ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.155.2

ПСЕВДОТРОМБОЦИТОПЕНИЯ — ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ДИАГНОСТИКИ

Зенина М. Н.[1, 2], Нуждина М. А.[2], Черныш Н. Ю.[2, 3], Юдина В. А.[2, 3]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России», Санкт-Петербург, Россия
[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:
Зенина Марина Николаевна,
ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России,
ул. Кирочная, д. 41, Санкт-Петербург, Россия, 191015.
E-mail: mari_ng@bk.ru

Статья поступила в редакцию 26.05.2023
и принята к печати 29.06.2023.

РЕЗЮМЕ

ЭДТА-индуцированная псевдотромбоцитопения — лабораторный феномен, который определяется как ложное снижение количества тромбоцитов, возникающее in vitro при использовании в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). На современном этапе проблема ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении приобрела значительную актуальность вследствие повсеместного введения в практику автоматических гематологических анализаторов, рекомендуемой для которых является кровь, стабилизированная ЭДТА. Целью данного исследования было оценить сульфат магния как антикоагулянт in vitro для подсчета тромбоцитов, MPV и коррекции уровня лейкоцитов. Своевременное определение у пациентов ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении является важным диагностическим критерием, необходимым для исключения заболеваний крови и предупреждения ошибок при выборе тактики лечения.

Ключевые слова: псевдотромбоцитопения, сульфат магния, тромбоциты, ЭДТА.

Для цитирования: Зенина М.Н., Нуждина М.А., Черныш Н.Ю., Юдина В.А. Псевдотромбоцитопения — проблемы и пути решения задач диагностики. Российский журнал персонализированной медицины. 2023;3(4):38-43. DOI: 10.18705/2782-3806-2023-3-4-38-43.

PSEUDOTHROMBOCYTOPENIA — PROBLEMS AND WAYS TO SOLVE DIAGNOSTIC PROBLEMS

Zenina M. N.[1, 2], Nuzhdina M. A.[2], Chernysh N. Y.[2, 3], Yudina V. A.[2, 3]

[1] North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia
[2] Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Saint Petersburg, Russia
[3] Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:
Zenina Marina N.,
North-Western State Medical University
named after I. I. Mechnikov,
Kirochnaya str., 41, Saint Petersburg,
Russia, 191015.
E-mail: mari_ng@bk.ru

Received 26 May 2023; accepted 29 June 2023.

ABSTRACT

EDTA-dependent pseudothrombocytopenia is the laboratory phenomenon of a spurious low platelet count which appears in vitro while using EDTA as anticoagulant. The problem of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia has significant relevance due to the widespread using of automated hematology analyzers which EDTA stabilized blood is most recommended for. The mechanism of this phenomenon is based on the production of the specificantibodies causing the platelet aggregation in the presence of EDTA. The aim of this study was to evaluate MgSO4 as an in vitro anticoagulant for platelet count, MPV and correction WBC. Early determination of the patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia is an important diagnostic criterion necessary to exclude blood diseases and prevent errors in treatment.

Key words: EDTA, Magnesium sulfate, platelets, pseudothrombocytopenia.

For citation: Zenina MN, Nuzhdina MA, Chernysh NY, Yudina VA. Pseudothrombocytopenia — problems and ways to solve diagnostic problems. Russian Journal for Personalized Medicine. 2023;3(4):38-43. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2023-3-4-38-43.

ВВЕДЕНИЕ

При обнаружении у пациента снижения или критически низкого количества тромбоцитов возникает необходимость дифференциальной диагностики между истинной и псевдотромбоцитопенией (ПТП). Псевдотромбоцитопения — феномен, наблюдаемый in vitro и связанный с образованием агрегатов из тромбоцитов, возникающих под действием аутоиммунных антитромбоцитарных антител, которые становятся активными при использовании в качестве антикоагулянтов калиевых солей ЭДТА или реже — цитрата натрия. Наиболее частый вариант псевдотромбоцитопении — это ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения. Связано это с широким внедрением в лабораторную практику гематологических анализаторов и унифицированных методов консервирования проб крови. Первые гематологические счетчики с кондуктометрическим методом определения числа клеточных элементов получили распространение во второй половине 1950-х гг., что привело к широкому внедрению в практику использования в качестве консерванта К2ЭДТА, позволяющего сохранять и доставлять пробы крови в жидком виде при минимальном влиянии на морфологию клеток крови. Данный стабилизатор оказался оптимальным для окрашивания мазков по Романовскому-Гимзе и последующего морфологического анализа.

Одним из недостатков применения К2ЭДТА является осмотический эффект «набухания» тромбоцитов, приводящий к увеличению их объема (MPV). Все современные анализаторы учитывают этот эффект при кондуктометрическом анализе клеток крови и классификации их по объему.

Впервые ЭДТА-ассоциированную тромбоцитопению описали Gowland E. и соавторы (1969 г.), которые выявили ПТП у женщины 70 лет с ретикулярной саркомой и обосновали связь этого феномена с использованием ЭДТА. Термин «псевдотромбоцитопения» (англ. pseudothrombocytopenia, PTCP) был предложен в 1973 году.

Данные литературы очень противоречивы в отношении того, является ли псевдотромбоцитопения феноменом, который наблюдается только in vitro и не имеет клинического значения, или же его выявление должно учитываться клиницистами. Не менее серьезной проблемой является искажение в подсчете числа лейкоцитов у пациентов с ПТП.

Частота встречаемости ПТП невелика и составляет, по данным разных авторов, от 0,07 до 0,2 %. Известно, что в механизме развития псевдотромбоцитопении принимают участие специфичные антитела, циркулирующие в крови только у пациентов с ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопенией. Как показали исследования, по своей природе эти антитела относятся к классу иммуноглобулинов: gM (10–50 % случаев), IgG (30–95 %), IgA (5–40 %), также в очень редких случаях возможно наличие 2 разных изотипов антител у одного пациента. Оптимальная температура их действия находится в пределах от 4 до 20 °C. Антитела взаимодействуют с видоизмененным рецептором мембраны тромбоцитов — гликопротеином IIb–IIIa (GPIIb–IIIa), который представляет собой димерный интегрин, состоящий из двух субъединиц. Образование комплекса между альфа (αIIb) и бета (β3) субъединицами напрямую зависит от наличия ионов кальция (рис. 1). В пробирке под влиянием ЭДТА происходит связывание ионов кальция, которое вызывает диссоциацию комплекса и последующее изменение структуры гликопротеина IIb–IIIa, в результате чего происходит обнажение скрытого в физиологических условиях эпитопа. Именно этот участок вступает в реакцию с антителами. Данный процесс провоцирует активацию и агрегацию тромбоцитов в пробе с ЭДТА, что объясняет возникновение ошибочных результатов в анализах крови.

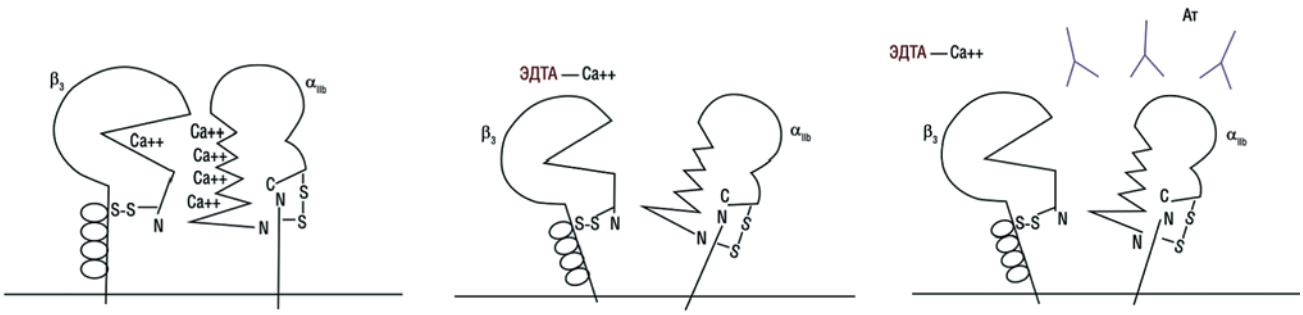

Рис. 1. Изменение структуры GPIIb–III под воздействием солей ЭДТА и взаимодействие антител с видоизмененным рецептором у пациентов с ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопенией

С 80-х годов прошлого века для предотвращения агглютинации тромбоцитов в стеклянных капиллярах в качестве альтернативного варианта у пациентов с выявленной ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопенией использовался сульфат магния (MgSO4). Но этот метод не нашел тогда широкого применения в рутинной практике из-за необходимости длительной экспозиции пробы. Предложенные современные вакуумные системы с добавлением сульфата магния модифицировали метод и позволяют уже на этапе клинического анализа крови провести дифференциальную диагностику тромбоцитопении, исключить ПТП, избежать при этом сложных и дорогостоящих диагностических процедур. Использование в качестве добавки к антикоагулянтам сульфата магния (MgSO4) исключает появление агрегации тромбоцитов у пациентов с ПТП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За 6-месячный период в амбулаторном отделении было обследовано 80 пациентов, обратившихся за консультацией гематолога с тромбоцитопенией неясного генеза. Для дифференциальной диагностики истинной и псевдотромбоцитопении проводились параллельные исследования цельной крови в пробах с К2ЭДТА и системе ThromboExact с добавлением сульфата магния (MgSO4). Количество (PLT), объем тромбоцитов (MPV) и уровень лейкоцитов (WBC) определяли с помощью автоматического анализатора UniCel DxH 800 Coulter (Beckman) одновременно трехмерным анализом: объем клетки, удельная электропроводность и лазерное светорассеяние. Микроскопия окрашенных по методу Паппенгейма (фиксация по Май-Грюнвальду, окраска Романовский-Гимза) препаратов периферической крови использовалась для морфологической оценки тромбоцитов и контроля их количества.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были выявлены три клинических случая псевдотромбоцитопении.

Клинический случай № 1. Женщина, 34 лет, при обследовании обнаружено бессимптомное снижение уровня тромбоцитов до 11 × 10^9 /л, MPV 8,3 fl, других изменений в анализе крови не наблюдалось. При микроскопическом обследовании были выявлены множественные агрегаты. В пробах крови, взятых системой ThromboExact, содержание тромбоцитов составило 178,0 × 10^9/л и MPV 7,5 fl. В контрольных, окрашенных мазках крови, сделанных из этой пробы, результаты подсчета тромбоцитов подтвердились. Кроме того, скорректированы данные подсчета лейкоцитов (WBC в пробе с К2ЭДТА составили 6,6 х 10*9/л, в пробе с добавлением сульфата магния — 4,5 х 10*9/л).

Клинический случай № 2. Мужчина, 40 лет, при обследовании было обнаружено бессимптомное снижение уровня тромбоцитов до 72 × 10^9 /л, MPV 8,4 fl, других изменений в анализе крови не наблюдалось. При микроскопическом обследовании были выявлены множественные агрегаты. Такие же результаты получены при использовании в качестве антикоагулянта цитрата натрия. Далее проанализированы пробы, взятые системой ThromboExact. Содержание тромбоцитов составило 227,0 × 10^9 /л и MPV 7,3 fl.

Содержание лейкоцитов (WBC) в пробе с К2ЭДТА составило 11,0 х 10*9/л, в пробе с добавлением сульфата магния — 9,7 х 10*9/л).

По результатам клинического анализа крови, проведенного с использованием пробирок с К2ЭДТА и системой ThromboExact, диагностирована ЭДТА-зависимая ПТП.

Клинический случай № 3. Мужчина, 45 лет, при обследовании обнаружено снижение уровня тромбоцитов до 69 × 10^9 /л и MPV 9,0 fl, других изменений в анализе крови не наблюдалось. При микроскопическом обследовании были выявлены множественные агрегаты. В пробах крови, взятых системой ThromboExact, содержание тромбоцитов составило 206,0 × 10^9 /л, MPV 8,0 fl. В контрольных, окрашенных мазках крови, сделанных из этой пробы, результаты подсчета тромбоцитов подтвердились.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема своевременного выявления или исключения ЭДТА-зависимой ПТП является важной в диагностике тромбоцитопений. Согласно существующим рекомендациям, любое не объяснимое выявленным заболеванием или патологическим состоянием снижение уровня тромбоцитов требует исключения ПТП. Первичное выявление тромбоцитопении должно быть основанием для подозрений на ПТП. Во всех случаях необходима микроскопическая оценка мазков крови, а при выявлении тромбоцитарных агрегатов — повторный анализ со стабилизацией пробы крови цитратом натрия и ускоренной доставкой в лабораторию. Однако, по некоторым сведениям, не менее чем в 15–20 % случаев ЭДТА-индуцированной тромбоцитопении агрегация наблюдается и в присутствии цитрата, что обосновывает необходимость обязательного микроскопического контроля и подсчета тромбо-

цитов опытным персоналом во всех случаях. Подсчет количества тромбоцитов в окрашенных мазках крови является трудоемким и, к сожалению, имеет ошибку до 25 %. Для оптимизации диагностического процесса причин тромбоцитопений целесообразно введение в схему обследования систем с добавлением сульфата магния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исключительно in vitro феномен, связанный с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА, может проявляться в виде значительного снижения PLT, заметного повышения WBC и увеличения MPV. Вероятнее всего, искажение количества клеток связано с формированием у образовавшихся агрегатов сходных с лейкоцитами физических и объемных характеристик. Повышение MPV отражает свойство ЭДТА действовать на плоский неактивированный тромбоцит и образование клеток сфероидной формы. Использование MgSO4 позволяет определить ЭДТА-зависимую псевдотромбоцитопению и может быть рекомендовано для оперативной коррекции диагноза, чтобы исключить дальнейшее инвазивное обследование и назначение неадекватной терапии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lin J, Luo Y, Yao S, et al. Discovery and Correction of Spurious Low Platelet Counts due to EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia // Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2015. Vol. 29. P. 419–426.

2. Harrison P, Ault K, Chapman S, et al. An Interlaboratory Study of a Candidate Reference Method for Platelet Counting // Am J Clin Pathol. 2001. Vol.115. P. 448–459.

3. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Гематологические анализаторы. Интерпретация анализа крови: Методические рекомендации. М.-Тверь: ООО «Издательствоо «Триада». 2007. 112 с.

4. Мининкова А.И. Аналитические возможности гематологических анализаторов в оценке тромбоцитов (обзор литературы)// Клиническая лабораторная диагностика. 2012. № 3. С. 27–34.

5. Соколова Н.А. Преимущества и недостатки различных методов подсчета тромбоцитов //Справочник заведующего КДЛ. 2020. № 6. С. 14–29.

6. Соснин Д.М. Роль микроскопических исследований при подсчете тромбоцитов // Справочник заведующего КДЛ. 2018. № 12. С. 24–32.

7. Sheu J, Hsiao G, Shen M, et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets// Br J Haematol. 2002. Vol 119. P. 1033–1041.

8. Папаян К.А., Цветкова Т.Г., Андреева Э.Ф. и др. Значение своевременной диагностики ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопении в клинической практике// Forcipe. 2018. Т. 1. № 1. С. 4–8.

Информация об авторах:

Зенина Марина Николаевна, заведующий отделением морфологических исследований Центра лабораторных исследований клиники, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»;

Нуждина Мария Андреевна, врач клинической лабораторной диагностики отделения морфологических исследований Центра лабораторных исследований клиники, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»;

Черныш Наталия Юрьевна, к.м.н., доцент кафедры лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; врач клинической лабораторной диагностики отделения морфологических исследований Центра лабораторных исследований клиники, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»;

Юдина Виктория Алексеевна, к.м.н., руководитель Центра лабораторных исследований клиники, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»; доцент кафедры лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Zenina Marina N., Head of the Department of Morphological Research of the Center for Laboratory Research of the Clinic, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

Nuzhdina Maria A., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Morphological Research, Center for Laboratory Research Clinic, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

Chernysh Natalia Y., PhD, Associate Professor of the Department of Laboratory Medicine with a clinic of the Almazov National Medical Research Centre; Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Morphological Research, Center for Laboratory Research Clinic, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

Yudina Victoria A., PhD, Head of the Center for Laboratory Research of the Clinic, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia"; Associate Professor of the Department of Laboratory Medicine with the Clinic of the Almazov National Medical Research Centre.