

**ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU
HEMATOLOGIA CLÍNICA E LABORATORIAL**

GABRIELA MULLER RECHE

**TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA EVITAR O FENÔMENO DE
PSEUDOTROMBOCITOPENIA**

São José do Rio Preto

2016

Academia de Ciência e Tecnologia

GABRIELA MULLER RECHE

Artigo apresentado pela Academia de Ciência e Tecnologia, como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Hematologia Clínica e Laboratorial.

São José do Rio Preto

2016

TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA EVITAR O FENÔMENO DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA

Resumo: A pseudotrombocitopenia é um fenômeno *in vitro* de agregação plaquetária que leva a uma contagem falsamente reduzida no valor de plaquetas quando realizada em contadores automatizados. Por não acarretar em distúrbios hemorrágicos, deve ser sempre identificada pelo laboratorista com a finalidade de evitar diagnósticos errôneos e tratamentos desnecessários para o paciente. Para tanto, é necessário que o laboratorista saiba quando suspeitar desse fenômeno e como agir para liberar um valor real de plaquetas. Este trabalho levantou as técnicas comumente utilizadas para evitar ou desfazer a agregação plaquetária como: a troca do anticoagulante utilizado, manter o sangue a 37°C, o uso do Vórtex e o uso de aminoglicosídeos. De todas as técnicas estudadas, a que tem se mostrado mais eficaz é o uso do aminoglicosídeo Canamicina.

Palavras-chave: pseudotrombocitopenia, EDTA-agregante, canamicina, sateletismo plaquetário.

1 INTRODUÇÃO

Pseudotrombocitopenia é um termo que se refere a uma contagem falsamente reduzida (abaixo de $150.000/\text{mm}^3$) no valor de plaquetas de um paciente (SAKURAI et al, 1997). Isto ocorre, na maior parte dos casos, devido a um fenômeno *in vitro* de formação de agregados plaquetários na amostra de sangue colhida, o que dificulta a contagem de plaquetas pelos contadores automatizados (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004). Com menor frequência, pode ocorrer uma contagem também reduzida com a formação de sateletismo plaquetário, fenômeno em que as plaquetas se agrupam em forma de rosetas em torno de células leucocitárias, geralmente os polimorfonucleares (MAYA, 2007).

Com a finalidade de se evitar um diagnóstico errôneo e tratamentos inapropriados, ao se evidenciar um paciente com contagem baixa de plaquetas, o laboratorista deve se atentar para o fato de que pode se tratar de uma pseudotrombocitopenia e deve tomar medidas tanto para identificá-la quanto para liberar um valor real de plaquetas (GUERRA et al, 2011). Existem algumas técnicas descritas na literatura para tentar evitar esse fenômeno.

Frente a esses dados, o presente trabalho tem como metodologia fazer um levantamento teórico sobre as técnicas utilizados para se evitar a pseudotrombocitopenia, com o objetivo de levantar a hipótese de que o uso da Canamicina é o método ideal para tal fim.

2 DESENVOLVIMENTO

A trombocitopenia é um quadro em que o paciente apresenta uma contagem baixa de plaquetas (abaixo de $150.000/\text{mm}^3$) podendo levar a distúrbios hemorrágicos quando abaixo de $20.000/\text{mm}^3$. Dependendo da sua causa, o médico pode optar por tratamentos como transfusão de plaquetas, uso de corticosteróides e até mesmo a esplenectomia (GUERRA et al, 2011).

Quando se trata de uma pseudotrombocitopenia, o fenômeno é exclusivamente laboratorial. Ocorre que os contadores automatizados não conseguem contar o valor real de plaquetas devido à presença de agregação ou sateletismo plaquetário, por conseguinte, o laboratório deve conter métodos para não liberar o valor falsamente reduzido de plaquetas (GUERRA et al, 2011).

A agregação e o sateletismo plaquetários são induzidos pelo uso do ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) como anticoagulante para a realização do hemograma e, com menor frequência, podem ocorrer também em amostras coletadas com citrato, oxalato e heparina (BIZZARO, 1995; SHREINER; BELL, 1973). Por se tratar de um fenômeno exclusivamente *in vitro*, não leva a complicações hemorrágicas para o paciente, portanto não demanda tratamento e deve ser sempre diferenciada da trombocitopenia verdadeira (MAYA, 2007).

Amostras EDTA-agregantes ocorrem com maior frequência em pacientes hospitalizados. Geralmente estão associadas com doenças hepáticas, auto-imunes, neoplásicas, com tumores sólidos, síndromes mieloproliferativas e linfoproliferativas ou até mesmo associadas ao uso de determinadas drogas utilizadas pós cirurgia cardíaca - Abciximab, por exemplo (CARRILLO-ESPER; CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, 2004; MAYA, 2007). No entanto, também podem ocorrer com pessoas saudáveis (BERKMAN, 1991).

A fisiopatologia que desencadeia a agregação e o sateletismo plaquetário, bem como a correlação com a presença do anticoagulante, ainda são de causa desconhecida (SAKURAI et al, 1997). Alguns autores defendem que se trata de um evento mediado por auto-anticorpos IgM, IgG e/ou IgA (nesta ordem de importância) que reagem contra glicoproteínas de membrana plaquetária (GpIIb/IIIa) ou antígenos plaquetários (GP78) na presença do anticoagulante (CARRILLO-ESPER; CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, 2004; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004; BIZZARO, 1995).

De acordo com Maya (2007), 1 em cada 1.000 indivíduos da população em geral apresenta pseudotrombocitopenia. Já a incidência de agregação plaquetária em pacientes hospitalares encontrada na literatura varia em torno de 0,03%-1,9% (FUJII, 1978). Dentre os pacientes ambulatoriais que

apresentam trombocitopenia, 15% deles, na verdade, possuem pseudotrombocitopenia (MAYA, 2007). Considerando a frequência apresentada, é de grande importância que os profissionais de laboratório saibam suspeitar e investigar se há uma pseudotrombocitopenia na amostra analisada para conseguir diferenciar esse fenômeno de uma plaquetopenia verdadeira.

O laboratório clínico deve suspeitar de uma pseudotrombocitopenia quando observar que, apesar da plaquetopenia, o paciente apresenta tempo de sangramento, de coagulação e fibrinogênio normais, ou seja, não há distúrbios hemorrágicos (CARRILLO-ESPER; CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, 2004). Além desse achado, pode apresentar uma pseudoleucocitose devido a alguns contadores automatizados confundirem agregados plaquetários com leucócitos. Para confirmar essa suspeita, deve-se analisar a lâmina de distendido de sangue periférico para se evidenciar a presença dos agregados plaquetários ou do sateletismo plaquetário (MAYA, 2007; CARRILLO-ESPER; CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, 2004).

O método mais comumente utilizado para se evitar a agregação plaquetária é a troca do anticoagulante na amostra. Alguns autores afirmam que esse fenômeno é induzido somente pela presença do EDTA, portanto indicam pedir coleta de uma nova amostra com o tubo de citrato de sódio a 3,8% ou oxalato de amônio a 1% que, em geral, não permitem a formação dos agregados plaquetários (MAYA, 2007; CARRILLO-ESPER; CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, 2004). Entretanto, existem registros de que, mesmo que em menor frequência, os demais anticoagulantes também podem levar à agregação (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004). Portanto, autores como Van Der Meer *et al* (2002) defendem que a contagem mais fidedigna para casos em que a ação dos anticorpos independe do EDTA é aquela realizada imediatamente após a coleta sem usar nenhum anticoagulante na amostra.

Outra técnica muitas vezes utilizada para se evitar esse fenômeno é coletar nova amostra com o tubo a 37°C e passá-lo imediatamente no contador. Esta técnica tem como finalidade evitar o efeito do tempo na amostra e a ação dos anticorpos frios, já que os principais anticorpos que participam dessa agregação (IgM) são aglutininas frias e não reagem à temperatura corporal (37°C) (CARRILLO-ESPER; CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, 2004; MAYA, 2007). Mas, como pode-se prever, não é uma medida eficaz para todos os casos, já que a reação pode também ter sido mediada por anticorpos quentes (AHN *et al*, 2002).

Uma forma de se evitar coleta em pacientes com pseudotrombocitopenia é o uso do vórtex para agitar a amostra e dissolver os agregados plaquetários (MAYA, 2007). A velocidade e o tempo necessários ainda não estão bem elucidados. Em uma publicação de 2003, o autor Cho *et*

al demonstra que o uso do vórtex por 30 segundos em amostras com agregados plaquetários levou a um aumento na contagem de plaquetas de 96% e uma diminuição do valor de leucócitos totais em 68%. Sugerindo assim, que houve desagregação plaquetária na amostra. Segundo o autor, os demais parâmetros hematológicos não foram afetados, portanto ele considera o uso do vórtex uma técnica simples e rápida como alternativa para a contagem errônea de plaquetas.

Em outro estudo, o vórtex foi utilizado para agitar a amostra em sua velocidade máxima por 1-2 minutos. Os resultados apresentados foram de dissolução completa dos agregados plaquetários em 44% das amostras e parcial em 49% (GULATI, 1998).

Recentemente, a suplementação de um aminoglicosídeo na amostra coletada com EDTA tem sido estudada e difundida como uma técnica muito eficiente para prevenir e dissolver grumos plaquetários (JEON; YANG, 2005). Em geral, usa-se a Canamicina para este fim.

Os autores Jeon e Yang (2005) fizeram um estudo de caso com uma criança de 6 anos que apresentava plaquetopenia nos tubos de EDTA (27 mil/mm³) e heparina (23 mil/mm³), mas com um valor normal em citrato de sódio (479 mil/mm³) e presença de grumos plaquetários em lâmina feita com EDTA. Foi realizada a adição de 20mg de Canamicina nos tubos de EDTA antes e depois da coleta do sangue. Nos dois casos houve um aumento do valor de plaquetas do paciente para acima de 600 mil/mm³. Além disso, a lâmina feita no tubo com suplementação do aminoglicosídeo também não apresentou grumos plaquetários.

Outro estudo de caso relatado por Ahn *et al* (2002) foi realizado com um adulto que apresentava valores baixos de plaquetas em EDTA (20 mil/mm³), citrato (45 mil/mm³) e heparina (44 mil/mm³) com presença de agregados plaquetários nos distendidos realizados com os três anticoagulantes. Foram adicionados 20mg de Canamicina em 2 mg de EDTA-K3 em um tubo antes da coleta e em outro trinta minutos após a coleta. Também foram coletadas novamente amostras em citrato, heparina e uma amostra em EDTA incubada a 37°C. As amostras coletadas em citrato e heparina falharam na prevenção de agregados plaquetários. A análise feita com amostra de EDTA incubada a 37°C e a que teve adição de Canamicina após a coleta conseguiram reverter parcialmente a agregação. A amostra suplementada antes da coleta foi a única que demonstrou a prevenção completa da pseudotombocitopenia.

Sakurai *et al* (1997) realizou um estudo comparando o uso de diversos antibióticos em pacientes EDTA-agregantes antes e 30 minutos após a coleta. Em seu estudo, o autor usou a proporção de 20mg de antibiótico para cada 1mL de sangue total coletado com EDTA. Seu estudo demonstrou que (i) a pré-suplementação de antibióticos previne a agregação plaquetária, (ii) a

suplementação após a coleta dissolve os agregados plaquetários, (iii) dentre os antibióticos utilizados, os aminoglicosídeos (incluindo a Canamicina) são os que apresentam melhores resultados.

3 CONCLUSÃO

A pseudotrombocitopenia é um fenômeno mediado por autoanticorpos antiplaquetários dependente de anticoagulante. Trata-se de um evento que ocorre exclusivamente *in vitro*, portanto não acarreta em distúrbios hemorrágicos para o paciente e não deve ser liberado pelo laboratório de forma a sugerir para o médico que há alguma patologia.

Várias técnicas já foram estudadas para tentar reverter esse fenômeno como: (I) a troca do anticoagulante, (II) fazer a leitura na amostra imediatamente a 37°C, (III) agitar a amostra com o Vórtex e (V) adicionar a Canamicina na amostra com EDTA.

Todas as técnicas apresentadas possuem prós e contras. A troca do anticoagulante nem sempre é eficiente pois a agregação pode ser independente de EDTA, ocorrendo também com os demais anticoagulantes.

A contagem imediata ou com seringa aquecida com a finalidade de manter a temperatura do sangue a 37°C é um método fácil e simples para laboratórios de pequeno porte em que o sangue é processado no mesmo local da coleta. Contudo, não é eficaz para uma desagregação completa em todos os casos e não é viável para laboratórios em que há um tempo significativo de deslocamento da amostra para ser analisada.

O uso do vórtex para agitar a amostra após a formação dos agregados plaquetários é uma boa alternativa para evitar o transtorno da coleta tanto para o paciente quanto para o laboratório. Mas como pode-se observar, os estudos demonstraram que, apesar dos valores de plaquetas subirem em quase todos os casos, nem sempre a agregação vai ser desfeita por completo e o resultado liberado após agitação nem sempre será o resultado real do paciente.

Embora o mecanismo da suplementação com aminoglicosídeos para evitar a pseudotrombocitopenia seja desconhecido, é consistente que ele previne a agregação plaquetária, principalmente quando adicionado ao tubo antes da coleta. Trata-se de um método simples e efetivo para evitar quaisquer transtornos para o paciente com pseudotrombocitopenia dependente de anticoagulante. Portanto, tem se mostrado idealmente eficiente para evitar a agregação plaquetária sem interferir em demais parâmetros hematológicos.

REFERÊNCIAS

AHN, Hae Lyun et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia confirmed by supplementation of kanamycin; a case report. **The Korean journal of internal medicine**, v. 17, n. 1, p. 65-68, 2002.

BERKMAN, Neville et al. Edta-dependent pseudothrombocytopenia: A clinical study of 18 patients and a review of the literature. **American journal of hematology**, v. 36, n. 3, p. 195-201, 1991.

BIZZARO, Nicola. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: A clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. **American journal of hematology**, v. 50, n. 2, p. 103-109, 1995.

CARRILLO-ESPER, Raúl; CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, Vladimir. Pseudotrombocitopenia inducida por ácido etilendiaminotetraacético en pacientes con quemaduras. **Cirugía y Cirujanos**, v. 72, n. 4, p. 335-338, 2004.

CHO, Duck et al. Correction of Platelet Count Using a Vortex in Pseudothrombocytopenia. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 23, n. 3, p. 151-156, 2003.

DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Pseudothrombocytopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 321-324, 2004.

FUJII, H. et al. Seventeen cases of pseudothrombocytopenia, with special reference to the clinical problems, its pathogenesis and significance (author's transl). **Nihon Ketsueki Gakkai zasshi: journal of Japan Haematological Society**, v. 41, n. 3, p. 523, 1978.

GUERRA, João Carlos de Campos et al. Thrombocytopenia: diagnosis with flow cytometry and antiplatelet antibodies. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 2, p. 130-134, 2011.

GULATI, Gene. Uso del mezclador vortex para disolver agregados plaquetarios. **Med. lab**, v. 8, n. 1, p. 33-7, 1998.

JEON, In-sang; YANG, Sung Wan. Prevention and dissociation of the platelet aggregation in a patient with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia by supplementation of kanamycin: a case report. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 48, n. 6, p. 675-677, 2005.

MAYA, G. Evaluación del paciente con trombocitopenia. **Med. Lab**, v. 13, n. 9-10, p. 411-435, 2007.

SAKURAI, Susumu et al. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent

pseudothrombocytopenia. **British journal of haematology**, v. 99, n. 4, p. 817-823, 1997.

SHREINER, David P.; BELL, William R. Pseudothrombocytopenia: manifestation of a new type of platelet agglutinin. **Blood**, v. 42, n. 4, p. 541-549, 1973.

VAN DER MEER, W. et al. Pseudothrombocytopenia: a report of a new method to count platelets in a patient with EDTA and temperature independent antibodies of the IgM type. **Eur J Haematol**.V. 69, p 347-7, 2002.