

PSEUDOTROMBOCITOPENIJA UZROKOVANA SA EDTA

ANITA MUJAKIĆ*

EDTA-ovisna pseudotrombocitopenija (EDTA-PTCP) uobičajena je laboratorijska pojava s prevalencijom koja se kreće od 0,1-2%. Oko 0,1% zdravih osoba posjeduje EDTA-ovisne aglutinine koji dovode do sljepljivanja trombocita ili adhezije na neutrofile i do lažne trombocitopenije. Ova reakcija je posljedica prirodno nastalih trombocitnih autoantitijela usmjerenih na trombocitni membranski glikoprotein. Kada se posumnja na EDTA ovisnu pseudotrombocitopeniju potrebno je kao antikoagulans upotrijebiti natrijum citrat. Unatoč svojoj neškodljivosti, EDTA-PTCP često dovodi do dugotrajnih, skupih i čak invazivnih dijagnostičkih ispitivanja. EDTA-PTCP se često zanemaruje jer se mrlje krvi ne ocjenjuju vizualno u rutinskoj praksi, a histogrami kao i upozoravajuće oznake hematoloških analizatora nisu pravilno interpretirani. Kod bolesnika kod kojih se nađe trombocitopenija potrebno je napraviti razmaz krvi radi diferenciranja mogućih trombocitopenija od pseudotrombocitopenija. Uzorkovanje krvi od strane medicinske sestre i poznavanje standarda rada utječe na kvaliteta uzorka, koja je ovisna o pravom volumenu krvi i rukovanju epruvetom nakon vađenja krvi.

Deskriptori: PSEUDOTROMBOCITOPENIJA, ETILENDIAMINTETRAOCTENA KISELINA (EDTA)

UVOD

Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) je poliprotionska kiselina koja je sposobna helatirati ili složiti metalne ione, uključujući kalcij, u 1:1 kompleksima. Zbog ovog svojstva, spoj se široko koristi u laboratorijskoj medicini u tri formulacije soli, tj. Na_2EDTA , K_2EDTA i K_3EDTA . Međunarodno vijeće za standardizaciju u hematologiji (ICSH) trenutno se zalaže za upotrebu K_2EDTA za hematološka ispitivanja i ova je preporuka priznata i široko rasprostranjena u većini europskih zemalja

i u Japanu, dok se K_3 Formulacija EDTA i dalje široko koristi u SAD i Velikoj Britaniji (1). Dodatna prednost bivše formulacije je dostupnost u "sprej" osušenom obliku, koji drastično smanjuje pristranost i zbog razrjeđivanja kao osmotski učinci na krvne stanice koji karakteriziraju uporabu K_3EDTA (2).

PREGLED LITERATURE O PSEUDOTROMBOCITOPENIJI (EDTA-PTCP)

Pseudotrombocitopenija ili lažna trombocitopenija je in vitro laboratorijski nalaz koji se obično povezuje s primjenom etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) u epruvetama za prikupljanje krvi (6). Nastaje zbog nakupljanja trombocita kada je

*Pedijatrični oddelek, JZZ Splošna bolnišnica Brežice

Adresa za dopisivanje:
E-mail: anita.mujacic@sb-brezece.si

krv antikoagulirana sa EDTA. EDTA, dok veže kalcijeve ione, oslobađa epitop glikoproteina IIb (GpIIb) interakcijom s molekulom glikoproteina IIb-IIIa (GpIIb-IIIa) na membrani trombocita (7, 8). Ako pacijent ima autoantitijela (obično IgG tip imunoglobulina) protiv ovih epitopa, ona uzrokuju začepljenje tih trombocita vezivanjem na epitope na njihovim površinama. Ove nakupine trombocita automatizirani brojači stanica u krvi smatraju leukocitima zbog njihove veličine, pa se broj trombocita procjenjuje kao nizak (5).

U laboratorijskoj medicini etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) koristi se kao antikoagulant. EDTA ovisna pseudotrombocitopenija je rijedak fenomen (0,1% u općoj populaciji) prisutnosti protutijela protiv trombocita ovisnih o EDTA, koja optimalno reagiraju između 0°C i 4°C, prepoznaju citoadhezivne receptore gpIIb-IIIa, potaknu ekspresiju aktivacijskih antigena, pokrenu aktivaciju tirozin kinaze, aglutinaciju trombocita i skupljanje in vitro, što dovodi do lažno smanjenog broja trombocita. Pouzdana i pravodobna identifikacija ovog artefakta je neophodna s obzirom na veliku vjerojatnost da ga se zamijeni s drugim, po život opasnim, poremećajima trombocita ili na neki drugi način dovede do neprikladnih kliničkih tumačenja i odlučivanja o terapiji (5).

U slučaju niske razine trombocita koji je obložen elektronskim brojačem perifernog krvnog razmaza, treba pripremiti i s pacijentovog vrha prsta i uzorka krvi s EDTA. Također se broj trombocita treba ponoviti s drugim antikoagulansima poput citrata ili heparina umjesto EDTA. Ponavljano brojanje trombocita s drugim antikoagulansima obično daje normalne vrijednosti trombocita. Trombociti se ponekad nalaze u leukocitima (trombocitni satelit) s kojima tvore grozd. Ti se klasteri ne mogu pravilno prebrojati elektronskim instrumentima za brojanje stanica krvi. Dakle, ovo treba isključiti kada se otkrije trombo-

citopenija. Treba imati na umu da se nizak broj trombocita može dobiti uslijed agregacije trombocita, kada se neispravno uzmu uzorci krvi (nedovoljna mješavina antikoagulanta i uzorka krvi, poteškoće u pristupu veni). Kada se u uzorku krvi utvrdi mali broj trombocita, a pacijentu je bilo otežano vađenje krvi, potrebno je učiniti razmaz periferne krvi i pregledati ga pod mikroskopom. MPV (prosječni volumen trombocita) mjeri se i iz pune krvne slike, pored broja trombocita. U bolesnika s niskom razinom trombocita, ako je vrijednost MPV visoka, diferencijalna dijagnoza treba uključivati akutni ITP, Bernard-Soulierov sindrom, a također treba uvijek preispitati mogućnost formiranja grozda trombocita i daljnje istraživanje treba provesti u skladu s tim uzrocima. Prije odlučivanja o daljnjim dijagnostičkim testovima potrebno je razlučiti je li trombocitopenija stvarna ili pseudo, a za to je uvijek potrebno napraviti i periferni razmaz s ukupnom krvnom slikom (5).

PRIKAZ PRIMJERA

Prikazan je primjer 15-godišnjeg dječaka, koji je pregledan u pedijatrijskoj ambulanti zbog mučnine i glavobolje. Vadećna mu je krv u epruveti sa EDTA. Trombociti u EDTA krvi: Prvi nalaz trombocita 79 - netočno, nalaz nije za autorizaciju i izdavanje. Trombociti u citratnoj krvi: 170 - nalaz je relevantan, autoriziran i za izdavanje. Prvi rezultat trombocita u epruveti sa EDTA je bio 79, što se ispostavilo kao netočno, zato nalaz nije izdan i autoriziran od strane laboratorija. Poslan je zahtjev u pedijatrijsku ambulantu, da se dječaku vadi krv u epruvetu sa natrijevim citratom.

S obzirom da EDTA i heparin mogu izazvati nakupljanje trombocita i, prema tome, lažno mali broj trombocita, zahtjev od strane laboratorija bio je opravdan. Kod 15-godišnjeg dječaka u uzorcima krvi s natrijevim citratom nije otkrivena agregacija trombocita i broj trombocita je bio

normalan (170). Iz prikaza primjera zaključujemo, da je prvi uzorak bio s PTCP-om ovisnim o EDTA. Mogući uzrok za to je naravno i nedovoljno miješanje epruvete nakon uzorkovanja krvi iz vene.

ULOGA MEDICINSKE SESTRE KOD PTCP OVISNOJ O EDTA

Medicinske sestre, posebno zaposlene u bolnicama, svakodnevno uzorkuju biološke uzorke. Bitno se pridržavati standarda prilikom obavljanja tih aktivnosti, u sklopu dobre kliničke prakse (eng. evidence based nursing) i pratiti preporuke i standarde laboratorijske medicine (17). Posljedice nepoštivanja i nepoznavanje standarda rada mogu rezultirati greškom u analizi i u rezultatu. Ova se faza odvija izvan laboratorija i uključuje sljedeće aktivnosti: odabir testova, naručivanje testova, pripremu pacijenta, uzorkovanje biološkog materijala, identifikaciju uzorka, popunjavanje prateće dokumentacije i prijevoz uzoraka u laboratorij (9). Medicinske sestre također trebaju biti svjesne utjecaja fizioloških, bioloških i okolišnih čimbenika koji mogu utjecati na rezultate laboratorijskih ispitivanja. Navedeni čimbenici uzrokuju promjene u biološkim uzorcima, najčešće u uzorcima venske krvi.

Krv se vadi u različite epruvete, uz dodan antikoagulan. Antikoagulan si vezanjem kalcija sprječavaju stvaranje ugruška u uzorku krvi. U svakoj epruveti se nalazi određena količina antikoagulansa za određeni volumen krvi, iz tog razloga svaka epruveta mora biti napunjena do potrebnog volumena. Kvaliteta uzorka je ovisna o volumenu krvi i o rukovanju epruvetom nakon uzorkovanja krvi (19). Bitno je da medicinska sestra napuni epruvetu do oznake, inače uzorak nije prikladan za laboratorijsku analizu. Kada uzimamo veći broj epruveta za različite vrste analiza potrebno je slijediti određen redoslijed punjenja:

- hemokultura;
- epruveta sa dodatkom Na-citrata;
- epruveta sa dodanim aktivatorom koagulacije;
- epruveta sa heparinom;
- epruveta sa dodatkom EDTA;
- epruveta s Na-fluoridom ili Na-jodacetatom.

Nakon uzimanja svakog uzorka, okretanjem epruvete za 180° potrebno je lagano miješati krv u epruveti. Epruvete s dodatkom Li-heparina, EDTA, Na-fluorida i Na-jodacetata okrećemo 8 do 10 puta, epruvete s aktivatorom koagulacije 5 do 6 puta i Na-citratne epruvete 3 do 4 puta (20).

Zaključak

Pseudotrombocitopenija ovisna o etilendiaminetetraoctenoj kiselini (EDTA) je pojava lažno malog broja trombocita zbog formiranja trombocitnih aglutinata u prisustvu antikoagulansa i antitijela, u krvi antikoaguliranoj s EDTA. Agregacija trombocita u PTCP-u ovisnom o EDTA obično je spriječena kada se radi sa drugim antikoagulansima, poput natrijevog citrata ili heparina. PTCP ovisan o EDTA nikad nije bio povezan s hemoragičnom dijatezom ili disfunkcijom trombocita (9). U ovom je radu predstavljen 15-godišnji dječak s PTCP-om ovisnim o EDTA. EDTA i heparin mogu izazvati nakupljanje trombocita i, prema tome, lažno mali broj trombocita. Međutim, u uzorcima krvi s natrijevim citratom nije otkrivena agregacija trombocita i broj trombocita je bio normalan.

EDTA je posebno korisna za hematološke testove zbog stabilnosti u brojanju i određivanju veličine krvnih stanica, mada se ponekad pojavljuje nakupljanje trombocita u otopini EDTA (10). Ova je

reakcija nazvana PTCP ovisnim o EDTA. EDTA-ovisni PTCP je fenomen lažnih autoantitijela s niskim brojem trombocita koji uzrokuju nakupljanje trombocita u krvi antikoaguliranoj s EDTA (11). Obično je ovo nakupljanje uzrokovano promjenom glikoproteina na površini trombocita (12). Ti modificirani trombocitni antigeni tada reagiraju na antiagregacijska antitijela, obično imunoglobulin G (IgG) ili imunoglobulin M (IgM) i rijetko imunoglobulin A (IgA) tipovi prepoznaju trombocitne antigene na membrani trombocita (13-15). Trombociti membranski glikoproteinski kompleks IIb/IIIb mogao bi biti uključen u reakciju antitijela ovisnih o EDTA (13, 16). Kunicki i suradnici pokazali su prototip autoantitijela povezanih s EDTA-PTCP. Klonirali su ljudsko monoklonsko IgM autoantitijelo, 2E7, koje se veže za oktapeptid u teškom lancu GP IIb i pokazali da vezanje 2E7 na normalne trombocite olakšava prisutnost EDTA.

Zaključno, pojavnost PTCP se mora razmotriti u slučajevima s niskim brojem trombocita, koji nisu imali povijest ili nalaze fizikalnog pregleda u skladu s trombocitopenijom. Uz to, skupe i sofisticirane tehnike, koje su korisne za dijagnosticiranje PTCP-a, nisu dostupne u svim klinikama, posebno u zemljama u razvoju, a te metode nisu superiorne u ispitivanju brisa periferne krvi. Dakle, potrebno je naglasiti da je, uz procjenu pacijenta s medicinskom i obiteljskom anamnezom, pregled razmaza krvi vrlo bitan i mora biti prvi korak u dijagnostici (9).

Bitno je da medicinske sestre imaju redovne edukacije iz područja predanalitičke faze, koja je ključna, da ne dolazi do lažne PTCP ovisnoj o EDTA. Ovladavanje predanaliznom fazom, komunikacija s laboratorijskim osobljem i fokusirana laboratorijska edukacija predanalitike za medicinske sestre predstavlja željeno poboljšanje u postizanju bolje kvalitete uzoraka i time točnije interpretacije laboratorijskih

rezultata. Zbog jedinstvenosti sadržaja analita u većini bioloških uzoraka, presudno je da medicinske sestre znaju pojedine korake procesa uzorkovanja. Pridržavanje smjernica povećava kvalitetu rada i uzoraka te smanjuje rizik od pogreške.

LITERATURA

1. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 565-76.
2. Lippi U, Schinella M, Modena N, Nicoli M. Unpredictable effects of K₃ EDTA on mean platelet volume. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 391-3.
3. Lippi G, Plebani M. EDTA - dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med*. 2012; 50 (8): 1281-5.
4. Nikolić Lj, Gojnić-Dugalić M, Dunjić B, Lazović V, Čolović R. Pseudotrombocitopenija izazvana upotrebom EDTA u akušerstvu i perinatologiji. *Hospital Pharmacology - International Multidisciplinary Journal* 2017; 4 (2): 528-32.
5. Bay A, Sivasli E, Taviloglu S, Leblebisatan G, Coskun E, Uluca U. Transplacental transmission of EDTA dependent pseudothrombocytopenia in a neonate. *Open Journal of Pediatrics*, 2011; 1 (03): 39-40.
6. Onder O, Weinstein W, Hoyer LW. Pseudo thrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood*, 1980; 56: 177-82.
7. Said SM, Hahn J, Schleyer E, Müller M, Fiedler GM, Buerke M, Prondzinsky R. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitor-induced thrombocytopenia: Diagnosis and treatment. *Clinical Research in Cardiology*, 2007; 96: 61-9.
8. Van der Meer W, Allebes W, Simon A, Van Berkel Y, De Keijzer MH. Pseudothrombocytopenia: A report of a new method to count platelets in a patient with EDTA - and temperature-independent antibodies of the IgM type. *European Journal of Haematology*, 2002; 69: 243-7.
9. Akbayram S, Dogan M, Akgun C, Caksen H. EDTA - dependent pseudothrombocytopenia in a child. *Oner AF. Clin Appl Thromb Hemost*. 2011; 17 (5): 494-6. Epub 2010 Jun 7.

10. Nishioka T, Yokota M, Tsuda I, Tatsumi N. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clin Lab Haematol.* 2002; 24 (2): 115-9.
11. Mori M, Kudo H, Yoshitake S, Ito K, Shinguu C, Noguchi T. Transient EDTA - dependent pseudothrombocytopenia in a patient with sepsis. *Intensive Care Med.* 2000; 26 (2): 218-20.
12. Dalamangas LC, Slaughter TF. Ethylenediamine-tetraacetic acid-dependent pseudothrombocytopenia in a cardiac patient. *Anesth Analg.* 1998; 86 (6): 10-11.
13. Ahn HL, Jo YI, Choi YS. EDTA - dependent pseudothrombocytopenia confirmed by supplementation of kanamycin; a case report. *Korean J Intern Med.* 2002; 17 (1): 65-8.
14. Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T, Nakahara K. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA - dependent pseudothrombocytopenia. *Br J Haematol.* 1997; 99 (4): 817-23.
15. Van der Meer W, Allebes W, Simon A, van Berkel Y, de Keijzer MH. Pseudothrombocytopenia: a report of a new method to count platelets in a patient with EDTA - and temperature-independent antibodies of the IgM type. *Eur J Haematol.* 2002; 69 (4): 243-7.
16. Bizzaro N. EDTA - dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol.* 1995; 50 (2): 103-9.
17. Clinical and laboratory Standards Institute. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard - Sixth Edition. Clinical and laboratory Standards Institute document H3-A6. Wayne, Pannsylvania: Clinical and laboratory Standards Institute; 2007.
18. Plebani M. Quality Indicators to Direct Pre-analytical Errors in laboratory Testing. *Clin Biochem Rev.* 2012; 33 (3): 85-5.
19. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. Samples: From the Patient to the Laboratory; The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 2nd ed. Darnstadt: GIT; 2001.
20. BD Vacutainer. Order of Draw for Multiple Tube Collection. Becton Dickinson & Company; 2010. Dostupno na: http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/plus_plastic_tubes_wallchart_orderofdraw_VS5729.pdf (10.1.2020).