

临床研究

PFA P2Y 评价服用氯吡格雷的老年心血管病患者的血小板功能

田奎朋¹, 关杰², 蔡力力¹, 李玉茹¹, 邓新立¹, 刘庆艳³, 郑本献⁴, 丛玉隆¹¹解放军总医院南楼检验科, 北京 100853; ²北京大学第一医院检验科, 北京 100034; ³解放军总医院心血管内科, 北京 100853; ⁴中国人民解放军装备发展部第六十一研究所门诊部, 北京 100141

摘要:目的 通过与两种常见的血小板功能检测方法的比较,评价血小板功能分析仪PFA-200的一种新的检测方法监测老年心血管病患者氯吡格雷治疗的应用价值。**方法** 选取2016年3月~8月解放军总医院心内科病房服用氯吡格雷的老年心血管病患者56例,并征集健康志愿者85例,使用PFA P2Y、光学比浊法(LTA)和血栓弹力图(TEG)同时检测所有受试者的血小板功能,评价PFA P2Y分别与LTA和TEG的相关性、符合率。**结果** PFA P2Y vs LTA($r=-0.701, P<0.001$); PFA P2Y vs TEG($r=0.475, P<0.001$)。PFA P2Y vs LTA的符合率为75%, $\kappa=0.434(P=0.001)$; PFA P2Y vs TEG的符合率为67.9%, $\kappa=0.242(P=0.046)$ 。以LTA的MAR_{ADP}(ADP诱导的最大血小板聚集率)>50%作为实验室氯吡格雷抵抗标准,作ROC曲线,得PFA P2Y的cut-off值为119s(AUC 0.733,灵敏度75.6%,特异度73.3%)。**结论** PFA P2Y与LTA具有较好的相关性和符合率,与TEG的相关性和符合率较差。PFA P2Y可用于监测老年心血管病患者氯吡格雷治疗, cut-off值为119 s,但与临床缺血事件的相关性还有待进一步确认和研究。

关键词: PFA-200; PFA P2Y; 光学比浊法; 血栓弹力图; 氯吡格雷

Evaluation of PFA P2Y assay in monitoring platelet function in elderly patients with cardiovascular disease receiving clopidogrel treatment

TIAN Kuipeng¹, GUAN Jie², CAI Lili¹, LI Yuru¹, DENG Xinli¹, LIU Qingyan³, ZHENG Benxian⁴, CONG Yulong¹¹Department of Clinical Laboratory in South Building, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; ²Department of Clinical Laboratory, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; ³Department of Vasculocardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; ⁴61st Research Institute Clinic of Equipment Development Department of PLA, Beijing 100141, China

Abstract: Objective To evaluate the value of a new platelet function test PFA P2Y (PFA-200) in monitoring clopidogrel treatment for cardiovascular disease in elderly patients. **Methods** Fifty-six elderly patients receiving clopidogrel therapy in the Department of Cardiology of General Hospital of PLA from March to August in 2016 and 85 healthy volunteers were recruited for analysis. All the subjects underwent PFA P2Y, LTA (light transmittance aggregometry) and TEG (Thromboelastograph) tests, and Spearman correlation coefficients were used to test the associations between test results. The agreement among the 3 platelet function test methods was assessed using Cohen's kappa coefficient. **Results** Correlation coefficient (r) was $-0.701 (P<0.001)$ between PFA P2Y and LTA, and $0.475 (P<0.001)$ between PFA P2Y and TEG. The agreement was 75% between PFA P2Y and LTA and 67.9% between PFA P2Y and TEG. The κ value was 0.434 ($P=0.001$) between PFA P2Y and LTA and 0.242 ($P=0.046$) between PFA P2Y and TEG. With ADP-induced maximum platelet aggregation rate of LTA >50% as the laboratory clopidogrel resistance, the cut-off value of PFA P2Y was 119 s (AUC=0.733) with a sensitivity of 75.6% and a specificity of 73.3%. **Conclusion** PFA P2Y has a moderate correlation and agreement with LTA, but has a poor correlation and agreement with TEG. PFA P2Y can be useful for assessing the effects of clopidogrel therapy and the association of the cut-off value (119 s) with the long-term clinical ischemic events needs be confirmed in further study.

Keywords: PFA-200; PFA P2Y; light transmittance aggregometry; thromboelastography; clopidogrel

PFA-200 是一种血小板功能床旁检测分析仪(POCT),已经被国外临床和科研工作者广泛应用于抗血小板药物的监测^[1-3]。其工作原理是:模拟体内血管损伤时,血小板在高剪切应力下的粘附和聚集过程^[4-5],血小板在高剪切应力作用下被激活,释放颗粒并粘附在

生物薄膜表面,聚集成血栓,阻塞生物薄膜上的孔道,结果记录为孔道封闭时间(Clots Time, CT)^[6-7]。PFA-200 共有3种检测模式:Col/EPI、Col/ADP和PFA P2Y,前二者应用于阿司匹林的监测,但无法用于监测氯吡格雷的治疗^[8-10],而PFA P2Y是一种新近研发的用于氯吡格雷治疗监测的方法,目前有关PFA P2Y的临床研究较少,尤其与作为血小板功能检测方法“金标准”的光学比浊法(LTA)和国内常用的血栓弹力图方法(TEG)之间

收稿日期:2017-01-09

作者简介:田奎朋,在读硕士研究生,E-mail: tiankuipeng@163.com

通信作者:丛玉隆,教授,博士生导师,E-mail: yulongc@263.net

的对比研究罕见。本研究通过比较PFA P2Y与LTA和TEG同时监测服用氯吡格雷的老年心血管病患者的血小板功能,评价PFA P2Y的临床应用价值。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取2016年3~8月解放军总医院心内科病房的老年患者56例(男性91.1%)为试验组,年龄86.5(77.5~91.0)岁,体质指数(BMI)为24.06±3.73。其中34例既往冠状动脉造影明确诊断冠心病,入院前规律服用单种抗血小板药物—氯吡格雷(波立维)75 mg/d,>12个月,入院维持75 mg/d治疗;22例既往诊断急性冠脉综合征(包括ST段心肌梗死、非ST段抬高性心梗死和不稳定性心绞痛),入院前规律服用氯吡格雷(波立维)75 mg/d,>12个月,入院后联合阿司匹林(拜耳)100 mg/d,服用时间>3 d。另入选85例(男性54.1%)表观健康志愿者为对照组,年龄26.0(25.0~27.0)岁,BMI为21.85±2.70,排除患有其他急慢性疾病、正在服用已知任何对血小板功能有影响的药物、吸烟或者怀孕者。所有受试者均满足血小板计数>100×10⁹/L,红细胞比容>0.3,并对本课题知情同意。

1.2 仪器与试剂

PFA-200血小板功能分析仪(德国SIEMENS)及配套的INNOVANCE® PFA P2Y试剂盒;CRONO-LOG Model 700血小板聚集仪(美国CHRONO-LOG)及ADP试剂(1 mmol/L);Thrombelastograph分析仪(美国Haemoscope)及配套试剂和一次性测试杯;SYSMEX XN-3000血细胞分析仪(日本Sysmex)及配套试剂;Thermo IEC CL40离心机(美国Thermo)。真空采血管(2.7 mL的3.2%枸橼酸钠抗凝管,4.0 mL的肝素锂抗凝管,2.0 mL的EDTA抗凝管,美国BD)。

1.3 标本采集

所有老年患者均于清晨5:30~6:30一次性采集肘静脉血4管:2管3.2%枸橼酸钠抗凝血(1管用于PFA P2Y检测和TEG检测,1管用于LTA检测),1管肝素锂抗凝血(用于TEG检测),1管EDTA抗凝血(用于血常规检测)。所有健康志愿者均于早晨8:00~10:00一次性采集与老年患者相同的肘静脉血4管,并进行相同检测。所有受试者采集得到的标本均于室温下存放,并在4 h内完成检测。

1.4 仪器测定

1.4.1 PFA P2Y 使用PFA-200血小板功能分析仪及配套的INNOVANCE® PFA P2Y试剂盒,严格按照配套说明书进行操作。实验结果记为CT(单位秒,s)。任何大于300 s的结果在仪器上会显示为“non-closure”,为了

方便统计,我们把结果—“non-closure”记录为300 s。

1.4.2 LTA 使用CRONO-LOG Model 700血小板聚集仪进行检测。800 r/min(120×g)、5 min和4000 r/min(850×g)、8 min离心分别得到500 μL的富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)和乏血小板血浆(platelet poor plasma, PPP)。以PPP为参照,在PRP中加入5 μL 1 mmol/L ADP(二磷酸腺苷,终浓度10 μmol/L)诱导血小板聚集。透光度改变的最大值记为最大血小板聚集率(MAR),并用百分数表示。

1.4.3 TEG 使用Thrombelastograph分析仪的3个检测通道:CK通道,A通道和ADP通道,并严格按照制造商提供的说明书进行操作。结果为血小板抑制率(IPA),并用百分数表示:IPA=(MA_{ADP}-MA_{fibrin})÷(MA_{thrombin}-MA_{fibrin})×100%。

1.5 统计学分析

正态分布资料以均数±标准差表示,偏态分布资料以中位数(Q1-Q3)表示。两组服从正态分布的独立样本资料之间的比较,总体方差相等采用独立样本的t检验,若总体方差不等则采用t'检验;两个来自非正态总体的独立样本的比较采用Wilcoxon秩和检验。两组结果的相关性采用Pearson线性相关分析,3种仪器测量结果之间的两两比较采用Cohen's kappa一致性检验。以上均采用双侧检验,P<0.05认为有统计学差异。使用统计软件SPSS17.0进行统计学分析,作图采用绘图软件GraphPad Prism 5。

2 结果

2.1 三种方法检测血小板功能的比较

PFA P2Y、LTA和TEG 3种检测方法均显示,服用氯吡格雷的老年心血管病患者血小板功能与健康受试者相比,结果有统计学差异(P<0.001,表1)。

表1 老年患者和健康志愿者3种血小板功能检测方法结果对比
Tab.1 Comparison between elderly patients and healthy volunteers in the three platelet function test methods

Platelet function test	Elderly patients	Healthy volunteers	P
PFA P2Y CT (S)	138.00 (73.75-233.00)	63.00 (57.00-72.50)	<0.001
LTA (Aggregation %)	52.18±24.00	77.24±7.49	<0.001
TEG (Inhibiton %)	43.66±14.31	17.43±10.52	<0.001

2.2 氯吡格雷抵抗率

Agarwal等^[1]建议,LTA的MAR_{ADP}>50%被认为服用氯吡格雷抵抗,IPA_{ADP}(TEG检测中ADP诱导的血小板抑制率)<30%被认为服用氯吡格雷抵抗。本研究以

LTA的 $MAR_{ADP}>50\%$ 作为实验室氯吡格雷抵抗标准,作PFA P2Y的ROC曲线(图1),cut-off值为119 s,AUC 0.733(0.549~0.916,95% CI, $P=0.008$),灵敏度75.6%,特异度73.3%。因此,PFA P2Y、LTA和TEG检测老年心血管病患者的血小板功能得到的氯吡格雷抵抗率分别为37.5%(21/56)、26.8%(15/56)和19.6%(11/56)。

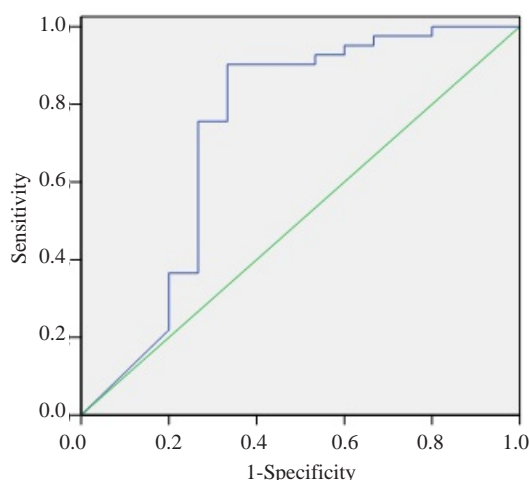


图1 以LTA的 $MAR_{ADP}>50\%$ 作为实验室氯吡格雷抵抗标准,作PFA P2Y的ROC曲线

Fig.1 ROC curve for PFA P2Y to differentiate clopidogrel resistance ($MAR_{ADP}>50\%$ for LTA) from others.

2.3 相关性分析

对所有受试者作不同方法结果间的相关性分析($n=141$),PFA P2Y vs LTA($r=-0.701$, $P<0.001$),PFA P2Y vs TEG($r=0.475$, $P<0.001$),TEG vs LTA($r=-0.712$, $P<0.001$)。

2.4 一致性分析

根据不同方法的cut-off值,对老年心血管病患者作不同方法间一致性检验($n=56$),PFA P2Y vs LTA的符合率为75%, $\kappa=0.434$ ($P=0.001$);PFA P2Y vs TEG的符合率为67.9%, $\kappa=0.242$ ($P=0.046$);TEG vs LTA的符合率为75%, $\kappa=0.304$ ($P=0.020$)。

3 讨论

氯吡格雷作为一种抗血小板药物在血栓性疾病治疗中起重要作用。理论上,临床医生可通过监测血小板功能调整个体化的抗血小板治疗方案,使患者获益,降低缺血事件和出血事件风险^[12]。因此,选择适宜的血小板功能检测方法尤显重要。相比于我国临床实验室常用的LTA和TEG,存在繁琐、费时、缺少标准化等问题^[13-14],血小板功能检测仪PFA-200具有操作简便、检测时间短、检测样本量少等优点^[9,15]。其新近开发PFA P2Y检测方法用于氯吡格雷治疗监测。我们的研究比较了PFA P2Y和LTA、TEG对老年心血管疾病患者的氯吡

雷治疗监测。

在本研究中,3种血小板功能检测方法结果在服药患者与健康对照两组之间均有统计学差异,显示PFA P2Y与LTA和TEG一样^[16-17]均能反映氯吡格雷的抗血小板作用。Jacek等^[18]的研究中,服药患者组为PCI术后服用双抗(阿司匹林和氯吡格雷)的患者,对照组为50名健康志愿者,PFA P2Y检测显示两组间血小板功能比较有统计学差异。尽管与Jacek等的研究中服药患者组纳入标准不同,但可以明确PFA P2Y可用于监测服用氯吡格雷患者的血小板功能变化。

LTA是Born于20世纪60年代设计并最早应用于临床检测血小板功能缺陷和抗血小板药物监测的工具,至今依然被认为是血小板功能检测的“金标准”。LTA的检测结果(AA、ADP诱导的血小板聚集率)被证实与ACS和SCAD患者的缺血事件的发生相关;而检测结果显示有抗血小板药物抵抗的ACS患者,主要不良心血管事件的发生风险也会增加^[19]。本研究以LTA的 $MAR_{ADP}>50\%$ 作为实验室氯吡格雷抵抗的标准,作PFA P2Y的ROC曲线,得到的cut-off值为119 s。制造商提供的PFA P2Y较宽泛的临界值是106 s,用于分析准确性、报告快速解读,但应用的临床意义并不明确^[9]。Kim等^[1]的研究以CYP2C19基因多态性检测中的PM(弱代谢)型作为氯吡格雷抵抗标准,作PFA P2Y的ROC曲线,得cut-off值为141 s(AUC 0.704,灵敏度70%,特异度76.6%),并认为141 s适于区分氯吡格雷抵抗和起效的患者,而106 s更适用于区分氯吡格雷服药的患者和不服用氯吡格雷的健康人群。本研究中119 s也大于106 s,但小于Kim的研究结果。因为LTA方法反映的是血小板聚集功能的宏观表型改变,而CYP2C19基因多态性是检测患者是否携带功能丢失的CYP2C19等位基因,但由于氯吡格雷为无活性的药物前体,其肝脏代谢是一个多步骤、多基因参与的过程,因此可能导致与本研究的结果存在差异。PFA P2Y的cut-off值仍需要进一步验证。

本研究中,PFA P2Y与LTA存在较好的符合率(75%)和相关性($r=-0.701$, $P<0.001$),虽然二者样本类型及检测原理不同,PFA P2Y利用全血检测,LTA通过富血小板血浆的光学透光度改变来评估血小板功能,但证实了PFA P2Y监测氯吡格雷治疗的价值。而PFA P2Y与TEG虽均采用全血样本进行检测,且二者均利用血液凝固的全血过程进行分析,但在本研究中,PFA P2Y与TEG的符合率较差(67.9%),相关性也较差($r=0.475$, $P<0.001$)。有文献证实,很多因素(如年龄、性别、血小板计数、C蛋白等)可以影响Col/EPI和Col/ADP及TEG的检测结果^[3,20-22]。任军伟等^[23]的研究也发现TEG的检测结果对于个体的测量结果差异较大。目

前虽无研究探讨PFA P2Y是否受以上因素影响,但无法排除因全血样本的影响而导致了PFA P2Y与TEG的相关性较差。但可以肯定的是,氯吡格雷口服后经肝脏P450酶氧化生成活化的硫醇代谢物,特异性的与血小板表面的P2Y₁₂受体结合而发挥抗血小板作用。TEG采用ADP作为激活剂评估氯吡格雷的抗血小板作用,ADP不仅激活了P2Y₁₂受体通路,还可以激活P2Y₁受体通路,引起血小板聚集^[14]。而PFA P2Y包含ADP和前列腺素E₁(PGE₁)两种物质^[24]。理论上PGE₁可以抑制ADP激活的P2Y₁受体通路,但不影响ADP激活P2Y₁₂受体通路使血小板聚集,提高了检测结果的特异性。

综上所述,PFA P2Y与LTA在方法学比较上相关性和符合率较好,但PFA P2Y与TEG的相关性和符合率较差。PFA P2Y可用于监测氯吡格雷治疗,cut-off值为119 s,但与临床缺血事件相关性尚需进一步确认和研究。

参考文献:

- [1] Kim H, Kim Y, Koh YS, et al. Evaluation of the innovance PFA P2Y assay and its association with CYP2C19 genotypes [J]. *Platelets*, 2015, 26(2): 148-53.
- [2] Li S, Choi JL, Guo LZ, et al. Correlation between the CYP2C19 phenotype status and the results of three different platelet function tests in cardiovascular disease patients receiving antiplatelet therapy: an emphasis on newly introduced platelet function analyzer-200 P2Y test [J]. *Ann Lab Med*, 2016, 36(1): 42-8.
- [3] Mulliez SM, Hallaert G, Van Roost D, et al. Influence of platelet clumps on platelet function analyser (PFA)-200[®] testing [J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37(5): e103-5.
- [4] Linnemann B, Schwonberg J, Rechner AR, et al. Assessment of clopidogrel non-response by the PFA-100 system using the new test cartridge innovance PFA P2Y [J]. *Ann Hematol*, 2010, 89(6): 597-605.
- [5] Le Quellec S, Bordet JC, Negrier C, et al. Comparison of current platelet functional tests for the assessment of aspirin and clopidogrel response. A review of the literature [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 116(4): 638-50.
- [6] Scavone M, Germanovich K, Femia EA, et al. Usefulness of the innovance PFA P2Y test cartridge for the detection of patients with congenital defects of the platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate [J]. *Thromb Res*, 2014, 133(2): 254-6.
- [7] Jang J, Lim J, Chang K, et al. A comparison of innovance[®] PFA P2Y and verifynow P2Y₁₂ assay for the assessment of clopidogrel resistance in patients undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *J Clin Lab Anal*, 2012, 26(4): 262-6.
- [8] Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, et al. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review [J]. *Am Heart J*, 2007, 153(2): 175-81.
- [9] Rechner AR. Platelet function testing in clinical diagnostics [J]. *Hamostaseologie*, 2011, 31(2): 79-87.
- [10] Edwards A, Jakubowski JA, Rechner AR, et al. Evaluation of the innovance PFA P2Y test cartridge: sensitivity to P2Y₁₂ blockade and influence of anticoagulant [J]. *Platelets*, 2012, 23(2): 106-15.
- [11] Agarwal S, Coakley M, Coakley M, et al. Quantifying the effect of antiplatelet therapy: a comparison of the platelet function analyzer (PFA-100) and modified thromboelastography (mTEG) with light transmission platelet aggregometry [J]. *Anesthesiology*, 2006, 105(4): 676-83.
- [12] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 抗血小板治疗中国专家共识 [J]. *中华心血管病杂志*, 2013, 41(3): 183-94.
- [13] Sambu N, Curzen N. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 72(4): 683-96.
- [14] Yao Y, Zhang JH, Tang XF, et al. Head to head comparison of two point-of-care platelet function tests used for assessment of on-clopidogrel platelet reactivity in Chinese acute myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(19): 2269-74.
- [15] Chen F, Maridakis V, O'Neill EA, et al. A randomized clinical trial comparing point-of-care platelet function assays and bleeding time in healthy subjects treated with aspirin or clopidogrel [J]. *Platelets*, 2012, 23(4): 249-58.
- [16] 关杰, 任军伟, 朱远, 等. 光学比浊法与连续血小板计数法监测血小板聚集功能的比较 [J]. *解放军医学院学报*, 2013, 35(8): 838-41.
- [17] Karon BS, Tolan NV, Koch CD, et al. Precision and reliability of 5 platelet function tests in healthy volunteers and donors on daily antiplatelet agent therapy [J]. *Clin Chem*, 2014, 60(12): 1524-31.
- [18] Golański J, Syska K, Chizynski K, et al. Changes in response to clopidogrel therapy in patients after percutaneous coronary interventions as assessed by different platelet function tests [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2016, 126(9): 653-61.
- [19] Paniccia R, Priora R, Liotta AA, et al. Platelet function tests: a comparative review [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2015, 11(5): 133-48.
- [20] Tsantes A, Ikonomidis I, Papadakis I, et al. Evaluation of the role of the new innovance PFA P2Y test cartridge in detection of clopidogrel resistance [J]. *Platelets*, 2012, 23(6): 481-9.
- [21] Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction [J]. *J Lab Clin Med*, 2001, 138(3): 152-63.
- [22] 张龙, 张海滨, 郭金成, 等. 冠心病患者血栓弹力图影响因素的相关性分析 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 15(3): 348-50.
- [23] 任军伟, 张艳萍, 丛玉隆, 等. 血栓弹力图与光电比浊法检测氯吡格雷抗血小板功能 [J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 27(6): 48-50, 51.
- [24] Mcglasson DL, Shah AD, Fritsma GA. Ability of the innovance PFA P2Y system to detect clopidogrel-induced ADP receptor blockade in preangioplasty individuals [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2011, 22(7): 583-7.

(编辑:孙昌朋)