

# Plaquetograma: relato de caso de pseudotrombocitopenia

## *Thrombogram: case report of pseudothrombocytopenia*

Bruno Miguel B. Costa; Maria C. Vellés; Maria Mariana F. B. Viana; Ana Conceição M. Pereira; Susana Catarina P. Rocha; Liliana P. Rocha; Vera Monica R. P. Moreira

Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, Patologia Clínica, Penafiel, Porto, Portugal.

### RESUMO

O plaquetograma é um dos componentes do hemograma que inclui a quantificação e a avaliação plaquetária. A presença de artefatos laboratoriais, como as contagens incorretas do número de plaquetas pelos analisadores hematológicos, pode originar casos de pseudotrombocitopenia (15% a 30% de casos de trombocitopenias isoladas observados na rotina laboratorial). A pseudotrombocitopenia induzida pelo anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) é um dos casos mais comuns em que a presença do anticoagulante em amostras de sangue pode provocar agregação plaquetária ou satelitismo plaquetário. A observação de forma criteriosa dos dados emitidos pelos analisadores (por exemplo, histograma de plaquetas e flags) é crucial. Outros procedimentos, como a verificação da existência de coágulo na amostra, a repetição da amostra e a visualização de um esfregaço de sangue periférico, além do pedido de nova amostra colhida com outro tipo de anticoagulante, como o citrato, são importantes para confirmar casos de pseudotrombocitopenia.

**Unitermos:** plaquetograma; pseudotrombocitopenia; anticoagulantes.

### ABSTRACT

*The thrombogram is one of the components of the blood count that includes platelet quantification and evaluation. The presence of laboratory artifacts, such as incorrect platelet counts by autoanalyzers, can lead to pseudothrombocytopenia, which is responsible for 15% to 30% of the cases of isolated thrombocytopenia observed in laboratory routine. Pseudothrombocytopenia induced by the anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is one of the most frequent cases in which the presence of anticoagulant in blood samples can cause platelet aggregation or platelet satellitism. Careful observation of the data emitted by autoanalyzers, such as platelet and flag histograms, is crucial. Other procedures, such as checking for clotting in the sample, repeating the sample and viewing a peripheral blood smear, requesting a new sample taken with another type of anticoagulant, such as citrate, are imperative for the confirmation of cases of pseudothrombocytopenia.*

**Key words:** thrombogram; pseudothrombocytopenia; anticoagulant.

### RESUMEN

*El plaquetograma es uno de los componentes del hemograma que incluye la cuantificación y la evaluación de las plaquetas. La presencia de artefactos de laboratorio, como los recuentos incorrectos del número de plaquetas por los analizadores hematológicos puede originar casos de pseudotrombocitopenia (del 15% al 30% de los casos de trombocitopenias aisladas observados en la rutina del laboratorio). La pseudotrombocitopenia inducida por el anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) es uno de los casos más comunes en los que la presencia de anticoagulante con muestras de sangre puede producir agregación plaquetaria*

*o satelitismo plaquetario. La observación criteriosa de los datos emitidos por los autoanalizadores (por ejemplo, histogramas plaquetarios y alarmas) es crucial. Otros procedimientos, como la verificación de la existencia de un coágulo en la muestra, la repetición del frotis de sangre periférica, además de la solicitud de nueva muestra con otro tipo de anticoagulante, como el citrato, son importantes para confirmar casos de pseudotrombocitopenia.*

**Palabras clave:** plaquetograma; pseudotrombocitopenia; anticoagulantes.

## INTRODUÇÃO

O plaquetograma é um dos componentes analíticos do hemograma que inclui a quantificação e a avaliação morfológica das plaquetas. Parâmetros laboratoriais como número de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (VPM), plaquetócrito (PCT), amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW) e percentual de plaquetas grandes (P-LCR) estão disponíveis no plaquetograma<sup>(1, 2)</sup>.

A presença de artefatos laboratoriais, como contagens incorretas de plaquetas feitas pelos analisadores hematológicos automatizados, pode levar à pseudotrombocitopenia (um resultado de número de plaquetas falsamente reduzido)<sup>(3, 4)</sup>.

As pseudotrombocitopenias correspondem a 15%-30% dos casos de trombocitopenia isolada observados na rotina laboratorial<sup>(5)</sup>. As principais causas da pseudotrombocitopenia são: problemas na coleta e no processamento das amostras (agitação imprópria do tubo de coleta, diluição da amostra, dificuldades na coleta de sangue periférico); síndrome da plaqueta gigante; indução por anticoagulantes, como ácido etilendiaminotetracético (EDTA), citrato, oxalato e heparina; doenças autoimunes; medicamentos (abciximabe, ácido valproico, mexiletina e olanzapina); tumores sólidos, síndrome mieloproliferativa e linfoproliferativa<sup>(6)</sup>.

O EDTA é o anticoagulante mais usado no hemograma e sua exposição às amostras de sangue de alguns pacientes pode induzir agregação plaquetária ou, com menos frequência, agregação plaquetária em torno de neutrófilos (satelitismo plaquetário), por um processo aparentemente imunomediado<sup>(7, 8)</sup>. Esse fenômeno, que é o mais frequentemente associado a casos de pseudotrombocitopenia, exige o emprego de procedimentos laboratoriais apropriados, por representar um grande problema laboratorial e clínico<sup>(6-10)</sup>.

## RELATO DO CASO

Paciente de 3 anos de idade foi encaminhado ao serviço de urgência apresentando sintomas de tosse seca e febre com duração

de três dias. Foram solicitadas análises laboratoriais, que não mostraram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos. Ao nível do hemograma, não houve alterações nem no eritrograma nem no leucograma; elas só foram observadas no plaquetograma. Três amostras de sangue periférico foram analisadas para o estudo do plaquetograma:

- amostra 1 – sangue venoso periférico coletado em tubo contendo anticoagulante (EDTA K3, 3 ml, VACUETTE<sup>®</sup>, Premium, Greiner Bio-One, Áustria). Volume de sangue coletado: 3 ml;
- amostra 2 – sangue venoso periférico coletado em tubo contendo anticoagulante (EDTA K3, 3 ml, VACUETTE<sup>®</sup>, Premium, Greiner Bio-One, Áustria). Volume de sangue coletado: 1,5 ml;
- amostra 3 – sangue venoso periférico coletado em tubo contendo anticoagulante (tubos de coagulação 9NC, citrato de sódio a 3,2%, 3,5 ml, VACUETTE<sup>®</sup>, Premium, Greiner Bio-One, Áustria). Volume de sangue coletado: 3,5 ml.

As três amostras foram processadas no analisador hematológico XN-2000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japão), onde foi utilizado um método de contagem óptica fluorescente de plaquetas (PLT-O).

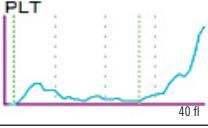
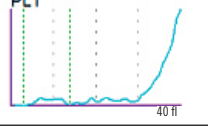
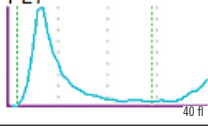
Os resultados obtidos para as três amostras, referentes aos diferentes parâmetros que formam o plaquetograma, são mostrados na **Tabela 1**.

O *software* associado ao analisador gerou, para as amostras 1 e 2, mensagens de intervenção técnica: verificação de coágulo e esfregaço de sangue periférico. Nenhum coágulo foi observado nas amostras 1 e 2 e, após repetição da análise, os esfregaços de sangue periférico foram estudados. A amostra 3 também foi submetida a exame do esfregaço de sangue periférico. Os valores finais de plaquetas e as respectivas observações sobre as séries plaquetárias são apresentados na **Tabela 2**.

## DISCUSSÃO

Cerca de 0,1% da população mundial possui anticorpos naturais antiplaquetas dependentes de EDTA<sup>(5)</sup>. A maior parte

TABELA 1 – Resultados obtidos no plaquetograma para amostras 1, 2 e 3

Plaquetograma (unidades)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ )	26	5	153
PDW (fl)	11,8	n.d.	n.e.
VPM (fl)	11,7	n.d.	n.e.
P-LCR (%)	38,2	n.d.	n.e.
PCT (%)	0,02	n.d.	n.e.
Histogramas plaquetários			
Alertas	Trombocitopenia	Trombocitopenia distribuição anormal de plaquetas	Sem alertas

PDW: amplitude de variação do tamanho das plaquetas; VPM: volume plaquetário médio; P-LCR: percentual de plaquetas grandes; PCT: plaquetócrito; PLT: plaquetas; n.d.: não determinada; n.e.: não efetuada.

TABELA 2 – Resultados de plaquetas liberadas e observações sobre as séries plaquetárias

Amostra	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Observações sobre as séries plaquetárias Informações da hematologia
1	> 26	Valor das plaquetas altamente subestimado pela presença de numerosos agregados plaquetários Recomenda-se colher em tubo de citrato
2	> 10	Numerosos agregados plaquetários Recomenda-se colher em tubo de citrato
3	> 168	Resultado das plaquetas em citrato Presença de alguns agregados plaquetários

dos anticorpos isolados desses indivíduos age como aglutininas frias numa faixa de temperatura ideal de  $4^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$ , geralmente correspondendo às classes de imunoglobulina G (IgG) e M (IgM), e com menos frequência à classe de imunoglobulina A (IgA)<sup>(6,11)</sup>. O mecanismo fisiológico da pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA ainda é pouco conhecido, mas há estudos sugerindo que autoanticorpos presentes no plasma, na presença de EDTA reconhecem e ligam-se ao epítipo da glicoproteína IIb (GPIIb), formando o complexo GPIIb/IIIa na agregação plaquetária, promovendo a aglutinação plaquetária<sup>(1-3,6)</sup>.

Quando um paciente apresenta trombocitopenia isolada, sem história familiar de trombocitopenia, doenças hematológicas ou manifestação de episódios hemorrágicos, deve-se suspeitar de pseudotrombocitopenia, que não deve ser confundida com outras condições clínicas sérias, como coagulação intravascular disseminada, púrpura trombocitopênica idiopática ou trombocitopenia induzida por heparina<sup>(12)</sup>.

No caso relatado, a presença de trombocitopenia isolada numa criança alertou para a possibilidade de pseudotrombocitopenia. Com baixa contagem de plaquetas, a existência de coágulo foi

verificada na amostra, mas sua presença não foi constatada (amostra 1). Depois desse procedimento, foi feito um novo hemograma, no qual o método usado para a contagem de plaquetas não foi impedância elétrica (PLT-I), mas PLT-O. De acordo com estudos, o PLT-O é mais confiável em contagens de plaquetas abaixo de  $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ <sup>(13)</sup>. O histograma exibido não apresenta distribuição normal de plaquetas, e sua trajetória sugere a presença de agregados plaquetários. Após repetição da análise, foi feito um esfregaço de sangue periférico, no qual se observaram numerosos agregados plaquetários. O resultado final do número de plaquetas liberado foi  $> 26 \times 10^3/\mu\text{l}$ , devido à presença de agregados plaquetários. Por causa da suspeita de pseudotrombocitopenia, recomendou-se que nova amostra fosse enviada para contagem de plaquetas em um tubo contendo citrato.

O uso de anticoagulantes alternativos ao EDTA, como citrato de sódio, oxalato ou heparina, é uma boa opção para descartar o fenômeno de pseudotrombocitopenia induzida por EDTA, mas há alguns casos raros de pseudotrombocitopenia associada a esses anticoagulantes<sup>(6-8)</sup>. Outros procedimentos menos usados na prática laboratorial para confirmar casos de pseudotrombocitopenia são reanalisar a amostra colhida em EDTA após incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos (o objetivo dessa incubação é a dissociação dos agregados plaquetários), ou acrescentar certos aminoglicosídeos como canamicina e amicacina (eles não interferem com as contagens de células e evitam a formação de agregados plaquetários, embora seu mecanismo de ação ainda não seja bem conhecido)<sup>(11)</sup> à amostra colhida com EDTA.

Por engano, a segunda amostra enviada para análise foi colocada em um tubo com EDTA; além disso, o volume da amostra não estava na proporção recomendada para a quantidade de anticoagulante. Cerca de 1,5 ml de sangue periférico foi coletado, quando o indicado eram 3 ml. Os resultados obtidos na segunda amostra refletem essa diluição com EDTA, resultando em uma

contagem PLT-O mais baixa que na amostra 1. O histograma de plaquetas da amostra 2 também é sugestivo da presença de agregados plaquetários. Os mesmos procedimentos foram empregados, como na amostra 1, quando a presença de numerosos agregados plaquetários foi documentada e uma nova amostra foi pedida em citrato. Independentemente do método de contagem de plaquetas nos analisadores, contagens de plaquetas inferiores a  $10 \times 10^3/\mu\text{l}$  são imprecisas, com essa contagem mínima sendo liberada como resultado se o analisador apresentar uma contagem mais baixa<sup>(14)</sup>. O resultado liberado foi de plaquetas  $> 10 \times 10^3/\mu\text{l}$ , devido à presença de agregados plaquetários.

Uma terceira amostra coletada em citrato confirmou a existência de pseudotrombocitopenia, já que a contagem de plaquetas no analisador foi  $153 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Embora o histograma plaquetário exibisse distribuição normal e não se suspeitasse da possível existência de agregados plaquetários, alguns agregados foram observados no esfregaço de sangue periférico. A amostra do tubo de citrato foi diluída com citrato (nove partes de sangue para um total de dez partes) e foi necessário corrigir o valor das plaquetas do analisador multiplicando os resultados pelo

fator de diluição 1,1 (10%)<sup>(1)</sup>. Na amostra 3, uma contagem de plaquetas  $> 168 \times 10^3/\mu\text{l}$  foi liberada, com a aplicação do respectivo fator de diluição e a presença de agregados plaquetários.

Há casos documentados nos quais alguns analisadores podem erroneamente contar agregados plaquetários como leucócitos, levando a uma contagem de leucócitos falsamente elevada, chamada pseudoleucocitose<sup>(4,11)</sup>. Isso não se observou neste caso.

## CONCLUSÃO

Uma interpretação incorreta dos resultados da contagem de plaquetas pelos analisadores hematológicos pode levar a falsos diagnósticos. É imperativo observar cuidadosamente os dados emitidos pelos analisadores (como histograma de plaquetas, alarmes sugestivos de pseudotrombocitopenia) para verificar a existência de um coágulo na amostra, repetir a amostra e visualizar um esfregaço de sangue periférico. A coleta de uma nova amostra com citrato pode ser suficiente para confirmar o achado de pseudotrombocitopenia.

## REFERÊNCIAS

- Lewis S, Bain B, Bates I. Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9 ed. Porto Alegre: Artmed; 2006; p. 30-48.
- Farias MG, Bó SD. Importância clínica e laboratorial do volume plaquetário médio. J Bras Patol Med Lab. 2010; 46(4): 275-81.
- Nagler M, Keller P, Siegrist D, Alberio L. A case of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: simple recognition of an underdiagnosed and misleading phenomenon. BMC Clin Pathol. 2014; 14: 19.
- Carrillo-Esper R. Pseudotrombocitopenia inducida por ácido etilenediaminetetracético en paciente con quemaduras. Cir Ciruj. 2004; 72(4): 335-8.
- Greenberg EM, Kaled ES. Thrombocytopenia. Crit Care Nurs Clin North Am. 2013; 25(4): 427-34.
- Esper RC, Victorino NM, Rosillo FJR. Pseudotrombocitopenia: reporte de un caso y revisión de la bibliografía. Med Int Mex. 2009; 25(2): 163-8.
- Makris PE. Pseudothrombocytopenia: a rare phenomenon. Clin Appl Thromb Hemost. 1998; 4(3): 167-9.
- 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.
- Shabnam I, Chuphal DS, Joshi BC. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-dependent pseudothrombocytopenia: a case report. J Clin Diagn Res. 2014; 8(10): FL03-4.
- Froom P, Barak M. Prevalence and course of pseudothrombocytopenia in outpatients. Clin Chem Lab Med. 2011; 49(1): 111-4.
- Ozcelik F, Arslan E, Serdar MA, et al. A useful method for the detection of ethylenediaminetetraacetic acid- and cold agglutinin-dependent pseudothrombocytopenia. Am J Med Sci. 2012; 344(5): 357-62.
- 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): 1281-5.
- Dzirba TA, Dionísio LM, Fabro JR, et al. Análise comparativa de contagens de plaquetas entre metodologias de impedância e óptica em amostras de sangue de indivíduos hospitalizados. RBAC. 2018; 50(2): 174-8.
- Malok M, Titchener EH, Bridgers C, Lee BY, Bamberg R. Comparison of two platelet count estimation methodologies for peripheral blood smears. Clin Lab Sci. 2007 Summer; 20(3): 154-60.

## AUTOR CORRESPONDENTE

Bruno Miguel Barbosa Costa  0000-0002-3163-9734  
e-mail: bruncosta1@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.