

Laboratorní postup při nálezu trombocytopenie

L. Šáchová, A. Urgasová, J. Gumulec

Hemato-onkologické a transfúzní centrum FN Ostrava, přednosta prim. MUDr. Jaromír Gumulec

Souhrn: Trombocytopenie – pokles počtu krevních destiček pod hodnotu $100 \times 10^9/l$ může představovat významný klinický problém – krvácení. Riziko hemoragických komplikací narůstá s tíží trombocytopenie. I těžká trombocytopenie však může být projevem stavu s dominantně trombotickými symptomy, kde krvácení stojí v pozadí (např. trombotické mikroangiopatie) nebo kde se krvácení objevuje současně s trombotickými projevy (tzv. trombohemoragické syndromy). Při prvním nálezu trombocytopenie je nutné vyloučit pseudo-trombocytopenii. Poté se doporučuje postupovat podle standardizovaného diferenciálně-diagnostického algoritmu, který by měl být na každém pracovišti vypracován. V článku shrnujeme obecná pravidla diferenciální diagnostiky trombocytopenie se zvláštním zaměřením na laboratorní postupy.

Klíčová slova: trombocytopenie – pseudotrombocytopenie – diferenciální diagnostika

Laboratory procedures following thrombocytopenia diagnosis

Summary: Thrombocytopenia – decrease in the blood platelets count below $100 \times 10^9/L$ – may represent a significant clinical complication – bleeding. A risk of haemorrhagic complications increases with the severity of thrombocytopenia. Even severe thrombocytopenia, however, may be a sign of a condition with predominant symptoms of thrombosis where bleeding is on the background (thrombotic microangiopathy, for example) or where bleeding occurs concurrently with symptoms of thrombosis (so called thrombohaemorrhagic syndromes). It is necessary to exclude pseudothrombocytopenia when thrombocytopenia is first diagnosed. It is then recommended to follow a standardized differential diagnosis algorithm that should be available at each clinical site. We summarize the general rules of thrombocytopenia differential diagnosis with a specific focus on laboratory processes.

Key words: thrombocytopenia – pseudothrombocytopenia – differential diagnosis

Úvod

Krevní destičky jsou buněčné fragmenty zasahující mimo jiné do systému stavění krvácení a do procesu tvorby trombotické cévní okluze. V periferní krvi cirkulují 7–10 dní a zhruba 1/3 je přechodně sekvistrované ve slezině. Obvyklé referenční rozmezí počtu krevních destiček u zdravého dospělého člověka je $130\text{--}450 \times 10^9/l$. Počet cirkulujících krevních destiček však může lehce kolísat v závislosti na řadě faktorů (reakce na závažné cytokiny, fáze menstruačního cyklu, gravidita apod.). Trombocytopenie – pokles počtu krevních destiček pod hodnotu $100 \times 10^9/l$ – může představovat významný klinický problém – krvácení. Riziko hemoragických komplikací narůstá s tíží trombocytopenie (tab. 1) [1]. I těžká trombocytopenie však může být projevem stavu s dominantně trombotickými symptomy, kde krvácení stojí v pozadí (např. trombotické mikroangiopatie) nebo kde se ob-

jevuje současně s trombotickými projevy (trombohemoragické syndromy).

Diferenciální diagnostika trombocytopenie může být komplikovaný problém, a máme-li jej vyřešit beze zbytku, musíme postupovat komplexně. Jen zřídka se jako první s pacientem s trombocytopenií setká klinický hematolog. V naprosté většině případů diagnózu trombocytopenie stanovuje lékař-nehematolog a jako úplně první trombocytopenii prokáže laboratorní pracovník.

Je pacient s trombocytopenií v život ohrožující situaci?

První myšlenka, kterou musí mít i laboratorní pracovník na paměti při prvním průkazu trombocytopenie ze vzorku krve, je, zda není pacient, jehož krev vyšetřuje, v daném okamžiku v život ohrožující situaci [2]. Stav, který je třeba zvažovat, jsou následující.

Aktivní krvácení (např. do gastrointestinálního traktu) může u pacienta s trombocytopenií vyústit v život ohro-

žující krvácení (ŽOK), počet krevních destiček pod $10 \times 10^9/l$ je spojen s rizikem rozvoje spontánního intracerebrálního krvácení (ICH) nebo krvácení z jiných velkých orgánů, což vyžaduje okamžité zhodnocení situace [1]. V každé laboratoři by měl být proto vypracován standardizovaný systém hlášení výsledků, které překročily určitou varovnou mez. Mezi nimi musí být i první nález významné trombocytopenie.

Trombocytopenie spojené s multiorganovým selháním – trombotické mikroangiopatie (TMA) [3,9–12]. Patří sem **trombocytopenie a jiné poruchy**

Tab. 1. Tíže trombocytopenie a riziko krvácení [1].

Počet krevních destiček	Riziko krvácení
$20\text{--}50 \times 10^9/l$	5 %
$10\text{--}20 \times 10^9/l$	10 %
pod $10 \times 10^9/l$	21 %

Tab. 2. Rozdělení trombocytopenie podle dominantního etiopatogenetického mechanismu [2].

Klasifikace trombocytopenie

Příčina	Jednotka
selhávající tvorba destiček	– trombocytopenie u megaloblastové anémie (B_{12}, folát) – leukemie nebo myelodysplastické syndromy – aplastická anémie – toxická myelosupese (alkoholem, polékové změny) – jaterní cirhóza s portální hypertenzí – seps – polékové změny (H_2-blokátory, inhibitory protonové pumpy, thiazidová diuretika) – virová infekce (EBV, HIV, HCV) – myelofibróza – kongenitální trombocytopenie
sekvestrace destiček ve zvětšené slezině	– jaterní cirhóza s portální hypertenzí – myeloproliferace – lymfoproliferace – infekce (<i>Mycobacterium avium</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, malarie, histoplazmóza) – endokarditida – autoimunitní hemolýza – stádající lipidózy
zvýšená destrukce/spotřeba destiček	
– imunní etiologie:	– idiopatická trombocytopenická purpura – heparinem indukovaná trombocytopenie – polékové trombocytopenie (chinin, chinidin, valproová kyselina) – Evansův syndrom – potransfuzní purpura – neonatální alloimunitní trombocytopenie
– mechanického původu:	– diseminovaná intravaskulární koagulace – trombotické mikroangiopatie (TTP, HUS, HELLP) – endokarditida – umělá srdeční chlopeč – infekce (rickettsiáza nebo ehrlichioza) – antifosfolipidový syndrom – systémové vaskulitidy
naředění normálního počtu destiček	– masivní nebo výměnná transfuze – gravidita – anasarka různého původu

hemostázy u kriticky nemocných pacientů včetně diseminované intravaskulární koagulopatie (DIC), které významně ovlivňují vyhlídky kriticky nemocných pacientů a projevují se trombo-hemoragickým syndromem. Dále mezi ně náleží **trombotická trombocytopenická purpura (TTP)** a **hemolyticko-uremický syndrom (HUS)**, život ohrožující stavy manifestované trombocytopenií, mikroangiopatickou hemolytickou anémií a orgánovým selháním, které vyžadují neodkladnou hospitalizaci, diagnostickou rozhodnost a event. výměnnou plazmaferézu.

U žen v těhotenství a po porodu je třeba pamatovat na odlišnosti chování TTP a HUS a na specifické, těhotenské TMA – **preeklampsie/eklampsie, HELLP syndrom** a **akutní steatóza jater těhotných** – vždy jde o život matky i plodu ohrožující stavy vyžadující hospitalizaci, rozhodnou diagnostickou rozvahu, přesné načasování porodu a správnou indikaci výměnné plazmaferézy. **Sekundární (nekonsumpční) TMA** – sekundární TTP/HUS-like syndromy jsou charakterizované trombocytopenií, mikroangiopatickou hemolytickou anémií, orgánovým selháním

a přítomností známých vyvolávajících faktorů. Vyžadují srovnatelně rozhodnou diagnosticko-terapeutickou rozhodnost jako primární TMA. **Katastrofický antifosfolipidový syndrom (CAPS)** je život ohrožující stav charakterizovaný mnohočetnými mikro- a makrovaskulárními trombotickými okluzemi nejméně ve 3 orgánech nebo tkáních, který se rozvíjí během jediného týdne u pacienta s průkazem antifosfolipidových protilátek (APA) [13,16].

Trombocytopenie spojené s průkazem APA, antifosfolipidový syndrom (APS) a **CAPS** jsou stavy s širokým spektrem projevů od asymptomatické trombocytopenie po případy s fatálním multiorgánovým selháním. Společným laboratorním projevem je průkaz APA [19–21].

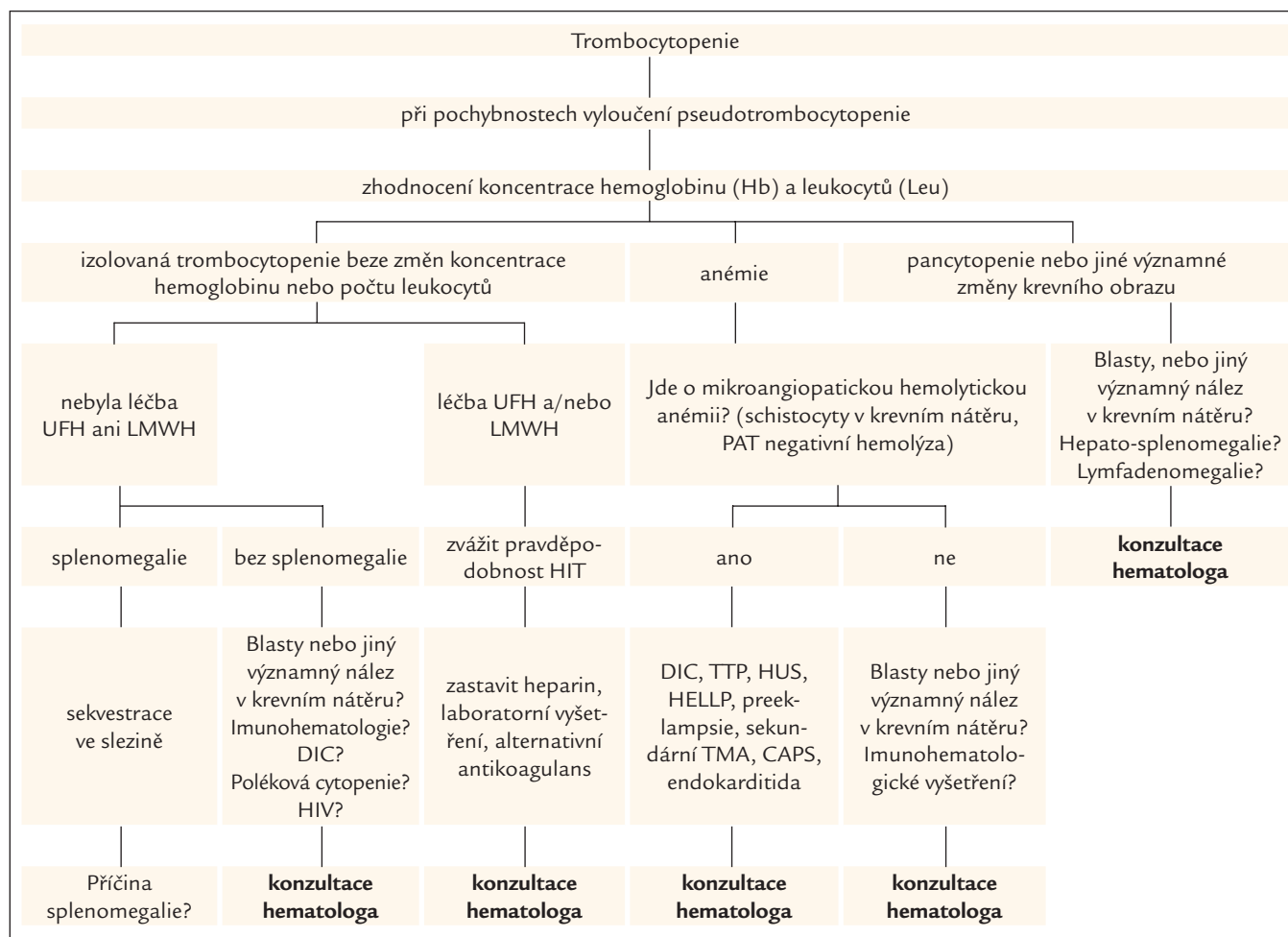
Heparinem-indukovaná trombocytopenie (HIT) je protilátkami zprostředkovaný nežádoucí účinek heparinu, je spojen s imunologicky navozenou aktivací trombocytů manifestovanou žilní a/nebo arteriální trombózou [4].

Akutní myeloidní leukemie (AML) představuje různorodou skupinu maligních onemocnění krvetvorby s proliferací a akumulací nezralých hematopoetických buněk v kostní dřeni a s jejich následným vyplavováním do periferní krve. Nezřídka se klinický stav pacienta rychle zhoršuje, a proto je třeba jednat velmi rychle. Neodkladné řešení (zahájení léčby) je nutné v případech akutní promyelocytární leukemie s vyšším počtem leukocytů nebo s rozvinutou DIC, dále ve všech případech s poškozením orgánů hyperleukocytárním syndromem nebo infiltrací orgánů (možné při počtu blastů nad $100 \times 10^9/l$) nebo při typu AML M4 a M5 dle FAB klasifikace [15].

Idiopatická trombocytopenická purpura (ITP) je trombocytopenie navozená imunitním mechanismem. Diagnózu je možné uzavřít po vyloučení všech ostatních příčin trombocytopenie.

Obecná pravidla diagnostiky a diferenciální diagnostiky trombocytopenie

Diferenciální diagnostika trombocytopenie obvykle vychází z dominujícího



Graf 1. Obecný diferenciálně-diagnostický algoritmus [2,14].

patofyziologického mechanismu, který pokles krevních destiček způsobuje. Jde o **sníženou novotvorbu destiček** nebo **vystupňovanou destrukci, resp. spotřebu**, o **vystupňovanou sekvestraci destiček ve slezině** a o **naředění normálního počtu destiček** (tab. 2, graf 1) [2].

Laboratorní vyšetření u pacientů s trombocytopenií [2–4]

Obecně: Krevní obraz včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů a počtu retikulocytů je jistě základní vyšetření. U pacientů s nově prokázanou trombocytopenií je důležité i podrobné prohlédnutí krevního nátěru v mikroskopu, které nelze omezovat na „pouhé“ mikroskopické zhodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů, nehematology často preferované před přístrojovým. Pečlivé prohlédnutí krevního nátěru v mikroskopu může navíc:

- vyloučit shlukování destiček (důvod pro nový odběr krve do standardní zkumavky nebo do alternativního protisrážlivého roztoku k vyloučení pseudotrombocytopenie závislé na EDTA) – podrobněji níže
- prokázat zmnožení schistocytů nad 3–5% upozorňující na možnost trombotické mikroangiopatie (TTP, HUS, DIC) nebo endokarditidy
- prokázat přítomnost blastů upozorňující na možnost akutní leukemie nebo myelodysplastického syndromu a diagnostikovat vyplavování leukocytárních a erytrocytárních prekurzorů (leukoerytroblastóza) charakteristických pro myeloproliferativní onemocnění, infiltraci dřeně, těžkou hemolýzu

Vyloučení pseudotrombocytopenie (nepravé, laboratorní trombocytopenie). Pseudotrombocytopenie je fa-

lešně nízký počet destiček stanovený in vitro, který neodpovídá skutečnému počtu destiček v krvi. Mimo jiné je způsobena odhalením epitopů na trombocytech v přítomnosti antikoagulačního činidla (nejčastěji EDTA, ale i ostatních) a interakcí těchto epitopů s antitrombocytárními protilátkami IgG nebo IgM (často tzv. chladové protilátky) nebo cirkulujícími imunokomplexy. Výsledkem je agregace destiček nebo jejich satelitizmus na granulocytech a stanovení velmi nízkého počtu trombocytů v krevním obraze. Jev se vyskytuje s nízkou frekvencí u normální populace, častěji pak u pacientů s autoimunitními onemocněními, po infekcích, posttraumatických stavech a s onkologickými onemocněními [17]. Moderní analyzátoři upozorňují na přítomnost shluků destiček, u některých vzorků však mohou jednotlivé shluky zařadit mezi erytro-

Tab. 3. Typické spektrum patofyziologických rysů mikroangiopatických hemolytických anémií [9].

Diagnóza	TTP	HUS	Pre-eklampsie/ eklampsie	HELLP	DIC
CNS projevy	+++	+/-	+/-	+/-	+/-
poškození ledvin	+/-	+++	+	+	+/-
horečka	+/-	-/+	-	-	+/-
poškození jater	+/-	+/-	+/-	+++	+/-
hypertenze	-/+	+/-	+++	+/-	-
hemolýza	+++	++	+	++	+
trombocytopenie	+++	++	+/-	++	+++
koagulopatie	-	-	+/-	+/-	+++

cyty nebo leukocyty [2,5–7]. Přítomnost shluků destiček lze potvrdit prohlédnutím krevního nátěru.

Přesný počet destiček lze zpravidla určit vyšetřením nového vzorku krve (pro vyloučení chyb způsobených nesprávným odběrem).

V případě opakovaného nálezů agregátů trombocytů je možné použít pro stanovení krevních destiček odběrovou zkumavku s alternativním protisrážlivým roztokem:

- odběrová zkumavka ThromboExact, která obsahuje látky zamezující agregaci destiček, výsledkem je počet destiček ($10^9/l$), jehož referenční rozmezí se nemění
- odběrová zkumavka s citrátem sodným (díky většímu objemu citrátu než EDTA dojde k naředění počtu destiček, a proto je nutné naměřený počet destiček vynásobit indexem 1,1)

Nezastupitelné je paralelní provedení a interpretace výsledků základních koagulačních testů, kam patří:

- protrombinový test (PT)
- aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT)
- fibrinogen (Fbg)
- antitrombin (AT) a D-dimery (DD) u kriticky nemocných pacientů
- protein C (PC) a trombin-antitrombin komplex (TAT) pro upřesnění podezření na rozvíjející se DIC

Ke správné interpretaci laboratorního obrazu u pacientů s nově prokázanou trombocytopenií patří interpretace základních biochemických testů

(ionty, urea, kreatinin, celkový, event. konjugovaný bilirubin, ALT, AST, LDH) a mikroskopického a chemického vyšetření moči.

Výsledek vyšetření přímého antiglobulinového (Coombsova) testu je důležitý pro vyloučení/potvrzení podezření na imunní nebo neimunní etiologii současné hemolytické anémie.

U febrilních pacientů s nově prokázanou trombocytopenií je třeba myslet na HUS/TTP, bakteriální endokarditidu a DIC. Pro komplexní zhodnocení je nutné u osob s krvavými průjmy typickými i pro HUS provést kultivaci stolice s cílem identifikovat *Escherichia coli* O157:H7, odběr krve na hemokulturu k identifikaci možné bakteriální endokarditidy.

Pro diagnostiku idiopatické trombocytopenické purpury (tab. 3) je nutné vyloučení jiných příčin trombocytopenie (v hematologické laboratoři pečlivě interpretovat všechny parametry krevního obrazu a koagulogramu) a u pacientů starších 60 let doplnit vyšetření kostní dřeně. Vyšetření destičkových protilátek má doplňkový význam.

U trombocytopenických pacientů s neurologickými projevy je nutné myslet na TTP a při vyšetřování krevního obrazu pátrat pro známky mikroangiopatické hemolytické (PAT negativní) anémie. Moderní hematologické analyzátory se sofistikovanými informačními systémy dokážou tyto postupy standardizovat.

V případě průkazu blastů nebo jiných významných změn v periferní krvi je třeba neprodleně výsledek konzultovat s odesílajícím lékařem a doporu-

čit nebo paralelně provést konzultaci hematologa.

U pacientů léčených heparinem je třeba myslet na rozvoj HIT a doporučit doplnění imunologických a funkčních testů k vyloučení/potvrzení této život ohrožující jednotky.

U pacientů s anamnézou trombotických epizod je v laboratoři třeba interpretovat nález trombocytopenie s ohledem na známé výsledky koagulačních testů a dalších testů na trombofilie, jako je antifosfolipidový syndrom, případně doporučit doplnění testů na antifosfolipidové protilátky (lupus antikoagulans, antikardiolipinové protilátky a protilátky proti β_2 -glykoproteinu I).

V konsolidované laboratoři lze s výhodou nový nález trombocytopenie interpretovat s výsledky ostatních testů (vitamin B_{12} , folát, TSH, HIV, HCV, HBV, EBV, CMV, parvoviry, sérologické testy na systémový lupus erythematosus a další).

Na žádankách o laboratorní vyšetření mají být stručně zformulovány všechny informace, které mohou přispět k přesnější a cílenější práci laboratoře. Mohou sem patřit i údaje z anamnézy a fyzikálního vyšetření pacientů s trombocytopenií.

Anamnéza zaměřená na etiologii trombocytopenie

- osobní nebo rodinná anamnéza krvácivých chorob (neobvykle silné, dlouhé nebo opakující se krvácení po lékařských zákrocích – stomatologických, chirurgických – nebo po poranění)
- nová medikace: H_2 -blokátory, inhibitory protonové pumpy, thiazidová diuretika, chinin, chinidin, valproová kyselina, zlato
- probíhající nebo nedávné virové onemocnění spojené s ITP nebo aplastickou anémií
- průjem nebo gastrointestinální onemocnění asociované s HUS
- bolesti hlavy, zmatenost, somnolence: zvážit trombotické mikroangiopatie, při trombocytopenii pod $10 \times 10^9/l$ nitrolební krvácení

- léčba heparinem – nefrakcionovaný nebo frakcionovaný: vyloučit HIT
- gravidita nebo nedávňý porod: HELLP syndrom, preeklampsie, akutní steatóza jater gravidních žen
- pátrání po získané poruše funkce destiček (viz výše)

Fyzikální vyšetření u pacientů s trombocytopenií

- petechie
- purpura – kožní nebo slizniční
- modřiny, ekchymózy
- neurologický nález
- oftalmoskopický nález
- lymfadenopatie nebo hepatosplenomegalie

Závěr

Při nálezu trombocytopenie pod $100 \times 10^9/l$ je nutné nejdříve vyloučit pseudotrombocytopenii. Po vyloučení pseudotrombocytopenie, postupujeme dále podle diferenciálně-diagnostického algoritmu, který by měl být vypracován a respektován v každé laboratoři.

Literatura

1. 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.

2. Shanafelt TD, Fonseca R. Thrombocytopenia. In: Oliveira GHM, Nesbit GC, Murphy JG. *Mayo Clinic Medical Manual*. Mayo Clinic Scientific Press 2006.

3. Guidelines on the Diagnosis and Management of the Thrombotic Microangiopathic Haemolytic Anaemias. *Br J Haematol* 2003; 120: 556–573.

4. Warkentin T, Greinacher A, Lincoff AM et al. Treatment and Prevention of Heparin-Induced Thrombocytopenia: American College of Chest Physicians of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. 8th ed. *Chest* 2008; 340S–380S.

5. Payne BA, Pierre RV. Pseudotrombocytopenia: A laboratory artifact with potentially serious complications consequences. *Mayo Clin Proc* 1984; 59: 123–125.

6. Berkman N, Michaeli Y, Or R et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: A clinical study of 18 patients and a review of the literature. *Am J Hematol* 1991; 36: 195–201.

7. Schrezenmeier H, Müller H, Gonsilius E et al. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb Haemost* 1995; 73: 506–513.

8. Bizzaro N. Platelet satellitosis to polymorphonuclears: Cytochemical, immunological, and ultrastructural characterization of eight cases. *Am J Hematol* 1991; 36: 235–242.

9. Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias. *Br J Hematol* 2003; 120: 556–557.

10. Mayer SA, LM. Aledort Thrombotic Microangiopathy: Differential Diagnosis,

Pathophysiology and Therapeutic Strategies. *Mt Sinai J Med* 2005; 72: 166–175.

11. Nguyen TC, Carcillo JA. Bench-to bedside review: Thrombocytopenia-associated multiple organ failure – a newly appreciated syndrome in the critically ill. *Critical Care* 2006; 10: 235–242.

12. Levi M, Opal SM. Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Critical Care* 2006; 10: 222–230.

13. Espinosa G, Bucciarelli S, Cervera R et al. Thrombotic microangiopathic haemolytic anemia and antiphospholipid antibodies. *Ann Rev Rheum Dis* 2004; 63: 730–736.

14. Taylor FBJ, Toh CH, Hoots WK et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1327–1330.

15. Krejčí M, Šmardová J, Adam Z. Akutní myeloidní leukémie. In: Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J et al. *Hematologie, přehled maligních hematologických onemocnění*. 2. dopl. a zcela přepr. vyd. Praha: Grada Publishing 2008; 29–38.

16. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2005; 4: 295–306.

17. Nové informace OLM MOU. Dostupnost na www.mou.cz/section.

Bc. Lucie Šachová
www.fnspo.cz
 e-mail: lucie.sachova@fnspo.cz

Doručeno do redakce: 30. 1. 2009