

Strategie laboratorní diagnostiky a diferenciální diagnostiky trombocytopenie

M. Kušnierová, P. Kessler

Oddělení hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov, p.o., přednosta prim. MUDr. Petr Kessler

Souhrn: Trombocytopenie je patologický stav charakterizovaný snížením počtu krevních destiček pod hodnotu dolní meze fyziologického rozmezí, tj. pod $150 \times 10^9/l$. Tato porucha může být provázena klinickými projevy hemoragické diatézy. Riziko krvácení je úzce spjato s hloubkou poklesu krevních destiček. Ke spontánnímu krvácení bez účasti jiné poruchy krevního srážení dochází zpravidla až při poklesu krevních destiček pod $20 \times 10^9/l$. Prvním krokem, který by měl být při nově diagnostikované trombocytopenii v laboratoři proveden, je pečlivé prohlédnutí krevního nátěru. Nejprve je nutno vyloučit pseudotrombocytopenii, která je způsobena abnormální agregací *in vitro* nebo (podstatně méně často) destičkovým satelitizmem. Je nutno také zhodnotit červené a bílé krvinky, zejména se zaměřit na přítomnost schistocytů nebo blastů. Dále je doporučeno postupovat podle standardního diferenciálně-diagnostického algoritmu, který by měl být k dispozici v každé hematologické laboratoři.

Klíčová slova: laboratorní diagnostika – trombocytopenie – pseudotrombocytopenie

The strategy of laboratory diagnostics and differential diagnostics of thrombocytopenia

Summary: Thrombocytopenia is a pathological state characterized by decreased platelet count under the lower limit of the physiological range, i.e. 150×10^9 per liter. This disorder can be associated with clinical manifestation of the hemorrhagic diathesis. The risk of bleeding is closely associated with the depth of platelets count decrease. Spontaneous bleeding (in absence of any other coagulation disorder) usually occurs when the platelet count decreases below 20×10^9 per liter. The first step, which should be done, when a newly diagnosed thrombocytopenia occurs, is a thorough review of a blood smear. Firstly, it is necessary to exclude the pseudothrombocytopenia, caused by an abnormal *in vitro* aggregation of thrombocytes, or (much less frequently) by platelet satellitism. It is also necessary to evaluate the red and white cells, especially to focus on the presence of schistocytes or blasts. Thereafter it is recommended to follow a standard diagnostic algorithm, which should be available in every hematological laboratory.

Key words: laboratory diagnostics – thrombocytopenia – pseudothrombocytopenia

Úvod

Trombocytopenie je častá porucha, s níž se setkávají lékaři různých odborností. Cílem článku je seznámit čtenáře (většinou internistu) s možností zapojení laboratorních pracovníků do diferenciálně diagnostického procesu. Jejich role v zachytu život ohrožujících stavů spojených s trombocytopenií může být totiž zcela klíčová. Standardizace laboratorních procesů i komunikace laboratoře s klinickým pracovištěm je přitom zásadním předpokladem dobré spolupráce.

Trombocyty jsou neúplné buňky, tzv. buněčné fragmenty, vznikající z megakaryocytů odštěpováním (zaškrcováním periferní cytoplazmy) nebo rozpadem. Jejich úloha je mnohostranná, uplatňují se na různých úrovních hemostázy. Hrají klíčovou roli v primární

hemostáze, uplatňují se v procesu plazmatické koagulace a jsou nezbytné pro normální funkci cévní stěny [1].

V klidovém stadiu mají diskoidní tvar a jejich povrch je tvořený buněčnou membránou, která je nositelem jejich základních hemostatických funkcí. Adheze, aktivace, agregace a prokoagulační aktivity. V cytoplazmě destiček jsou přítomna specifická skladovací granula, která se rovněž uplatňují v hemostáze.

V periferní krvi cirkulují 7–10 dní, 1/3 je na přechodnou dobu sekvistrována ve slezině.

Referenční rozmezí počtu destiček se pohybuje většinou kolem $150\text{--}450 \times 10^9/l$. Počty cirkulujících destiček v periferní krvi kolísají v závislosti na mnoha faktorech (zánětlivá onemocnění, sideropenie, gravidita, fáze menstruačního cyklu atd.) [2].

Trombocytopenie a krvácivé projevy

Za trombocytopenii se považuje nález počtu krevních destiček pod spodní hranici referenčního rozmezí, tedy většinou pod $150 \times 10^9/l$. Vzhledem k velké rezervě však mírný pokles nemá žádné klinické následky. Teprve pokles krevních destiček pod $100 \times 10^9/l$ může představovat riziko krvácivých komplikací v případě extrémní zátěže hemostázy, např. při rozsáhlém chirurgickém výkonu, většinou drobných chirurgických výkonů je možno provést při počtu trombocytů mezi 50 a $100 \times 10^9/l$.

Ke spontánnímu krvácení bez souběžného výskytu další poruchy krevního srážení dochází většinou až při poklesu počtu destiček pod hodnotu $20 \times 10^9/l$ [3]. Individuální rozdíly jsou však velmi široké, někteří nemocní nemají krvácivé

Tab. 1. Riziko spontánních krvácivých komplikací v závislosti na hloubce trombocytopenie [4].

Počet krevních destiček	Riziko spontánních krvácivých komplikací
50–20 × 10 ⁹ /l	5 %
20–10 × 10 ⁹ /l	10 %
pod 10 × 10 ⁹ /l	21 %

projevy ani při poklesu pod 10 × 10⁹/l, jiní mají spontánní krvácivé projevy už při hodnotě 80 × 10⁹/l, zejména při současné trombocytopatii nebo poruše cévní stěny. Riziko spontánních krvácivých komplikací v závislosti na počtu trombocytů je shrnuto v tab. 1 [4].

Ani těžká trombocytopenie nechrání pacienta zcela před trombózou, existuje dokonce skupina chorob – trombotické mikroangiopatie – kdy kromě krvácivých projevů při těžké trombocytopenii vidíme i trombotické poruchy, které mohou být fatální.

Etiopatogeneze trombocytopenie

Trombocytopenie vzniká v důsledku poruchy tvorby krevních destiček v kostní dřeni nebo jejich zvýšeného zániku, sekvestrace ve slezině, spotřeby či ztráty z periferní krve. K trombocytopenii může docházet z vrozených nebo získaných příčin. U získaných tvoří převahu imunitní mechanismy [5]. V tab. 2 je uvedeno rozdělení trombocytopenií podle dominantního etiopatogenetického mechanismu [6].

Strategie laboratorní diagnostiky trombocytopenie

Role laboratorního pracovníka, který se setká s nově zjištěnou trombocytopenií, je zcela klíčová. Správným postupem může na jedné straně zachránit život kriticky ohroženého pacienta, na druhé straně může předejít traumatizaci zdravého člověka a ekonomickým ztrátám způsobeným zbytečným vyšetřováním falešné trombocytopenie. Po zjištění trombocytopenie je tedy třeba provést následující kroky:

Tab. 2. Klasifikace trombocytopenií [6].

Příčina	Nozologická jednotka
snížená tvorba destiček	- trombocytopenie u megaloblastové anémie - leukemie nebo myelodysplastické syndromy - aplastická anémie - toxická myelosuprese - jaterní cirhóza s portální hypertenzí - seps - polékové změny - virové infekce (EBV, HIV, HCV) - myelofibróza - kongenitální trombocytopenie
sekvestrace destiček ve zvětšené slezině	- jaterní cirhóza s portální hypertenzí - trombóza v. portae - myeloproliferace - lymfoproliferace - bakteriální infekce (<i>Mycobacterie</i>, malaria, histoplazmózy) - endokarditida - autoimunitní hemolýza - střádající lipidózy
zvýšená spotřeba, destrukce destiček imunní etiologie	- idiopatická trombocytopenická purpura - heparinem indukovaná trombocytopenie - polékové trombocytopenie - Evansův syndrom - potransfuzní purpura - neonatální alloimunitní trombocytopenie
zvýšená spotřeba, destrukce destiček mechanického původu	- diseminovaná intravaskulární koagulace - trombotické mikroangiopatie (TTP, HUS, HELLP) - endokarditida - umělá srdeční chlopeč - infekce (rickettsiosy, ehrlichózy) - antifosfolipidový syndrom - systémové vaskulitidy
naředění normálního počtu destiček	- masivní nebo výměnná transfuze - gravida - hyperhydratace různého původu

Makroskopické ohledání vzorku k vyloučení hrubého zkreslení výsledku v preanalytické fázi

Pokud je ve vzorku krve přítomna krevní sraženina, většinou dojde k významnému zkreslení hodnot krevního obrazu, nejvýraznější změny jsou právě v počtu trombocytů. V případě jejího nálezu je nutno vyžádat si nový odběr a analýzu zopakovat z nově odebraného vzorku.

Provedení krevního nátěru, jeho obarvení a zhodnocení

U každé nově zjištěné trombocytopenie je nutno provést pečlivé zhodnocení krevního nátěru. V první řadě je nutno vyloučit pseudotrombocytopenii, dále je nutno se soustředit na známky život

bezprostředně ohrožujících onemocnění a posléze je doporučeno podle stanoveného algoritmu systematicky zhodnotit případné ostatní morfologické odchylky.

Pseudotrombocytopenie je falešně snížený počet destiček stanovený *in vitro* hematologickým analyzátozem, který neodpovídá skutečnému počtu destiček v krvi. Patofyziologickým podkladem je odhalení epitopů na trombocytech v přítomnosti EDTA nebo jiných antikoagulačních činidel a interakce těchto epitopů s protilátkami typu IgG, IgM nebo cirkulujícími imunokomplexy [7]. Výsledkem je agregace destiček, případně jejich satelitizmus na granulocytech. Takto seskupené trombocyty nejsou automatickými analyzá-

tory krevních obrazů správně spočítány, a proto je vydán výsledek krevního obrazu s nízkým počtem destiček. Tento jev se vyskytuje v 15–20 % u všech pacientů s izolovanou trombocytopenií [8–10]. Některé analyzátory upozorňují na přítomnost shluků, většina je velikostně přiřadí k leukocytům, případně k erytrocytům. V histogramu je pak viditelný malý peak před vlastní populací elementů.

Přítomnost shluků i satelitizmu je možno zcela spolehlivě prokázat v krevním nátěru.

Při nálezu pseudotrombocytopenie je optimální zajistit odběr krve přímo v laboratoři nebo v co nejbližší odběrové ambulanci a nový vzorek zpracovat co nejdříve po odběru. V naprosté většině případů pak najdeme normální počet trombocytů, neboť ke shlukování dochází pomalu, většinou až po několika desítkách minut. V případě rychlejší agregace je doporučováno provést odběr do jiného antikoagulantu než EDTA, vhodné jsou tyto možnosti:

- odběrová zkumavka s citrátem sodným (výslednou hodnotu destiček je nutno násobit indexem 1,1 kvůli většímu objemu citrátu a naředění destiček),
- speciální odběrová zkumavka ThromboExact (obsahuje látky, které zabírají agregaci destiček).

Trombocytopenie může být projevem některých život ohrožujících stavů, na jejich případné projevy je nutno se soustředit hned po vyloučení pseudotrombocytopenie. K těmto stavům patří mikroangiopatické hemolytické anémie, zejména trombotická trombocytopenická purpura (TTP), akutní leukemie a heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT). K diagnóze prvních dvou uvedených stavů může vyšetření krevního nátěru zásadně napomoci.

- **Mikroangiopatické hemolytické anémie**, nebo též trombotické mikroangiopatie, jsou charakterizovány generalizovanou agregací trombocytů různé etiologie, nejčastěji v důsledku endoteliální dysfunkce nebo

nadbytku extrémně vysokomolekulárních polymerů von Willebrandova faktoru při nedostatku funkčního enzymu ADAMTS 13. Patří mezi ně TTP, hemolyticko-uremický syndrom, pre eklampsie a HELLP syndrom. V jejich průběhu dochází ke konzumpci trombocytů s následným poklesem jejich počtu a k rozsáhlému poškození mikrocirkulace s následnou ischemií tkání, stav může vyústit v multiorgánové selhání, které se může v některých případech vyvinout velmi rychle. Současně dochází k mechanickému poškození erytrocytů při průchodu částečně okludovanými drobnými cévami s následnou hemolýzou [11]. Právě toto může být prvním záchytným bodem v diagnóze, neboť v krevním nátěru jsou zmnožené schistocyty. **Zaměření na přítomnost zmnožených schistocytů tedy patří k prvořadým úkolům laboratorního pracovníka, který se setká s poprvé zjištěnou trombocytopenií.**

- U pacientů, kteří jsou léčeni **heparin** (UFH, LMWH), může dojít k rozvoji **HIT**. Jde o imunně podmíněnou trombocytopenii podmíněnou přítomností protilátek proti komplexu PF4-heparin. Tato porucha je či není spojená s arteriální nebo žilní trombózou, která může případně ohrozit život nemocného. Incidence pozitivní HIT-protilátek se pohybuje mezi 1 a 30 % heparinizovaných osob [12]. Laboratorní průkaz je časově náročný a zahrnuje metody s různou specifičností a senzitivitou. Orientační, ale spolehlivou screeningovou metodou je kvalitativní průkaz heparin/PF4 protilátek metodou gelové filtrace na systému Diamed. Nízkou záchytnost, ale vysokou specifičností má stanovení indukce agregace příslušným heparinem nebo LMWH. (HIPA). Další možností je ELISA stanovení komplexu heparinu s PF4. Za konfirmační metodu je považováno stanovení uvolnění serotoninu z trombocytů indukovaného protilátkami proti komplexu PF4-heparin (serotonin release assay – SRA) [13–15].

- **Akutní leukemie** se mohou manifestovat krvácivými projevy, podmíněnými trombocytopenií. V krevním nátěru zpravidla vidíme blastické elementy, jejichž rozpoznání nečiní laboratornímu pracovníkovi větších potíží. Nejzávažnější trombocytopenii hned od počátku bývá provázána akutní promyelocytární leukemie, kdy může dojít k rozvoji významné trombocytopenie ještě dříve, než jsou vyplaveny leukemické promyelocyty ve větším počtu do periferní krve. V těchto případech můžeme diagnózu významně urychlit velmi pozorným prohlédnutím nátěru na sklíčku, kdy nám nález i zcela ojedinělých promyelocytů (často s typickými Auerovými tyčkami) umožní další vyšetřování cíleně nasměrovat, a tak s co nejmenším zdržením zahájit léčbu.

Poté, co vyšetřením krevního nátěru nebyly nalezeny známky výše uvedených život ohrožujících stavů, je třeba se věnovat **podrobnému zhodnocení počtu a morfologie krevních elementů**.

Především rozlíšíme, zda jde o izolovanou trombocytopenii nebo o kombinaci s anémií, leukopenií, nebo zda jde o pancytopenii. Bicytopenie nebo pancytopenie ještě nemusí znamenat jistou diagnózu hematologického onemocnění, může jít např. o projev hypersplenizmu nebo autoimunitního onemocnění typu systémového lupus erytematodes. Pro primárně hematologické onemocnění svědčí spíše morfologické odchylky v jednotlivých krevních řadách.

Morfologické odchylky v jednotlivých krevních řadách u nemocí spojených s trombocytopenií

Megaloblastové anémie. Zahrnují skupinu chorob různé patogeneze, které mají společné morfologické a funkční změny v krvi a kostní dřeni. Příčinou vzniku je nedostatek vitamínu B₁₂ a/nebo kyseliny listové. V erytrocytové řadě jsou nápadné patologické megaloblasty. V leukocytární řadě je vidět charakteris-

tické změny ve smyslu obrovských tyčů a metamyelocytů v kostní dřeni a hypersegmentované neutrofile v periferní krvi. V trombocytopoéze se objevují obrovské megakaryocyty s hypersegmentovaným až bizarním tvarem jádra. V periferní krvi bývá nejen anémie, ale i trombocytopenie a leukopenie s neutropenií.

Aplastická anémie. Vychází z porušené normální hematopoézy a je charakterizována pancytopenií v periferní krvi. V časném stadiu se objevuje leukopenie s trombocytopenií, anémie bývá makrocytární (nad 100 fl), vzácněji normocytová [16]. V krevním nátěru prokazujeme lehkou anizocytózu a makrocytózu, můžeme najít terčovité, ale i jiné patologické formy erytrocytů. Krevní destičky jsou obvykle malé.

Do obrazu aplastické anémie nepatří nález blastických elementů a prekurzorů červené řady! V kostní dřeni je nápadně snížený počet megakaryocytů, tyto mohou zcela chybět. V granulocytové řadě nacházíme dysplastické změny a útlum zrání. V červené řadě megaloblastické změny, vícejadermost a bazofilní tečkování.

Fanconiho anémie. Onemocnění je charakterizované pancytopenií, poruchou růstu a kožními pigmentacemi, neurologickou symptomatologií. V krevním obraze dominuje makrocytová anémie, leukopenie a trombocytopenie [17]. V kostní dřeni zpočátku nacházíme hyperplazii se známkami dysplastické erytropoézy, se zmnožením makrofágů a plazmocytů.

Wiskottův-Aldrichův syndrom. Trombocytopenie provázena ekzémy a poruchami humorální imunity. V nátěru jsou nápadné mikrotrombocyty. Mají zkrácené přežívání a narušenou strukturu.

Mayova-Hegglinova anomálie. Většinou se neprojevuje krvácivou diatézou nebo má mírné projevy. V nátěru je nápadná přítomnost obrovských destiček a bazofilních inkluzí ve všech neutrofilních granulocytech (Dohleho inkluze). Jde o sytě modrá cystická tělíska. Vyskytují se jednotlivě nebo mno-

hočetně a je možno je najít i v lymfocytech a monocytech.

Pseudo Pelger-Huetova anomálie. Jedná se o neschopnost segmentace jader neutrofilů, která vede k hyposegmentaci bez postižení funkce granulocytů. Tvoří se jádra nejvíce se dvěma segmenty a asi 30 % všech neutrofilních granulocytů vytváří tyčky. Častěji se tvoří hypogranulární formy neutrofilů. Vyskytuje se hlavně u těžkých infekcí, u akutní leukemie s myelodysplastickými změnami, MDS, metastázách karcinomu do kostní dřene, po podání některých léků.

Myelodysplastický syndrom. Onemocnění je charakterizováno anémií, leukopenií a trombocytopenií nebo jejich různou kombinací. V periferní krvi, ale i v kostní dřeni nacházíme četné morfologické abnormality. Anémie je normo- nebo makrocytární se znaky anizocytózy, poikilocytózy. Střední objem erytrocytů je často nad 100 fl. V periferní krvi nacházíme makroovalocyty, schizocyty, poikilocyty, siderocyty, bazofilní tečkování. Můžeme najít i Howell-Jollyho tělíska nebo i karyorrhexi. Mohou se vyskytnout i vícejaderné erytroblasty. V granulocytární řadě se vyskytuje hyposegmentace neutrofilních leukocytů. Často se vyskytují poruchy specifické granulace neutrofilů. Typické jsou hypogranulární až agranulární formy myelocytů, metamyelocytů, tyček i segmentů [18]. Někdy přetrvává bazofilie plazmy granulocytů i ve zralých buňkách. Trombocyty v periferní krvi bývají často obrovské, avšak v kostní dřeni se vyskytují mikromegakaryocyty s málo lobulizovaným jádrem, případně jednojadernou formou.

Další vyšetření užitečná v laboratorní diagnostice trombocytopenií

Posouzení základních koagulačních testů. Protrombinový test, aktivovaný parciální tromboplastinový test, fibrinogen, antitrombin, D-dimery jsou nezbytné pro posouzení hemostázy a k vyloučení přidružené nebo komplexní poruchy hemostázy.

Imunohematologické vyšetření. Vyšetření přímého antiglobulinového testu (PAT) je důležité při podezření na imunní hemolytickou anémii.

Vyšetření kostní dřene. Indikováno je vždy při podezření na poruchu krvetvorby na základě nálezu pancytopenie nebo morfologických odchylek v periferní krvi.

Základní biochemické parametry. Vyšetření renálních funkcí (možná alterace u TTP, HUS), jaterních testů (trombocytopenie alkoholiků, při jaterní cirhóze, HELLP syndrom), haptoglobinu a LDH (vyloučení současné hemolýzy), kyselina močová (bývá vyšší u myeloproliferací).

Jiná vyšetření. Sérologické testy na systémový lupus erythematosus, HIV, HCV, HBV, EBV, CMV a jiné.

Závěr

Diferenciální diagnostika nově zjištěné trombocytopenie představuje komplikovaný problém, který je potřeba urgentně řešit. Jako první se s tímto problémem musí vypořádat laboratorní pracovník. Svým rychlým a správným postupem v diferenciální diagnostice může zachránit život kriticky nemocného pacienta. Proto je doporučeno v každé hematologické laboratoři vypracování a dodržování standardního operačního postupu s cílem včasného zachytu život ohrožujících stavů. Definitivní diferenciální diagnóza je pak v rukou ošetřujícího lékaře a spolupracujícího hematologa.

Literatura

1. Kubisz P et al. Hematologia a transfuziologia. Praha: Grada Avicenum 2006.
2. Guidelines on the Diagnosis and Management of the Thrombotic Microangiopathic Haemolytic Anaemias. Br J Haematol 2003; 120: 556–577.
3. Penka M, Bulikova A et al. Neonkologická hematologie, 2. doplněné a zcela přepracované vydání, Praha: Grada Publishing 2009, 107 s.
4. Elting LS, Rubenstein EB, Martin CG et al. Incidence, cost and outcomes of bleeding and chemotherapy dose modification among solid tumor patients with chemotherapy – induced thrombocytopenia. J Clin Oncol 2001; 19: 1137–1146.

5. Colman RV, Hirsch J et al. Diagnosis of the Immune thrombocytopenic purpura. *Hemostasis and Thrombosis* 1994; 117: 1713–1721.
6. Shanafelt TD, Fonseca R. Thrombocytopenia. In: Oliveira GHM, Nesbit GC, Murphy JG Mayo Clinic Medical Manual, Mayo Clinic Scientific Press 2006.
7. Mant MJ, Doery JC, Gauldie J et al. Pseudothrombocytopenia due to platelet aggregation and degranulation in blood collected in EDTA. *Scand J Haematol* 1975; 15: 161–170.
8. Payne BA, Pierre RV. Pseudothrombocytopenia a laboratory artefact with potentially serious consequences. *Mayo Clin Proc* 1984; 59: 123–125.
9. Drachman JG. Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean MP. *Blood* 2004; 103: 390–398.
10. Hull RD, Pineo GF, Rashob GE. Heparin versus heparin and LMWH. *J Lab Clin Med* 1998; 133: 171–174.
11. Becker JU. Disseminated Intravascular Coagulation: Differential Diagnosis. *Br J Hematol* 2007; 139: 387–415.
12. Taylor FBJ, Toh CH, Hoots WK et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Tromb Haemost* 2001; 86: 1327–1330.
13. Kelton J, Smith J, Warkentin T et al. Immunoglobulin G From Patients With Heparin-Induced Thrombocytopenia Binds to a Complex of Heparin and Platelet Factor 4. *Blood* 1994; 83: 3232–3239.
14. Koch S, Harenberg J, Odel M et al. Development of a High-Pressure Liquid Chromatography Method for Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 900–904.
15. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: diagnosis and management. *Circulation* 2004; 110: 454–458.
16. Young NS, Calado RT, Schering P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anaemias. *J Blood* 2006; 108: 2509–2519.
17. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. *Value of Laboratory Testing* 1998; 7: 1527.
18. Dunbar CE, Nienhuis AW. Myelodysplastic syndromes. *Blood: Principles and practice hematology*. *J Blood* 1995; 85: 377–414.

RNDr. Mária Kušnierová
www.hospital-pe.cz
e-mail: mkusnierova@hospital-pe.cz

Doručeno do redakce: 31. 3. 2010

www.zdravky.cz