、MCV、MPV四大参数,可以帮助判断血小板聚集功能异常的原因,并提示下一步针对性检查,如

小红细胞,大、小血小板,血小板异常减少、增多等因素的影响。

实验通过与LTA法检测结果比较发现,两种方法相关性较好, $r=0.62$ 。由于血小板聚集功能检测自身重复性不是很好,而是在一定范围内变化^[11,12],而且两种方法原理、标本类型不一致,还受到仪器、试剂等的影响,不难发现PL-11仪的电阻抗原理检测血小板聚集功能,在一定的基础上,能满足临床诊断的要求。

研究中,整个实验操作都由一个人完成,减少了随机误差,检测结果的准确性、精密度和稳定性亦远高于传统的手工方法满足临床实验室要求,便于实验室质量控制。与传统方法比较,PL-11电阻抗原理检测血小板聚集功能有准确、快速、简便、自动化等优势,值得临床推广应用。后续研究中,我们将建立实验室的多个诱聚剂的健康人生物参考区间,并进一步详细的研究PL-11血小板聚集仪在各类疾病中的应用价值。

【参考文献】

- [1] Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, *et al.* Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50: 1822-1834.
- [2] Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, *et al.* Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51: 1404-1411.
- [3] Schafer A, Weinberger S, Flierl U, *et al.* ADP-induced platelet aggregation frequently fails to detect impaired clopidogrel-responsiveness in patients with coronary artery disease compared to a P2Y₁₂-specific assay. *Thromb Haemost*, 2008, 100: 618-625.
- [4] Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, *et al.* Comparison of methods to evaluate clopidogrel mediated platelet inhibition after percutaneous intervention with stent implantation. *Thromb Haemost*, 2009, 101: 333-339.
- [5] Bal Dit Sollier C, Berge N, Boval B, *et al.* Functional variability of platelet response to clopidogrel correlates with P2Y₁₂ receptor occupancy. *Thromb Haemost*, 2009, 101: 116-122.

(下接P354)

CA153、CYFRA、NSE 八项同时检测, 由于除 CEA、CA72-4、SF 之外其他肿瘤标记物特异性差、灵敏度低等缺点, 临床意义并没有达到目前的诊断需求; 再者国内肿瘤标记物检测以化学发光法为主流, 其准确性高、稳定性好、灵敏度高等优点, 但仪器和试剂通常进口, 费用昂贵, 普通患者难以接受, 寻求最少的项目组合但又最大限度地保证其诊断的高准确度和灵敏度是需要临床医生考虑的。笔者认为 CEA、CA72-4、SF 是诊断结肠癌肿瘤标记物较佳的诊断需求。

本文通过计算阳性似然比 CEA、CA72-4、SF 联合检测大大提高结肠癌疾病的诊断价值, 提高了灵敏度和阳性率(78.78%), 特异性也高达 76.55%。尤其联合检测明显高于对照疾病组和健康体检组, 因此可以鉴别其它恶性肿瘤疾病, 早期预测结肠癌的发生, 早发现早诊断。联合检测探究其在结肠癌应用和诊断价值还有待继续临床观察, 其意义还需在临床实践中得以体现, 并以此能给同行带来新的研究视点和方向,

并相互交流。

【参考文献】

- [1] 方玲, 沈庆茂, 顾向明, 等. 肿瘤标志物联合检测对常见恶性肿瘤的筛查作用. 检验医学与临床, 2008, 5(3): 581-582.
- [2] 杨昊, 张帆, 周萍, 等. 联合检测血清 AFP、CEA、CA199 对消化系统恶性肿瘤的诊断价值. 实用预防医学, 2007, 14(2): 296-298.
- [3] 吴健雄, 余宏超, 邵永孚. CEA 和 CA242 在大肠癌诊断中的意义. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(6): 438-440.
- [4] 余捷凯, 杨美琴, 姜铁军, 等. 血清肿瘤标志物优化组合人工神经网络模型在大肠诊断中的应用. 浙江大学学报(医学版), 2004, 33(5): 407-410.
- [5] 宋英明, 连长江, 席鑫. 多肿瘤标志物蛋白芯片在结肠癌诊断中的应用研究. 2012, 26(1): 34-38.

(上接P359)

- [6] Matetzky S, Fefer P, Shenkman B, et al. Effectiveness of reloading to overcome clopidogrel nonresponsiveness in patients with acute myocardial infarction. Am J Cardiol, 2008, 102: 524-529.
- [7] Tantry US, Gurbel A. Assessment of oral antithrombotic therapy by platelet function testing. Nat Rev Cardiol, 2011, 8: 572-579.
- [8] CLSI. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline. Document EP5 -A2. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- [9] NCCLS. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods, approved guideline. 2nd ed. Document EP10-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002.

- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples: approved guideline. 1st ed. Document EP9-A. Wayne:NCCLS, 1995.
- [11] Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? Platelets, 2005, 16: 151-158.
- [12] Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, et al. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. J Thromb Haemost, 2008, 6: 677-683.