

ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения у ребенка (клинический случай)

Н. А. Соколова¹, М. И. Савина¹, О. С. Шохина²

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

²ГБУЗ «Детская городская поликлиника № 7 Департамента здравоохранения города Москвы»

РЕЗЮМЕ

ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения представляет собой феномен агрегации тромбоцитов под действием антитромбоцитарных аутоантител, которая происходит, если периферическая кровь была стабилизирована антикоагулянтом K_2 ЭДТА или K_3 ЭДТА, реже другими – цитратом натрия или гепарином. Агрегацию тромбоцитов можно предотвратить, применяя другие варианты антикоагулянтов или дополняя их аминокислотами. При ЭДТА-зависимой тромбоцитопении функция тромбоцитов не нарушена, проявлений геморрагического синдрома нет. В данной статье рассмотрен клинический случай выявления ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении у ребенка 2 лет 6 месяцев, что представляет практический интерес, поскольку у детей данное явление встречается довольно редко. Было зарегистрировано низкое число тромбоцитов в общем анализе крови у ребенка в крови, стабилизированной антикоагулянтом K_2 ЭДТА. Подсчет тромбоцитов в образце крови, стабилизированной цитратом натрия, был в пределах референтных интервалов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: общий анализ крови, тромбоцитопения, ЭДТА, цитрат натрия, псевдотромбоцитопения, тромбоциты.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in child (clinical case report)

N. A. Sokolova¹, M. I. Savina¹, O. S. Shokhina²

¹Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow, Russia

²Children's City Clinic No. 7, Moscow, Russia

SUMMARY

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-dependent pseudothrombocytopenia is the phenomenon of a spurious low platelet count due to antiplatelet antibodies that cause platelet clumping in blood anticoagulated with EDTA. The aggregation of platelets in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia is usually prevented by other anticoagulants, such as sodium citrate. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia has never been associated with hemorrhagic diathesis or platelet dysfunction. In this article, a 2,5-year-old boy with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia is presented because of rare presentation. We report that EDTA can induce platelet clumping, and thus spuriously low platelet counts. However, aggregation of platelets was not detected in blood samples with sodium citrate, and platelet count was normal.

KEY WORDS: thrombocytopenia, complete blood count, ethylenediaminetetraacetic acid, citrate, pseudothrombocytopenia, thrombocyte.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Псевдотромбоцитопения – это феномен, наблюдаемый *in vitro*, и связанный с образованием агрегатов из тромбоцитов, возникающих под действием аутоиммунных антитромбоцитарных антител, которые становятся активными, при использовании в качестве антикоагулянтов калиевых солей ЭДТА или реже – цитрата натрия [1]. Псевдотромбоцитопения может быть принята за истинную в некоторых случаях, и, как следствие, разворачивается целый комплекс необходимого обследования для установления причины тромбоцитопении, и еще в более редких случаях пациенты получают лечение по поводу выявленной «тромбоцитопении», которой на самом деле нет.

Клиническое наблюдение

Рассмотрим клинический случай выявления псевдотромбоцитопении у ребенка *III.*, родившегося 16.07.2014. Мальчик *III.* родился от первой беременности, роды были своевременными в головном предлежании, при рождении масса тела новорожденного была 3550 г и рост – 53 см,

оценили по шкале Апгар на 8 из 9 баллов. Ребенок находился на грудном вскармливании, раннее развитие соответствовало возрасту. Пациент *III.* перенес следующие заболевания: 07.2014 – острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ); 12.2014 – острый ринит, аллергическая сыпь; 04.2015 – герпетическая ангина; 05.2015 – аллергический конъюнктивит; 09.2015 – герпетическая ангина; 10.2016 – ОРВИ; 12.2016 – ОРВИ.

В январе 2017 года ребенок *III.* в возрасте 2 лет 6 месяцев обратился к участковому педиатру с жалобами на влажный кашель, насморк, гнойное отделяемое из глаз, повышение температуры тела до 38,5 °С. При осмотре состояние было оценено как удовлетворительное, кожные покровы чистые, влажные; зев чистый, гиперемии нет; везикулярное дыхание, хрипов нет. Был поставлен диагноз «ОРВИ. Острый гнойный конъюнктивит», назначен общий анализ крови (ОАК).

ОАК от 13.01.2017 (исследование было выполнено с помощью 3-diff-гематологического анализатора и методом световой микроскопии окрашенных по Романовскому–Гимзе мазков периферической крови).

- Гемоглобин – 119 г/л.
- Эритроциты – $4,47 \times 10^{12}/л$.
- Гематокрит – 34,4%.
- MCH – 26,5 пг.
- MCHC – 345 г/л.
- MCV – 77 фл.
- RDW – 13,9%.
- Лейкоциты – $12,3 \times 10^9/л$.
- Тромбоциты – $58 \times 10^9/л$.
- СОЭ – 9 мм/ч (выполнено микрометодом Панченкова).
- Палочкоядерные нейтрофилы – 1%.
- Сегментоядерные нейтрофилы – 45%.
- Эозинофилы – 2%.
- Лимфоциты – 43%.
- Моноциты – 9%.

Впервые у ребенка была выявлена тромбоцитопения ($58 \times 10^9/л$), ранее число тромбоцитов колебалось в диапазоне $330\text{--}380 \times 10^9/л$. Педиатром был поставлен диагноз «тромбоцитопения неуточненная» и начат поиск возможных причин ее развития. Никаких клинических проявлений тромбоцитопении не было. Повторный анализ крови выполнен 17.01.2017, уровень тромбоцитов снизился до $19 \times 10^9/л$ при измерении на гематологическом анализаторе, при подсчете в окрашенном мазке крови число тромбоцитов составило $86 \times 10^9/л$, при этом были обнаружены агрегаты тромбоцитов, что делало фактически невозможным точное определение числа тромбоцитов методом по Фонию. Геморрагических проявлений у ребенка не было.

В феврале 2017 года ребенок перенес ОРВИ, затем обращение в марте 2017 года по поводу повышения температуры до $37,5^\circ\text{C}$, сухого кашля, насморка. При осмотре выявлена гиперемия зева, миндалины рыхлые, налетов нет. Диагноз: ОРВИ. Назначен общий анализ крови.

Общий анализ крови 17.03.2017.

- Гемоглобин – 117 г/л.
- Эритроциты – $4,37 \times 10^{12}/л$.
- Гематокрит – 34,8%.
- MCH – 26,5 пг.
- MCHC – 345 г/л.
- MCV – 77 фл.
- RDW – 13,5%.
- Лейкоциты – $8,7 \times 10^9/л$.
- Тромбоциты – $99 \times 10^9/л$.
- СОЭ – 9 мм/ч (выполнено микрометодом Панченкова).
- Палочкоядерные нейтрофилы – 1%.
- Сегментоядерные нейтрофилы – 36%.
- Эозинофилы – 1%.
- Лимфоциты – 53%.
- Моноциты – 9%.

При подсчете лейкоцитарной формулы в окрашенном по Романовскому–Гимзе мазке крови врач клинической лабораторной диагностики обратила внимание на большое количество агрегатов тромбоцитов. Доктор сделала предположение, что у ребенка Ш. возможно наличие псевдотромбоцитопении. Ребенку повторно в этот же

день был взят образец венозной крови с антикоагулянтном цитратом натрия. Количество тромбоцитов в этой пробе крови составило $216 \times 10^9/л$.

Таким образом было подтверждено наличие у пациента Ш. псевдотромбоцитопении. Были даны рекомендации по выполнению общего анализа крови в дальнейшем.

Обсуждение

Наиболее частый вариант псевдотромбоцитопении – это ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения [1]. Впервые данное явление было описано в 1969 году Gowland *et al.*: у женщины 70 лет с ретикулярной саркомой при подсчете числа тромбоцитов в крови, стабилизированной калиевыми солями ЭДТА, их количество составило $45 \times 10^9/л$, но при этом в мазке крови, окрашенной по Романовскому–Гимзе, были обнаружены агглютинаты [2]. При подсчете тромбоцитов в капиллярной крови без использования ЭДТА у данной пациентки число тромбоцитов оказалось $249 \times 10^9/л$, в дальнейшем авторы публикации испытывали кровь этой больной с различными антикоагулянтами – гепарином, цитратом натрия [2].

Частота встречаемости ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении невелика и составляет 0,10% общей популяции, достигая 0,21% среди госпитализированных пациентов; согласно другим данным, частота встречаемости колеблется от 0,07% до 0,20% [3, 4]. В присутствии калиевых солей ЭДТА антитромбоцитарные антитела взаимодействуют с антигенами тромбоцитов $gpIIb-IIIa$ [1, 4]. При образовании комплекса «антиген – антитело» стимулируется экспрессия активационных антигенов на тромбоцитах, активируется внутриклеточный фермент тирозин-киназа, что ведет в конечном итоге к агглютинации тромбоцитов, образованию ими агрегатов *in vitro*, и при подсчете числа тромбоцитов с помощью гематологического анализатора их количество будет снижено [1].

ЭДТА-зависимые антитромбоцитарные антитела обычно относятся к иммуноглобулинам класса G, A, M. Иммуноглобулины класса M могут вызывать агглютинацию тромбоцитов также при температуре 37°C и при использовании цитрата натрия в качестве антикоагулянта [5]. ЭДТА связывает ионы кальция, при этом наблюдается диссоциация Ca^{2+} -зависимых гетеродимеров $gpIIb-IIIa$, что, вероятно, позволяет аутоантителам соединиться с определенными антигенными структурами, которые становятся доступными для антител только после диссоциации гетеродимеров. Однако, если принять данный механизм за основу, остается открытым вопрос: почему в некоторых случаях использование цитрата натрия, который также является хелатором ионов кальция, агглютинации тромбоцитов не наблюдается [4]. При использовании гепарина, механизм антикоагулянтного действия которого является другим, также может наблюдаться агглютинация тромбоцитов [4]. Было показано, что абсолютное и относительное количество CD 5-положительных В-лимфоцитов у пациентов с ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопенией находится в пределах референтных интервалов [5].

Данные литературы очень противоречивы о том, является ли псевдотромбоцитопения только феноменом, который наблюдается только *in vitro* и не имеет клинического значения, или же выявление данного явления должно учитываться клиницистами. Например, в ряде работ было показано, что ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения чаще встречается у пациентов в тяжелом состоянии, страдающих онкологическими, аутоиммунными заболеваниями, а также имеющих патологию печени [3, 6]. В других же исследованиях не было установлено связи между данным феноменом и наличием у пациента травмы, ожогов, иммунодефицитных состояний, злокачественных новообразований, краснухи и цитомегаловирусной инфекции [5].

В ходе исследования феномена псевдотромбоцитопении, выполненного Lin *et al.*, было выявлено, что нет никакой корреляции данного явления с возрастом, полом пациентов, также не связано с приемом ими каких-либо лекарственных средств [1]. В работе Naoko Ohashi-Fukuda *et al.* были сопоставлены пациенты с ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопенией и без нее с различными нозологиями [3]. Пациенты, у которых была обнаружена ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения, чаще имели в анамнезе те или иные онкологические заболевания; кроме того, у этих пациентов был более высокий риск смерти по сравнению с другими больными с учетом поправки на возраст, пол, наличие злокачественных опухолей, аутоиммунных заболеваний и патологии печени [3]. По результатам исследования авторами был сделан вывод, что ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения не является исключительно лабораторным феноменом, который следует учитывать при выполнении подсчета количества тромбоцитов, но может быть индикатором такого варианта патологического состояния пациента, которое сопровождается повышенным риском неблагоприятных исходов. В ходе наблюдения за пациентами (в среднем в течение 5 лет) с выявленной ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопенией, в другом исследовании было установлено, что это состояние у них может сохраняться длительно, но не ведет к каким-то негативным последствиям [5].

Калиевые соли ЭДТА в лабораторной гематологии стали широко использоваться в связи с тем, что данный стабилизатор оказался оптимальным для проведения окрашивания мазков по Романовскому–Гимзе. Однако этот антикоагулянт имеет один существенный недостаток: он вызывает увеличение (набухание) тромбоцитов, нарастающее при увеличении длительности хранения крови, стабилизированной ЭДТА [7].

Сульфат магния ($MgSO_4$) – хорошо известный антикоагулянт, который использовался для предотвращения агглютинации тромбоцитов в стеклянных капиллярах. В конце 80 годов использовался с успехом в качестве альтернативного варианта у тех пациентов, у которых была выявлена ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения, но никогда не использовался широко в рутинной практике [7].

Недостаточно изученным, однако, является влияние различных антикоагулянтов на подсчет тромбоцитов

гематологическими анализаторами, особенно разными методами (импедансным, оптическим, иммунологическим). В работе Mannus *et al.* приводятся интересные данные, полученные при подсчете тромбоцитов 834 пациентов, кровь которых стабилизировалась тремя вариантами антикоагулянтов (калиевыми солями ЭДТА, цитратом натрия, сульфатом магния). Число тромбоцитов при подсчете их методом Култера в крови стабилизированной ЭДТА лучше коррелировало с количеством тромбоцитов определенных этим методом в крови, стабилизированной сульфатом магния, по сравнению с подсчетом в крови при использовании цитрата натрия (коэффициент корреляции $r_1 = 0,967$ в первом случае, $r_2 = 0,834$ – во втором) [7]. При подсчете флуоресцентным методом числа тромбоцитов расхождение было очень невелико при использовании различных антикоагулянтов: $r_1 = 0,977$ и $r_2 = 0,932$ соответственно [7].

В ходе исследования S. Sakurai *et al.* было установлено, что добавление аминогликозидов (в частности, канамицина) к крови, стабилизированной калиевыми солями ЭДТА в случае, если пациента наблюдается ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения, предотвращает образование агрегатов [8]. Механизм действия на тромбоциты аминогликозидов у данных пациентов неясен, но канамицин может как предотвращать агрегацию тромбоцитов, так и способствовать диссоциации уже образовавшихся агрегатов [8].

Несмотря на то что такие антикоагулянты, как ЭДТА, цитрат натрия используются в рутинной практике на протяжении десятилетий, влияние их на клетки крови изучено не до конца, и даже известные данные мало учитываются в практической работе. ЭДТА необратимо связывает ионы кальция, цитрат же связывает кальций в зависимости от уровня pH среды. Зная этот факт, можно объяснить образование агрегатов тромбоцитов при хранении крови, стабилизированной цитратом: постепенное высвобождение ионов кальция ведет к активации тромбоцитов и их агрегации [7]. Образующиеся агрегаты могут быть подсчитаны как единичные крупные тромбоциты или как лейкоциты, что подтверждается экспериментальными данными – при увеличении срока хранения крови, стабилизированной цитратом, число тромбоцитов снижается при подсчете кондуктометрическим методом. Однако остается не полностью ясным, почему может наблюдаться низкое количество тромбоцитов сразу после взятия крови при применении цитрата.

Необходимо учитывать и тот факт, что большинство анализаторов адаптированы для работы с кровью, стабилизированной ЭДТА. Это важно учитывать в связи с тем, что ЭДТА, цитрат и сульфат магния по-разному влияют на объем тромбоцитов (MPV). При подсчете же тромбоцитов методом Култера объем клетки – это важный параметр, который определяет, в какой пул она будет отнесена. При использовании ЭДТА MPV увеличивается более значимо, если сравнивать с изменением MPV при применении цитрата или сульфата магния. В связи с этим вероятно, что часть тромбоцитов не будет регистриро-

ваться гематологическим анализатором как тромбоциты при исследовании крови, стабилизированной цитратом или сульфатом магния. Безусловно, на этот процесс будет сильно влиять конкретный алгоритм анализа информации, получаемый при прохождении клеток через апертуру, то есть модель прибора. В работе [7] на образцах крови 834 пациентов было показано, что число тромбоцитов, определенное в крови, стабилизированной цитратом или сульфатом магния, всегда было ниже количества подсчитанного в крови, стабилизированной ЭДТА при подсчете импедансным методом на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ 5000. При подсчете тромбоцитов флуоресцентным методом и методом по Фонию в этих же образцах крови результаты получались сходными [7].

Проблема корректного подсчета тромбоцитов не решена полностью в настоящее время. Стандартных унифицированных рекомендаций, как действовать в случае выявления тромбоцитопении у пациента, не существует, поскольку алгоритм действий будет сильно зависеть от типа гематологического анализатора в лаборатории и его возможностей в плане подсчета тромбоцитов. При подозрении на наличие у пациента ЭДТА-зависимой псевдотромбоцитопении следует стабилизировать кровь другим антикоагулянтом, но необходимо учитывать рекомендации производителя анализатора по выбору антикоагулянта при работе на данной модели прибора, а также тот факт, что антикоагулянты по-разному изменяют MPV и их влияние усиливается при увеличении времени хранения образца. Простейшим методом, который может использоваться в лаборатории любого уровня и оснащения, является исследование окрашенного

по Романовскому–Гимзе мазка крови с целью оценки наличия агрегатов тромбоцитов и получения общего впечатления о количестве тромбоцитов у пациента. Идеального со всех точек зрения антикоагулянта для проведения гематологических исследований в настоящее время нет. Простые клинические случаи демонстрируют необходимость дальнейшего изучения влияния антикоагулянтов на клетки крови и разработки более четких алгоритмов действий в сложных ситуациях для практической работы.

Список литературы / References

1. Lin J., Luo Y., Yao S., Yan M., Li J., Ouyang W., Kuang M. Discovery and correction of spurious low platelet counts due to EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *J Clin Lab Anal.* 2015; 29 (5): 419–26. <https://doi.org/10.1002/jcla.21818>
2. Gowland E., Kay H.E., Spillman J.C., Williamson J.R. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. *J Clin Pathol.* 1969; 22 (4): 460–4. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.22.4.460>
3. Ohashi-Fukuda N., Inokuchi R., Sato H., Nakamura K., Iwagami M., Wada T., Jona M., Hisasue T., Nakajima S., Yahagi N. Poorer Prognosis With Ethylenediaminetetraacetic Acid-dependent Pseudothrombocytopenia. *Medicine.* 2015; 94 (15): 1–4. DOI: 10.1097/MD.0000000000000674.
4. Akbayram S., Dogan M., Akgun C., Caksen H., Oner A.F. EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia in a Child. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2011; 17 (5): 494–6. <https://doi.org/10.1177/1076029610373367>
5. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol.* 1995; 50: 103–109. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830500206>
6. Berkman N., Michaeli Y., Or R., Eldor A. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical study of 18 patients and a review of the literature. *Am J Hematol.* 1991; 36 (3): 195–201. DOI: 10.1002/ajh.2830360307.
7. Mannuß S., Schuff-Werner P., Dreißiger K., Kohlschein P. Magnesium Sulfate as an Alternative In Vitro Anticoagulant for the Measurement of Platelet Parameters? *Am J Clin Pathol.* 2016; 145 (6): 806–14. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw066>
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): 817–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.4773280.x>

Статья поступила / Received 15.07.2020

Получена после рецензирования / Revised 10.12.2020

Принята в печать / Accepted 21.12.2020

Сведения об авторах

Соколова Наталья Александровна, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного постдипломного образования¹. E-mail: sokolova.nat@mail.ru.

Савина Марина Ивановна, д.б.н., проф. кафедры клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования¹. E-mail: savina_mi@rsmu.ru.

Шокина Оксана Сергеевна, зав. клинико-диагностической лабораторией². E-mail: syrr@list.ru.

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва
²ГБУЗ «Детская городская поликлиника № 7 Департамента здравоохранения города Москвы»

Автор для переписки: Соколова Наталья Александровна, E-mail: sokolova.nat@mail.ru.

Для цитирования: Соколова Н.А., Савина М.И., Шокина О.С. ЭДТА-зависимая псевдотромбоцитопения у ребенка (клинический случай). *Медицинский алфавит.* 2021; (13): 51–54. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-13-51-54>

About authors

Sokolova Natalya A., PhD Med, associate prof. at Dept of Clinical Laboratory Diagnostics of the Faculty of Additional Postgraduate Education¹. E-mail: sokolova.nat@mail.ru.

Savina Marina I., Dr of Bio Sci, prof. at Dept of Clinical Laboratory Diagnostics of the Faculty of Additional Postgraduate Education¹. E-mail: savina_mi@rsmu.ru.

Shokhina Oksana S., head of Clinical Diagnostic Laboratory². E-mail: syrr@list.ru.

¹Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow, Russia

²Children's City Clinic No. 7, Moscow, Russia

Corresponding author: Sokolova Natalya A. E-mail: sokolova.nat@mail.ru.

For citation: Sokolova N.A., Savina M.I., Shokhina O.S. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in child (clinical case report). *Medical alphabet.* 2021; (13): 51–54. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-13-51-54>

