

УДК 616-097:616.151.5:612.12:615.273.5:616.15-07:616.155.294

ЗНАЧЕНИЕ СВОЕВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭДТА-АССОЦИИРОВАННОЙ ПСЕВДОТРОМБОЦИТОПЕНИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

© Карина Альбертовна Папаян¹, Татьяна Геннадьевна Цветкова², Эльвира Фаатовна Андреева¹, Рустам Алигисмет оглы Шахалиев¹, Надежда Нодариевна Немсцверидзе¹

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

² ВЦЭРМ им А.М. Никифорова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 4/2.

Контактная информация: Карина Альбертовна Папаян — к.м.н., доцент кафедры факультетской педиатрии.
E-mail: papayan@inbox.ru

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. Этилендиаминтетрауксусная кислота (К2ЭДТА или К3ЭДТА) представляет собой мелкокристаллический порошок белого цвета. Она широко применяется в качестве антикоагулянта в лабораторной практике ввиду ряда преимуществ, таких как хорошая растворимость, отсутствие структурных изменений клеток и разведения крови при использовании (в отличие от, например, цитрата натрия). Основным механизмом действия ЭДТА является образование малодиссоциирующих соединений с ионами кальция (Ca²⁺), что ограничивает его взаимодействие с мембранными рецепторами, выключает из системы свертывания крови и, следовательно, тормозит агрегацию и адгезию тромбоцитов при проведении анализов в лаборатории. Своевременное определение у пациентов ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении является важным диагностическим критерием, необходимым для исключения заболеваний крови и предупреждения возникновения ошибок при выборе тактики лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ЭДТА, псевдотромбоцитопения, тромбоциты, гликопротеин.

THE IMPORTANCE OF TIMELY DIAGNOSIS OF EDTA-ASSISTED PSEUDOTHROMBOCYTOPENIA IN CLINICAL PRACTICE

© Karina A. Papayan¹, Tatiana G. Tsvetkova², Elvira F. Andreeva¹, Rustam oglu A. Shagaliev¹, Hope N. Nemsitsveridze¹

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

² VTSERM them A.M. Nikiforova. 194044, Saint-Petersburg, ul. Academician Lebedev, 4/2.

Contact Information: Karina A. Papayan — Ph. D., Associate Professor of the Faculty of Pediatrics Department. E-mail: papayan@inbox.ru

ABCSTRACT. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia (PTCP) 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 specific antibodies causing the platelet aggregation in the presence of EDTA. Ethylenediaminetetraacetic acid (K2EDTA or K3EDTA) is a white crystalline powder. It is widely used in laboratory practice owing to several advantages such as high solubility, lack of cell structure alteration and blood dilution. 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, pseudothrombocytopenia, platelets, glycoprotein.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, клинический анализ крови является одним из наиболее часто проводимых исследований для постановки диагноза в практике врачей любой специальности, поэтому вопрос о точности и достоверности данного анализа не теряет своей значимости. Чрезвычайно важно своевременно выявлять все факторы, способные приводить к искажению результатов. К таким факторам относится ЭДТА-индуцированная псевдотромбоцитопения — лабораторный феномен, который определяется как ложное снижение количества тромбоцитов, возникающее *in vitro* при использовании в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). В данной статье приводится описание феномена, клинических лабораторных критериев, алгоритм диагностики, а также, в качестве примера, разбор клинического случая.

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Следует еще раз отметить, что ЭДТА-индуцированная псевдотромбоцитопения является исключительно лабораторным феноменом. Наличие данного явления не влияет на количество тромбоцитов *in vivo* (оно остается в пределах нормы).

Частота встречаемости в популяции составляет 1:1000. Зависимости от пола, возраста, приема лекарственных средств не наблюдается.

По данным исследований, ЭДТА-индуцированная псевдотромбоцитопения одинаково часто встречается как у больных, так и у здоровых людей.

МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ

Этиопатогенез феномена до конца не изучен. Известно, что в механизме принимают участие специфические антитела, циркулирующие в крови только у пациентов с ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопенией. Как показали исследования, по своей природе эти антитела относятся к классу иммуноглобулинов: IgM (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 °С. 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 (α IIb) и бета (β 3) субъединицами напрямую зависит от наличия ионов кальция (рис. 1).

В пробирке под влиянием ЭДТА происходит связывание ионов кальция, которое вызывает диссоциацию комплекса и последующее

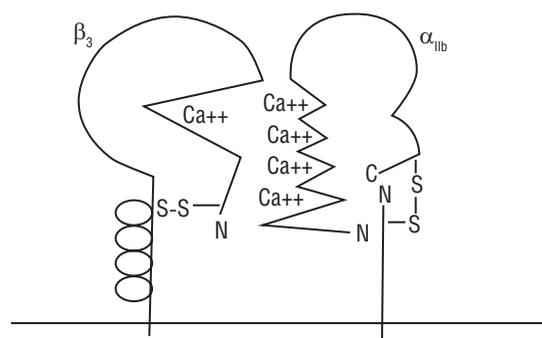


Рис. 1. Схема рецептора GPIIb-IIIa

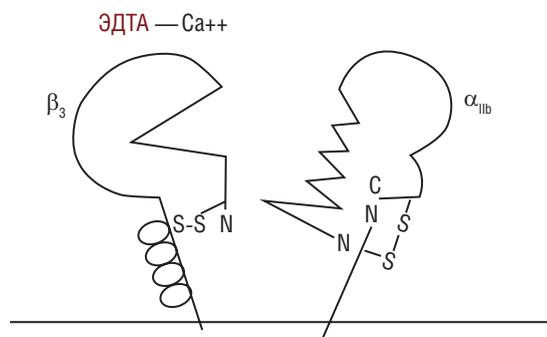


Рис. 2. Изменение структуры GPIIb-IIIa

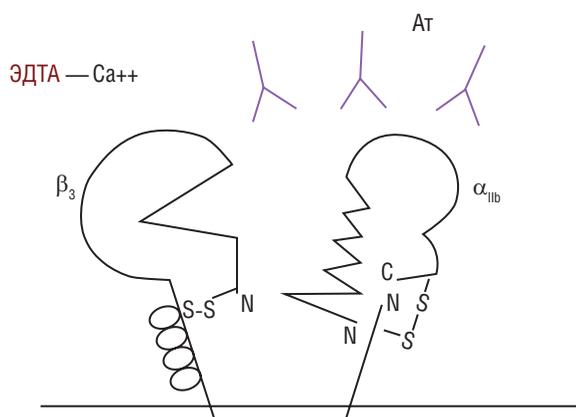


Рис. 3. Взаимодействие антител с видоизмененным рецептором у пациентов с ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопенией

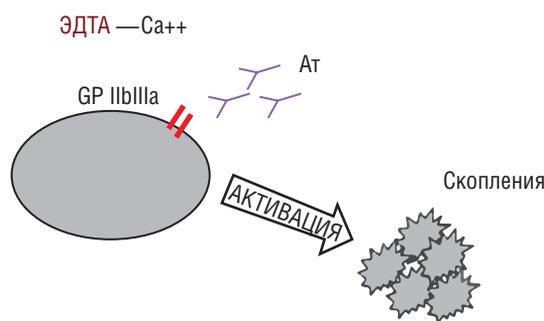


Рис. 4. Активация агрегации тромбоцитов в пробе с ЭДТА у пациентов с ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопенией

изменение структуры гликопротеина IIb-IIIa (рис. 2), в результате чего происходит обнажение скрытого в физиологических условиях эпитопа. Именно этот участок вступает в реакцию с антителами (рис. 3). Данный процесс провоцирует активацию и агрегацию тромбоцитов в пробе с ЭДТА, что объясняет возникновение ошибочных результатов в анализах крови, в частности псевдотромбоцитопению (рис. 4).

ДИАГНОСТИКА

Для постановки ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении выделяются следующие диагностические критерии:

1. Количество тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$
2. Прогрессирующее с течением времени снижение количества тромбоцитов в пробе с ЭДТА
3. Наличие скоплений только в тех пробах, где в качестве антикоагулянта использовалась ЭДТА
4. Отсутствие клинических проявлений геморрагического синдрома

Постановка диагноза в лабораторной практике требует выполнения определенных анализов, которые проводятся с использованием нескольких антикоагулянтов и с различными временными интервалами. В качестве примера приведем клинический случай.

Пациент Ф.А. А., 15 лет

Основной диагноз: единственная (вследствие мультикистоза контрлатеральной) функционирующая викарно гипертрофированная левая почка.

С 2011 года по настоящее время у данного пациента многократно в клинических анализах крови отмечается снижение уровня тромбоцитов на фоне отсутствия геморрагических проявлений.

На первом этапе исследования был произведен подсчет тромбоцитов по Фонию, который выявил их нормальное количество ($209 \times 10^9/\text{л}$), с одновременным присутствием скоплений кровяных пластинок в мазке крови.

Следующим этапом проводилось исследование на автоматическом анализаторе с ис-

Таблица 1

Динамика уровня тромбоцитов с 2011 г.

Возраст	9 лет		11 лет	12 лет			14 лет	15 лет		
PLT, $10^9/\text{л}$	65	59	97	49	89	84	68	84	131	92

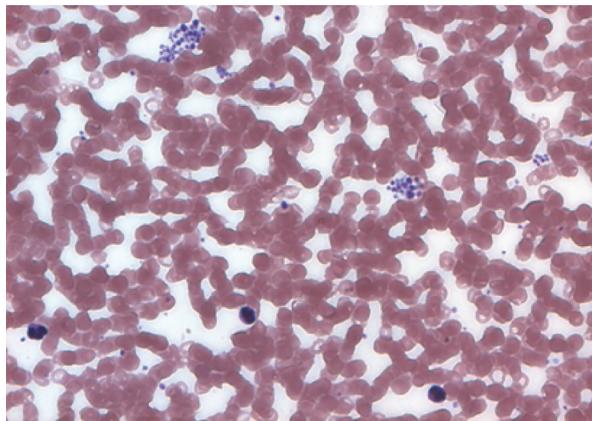


Рис. 5. Скопления тромбоцитов в пробе с ЭДТА через 60 минут после взятия крови

пользованием следующих антикоагулянтов: ЭДТА и цитрат натрия. Было проведено три анализа с ЭДТА с временными интервалами в 10, 60, 120 минут после взятия крови. Параллельно при тех же условиях исследовался образец крови с цитратом натрия: первый анализ через 10 минут, второй — спустя 60 минут после взятия крови. Одновременно с исследованиями на автоматическом анализаторе изучались мазки крови с ЭДТА и цитратом натрия на наличие скоплений тромбоцитов методом световой микроскопии.

В анализах, проведенных через 10 минут от взятия крови, отмечалось нормальное и сопоставимое количество тромбоцитов в пробах и с ЭДТА ($177,4 \times 10^9/\text{л}$), и с цитратом натрия ($162,0 \times 10^9/\text{л}$). Небольшое снижение количества тромбоцитов в пробе с цитратом натрия по сравнению с ЭДТА объясняется наличием разведения (объем используемого цитрата натрия составляет 1 мл).

В анализах, проведенных спустя 1 час после взятия крови, в пробе с ЭДТА было выявлено снижение количества тромбоцитов по данным анализатора ($118,9 \times 10^9/\text{л}$), а в мазке обнаруживались скопления, тогда как в пробе с цитратом натрия количество тромбоцитов оставалось в пределах нормы ($158,7 \times 10^9/\text{л}$), скопления отсутствовали. В анализах, проведенных через 2 часа от взятия крови, в пробе с ЭДТА отмечалось еще более выраженное снижение числа тромбоцитов ($104,3 \times 10^9/\text{л}$) за счет образования скоплений. Агглютинация тромбоцитов выявлялась только тогда, когда в пробирке присутствовали кальциевые хелаты ЭДТА, что подтверждает наличие у данного пациента ЭДТА-индуцированной псевдотромбоцитопении.

Таким образом, были соблюдены все критерии постановки данного феномена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как было сказано ранее, актуальность диагностики ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопении коррелирует с широким распространением автоматических гематологических анализаторов, поэтому необходимо помнить о существовании данного феномена. А также не стоит недооценивать значимость подсчета тромбоцитов по методу Фонио. В заключении следует отметить, что доказанное наличие у пациентов феномена ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении позволяет избежать дальнейших диагностических ошибок и необоснованных лекарственных назначений во врачебной практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Н.А. Гематология и иммунология детского возраста. СПб.: Гиппократ; 2009: 166–168, 590–591.
2. Гематологические анализаторы. Интерпретация анализа крови. Министерство здравоохранения и социального развития РФ. Методические рекомендации. М.: 21.03. 2007 N2050-PX.
3. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol.* 1995; 103–109. DOI:10.1002/ajh.2830500206.
4. Casonato A., Bertomoro A., Pontara E., Dannhauser D., Lazzaro A.R., Girolami A. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIb-IIIa. *J Clin Pathol.* 1994; 625–630. DOI: 10.1136/jcp.47.7.625.
5. Lin J., Luo Y., Yao S., Yan M. Li J., Ouyang W., and Kuang M. Discovery and Correction of Spurious Low Platelet Counts due to EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 29. 2015: 419–426. DOI 10.1002/jcla.21818.
6. 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): 1281–1285. DOI 10.1515/cclm-2012-0081.
7. 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): 115–119.
8. 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): 817–823.
9. Savage R.A. Pseudoleukocytosis due to EDTA-induced platelet clumping. *Am J Clinl Pathol.* 1984; 81(3): 317–322.
 10. van der Meer W., Allebes W., Simon A., van Berkel Y., de Keijzer M.H. 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): 243–247.
-
- REFERENCES**
-
1. Alekseev N.A. Gematologiya i immunologiya detskogo vozrasta. [Hematology and childhood immunology]. SPb.: Gippokrat; 2009: 166–168, 590–591. (in Russian).
 2. Gematologicheskie analizatory. Interpretaciya analiza krovi. [Hematologic analyzers. Interpretation of blood tests]. Ministerstvo zdravoohraneniya i social'nogo razvitiya RF. Metodicheskie rekomendacii. M.: 21.03.2007 N2050-RH. (in Russian).
 3. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol.* 1995: 103–109. DOI:10.1002/ajh.2830500206.
 4. Casonato A., Bertomoro A., Pontara E., Dannhauser D., Lazzaro A.R., Girolami A. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIB-IIIa. *J Clin Pathol.* 1994; 625–630. DOI: 10.1136/jcp.47.7.625.
 5. Lin J., Luo Y., Yao S., Yan M. Li J., Ouyang W., and Kuang M. Discovery and Correction of Spurious Low Platelet Counts due to EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 29. 2015: 419–426. DOI 10.1002/jcla.21818.
 6. 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): 1281–1285. DOI 10.1515/cclm-2012-0081.
 7. 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): 115–119.
 8. 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): 817–823.
 9. Savage R.A. Pseudoleukocytosis due to EDTA-induced platelet clumping. *Am J Clinl Pathol.* 1984; 81(3): 317–322.
 10. van der Meer W., Allebes W., Simon A., van Berkel Y., de Keijzer M.H. 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): 243–247.