

HOVEDBUDSKAP

- For å skille mellom trombocytopeni og pseudotrombocytopeni må prøven undersøkes for trombocyttaggregater.
- Vi har sammenliknet vår standardmetode, blodutstryk, med direkte mikroskopi av fullblodsdråpe og buffycoat.
- Vi anbefaler buffycoat som alternativ metode til blodutstryk ved vurdering av trombocyttaggregater fordi den har god sensitivitet, er enkel å utføre og er tidsbesparende.

SAMMENDRAG

Ved lave trombocyttkonsentrasjoner undersøkes prøven for trombocyttaggregater for å skille mellom trombocytopeni og pseudotrombocytopeni. Blodutstryk er standardmetode for påvisning av trombocyttaggregat ved Diakonhjemmet Sykehus AS, men metoden er tidkrevende og kan være vanskelig å vurdere på grunn av artefakter. Hensikten med studien var å evaluere om to alternative metoder, fullblodsdråpe og buffycoat, er like egnet som blodutstryk til identifisering av trombocyttaggregater. Prøvene ble i tillegg analysert på Sysmex XE-5000 før og etter uttak av buffycoat for å se om uttak av 10 µL buffycoat påvirket trombocyt- og leukocyttparameterne i så stor grad at prøven ikke kunne brukes til eventuell etterrekvirering.

Vi undersøkte 57 prøver med trombocyttkonsentrasjoner $< 90 \times 10^9/L$. Buffycoat hadde sensitivitet på 97 % sammenliknet med blodutstryk. I tillegg var metoden tidsbesparende og enkel å utføre. Bruk av fullblodsdråpe var raskest og enklest å utføre, med sensitivitet på 64 % sammenliknet med blodutstryk. Med denne metoden var det utfordrende å påvise eventuelle trombocyttaggregat på grunn av antallet erytrocytter tilstede i preparatet. Basert på dette anbefales ikke fullblodsdråpe som alternativ metode til blodutstryk. Resultatene viste også at det ikke var statistisk signifikant forskjell mellom trombocyt- og leukocyttparameterne før og etter uttak av buffycoat. Den prosentvise differansen mellom parameterne var mindre enn den analytiske variasjonen, og derfor ikke av klinisk betydning. Konklusjonen er at buffycoat kan benyttes som alternativ metode til blodutstryk for å identifisere trombocyttaggregater.

Nøkkelord: pseudotrombocytopeni, trombocyttaggregater, blodutstryk, buffycoat, fullblodsdråpe

- Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

Sammenlikning av tre metoder påvisning av trombocyttaggregat utredning av trombocytopeni

Av SIRI BEISVÅG ROM¹, HILDE K. OMDAL², DANIJELA PAVLOVIC³, RITA ZORA⁴ og GRO ELISABETH JENSEN¹

1. Bioingeniør, MSc, Avdeling for medisinsk biokjemi, Diakonhjemmet Sykehus AS, Oslo
2. Bioingeniør, Volvat medisinske senter, Majorstuen, Oslo
3. Bioingeniør, Humana medisinske senter, Sandvika
4. Bioingeniør, Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus Rikshospitalet, Oslo

Innledning

Trombocytter (blodplater) produseres i benmargen og er fragmenter av megakaryocyttenes cytoplasma. Megakaryocytters opphav, megakaryoblaster, dannes ved differensiering av hematopoietiske stamceller. Én megakaryocyt kan gi opphav til 1000 – 5000 trombocytter. Trombocytter er omtrent 20 % av størrelsen til erytrocytter, med et volum på 7 – 19 fL og diameter på 2 – 4 µm (1, 2). Trombocytter sirkulerer i blodbanen i syv til 10 dager (2).

De har ikke kjerne, men har mange unike strukturer som er essensielle for at de kan utøve sin funksjon. Trombocytmembranen består blant annet av forskjellige glykoproteiner (GP) som fungerer som reseptorer, hvor reseptor for von Willebrands faktor (VWF) spiller en viktig rolle. GP medvirker i to av trombocyttenes viktigste funksjoner: adhesjon til subendotelte vev (kollagen) og aggregering med andre trombocytter (3, 4). Stimulering av trombocytter fører til aktivering av GPIIb/IIIa-molekyler. Figur 1 viser hvordan trombocyttenes kryssbindes med fibrinogenbroer (5). Denne bindingen fører til molekylær konformasjons-

endring som resulterer i en sterk kobling og videre aktivering av trombocytter. En hvilende trombocyt kan ha 50 – 80 000 passive GPIIb/IIIa-reseptorer.

Trombocytopeni

Trombocytopeni (TCP) er unormalt lav konsentrasjon av trombocytter i blodet, og fører til redusert blødningskontroll. Det finnes ulike årsaker til TCP; medikamenter som påvirker funksjonen av benmargceller, heparinindusert trombocytopeni (6), lav produksjon av trombocytter på grunn av leukemi, økt nedbrytning av trombocytter i vev eller milt ved autoimmune sykdommer, store blødninger og spontan dannelse av koagel (7). TCP er også vanlig ved myelodysplastisk syndrom (MDS), hvor lave trombocytter skyldes manglende differensiering av megakaryocytprogenitorceller og økt apoptose av megakaryocytter (8).

Pseudotrombocytopeni (PTCP) er falske lave verdier ved analysering av trombocytter og skyldes aggregering av blodplater in vitro. Dette kan mistolkes som reell TCP, og føre til feildiagnostisering og unødvendig behandling. PTCP er van-

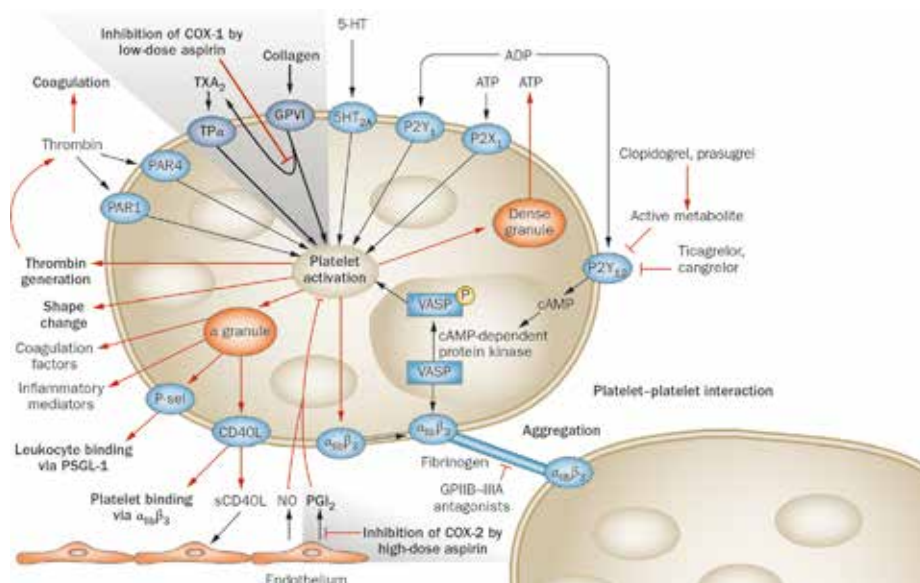
Artikkelen er basert på en bacheloroppgave utført på Diakonhjemmet Sykehus av bioingeniørstudentene Hilde K. Omdal, Danijela Pavlovic og Rita Zora. Veiledere var seksjonsleder Msc. Siri Beisvåg Rom og avdelings-sjef Msc. Gro Elisabeth Jensen. Intern veileder ved Høgskolen i Oslo og Akershus var Anne Karine Thorsrud.

for ater ved

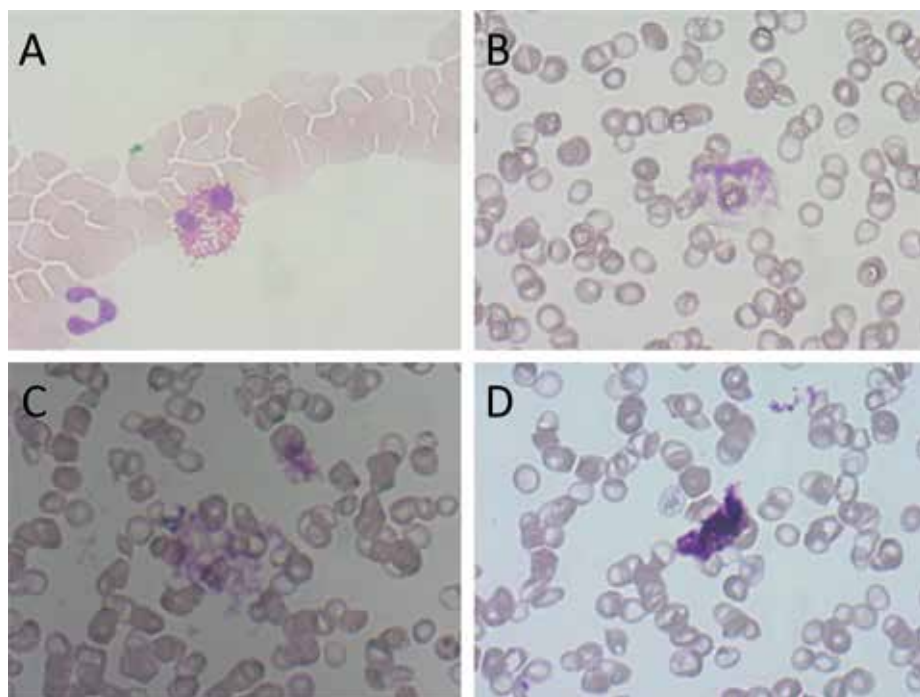
ligvis forårsaket av EDTA, og skyldes konformasjonsendringer i de cytoadhesive GPIIb-IIIa-reseptorene i trombocytmembranen. Det skjer en eksponering av epitoper som blir tilgjengelige for autoantistoffer, som igjen trigger trombocyt-aggregering in vitro. IgG er det dominerende antistoffet, og vil i denne prosessen oppføre seg som kuldeagglutinin som reagerer med trombocytene in vitro (9, 10, 11). PTCP kan også skyldes heparin in vitro (12). PTCP er vist å ha en prevalens på 0,1 – 2 % hos innlagte pasienter, og 15 – 17 % hos pasienter som evalueres isolert for TCP (13). Det er viktig å bekrefte eller avkrefte om lave trombocytall skyldes TCP eller PTCP.

Påvisning av trombocyttaggregater

Ved Diakonhjemmet Sykehus analyseres hematologiske prøver med Sysmex XE-5000. Trombocytter måles enten ved hjelp av motstandsprinsippet (impedans) eller optisk ved flowcytometri (14, 15). I impedansekanalen analyseres trombocytter parallelt med erytrocytter, og separeres fra disse ut fra størrelse. Sysmex XE-5000 gir to trombocytrelaterte flagg der aggregater kan være til stede i prøven: abnormal platelet distribution flag (PAD) og platelet clumps (CLP). Samsvar mellom flagging på instrumentet og forekomst av trombocyttaggregater har blitt undersøkt (16). Det ble vist at CLP er et mer pålitelig flagg med sensitivitet på 57 % (PAD 42 %), spesifisitet 99 % (PAD 83 %), positiv prediktiv verdi (PPV) på 37 % (PAD 1 %). Ved fravær av begge flagg er negativ prediktiv verdi (NPV) 100 %.



FIGUR 1: Aktivering av GPIIb/IIIa fører til at trombocytene aggregerer via fibrinogenbroer (5). Figuren er gjengitt med tillatelse fra Nature Publishing Group.



FIGUR 2: Eksempler på artefakter som kan oppfattes som trombocyttaggregater i blodutstryk; ødelagt eosinofil granulocyt (A), kjerneskygge (B) og fargeutfellinger (C og D).

Ved uventet funn av trombocytopeni er gjeldende rutine ved Diakonhjemmet Sykehus at prøven undersøkes for trombocyttaggregater i blodutstryk. Dette er en

ressurskrevende metode med utfordringer knyttet til subjektiv vurdering. Artefakter kan mistolkes som trombocyttaggregater (figur 2). Mulige alternative

TABELL 1: Krysstabell for fullblodsdråpe sammenlignet med blodutstryk viser 13 falske negative prøver.

	Fullblodsdråpe			
	Negativ	Positiv	Total	
Blodutstryk	Negativ	21	0	21
	Positiv	13	23	36
	Total	34	23	57

metoder er bruk av buffycoat eller fullblodsdråpe til direkte mikroskopi. Fullblodsdråpe gir et tykt lag med erythrocytter som kan skjule trombocyttagregater i prøven. Ved bruk av buffycoat er det usikkert om uttak av et lite volum vil påvirke antall leukocytter og trombocytter i så stor grad at prøverøret ikke kan benyttes til eventuell etterrekvirering.

Hensikten med denne studien var å sammenlikne referansemotoden (blodutstryk) med mikroskopi av buffycoat og

fullblodsdråpe for påvisning av trombocyttagregater med hensyn til sensitivitet, tidsbruk og utførelse. I tillegg ble det vurdert om uttak av buffycoat påvirker trombocyt- og leukocyttparametre ved reanalysering på Sysmex XE-5000.

Materiale og metoder

Studien gjelder kvalitetssikring av metode, og det kreves derfor ikke godkjenning fra Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK).

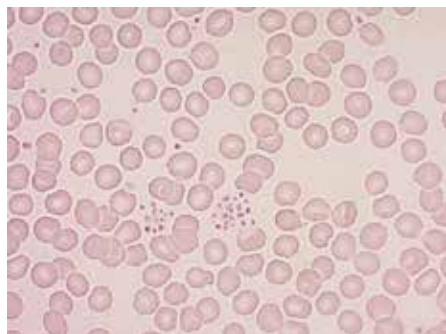


Foto: Heidi Andersen

FIGUR 3: Blodutstryk med trombocyttagregater.

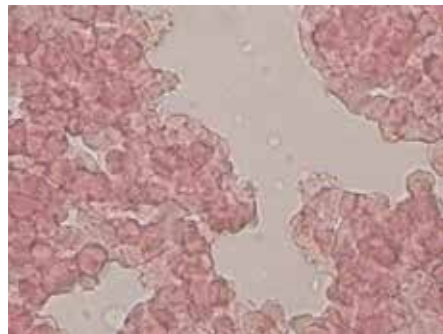


Foto: Siri Beisvåg Rom

FIGUR 5: Fullblodsdråpe uten trombocyttagregater.



Foto: Siri Beisvåg Rom

FIGUR 4: Buffycoat uten (A) og med (B) trombocyttagregater.

Studiedesign

Det ble samlet inn til sammen 57 prøver fra både inneliggende og polikliniske pasienter med trombocytterverdier $< 90 \times 10^9/L$. Blodprøvene var tappet på EDTA-rør og ble analysert på Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) for følgende parametre: Complete Blood Count (CBC) inkludert trombocytter, 5-parts differensialtelling av leukocytter (DIFF), kjerneholdige erythrocytter (NRBC) og retikulocytter.

Blodutstryk ble laget og farget med May-Grünwald/Giemsa-farging. Før vurdering i mikroskop påføres utstryket et tynt lag immersjonsolje. Utstryket vurderes først med 10x objektiv for å sjekke om fargingen har vært vellykket. For å kunne identifisere trombocytter og eventuelle aggregater ble hele utstryket vurdert med 40x objektiv (figur 3). Avdelingens kriterier for positivt funn i blodutstryk er minimum fire aggregater bestående av minst fire trombocytter.

Buffycoatpreparat ble laget ved å la EDTA-glasset stå på benk i cirka 20 minutter, slik at cellene sedimenterer. Leukocytter og trombocytter befinner seg i buffycoat, sjiktet i overgangen mellom erythrocytter og plasma. Det ble avpipettert 10 μL buffycoat cirka midt i buffycoatlaget. Det ble plassert på et objektglass og dekket med dekkglass. Buffycoatpreparatet ble mikroskopert i løpet av fem minutter for å unngå uttørring. Det ble først mikroskopert med 10x objektiv. For å bekrefte funn av aggregater ble det brukt 40x objektiv (figur 4). Prøven ble regnet som positiv ved synlige aggregater til stede i preparatet. Etter uttak av buffycoat ble prøven reanalyseret på Sysmex XE-5000.

Tillaging av preparat for fullblodsdråpe ble utført ved at 10 μL fullblod ble plassert på et objektglass, og dekket med dekkglass. Fullblodsdråpen ble mikroskopert i løpet av fem minutter for å unngå uttørring. Mikroskopering ble utført med 40x objektiv (figur 5), og hele fullblodspreparatet ble undersøkt for trombocyttagregater. Kriteriet om minst fire trombocytter i minst fire aggregater ble benyttet for å kategorisere prøven som positiv.

TABELL 2: Krysstabell for buffycoat sammenlignet med blodutstryk viser én falsk negativ prøve.

	Buffycoat			
	Negativ	Positiv	Total	
Blodutstryk	Negativ	21	0	21
	Positiv	1	35	36
	Total	22	35	57

Funn av aggregater i blodutstryk var ikke kjent ved analysering av buffycoat og fullblodsdråpe.

Resultatene fra de to alternative metodene buffycoat og fullblodsdråpe ble sammenlignet med resultatet fra blodutstryk ved å sette opp krysstabeller og beregne sensitivitet. Sensitivitet beregnes ved formelen: antall sanne positive / (antall sanne positive + antall sanne negative).

Statistikk

Shapiro-Wilk normalfordelingsstest ble utført på differansen før og etter uttak av buffycoat for hver parameter analysert på Sysmex XE-5000. Grubbs test ble benyttet for beregning av eventuelle slengere, som i etterkant ble utelatt fra statistikken. Korrelasjonen mellom før og etter uttak av buffycoat ble beregnet med paret t-test for normalfordelte differanser, og Wilcoxon rangeringstest for ikke-normalfordelte differanser. Statistiske analyser ble utført med Microsoft Excel 2013 eller Analyse-it.

Resultater

Blodutstryk av de 57 prøvene med trombocyttdverdi $< 90 \times 10^9/L$, viste at 21 av prøvene var negative for trombocyttaggregater, altså reelle trombocytopenier.

Det ble funnet trombocyttaggregater i blodutstryk i 36 av de 57 prøvene. Av de 36 positive prøvene, var 35 positive ved undersøkelse av buffycoat og 26 positive ved undersøkelse av fullblodsdråpe (tabell 1 og 2). Det ble påvist 22 negative prøver med buffycoat og 34 negative prøver ved bruk av fullblodsdråpe, som gir henholdsvis én og 13 falske negative prøver (tabell 1 og 2). Sensitivitet ved bruk av buffycoat og fullblodsdråpe, sammenlignet med standardmetoden blodutstryk, blir da henholdsvis 0,97 og 0,64 (tabell 3). Fullblodsdråpe var den raskeste metoden å utføre av de tre (cirka seks minutter). Buffycoat tok cirka 25 minutter og farging og vurdering av blodutstryk omtrent en time.

Shapiro-Wilk normalitetstest viste at differansene for parameterne leukocytter (WBC), trombocytter (PLT) og lymfocytter (LYMPH) før og etter uttak av buffycoat var normalfordelte. Paret t-test viste ingen signifikant forskjell mellom differansene ved 0,05 signifikansnivå (tabell 4). Wilcoxon rangeringstest for de ikke-normalfordelte differansene for parameterne monocytter (EO), nøytrofile (NEUT), eosinofile (VAF) og basofile (BASO) granulocytter, viste heller ingen signifikant forskjell ved 0,05 signifikansnivå (tabell 5).

TABELL 3: Sensitivitet for metodene fullblodsdråpe og buffycoat. Blodutstryk er referansemetode.

	Fullblodsdråpe	Buffycoat
Sensitivitet	0,639	0,972

Diskusjon

For de tre metodene som ble sammenlignet i denne studien var det enklest å påvise trombocyttaggregater i buffycoat. Sammenlignet med fullblodsdråpe har buffycoat høyere konsentrasjon av trombocytter, generelt større aggregater og fravær av erytrocytter. Denne metoden har heller ikke utfordringer knyttet til mulige fargeutfellinger, slik som ved blodutstryk.

Resultatene fra sammenlikningen mellom buffycoat og blodutstryk viser god overenstemmelse i antall positive og negative prøver for trombocyttaggregat. Kun én prøve viste falskt negativt resultat i buffycoat. Denne prøven hadde lavt prøvevolum og hemolyse, og det var derfor vanskelig å pipettere av buffycoat uten å få med erytrocytter. I blodutstryket fra samme prøve ble det funnet flere aggregater, som hver inneholdt > 10 trombocytter.

Fullblodsdråpepreparatet er vesentlig tykkere enn blodutstryk. Tilstedeværelse av erytrocytter gjør det derfor vanskeligere å påvise aggregater fordi erytrocytene dekker over dem. Resultatene viste hele 13 falske negative funn ved undersøkelse i fullblodsdråpe sammenlignet med blodutstryk. Dette kan gi alvorlige konsekvenser knyttet til diagnose og behandling av pasienten. ➤

TABELL 4: Paret t-test på differansen før og etter uttak av buffycoat for parameterne leukocytter (WBC), trombocytter (PLT) og lymfocytter (LYMPH).

	n	Gjennomsnitt før	SD (gjennomsnitt før)	Gjennomsnitt etter	SD (gjennomsnitt etter)	Differanse	SD (differanse)	p
WBC	56	6,62	5,30	6,60	5,28	0,02	0,30	0,646
PLT	55	49,73	22,70	49,29	22,44	0,44	4,52	0,477
LYMPH	55	1,13	0,79	1,11	0,78	0,02	0,08	0,095

TABELL 5: Wilcoxon rangeringstest for parameterne nøytrofile granulocytter (NEUT), monocytter (MONO), eosinofile granulocytter (EO) og basofile granulocytter (BASO).

Fortegn	n	Gjennomsnittlig rang	p
NEUT			
Positiv	23	26,41	0,458
Negativ	29	26,57	
Null	4		
MONO			
Positiv	22	25,25	0,571
Negativ	27	24,80	
Null	7		
EO			
Positiv	20	21,00	0,173
Negativ	16	15,38	
Null	21		
BASO			
Positiv	13	16,46	0,173
Negativ	12	9,25	
Null	32		

Ved litteratursøk fant vi ingen kriterier for når en prøve skal regnes som positiv for trombocyttaggregat ved vurdering av fullblodsdråpe og buffycoatpreparat, og det var heller ikke fra vår side utarbeidet kriterier. Vi foreslo derfor først at definisjonen på en positiv prøve i buffycoat skulle være aggregater bestående av omtrent 20 trombocytter. Det viste seg imidlertid at det i praksis ikke er lett å telle antall trombocytter i et aggregat, og det ble bestemt at så lenge det var synlige aggregater til stede i preparatet ble prøven regnet som positiv. At det ikke ble funnet falske positive prøver ved undersøkelse av buffycoat taler for at dette er kriterier som kan benyttes. For fullblodspreparat ble det bestemt at trombocyttaggregatene måtte bestå av over fire trombocytter, og at det måtte være minimum fire aggregater; tilsvarende som for blodutstryk. Ved tvil om aggregater i fullblodsdråpe og buffycoat var store nok eller mange nok til å klassifisere prøven som positiv, ble preparatet mikroskopert av flere.

En potensiell feilkilde ved bruk av buffycoat er at store aggregater kan synke

til bunnen av glasset og ikke være til stede i buffycoat. Det er antatt at aggregeringstendensen i en slik prøve vil fanges opp av instrumentet. Ved tilstedeværelse av flagget CLP, og ikke funn av trombocyttaggregater i buffycoat, vil det være aktuelt å lage blodutstryk i tillegg.

Preparatene (både buffycoat og fullblodsdråpe) må undersøkes innen fem minutter for å hindre uttørking. Ved uttørking av preparat vil plasma fordampe og føre til mindre avstand mellom cellene. Dette kan gi falsk aggregering. Blodutstrykene er ikke utsatt for dette problemet.

Det ble ikke påvist noen statistisk signifikant forskjell på hematologiske parameterne etter uttak av buffycoat. I tillegg er den prosentvise differansen mindre enn den analytiske CV %-verdien for alle parameterne. Dette betyr at differansen etter uttak av buffycoat ikke er av klinisk betydning, slik at prøvene kan benyttes til etterrekvirering.

Det er ikke funnet andre norske eller internasjonale studier som avkrefter eller styrker vårt funn. Videre studier kan være å undersøke hva andelen aggregerte trombocytter har å si for det totale antall trombocytter hos pasienten, med mål om å kunne angi grad av aggregering som vurderingskriterium og dermed si noe om det totale antall trombocytter.

Konklusjon

Påvisning av trombocyttaggregat ved bruk av buffycoat gir en sensitivitet på 97 % sammenlignet med blodutstryk. I tillegg er buffycoat tidsbesparende og en enklere metode enn blodutstryk for å påvise trombocyttaggregater. Det er ikke påvist noen statistisk signifikant forskjell i antall leukocytter og trombocytter etter uttak av 10 µL buffycoat. Den prosentvise differansen er mindre enn den analytiske variasjonen og har dermed ingen klinisk betydning. På bakgrunn av dette anbefales buffycoat som alternativ metode til blodutstryk for påvisning av trombocyttaggregater i diagnostiseringen av trombocyttopeni og pseudotrombocyttopeni.

Bruk av fullblodsdråpe anbefales ikke som et alternativ til blodutstryk. ■

Referanser

- Miwa S. Atlas of Blood Cells. 4. utgave. Tokyo: Bunkodo Co; 1998.
- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Essential Haematology. 5. utgave. Oxford: Blackwell; 2006.
- George JN. Platelets: <https://www.ouhsc.edu/platelets/platelets/platelets%20intro.html> (18.07.16).
- Kunicki TJ. Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview. *Blut*. 1989;59(1):30-4.
- Warden BA, Willman AM, Williams CD. Anti-thrombotics for secondary prevention of non-cardioembolic ischaemic stroke. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(4):223-35.
- Hager H, Nyquist E, Jacobsen R, Hager A. En kvinne i 60-årene med store trombemasser i aorta. *Tidsskr Nor Legeforen*. 2015(135):1853-7.
- Evensen S. Trombocytopeni: <https://sml.snl.no/trombocytopeni> (18.07.16).
- Li W, Morrone K, Kambhampati S, Will B, Steidl U, Verma A. Thrombocytopenia in MDS: epidemiology, mechanisms, clinical consequences and novel therapeutic strategies. *Leukemia*. 2016;30(3):536-44.
- Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudo-thrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(8):1281-5.
- Nagler M, Keller P, Siegrist D, Alberio L. A case of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: simple recognition of an underdiagnosed and misleading phenomenon. *BMC Clin Path*. 2014;14:19.
- Pegels J, Bruynes E, Engelfriet C, Von Dem Borne A. Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. *Blood*. 1982;59(1):157-61.
- Noguchi S, Kitayama M, Niwa H, Tamai Y, Hirota K. A case report of sudden thrombocytopenia detected only by in vitro analysis. *J Anesth*. 2016;30(4):720-2.
- Vicari A, Banfi G, Bonini P. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a 12-month epidemiological study. *Scand J Clin Lab Invest* 1988;48(6):537-42.
- Systemx Europe GmbH. DC Sheath flow detection method: www.systemx.no/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/dc-sheath-flow-detection-method.html (18.07.16).
- Systemx Europe GmbH. RET/PLT-O Channel: www.systemx.no/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/ret-channel.html (18.07.16).
- Hawkins D, Jennifer M, Uppal M, Gong M, Jerald Z. An Assessment of the reliability of platelet-associated flags generated by the Systemx XE-5000 automated hematology analyzer in detecting platelet clumps: <http://jdc.jefferson.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1164&context=pacbf> (18.07.16).