

Pseudotrombocytopenie door trombocyttagglutinen (EDTA-pseudotrombocytopenie)

J. JACOBS, G. TRICOT EN R. L. VERWILGHEN

INLEIDING

Bloedplaatjestellingen zijn alleen betrouwbaar als talrijke potentiële technische fouten geëlimineerd zijn. De nieuwe generatie elektronische trombocytentellers heeft bewezen accuraat te zijn binnen bepaalde grenzen.¹ Ook de reproduceerbaarheid is hoog: Dacie et al. vermeldden reeds tien jaar geleden een variatiecoëfficiënt van slechts 3 tot 4%, tegenover 8 tot 10% bij de optische telling.²

Meestal wordt als antistollingsmiddel van het bloed ethyleen-diamine-tetra-acetaat (EDTA) gebruikt, in normale omstandigheden de krachtigste inhibitor van de trombocyttaggregatie en -adhesie. Bovendien brengt het slechts een minimum aan morfologische veranderingen teweeg aan de cel.³ Nochtans zijn er foutief-lage trombocytentellingen beschreven bij anticoagulantia zoals EDTA, zowel bij normale personen als bij patiënten met allerlei aandoeningen. Een in vitro-agglutinatie van de trombocyten is hiervoor verantwoordelijk. Het herkennen van dergelijke pseudotrombocytopenie is uitermate belangrijk. Foutief-lage bloedplaatjestellingen kunnen leiden tot diagnostische en therapeutische vergissingen.

In 1 jaar tijd werd pseudotrombocytopenie door agglutinen vastgesteld bij 12 patiënten, van wie twee worden beschreven. Daarbij valt de nadruk op de herkenning van pseudotrombocytopenie.

METHODEN

Bloedplaatjestellingen worden uitgevoerd in bloed ontteld door K₂-EDTA met elektronische partikeltellers (Coulter Counter S-plus en S IV-plus, Ortho ELT-800). De naar volumina gedefinieerde elementen van het bloed worden geteld volgens het principe van de flow-cytometrie, en naar grootte gerangschikt met behulp van een oscilloscoop, de 'Channelyzer' (Coulter). De grootte van de getelde partikels bepaalt hierbij de grootte der elektrische impulsen, en deze worden naar stijgende intensiteit gerangschikt. Op een X-as wordt de grootte der partikels uitgezet, terwijl op de Y-as het aantal impulsen afgebeeld wordt. Hieruit wordt een histogram afgeleid. Dit wordt van bloedplaatjes, witte en rode bloedcellen getekend. Als voorbeeld beelden wij het leukocytenhistogram af van de Coulter S IV-plus (figuur 1). De leukocyten (die een schrompelingsproces ondergaan) worden reeds vanaf een volume van 35 femtoliter (fl) geteld.

Universitair Ziekenhuis Gasthuisberg, Kliniek Inwendige Geneeskunde, afd. Hematologie, Herestraat 49, 3000 Leuven (België).
J. Jacobs, assistent-geneeskundige; G. Tricot en R.L. Verwilghen, hematologen.

Correspondentie-adres: J. Jacobs.

SAMENVATTING

In de periode van één jaar werd bij twaalf patiënten pseudotrombocytopenie vastgesteld: de foutief-lage bloedplaatjestellingen langs geautomatiseerde weg waren te wijten aan bloedplaatjesagglutinaties in aanwezigheid van ethyleendiaminetetra-acetaat als anticoagulans. Bij geen van de patiënten werden tekenen van een verhoogde bloedingneiging waargenomen. Indien uitgevoerd, waren de stollingstests normaal en werden er geen trombocytantistoffen gevonden; bij beenmerg-onderzoeken werd een normale megakaryopoëse aangetoond. Microscopisch onderzoek van het bloeditrijkje bracht talrijke trombocyttagglutinen aan het licht, de bron van deze agglutinen veroorzaakte een foutief-hoge leukocyten telling langs geautomatiseerde weg.

Het diagnostische en therapeutische belang van pseudotrombocytopenie wordt beklemtoond. Ook andere oorzaken van pseudotrombocytopenie worden vermeld.

Het belangrijkste element bij het herkennen van dit in vitro-artefact blijft het microscopische onderzoek van het perifere bloed. Met heparine onstolbaar gemaakt bloed zal normale trombocytentellingen weergeven. Met fluoride-oxalaat en ook met Na₃-citraat ontteld bloed kan eveneens een beeld van pseudotrombocytopenie geven. Het histogram, waarmee moderne automatische partikeltellers uitgerust zijn, vormt een snel en elegant hulpmiddel: bloedplaatjesagglutinen voegen een karakteristieke curve toe aan het lage-volumina-gebied van het leukocytenhistogram.

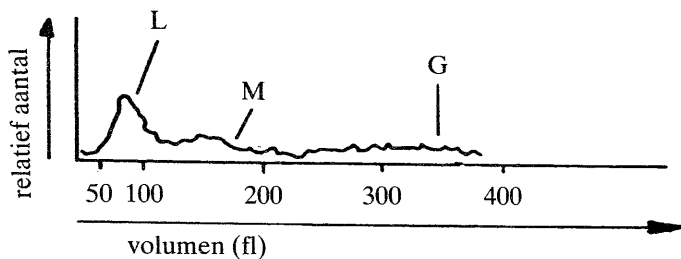
Bij het doorgeven en interpreteren van lage bloedplaatjestellingen zou men deze gegevens voor ogen dienen te houden.

ZIEKTEGESCHIEDENISSEN

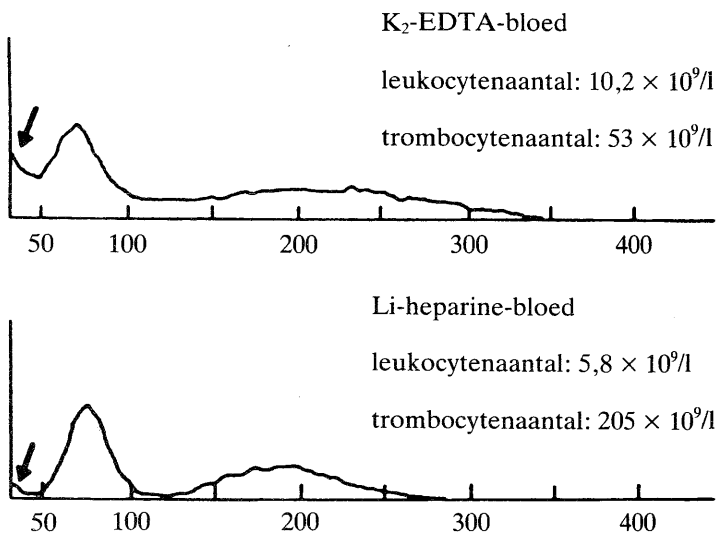
Patiënt A is een 38-jarige huisvrouw zonder belangrijke ziekten in de voorgeschiedenis. Zij raadpleegt haar huisarts wegens paresthesiën in de rechter onderarm. Bij elektronische telling wordt een ernstige trombocytopenie vastgesteld ($18 \times 10^9/l$), die door optische telling wordt bevestigd ($35 \times 10^9/l$). De dagen voordien had zij naproxen, mefenesine en chloormezanone tegen de pijn ingenomen.

Bij opname blijken geen klinische tekenen van bloedingneiging te bestaan. Oogfundi en stollingsuitslagen zijn normaal. De trombocytopenie wordt door elektronische telling bevestigd (Ortho ELT-800), en tevens wordt een lichte leukocytose vastgesteld ($10,3 \times 10^9/l$). De patiënte krijgt bloedplaatjes uit 2 eenheden bloed toegediend. In het sternumpunctaat wordt een actieve megakaryocytaire reeks waargenomen, hetgeen het vermoeden van idiopathische trombocytopenische purpura (ITP) versterkt. In het uitstrijkje van perifeer bloed worden echter talrijke trombocyttagglutinen gezien.

In een controlebepaling in bloed ontteld met Li-heparine blijkt evenwel dat het aantal trombocyten en het aantal leukocyten normaal zijn, en ook dat de door additie van trombocyttagglutinen verhoogde top vooraan in het leukocytenhistogram



FIGUUR 1. Leukocytenhistogram van de Coulter S IV-plus met de drie subpopulaties: lymfocyten (L), mononucleaire cellen (M) en granulocyten (G).



FIGUUR 2. Leukocytenhistogrammen van patiënte A (Coulter S-plus). De trombocytagglutinatoren in K₂-EDTA-bloed worden als leukocyten verrekend en veroorzaken een additiebeeld voorafgaand aan het histogram (pijl); foutief-lage trombocyten tellingen en foutief-hoge leukocyten tellingen zijn het gevolg. Dit artefact wordt niet weergegeven in met Li-heparine ontsteld bloed.

thans bij elektronische telling afwezig is (figuur 2). Bij microscopisch onderzoek van uitgestreken perifeer bloed worden geen trombocytagglutinatoren meer waargenomen.

Patiënt B is een man van 89 jaar bij wie twee maanden voor opname een bronchuscarcinoom werd ontdekt. Hij wordt thans opgenomen wegens een ingeklemde liesbreuk. Bij preoperatief laboratoriumonderzoek wordt een ernstige trombopenie vastgesteld ($10 \times 10^9/l$). Omdat men een idiopathische trombopenische purpura vermoedt, dient men hem 100 mg prednisolon toe en tevens een bloedplaatjestransfusie uit 6 eenheden bloed. De hemostase tijdens de operatie is normaal. Na de operatie worden sterk schommelende trombocytenwaarden gevonden (van 25×10^9 tot $143 \times 10^9/l$). De optische bloedplaatjestelling bedraagt $10 \times 10^9/l$. De stollingsstatus is normaal.

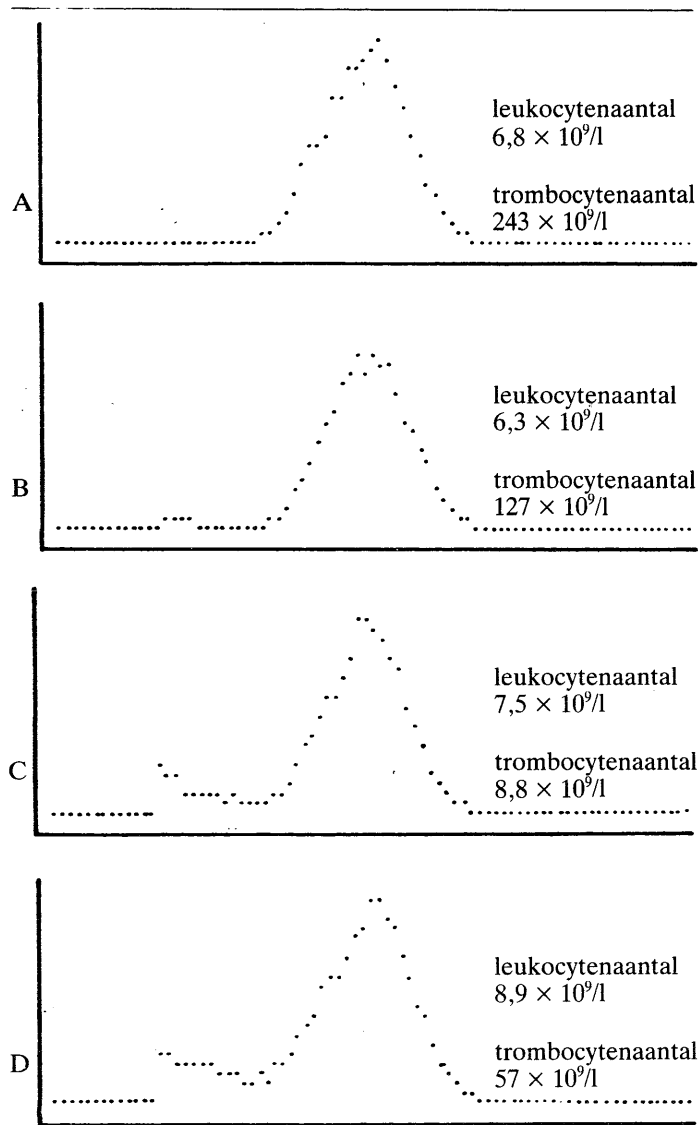
Behalve diazepam, amoxicilline, theofylline en acetylcysteïne neemt de patiënt ook kinidinebisulfaatdurettes: men vermoedt een immuun-gemedieerde trombopenie hierop, en staakt de toediening van kinidine. Bij een beenmergonderzoek worden weinig celrijke preparaten aangetroffen met een vrij zwak vertegenwoordigde megakaryocyttaire reeks. Weerom worden in het uitstrijkje van perifeer bloed trombocytagglutinatoren waargenomen. Een pseudotrombocytopenie vermoedend, voeren wij seriële bepalingen uit in K₂-EDTA-bloed. Vrij snel

wordt er een daling van het aantal trombocyten waargenomen (figuur 3). Tegelijkertijd verschijnt er een 'additiebeeld' van trombocytagglutinatoren voorafgaand aan het leukocytenhistogram: deze agglutinatoren worden, zodra ze volumineus genoeg zijn, als leukocyten geteld en geven aldus aanleiding tot foutief-hoge leukocyten tellingen.

Gedurende de volgende maanden stelden wij nog verscheidene gevallen van pseudotrombocytopenie vast. Alle patiënten zijn te zamen ondergebracht in de tabel. Retrospectief achterhaalden wij in dezelfde periode (augustus 1984-juli 1985) nog drie gevallen waarbij de trombocytopenie door dit in vitro-artefact verklaard kan worden.

BESCHOUWING

Vier typen van pseudotrombocytopenie worden onderscheiden: reuzebloedplaatjes, bloedplaatjesagglutina-



FIGUUR 3. Patiënt B (Ortho ELT-800). Tijdfafhankelijk optreden van de trombocytagglutinatoren in bloed ontsteld met K₂-EDTA. De figuur toont het leukocytenhistogram, de trombocyten- en de leukocyten tellingen onmiddellijk na afname (A), 1/2 uur (B), 1 uur (C) en 2 uur (D) na afname. Te zamen met de daling van de trombocytenaantallen en de stijging van de leukocytenaantallen, valt het ontstaan op van het additiebeeld voorafgaand aan het histogram.

Patiënten met pseudotrombocytopenie

patiënt, geslacht, leeftijd (jr) en kenmerken	trombocytentellingen in $10^9/l$	
	EDTA	ander anticoagulans
A v 38 paresthesieën t.h.v. arm	53	205 (heparine)
B m 89 bronchuscarcinoom liesbreukoperatie	10	226 (heparine)
C v 54 atypische rugklachten	40	215 (heparine)
D m 19 allergische rinitis	40	192 (heparine)
E v 38 cafergot-intoxicatie	61	267 (Na ₃ -citraat)
F m 69 CARA	8	257 (heparine)
G m 81 acute verwardheid	27	107 (heparine)
H v 87 diabetes mellitus	39	207 (heparine)
J v 29 hoofdpijn	53	366 (heparine)

ten, het zg. platelet-satellitisme en trombocyttagregaten.⁴

– Echte aggregaten berusten op een afnamefout: trombine kan vrijkomen door een zeer traumatiserende venepunctie. Meestal zal deze fout ook eenmalig zijn en bij controle-afname niet gereproduceerd worden.

– Grote bloedplaatjes kunnen een probleem vormen, zowel bij visuele tellingen als bij elektronische tellingen. Bij de eerste methode is het onderscheid met de witte bloedcellen moeilijk. Bij de elektronische telling overschrijden de reuzenbloedplaatjes de voor trombocyten gedefinieerde groottedrempel. Gedurende de vermelde periode van één jaar namen wij drie zulke gevallen waar. Myelodysplasie, de ziekte van May-Hegglin en het syndroom van Alport zijn de afwijkingen waarmee de patiënten zich aandienden.

– Bloedplaatjesagglutinatie en satellitisme houden verband met het anticoagulans: meestal betreft het EDTA. Bij satellitisme gaan de bloedplaatjes zich selectief rondom de neutrofiële segmentkernige cellen groeperen ('granulocyte-platelet rosettes').⁴ Het fenomeen is EDTA-afhankelijk,⁵ tijdafhankelijk,⁶ en blijkt geen fixatie-artefact te zijn.⁷ Het komt voor bij talrijke klinische toestanden, waarin Payne de 'stress'-factor als gemeenschappelijke noemer meent te onderkennen: het zou gaan om zgn. stress-platelets, jonge bloedplaatjes zoals deze in de circulatie vrijgelaten worden bij gestegen produktie na trombocytopenie.⁸ Hirokazu Imai et al. spreken over dit fenomeen als pseudotrombocytopenie type II.⁹ De eigenlijke agglutinatoren vertegenwoordigen dan type I.

– Trombocyttagglutinatoren. De absolute frequentie van dit fenomeen is laag: op een totaal van bijna 60.000 trombocytentellingen in 1 jaar tijds onderkennen wij dit twaalf maal. Gedurende dezelfde periode werden de beenmergpreparaten van 24 patiënten onderzocht, bij wie de trombocytopenie ($< 100 \times 10^9/l$) niet door een gedaalde aanmaak verklaard kon worden (carentie,

kwaadaardige aandoeningen). De relatieve frequentie van pseudotrombocytopenie ligt dus hoger. Bovendien lijkt het ons dat pseudotrombocytopenie vaak miskend wordt.

Pseudotrombocytopenie door agglutinatoren is zowel bij gezonde als bij zieke individuen beschreven, en dit bij een grote variëteit van aandoeningen. Bij de laatsten gaat het om maligne aandoeningen,^{3,5} acute en chronische leverziekten,¹⁰ auto-immuunziekten,^{5,10} en zeldzame aandoeningen zoals IgA-nefritis.⁹ Tussen deze uiteenlopende klinische toestanden zien de meeste schrijvers geen verband. Veenhoven et al. onderkennen algemene ziektebeelden met verhoogde (IgM-)globulinefractie als gemeenschappelijke factor.¹¹ Gowland et al. beschrijven de bloedplaatjes als bleker dan normaal.³ Het aantal azurofiële korrels zou verminderd zijn.

De meeste auteurs concluderen dat EDTA de verantwoordelijke cofactor is, in aanwezigheid van koude agglutinen van het IgM-type,^{4,10} of van een temperatuurafhankelijk IgG-globuline.¹² Watkins et al. vermelden een niet gespecificeerd γ -globuline.¹³ Onder en medewerkers beschrijven twee typen agglutinen: een type I, een divalent IgG en een type II, een IgM dat reageert zo de calciumconcentratie kleiner wordt dan 50 μmol .¹⁰ Belangrijk is dat bij dit laatste type er ook agglutinatoren optreden bij ontstopping van bloed met Na₃-citraat en fluoride-oxalaat, een fenomeen dat bij enkele van onze patiënten ook waargenomen werd. Pegels et al. toonden IgG-, IgA- en IgM-antistoffen aan.¹⁴

De rol van EDTA is fel bediscussieerd en loopt over twee sporen.^{3,10} (1) Calcium vormt een element van biologische membranen; het is geïncorporeerd in membraanproteïnen (de carboxylgroep van glutamaat en aspartaat) en in de fosfolipiden (fosfaatgroepen). Door de chelatie in EDTA wordt het calciumion onttrokken aan de membraan, die daardoor wordt gemodificeerd. Wellicht zou aldus een nieuwe antigene determinant bepaald worden, waarmee een IgM-immunoglobuline zou interageren. Hiermee zou ook het optreden van trombocyttagglutinatie bij citraat en oxalaat verklaard kunnen worden. Bij heparine komt dit niet voor: heparine neutraliseert trombine, en weerhoudt calcium niet, zoals de andere anticoagulantia doen. (2) EDTA zou rechtstreeks de membraan beschadigen, bijv. door reactie met de positieve NH₃⁺-groepen uit lysine. Het is bekend dat rode bloedcellen en trombocyten langer overleven op acid citrate dextrose (ACD) dan op EDTA. Dit directe toxische effect van EDTA op de membraan zou evenzo een neo-antigeen kunnen induceren, waarmee een globulinemolecule kan reageren. Ter preventie van de EDTA-afhankelijke agglutinatie vermelden Berning et al. dat men de pH van het bloedstaal moet terugbrengen tot 5,5. Agglutinatie treedt dan niet op.¹⁵

Het grote belang van juiste bloedplaatjestellingen maakt het snel herkennen van dit in vitro-artefact noodzakelijk. Het ontbreken van verhoogde bleedingsneiging bij ernstige trombocytopenie en de sterk uiteenlopende waarden bij controlebloednamen (ook bij optische tellingen!) moeten een vermoeden doen rijzen. Door micro-

scopisch onderzoek van het perifere-bloeduitstrijkje zullen talrijke agglutinatoren worden aangetoond. Deze kunnen zich zowel in de uitlopers van de uitstrijk als centraal bevinden: het verdient aanbeveling verscheidene velden te overschouwen. Controlestalen met Na₃-citraat, fluoride-oxalaat, doch vooral met Li-heparine bevestigen het artificiële karakter van de trombocytopenie. Een snel en illustratief hulpmiddel is het histogram, dat door de moderne elektronische partikeltellers afgebeeld wordt, waarbij de trombocyttagglutinatoren zich ophopen vooraan in het leukocytenhistogram. Ze worden als leukocyten geteld en geven aldus aanleiding tot foutief-hoge leukocyten tellingen, zoals in de figuren 2 en 3 weergegeven wordt.

Zo het histogram niet aan bepaalde mathematische criteria voldoet, wordt het 'flagged': een symbool (R₁) duidt de regio van interferentie aan (Coulter S IV-plus). Een dergelijk beeld is sterk suggestief voor trombocyttagglutinatoren, doch het dient gedifferentieerd te worden met andere interferenties. Normoblasten, niet-gelyseerde rode bloedcellen, proteïnemie en cryoglobulinen zijn er de voornaamste van, naast de vermelde reuzentrombocyten. Desalniettemin is dit beeld op het histogram een snel en duidelijk hulpmiddel, dat het definitief herkennen van de agglutinatoren bij microscopisch onderzoek kan voorafgaan.

SUMMARY

Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutination (EDTA pseudothrombocytopenia). - Twelve patients with pseudothrombocytopenia are reported: the spurious low platelet automated counts were due to agglutination of platelets in the presence of the anticoagulant ethylene diamine tetra-acetate (EDTA). None of the patients had symptoms or signs of a bleeding diathesis. If performed, the coagulation tests were normal, and no platelet antibodies were found; bone marrow examinations showed a normal megakaryopoiesis. Microscopic examination of the blood smear revealed numerous platelet clumps. These platelet clumps caused a false-high leucocyte count. The diagnostic and therapeutic importance of pseudothrombocytopenia is stressed. Other causes of pseudothrombocytopenia are mentioned.

The most important element in the recognition of this in vitro artefact is microscopic examination of the blood smear. Heparin anticoagulated blood will give normal platelet counts but fluoride oxalate and even trisodium citrate anticoagulated blood may give a picture of pseudothrombocytopenia. The histogram, which the modern automatic particle counters provide, is a fast and elegant aid: platelet clumps add a characteristic curve in the beginning of the leucocyte histogram.

In reporting and interpreting low platelet counts, this information should be kept in mind.

LITERATUUR

- Mayer K, Chin B, Magnes J, Thaler HT, Lotspeich C, Baisley A. Automated platelet counters: a comparative evaluation of latest instrumentation. *Am J Clin Pathol* 1980; 74: 135-50.
- Dacie JV, Lewis SM. *Practical haematology*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975: 57.

- Gowland E, Kay HEM, Spillman JC, Williamson JR. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. *J Clin Pathol* 1969; 22: 460-4.
- Kjeldsberg C. Platelet satellitism. *N Engl J Med* 1974; 290: 165.
- Kjeldsberg CR, Hershgold EJ. Spurious thrombocytopenia. *JAMA* 1974; 227: 628-30.
- Skinninger LF, Musclove CE, Kahn W. Platelet satellitism. An ultrastructural study. *Am J Hematol* 1978; 4: 179-85.
- Kjeldsberg CR, Swanson J. Platelet satellitism. *Blood* 1973; 43: 831-6.
- Payne CM. Platelet satellitism: an ultrastructural study. *Am J Pathol* 1981; 103 (1): 116-28.
- Imai H, Nakamoto Y, Miki K, et al. Pseudothrombocytopenia and IgA-related platelet agglutinin in a patient with IgA nephritis. *Nephron* 1983; 34: 154-8.
- Onder V, Weinstein A, Hoyer LW. Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood* 1980; 56: 177-82.
- Veenhoven WA, Schans GS van der, Huiges W, et al. Pseudothrombocytopenia due to agglutinins. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 1005-8.
- Schreiner DR, Bell WR. Pseudothrombocytopenia: Manifestation of a new type of platelet agglutinin. *Blood* 1973; 42: 541-9.
- Watkins SP, Shulman RN. Platelet cold agglutinins. *Blood* 1970; 36: 153-8.
- Pegels JG, Bruynes EC, Engelfriet CP, Borne AEGKr von dem. Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. *Blood* 1982; 59: 157-61.
- Berning H, Stilbo I. Pseudothrombocytopenia and the haematology laboratory (letter). *Lancet* 1982; ii: 1469-70.

Aanvaard op 17 maart 1986

Bladvulling

Vrijheidsberoving van krankzinnigen

Wanneer een krankzinnige, die tegen zijn wil in een gesticht werd verpleegd, na het verlaten van dit gesticht zijn bevindingen te boek stelt - iets wat meermalen gebeurt - dan zijn dergelijke autobiographiën voor den psychiater ex professo ontwijfelbaar van eenige waarde.

Niet alleen treft hun historische beteekenis tot opbouw van het geheel, het zijn tevens authentieke stukken, waaruit ten duidelijkste blijkt, hoeveel deernis en medelijden krankzinnigen verdienen; hoe diep zij somwijlen lijden als zij van hun vrijheid zijn beroofd. Redenen te over om met die vrijheidsberoving niet lichtvaardig te werk te gaan.

Maar het is juist de zoo even genoemde overweging; het is juist het diepe lijden, dat uit dergelijke stukken spreekt, dat bij mij althans vragen doet opkomen, wier belangrijkheid ongetwijfeld zal moeten worden toegegeven.

Binnen welke grenzen mag wel de absolute opoffering van het krankzinnige individu aan het algemeen belang gewettigd zijn? Kan elke krankzinnige, om het bloote feit alleen, dat hij krankzinnig is, worden beroofd van zijn vrijheid? En indien dit niet zoo is - (tot welke gedrochtelijke consequenties toch zou de bevestiging der laatstgenoemde vraag voeren) - wie moet dan aanwijzen, welke krankzinnigen in het maatschappelijk verkeer kunnen blijven, en welke daarentegen, om verschillende redenen, moeten worden beroofd van hunne vrijheid?

(Ned Tijdschr Geneeskd 1886; 30 (I): 255-6.)