

01-2024/v.1.

**Nacionalne preporuke Hrvatske komore
medicinskih biokemičara i Radne grupe za
laboratorijsku hematologiju Hrvatskog društva za
medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu:
Obrada uzoraka kod sumnje na pseudotrombo-
citopeniju uzrokovanu EDTA antikoagulansom**

**Lara Milevoj Kopčinović, Gordana Juričić,
Dragana Antončić, Fran Smaić, Brankica
Šimac, Ivana Lapić, Vanja Radišić Biljak**

Zagreb, prosinac 2024.

Naslov:

Nacionalne preporuke Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Radne grupe za laboratorijsku hematologiju Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Obrada uzoraka kod sumnje na pseudotrombocitopeniju uzrokovanu EDTA antikoagulansom

Autori:

Lara Milevoj Kopčinović, Gordana Juričić, Dragana Antončić, Fran Smaić, Brankica Šimac, Ivana Lapić, Vanja Radišić Biljak

Izdavač:

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM)

Prijevod:

Fran Smaić, Lara Milevoj Kopčinović, Vanja Radišić Biljak

Ovaj dokument je prijevod članka objavljenog u časopisu Biochemia Medica: National recommendations of the Croatian Chamber of Medical Biochemists and Working group for Laboratory hematology of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: Management of samples with suspected EDTA-induced pseudothrombocytopenia. Biochem Med (Zagreb). 2024;34:030504.

Korektura:

Gordana Juričić, Dragana Antončić, Brankica Šimac, Ivana Lapić, Vanja Radišić Biljak

Grafičko oblikovanje:

Maja Mravec, Braće Radića 107, Mracilin

ISBN: 978-953-96611-6-6

Nacionalne preporuke Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Radne grupe za laboratorijsku hematologiju Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Obrada uzoraka kod sumnje na pseudotrombocitopeniju uzrokovanu EDTA antikoagulansom

Lara Milevoj Kopčinović

Klinički zavod za kemiju,
Klinički bolnički centar Sestre
milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Medicinski fakultet Hrvatskog katoličkog
sveučilišta, Zagreb, Hrvatska

Gordana Juričić

Odjel za medicinsko-biokemij-
sku djelatnost, Opća bolnica
Pula, Pula, Hrvatska

Dragana Antončić

Klinički zavod za laboratorijsku
dijagnostiku, Klinički bolnički
centar Rijeka, Rijeka, Hrvatska

Fran Smaić

Odjel za laboratorijsku dijagnostiku,
Opća bolnica Dr. Josip Benčević,
Slavonski Brod, Hrvatska

Brankica Šimac

Klinički zavod za laboratorijsku
dijagnostiku, Klinička bolnica
Dubrava, Zagreb, Hrvatska

Ivana Lapić

Klinički zavod za laboratorijsku
dijagnostiku, Klinički bolnički
centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-
biokemijski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Vanja Radišić Biljak

Zavod za medicinsko laboratorijsku
dijagnostiku, Klinička bolnica
„Sveti Duh“, Zagreb, Hrvatska

Katedra za medicinu sporta i vježbanja,
Sveučilište u Zagrebu, Kineziološki
fakultet, Zagreb, Hrvatska

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| SAŽETAK | 3 |
| UVOD | 4 |
| PREPORUČENI KRITERIJI ZA POSTAVLJANJE SUMNJE NA PSEUDOTROMBOCITOPENIJU | 4 |
| PREPORUČENI LABORATORIJSKI POSTUPAK ZA PREPOZNAVANJE I OBRADU UZORAKA S EDTA-PSEUDOTROMBOCITOPENIJOM | 6 |
| 1. Isključivanje utjecaja predanalitičkih pogrešaka | 7 |
| 2. Mikroskopska potvrda pseudotrombocitopenije | 8 |
| 3. Određivanje broja trombocita u uzorcima sa sumnjom na EDTA-pseudotrombocitopeniju | 8 |
| 4. Izvještavanje broja trombocita | 11 |
| 5. Izvještavanje broja trombocita iz uzoraka s isključenom pseudotrombocitopenijom | 12 |
| LITERATURA | 13 |
| Dodatak 1. BROJANJE TROMBOCITA PO FONIO-U | 14 |

SAŽETAK

Pseudotrombocitopenija se definira kao lažno snižen broj trombocita nastao kao posljedica njihova *in vitro* nakupljanja. To je rijetka i benigna pojava koja nije povezana s određenim poremećajem ili terapijom, a postaje klinički značajna ako se pravovremeno i pouzdano ne prepozna. Posljedično može dovesti do pogrešnih kliničkih odluka koje obuhvaćaju nepotrebnu dodatnu laboratorijsku obradu, postavljanje pogrešne dijagnoze i moguće nepravilno liječenje, čime se neizbježno ugrožava sigurnost pacijenta. Najčešći oblik pseudotrombocitopenije uzrokovan je djelovanjem etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), koja se koristi kao antikoagulans u spremnicima za uzorkovanje krvi.

U literaturi je opisano nekoliko različitih pristupa obradi uzoraka sa pseudotrombocitopenijom uzrokovanom EDTA antikoagulansom (EDTA-pseudotrombocitopenija), međutim malo je stručnih preporuka. Cilj ovih preporuka jest doprinos u postizanju harmonizacije na nacional-

noj razini u pravilnom prepoznavanju EDTA-pseudotrombocitopenije, obradi takvih uzoraka i izvještavanju broja trombocita. Ovi minimalni zahtjevi nastali su u suradnji Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Radne grupe za laboratorijsku hematologiju Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu te se mogu prilagoditi sukladno specifičnim uvjetima (osoblju i opremi) svakog pojedinog medicinsko-biokemijskog laboratorija. Preporuke su prvenstveno namijenjene svim laboratorijskim djelatnicima uključenim u obradu uzoraka s EDTA-pseudotrombocitopenijom, ali i drugim zdravstvenim djelatnicima koji su uključeni u prikupljanje uzoraka i tumačenje rezultata analize kompletne krvne slike.

Ključne riječi: trombocitopenija; pseudotrombocitopenija; hematološki analizatori; postupci; harmonizacija

UVOD

Trombocitopenijom se naziva stanje karakterizirano sniženim brojem trombocita ($< 150 \times 10^9/L$), a povezano je s različitim poremećajima (1). Za razliku od trombocitopenije, pseudotrombocitopenija je obilježena lažno sniženim brojem trombocita koji nastaje kao posljedica *in vitro* nakupljanja trombocita (2). Ova benigna i rijetka pojava, koja se javlja u 0,03 - 0,27% opće populacije te u 15,3% pacijenata s trombocitopenijom, nije povezana s određenim poremećajem ili terapijom (2). Međutim, ako se pravovremeno i pouzdano ne prepozna, pseudotrombocitopenija može rezultirati neželjenim kliničkim posljedicama. Nепрепозnavanje uzroka ove lažne trombocitopenije dovodi do neodgovarajućih kliničkih odluka (nepotrebne dodatne laboratorijske obrade, pogrešnih dijagnoza i potencijalno do pogrešnog liječenja), neizbježno ugrožavajući sigurnost pacijenta (2,3).

Najčešći oblik pseudotrombocitopenije uzrokovan je etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) (EDTA-pseudotrombocitopenija). U literaturi je opisano nekoliko različitih pristupa obradi uzoraka s EDTA-pseudotrombocitopenijom. To su, primjerice, dodavanje različitih spojeva (npr. amikacina ili kanamicina) uzorku s potvrđenom EDTA-pseudotrombocitopenijom kako bi se spriječilo stvaranje nakupina trombocita ili razdvojilo trombocite u postojećim nakupinama, neodgođena analiza uzorka s EDTA antikoagulansom, uzorkovanje i analiza uzorka s EDTA antikoagulansom na 37 °C, te korištenje drugih antikoagulansa (npr. kiselina citrat dekstroza, magnezijev sulfat ili natrijev citrat) (2-4). Dodatno, iako su provedena ispitivanja o mogućoj korisnosti vorteksiranja uzoraka s EDTA antikoagulansom u svrhu razbijanja nakupina trombocita, ne postoje objektivni dokazi koji potvrđuju učinkovitost ovog pristupa u potpunom uklanjanju nakupina trombocita

te posljedično tome i pouzdanom određivanju broja trombocita u takvom uzorku (5-7). Usprkos svemu navedenom, i dalje nedostaje stručnih preporuka u svrhu pravilne obrade uzoraka s EDTA-pseudotrombocitopenijom.

S obzirom na značajnu neujednačenost u pristupima obradi takvih uzoraka, cilj ovih preporuka je doprinos u postizanju harmonizacije na nacionalnoj razini u pravilnom prepoznavanju EDTA-pseudotrombocitopenije, obradi takvih uzoraka i izvještavanju broja trombocita. Predložene minimalne preporuke nastale su kao rezultat suradnje članova zajedničke radne skupine Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Radne grupe za laboratorijsku hematologiju Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, te se mogu prilagoditi specifičnim uvjetima (osoblju i opremi) svakog pojedinog medicinsko-biokemijskog laboratorija. Ove su preporuke prvenstveno namijenjene svim laboratorijskim djelatnicima uključenim u obradu uzoraka sa sumnjom na EDTA-pseudotrombocitopeniju. Nadalje, one su namijenjene i drugim zdravstvenim djelatnicima koji su uključeni u prikupljanje uzoraka i tumačenje rezultata analize kompletne krvne slike.

Preporučeni kriteriji za postavljanje sumnje na pseudotrombocitopeniju

Ako je zadovoljen barem jedan kriterij, treba posumnjati na prisutnost pseudotrombocitopenije i postupiti prema preporučenom laboratorijskom postupku za prepoznavanje i obradu uzoraka s pseudotrombocitopenijom.

1. Snižen broj trombocita ($< 100 \times 10^9/L$) određen na hematološkom analizatoru kod pacijenta bez kliničkih znakova trombocitopenije, bez prethodno potvrđene

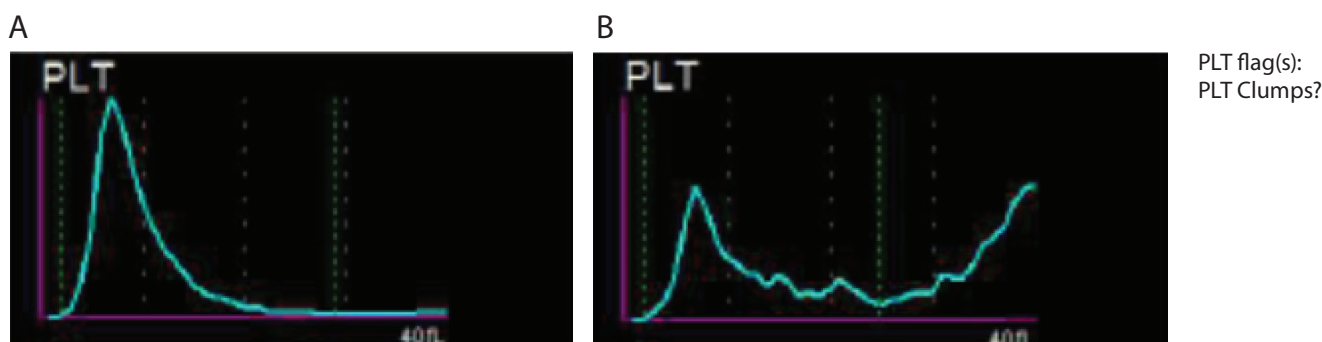
dijagnoze trombocitopenije ili drugog poremećaja trombocita te bez prethodnih rezultata određivanja broja trombocita; i/ili

2. Značajan pad broja trombocita (klinički značajna razlika (engl. *delta check*) $\geq 40\%$) u usporedbi s prethodnim rezultatima; i/ili
3. Prisutnost poruka upozorenja koje se odnose na trombocite i/ili leukocite na hematološkom analizatoru u kombinaciji s promijenjenim histogramom trombocita (2,3,8,9) (Slika 1).

Pseudotrombocitopenija nastaje pod utjecajem imunoloških (autoantitijela na trombocite), kemijskih (antikoagulansi) i fizikalnih čimbenika (vrijeme, temperatura) koji zajedno doprinose nastanku ovog *in vitro* fenomena. U literaturi se pseudotrombocitopenija najčešće povezuje s prisustvom autoantitijela koji unakrsno reagiraju s kompleksom glikoproteina IIb/IIIa (receptor za fibrinogen). Njegovi se skriveni epitopi izlažu na membrani trombocita uslijed djelovanja kalcij-kelirajućih sredstava koji se uobičajeno koriste kao antikoagulansi u spremnicima za uzorkovanje pune krvi.

Pseudotrombocitopenija je najčešće uzrokovana EDTA antikoagulansom, ali može biti povezana i s prisutnošću natrijeva citrata ili litijeva heparina, kao i drugih antikoagulansa (2,3,5). Nakon kontakta spomenutih antikoagulansa i pune krvi u kojoj su prisutna antitijela ovisna o antikoagulansu (koji svoju optimalnu aktivnost postižu na temperaturama nižim od normalne tjelesne temperature), dolazi do nakupljanja trombocita što se posljedično očituje pseudotrombocitopenijom (8).

Prema preporukama Međunarodnog društva za laboratorijsku hematologiju (engl. *International Society for Laboratory Hematology*, ISLH) razmaz periferne krvi potrebno je pregledati: a) kada je broj trombocita određen na hematološkom analizatoru $< 100 \times 10^9/L$ (prvo određivanje za pacijenta, bez prethodnih rezultata određivanja broja trombocita), i b) ako je klinički značajna razlika broja trombocita (razlika između trenutnog i prethodnog rezultata) veća od 40% (10). Osim ovih kvantitativnih kriterija, ISLH preporuča pregled razmaza periferne krvi bez obzira na broj trombocita ako se pojavi bilo koja od sljedećih poruka upozorenja tijekom automatizirane analize kompletne krvne slike: prisutnost nakupina trombocita (engl. *platelet clumps*), veliki trombociti (engl.



SLIKA 1. Usporedba histograma trombocita dobivenih metodom impedancije na hematološkom analizatoru Sysmex XN-1000 (Sysmex, Kobe, Japan): u (A) uzorku krvi bez sumnje na pseudotrombocitopeniju i (B) uzorku krvi sa sumnjom na pseudotrombocitopeniju. Prilagođeno prema (11). PLT – trombociti. Flag – poruka upozorenja. Clumps - nakupine.

giant platelets) ili bilo koja druga poruka povezana s promjenama u raspodjeli i/ili veličini trombocita (9,10).

Dostupnim automatiziranim metodama može se pouzdano odrediti broj trombocita u prisutnosti velikih trombocita i fragmenata drugih krvnih stanica; međutim, nijednom se automatiziranom metodom ne može pouzdano odrediti broj trombocita u uzorku u kojem su prisutne nakupine trombocita. Važno je napomenuti da pojava poruka upozorenja koje se odnose na nakupine trombocita ovisi o postavka analizatora i analitičkoj metodi koja se koristi (Tablica 1). Impedancija je metoda koja je najosjetljivija na prisutnost nakupina trombocita (2). Stoga se pregled izgleda histograma trombocita dobivenog metodom impedancije smatra važnim korakom u postavljanju sumnje na pseudotrombocitopeniju bez obzira na do-

biveni broj trombocita ili prisutnost poruka upozorenja. Neuobičajeni, promijenjeni trombocitni histogram nazubljenih linija te krivulja s nazubljenim krajem koja se kod oznake od 20 fL ne približava baznoj liniji može ukazivati na nakupljanje trombocita (Slika 1). Fragmenti leukocita i eritrocita te mikrociti mogu također interferirati kod automatiziranog određivanja broja trombocita (2,3).

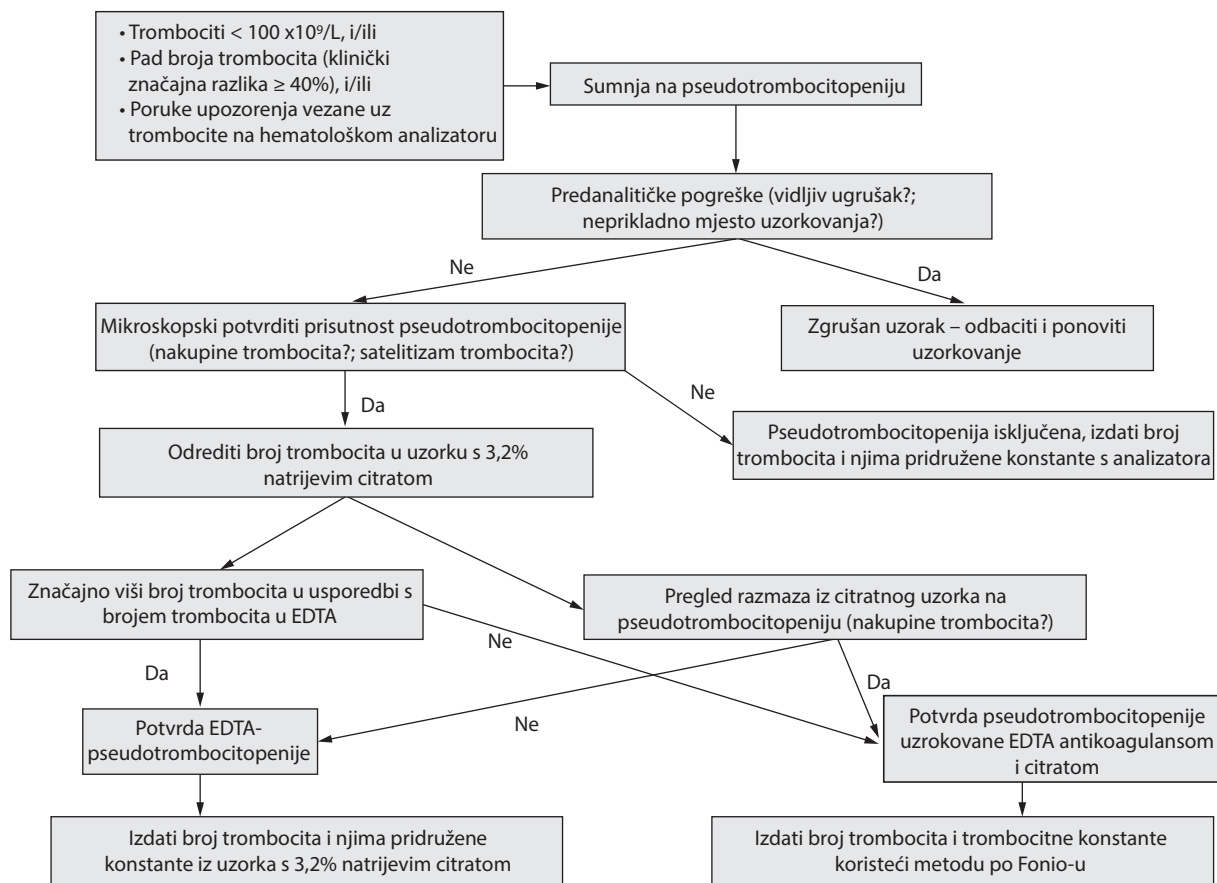
Preporučeni laboratorijski postupak za prepoznavanje i obradu uzoraka s EDTA-pseudotrombocitopenijom

Preporučeni postupak za prepoznavanje i izdavanje rezultata broja trombocita kod sumnje na pseudotrombocitopeniju opisan je u nastavku. Postupak je sažeto prikazan na Slici 2.

TABLE 1. Pregled najčešćih hematoloških analizatora u Hrvatskoj s pripadajućim porukama upozorenja kod sumnje na pseudotrombocitopeniju

| Proizvođač | Analizatori | Poruke upozorenja |
|---|---|---|
| Sysmex (Sysmex, Kobe, Japan) | XS, XE, XN, XT, XP, KX serija, poch 100i | PLT clumps Plt Abn Distribution Giant Platelets |
| Beckman Coulter (Beckman Coulter, Miami, SAD) | ACT, UniCel DxH, LH750, HmX | Platelet Clumps Giant Platelet PLT Inter: Debris RBC-PLT Overlap |
| Siemens (Siemens, Marburg, Njemačka) | Advia 360, 120, 560, 2120i | PLT-CLM Plt Clumps Large PLT |
| Mindray (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics CO., Ltd., Shenzhen, Kina) | BC 5150, BC 5380, BC 5390 | Plt Clump? |
| Abbott (Abbott, Santa Clara, SAD) | Alinity hq, Cell-Dyn 1800, 3700, Ruby, Emerald | PLT Clump No MPV result NRBC NWBC |

PLT – trombociti. RBC - eritrociti. MPV – prosječni volumen trombocita. WBC – leukociti.



SLIKA 2. Postupak obrade uzorka sa sumnjom na EDTA-pseudotrombocitopeniju.

1. Isključivanje utjecaja predanalitičkih pogrešaka

Neadekvatno predanalitičko rukovanje s uzorkom (nedovoljno punjenje spremnika, ili neodgovarajuće miješanje spremnika krvi nakon uzorkovanja) može dovesti do lažno sniženog broja trombocita. Ako se sumnja na pseudotrombocitopeniju sukladno prethodnim kriterijima, potrebno je isključiti sljedeće:

1. *in vitro* aktivaciju procesa zgrušavanja, bilo otkrivanjem vidljivog ugruška ili fi-

brinskih niti u EDTA uzorku. Takvi uzorci nisu prihvatljivi za analizu, odbijaju se i potrebno je ponoviti uzorkovanje.

2. Odabir neprikladnog mjesta venepunkcije – uzorkovanje u blizini mjesta infuzije može dovesti do kontaminacije uzorka infuzijskim otopinama i posljedično do lažno sniženog broja svih stanica, uključujući i trombocite. Kad god je moguće, treba odabrati alternativno mjesto za uzorkovanje, po mogućnosti iz druge ruke, kako bi se izbjegla kontaminacija (12).

Nakon isključenja utjecaja predanalitičkih čimbenika na broj trombocita, može se provesti i refleksno testiranje broja trombocita koristeći drugu analitičku metodu (brojenje trombocita optičkom ili fluorescentnom metodom), ako je ona dostupna. Rezultat određivanja broja trombocita dobiven alternativnom metodom treba se smatrati samo informativnim, ali nika-ko konačnim (13,14).

2. Mikroskopska potvrda pseudotrombocitopenije

Nakon što je utjecaj predanalitičkih čimbenika isključen, pseudotrombocitopeniju treba potvrditi morfološkim pregledom razmaza periferne krvi. Priprema razmaza i bojenje može se izvesti ručno (bojenjem po May-Grünwald Giemsa-i tehnici, MGG), ili koristeći automatizirani uređaj za izradu i bojenje razmaza. Prisutnost nakupina ili satelitizma trombocita u uzorcima s EDTA antikoagulansom potrebno je potvrditi pregledom razmaza periferne krvi pomoću svjetlosne mikroskopije. Ona se, prema preporuci Među-

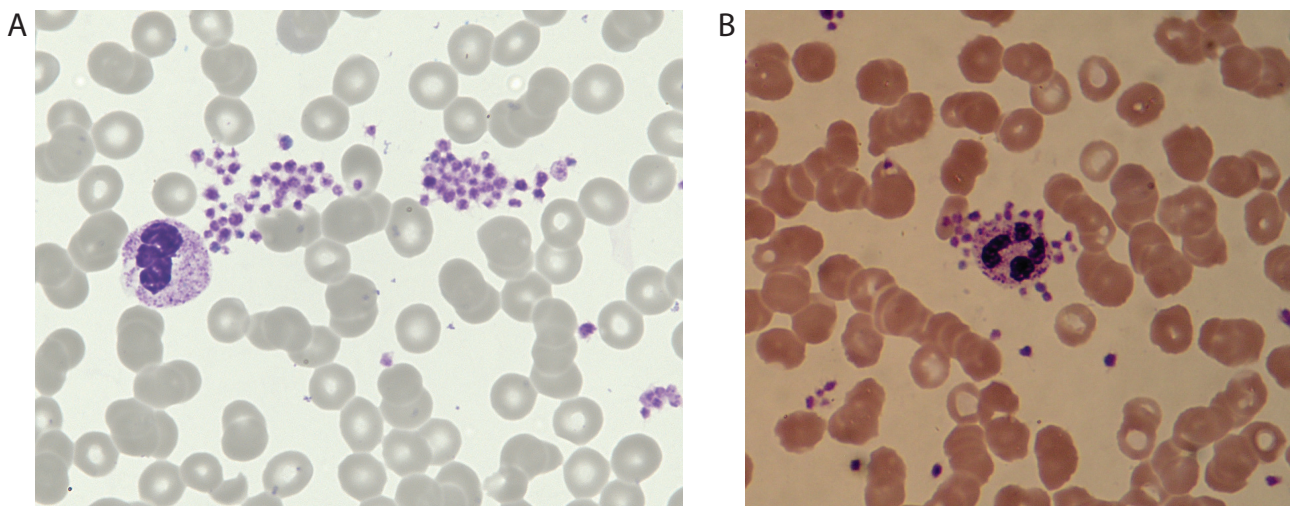
narodnog vijeća za standardizaciju u hematologiji, smatra metodom izbora u ovu svrhu (Slika 3) (15).

Nakon potvrde prisutnosti nakupina trombocita u uzorku, broj trombocita i pripadajuće trombocitne konstante se ne izvještavaju. Na laboratorijskom nalazu potrebno je jasno naznačiti sumnju na prisutnost nakupina trombocita potvrđenih mikroskopskim pregledom (Slika 4).

3. Određivanje broja trombocita u uzorcima sa sumnjom na EDTA-pseudotrombocitopeniju

U uzorcima s mikroskopski potvrđenom pseudotrombocitopenijom, broj trombocita i pripadajuće trombocitne konstante (prosječni volumen trombocita (MPV), trombo-krit (PCT), i drugi) se ne izvještavaju.

Odgovorni magistar medicinske biokemije/specijalist medicinske biokemije i laborato-



SLIKA 3. (A) Nakupine trombocita i (B) satelitizam trombocita u razmazu periferne krvi pripremljenom iz uzorka s EDTA antikoagulansom (16).

rijske medicine treba izravno kontaktirati odgovornog liječnika, prokomentirati nalaze i zatražiti ponovljeno uzorkovanje za određivanje broja trombocita u spremniku s 3,2% natrijevim citratom. Ako je odgovorni liječnik nedostupan, pacijenta se izravno kontaktira i poziva na ponovljeno uzorkovanje.

U slučajevima kada je uzorak s 3,2% natrijevim citratom već dostupan u medicinsko-biokemijskom laboratoriju (npr. kada su zatražene koagulacijske pretrage), treba ga koristiti za određivanje broja trombocita kod sumnje na EDTA-pseudotrombocitopeniju, bez potrebe za ponovnim uzorkovanjem.

Broj trombocita treba odrediti na hematološkom analizatoru iz uzorka s 3,2% natrijevim citratom i rezultat treba pomnožiti s faktorom 1,1 kako bi se uklonio učinak razrjeđenja uzrokovan tekućim antikoagulansom.

Broj trombocita i pripadajuće trombocitne konstante izvještavaju se iz uzorka s 3,2% natrijevim citratom nakon potvrde EDTA-pseudotrombocitopenije, odnosno u sljedećim slučajevima:

- 1) kada je u uzorku s 3,2% natrijevim citratom određen značajno viši broj trombocita u usporedbi s onim iz uzorka s EDTA antikoagulansom, ili
- 2) kada je prisutnost nakupina trombocita u uzorku s 3,2% natrijevim citratom isključena nakon mikroskopskog pregleda razmaza periferne krvi pripremljenog iz uzorka s 3,2% natrijevim citratom.

Ako broj trombocita određen iz uzorka s 3,2% natrijevim citratom nije značajno viši, ili su nakupine trombocita prisutne i u razmazu pripremljenom iz uzorka s 3,2% natrije-

A)

| Parametar | Rezultat | Jedinica | Referentni interval |
|-----------------|----------|--------------------|---------------------|
| (PK) Eritrociti | 4.84 | $\times 10^{12}/L$ | 3.56 – 5.08 |
| (PK) Hemoglobin | 142 | g/L | 119 – 157 |
| (PK) Hematokrit | 0.422 | L/L | 0.356 – 0.470 |
| (PK) MCV | 87.2 | fL | 83.0 – 97.2 |
| (PK) MCH | 29.3 | Pg | 27.4 – 33.9 |
| (PK) MCHC | 336 | g/L | 320 – 345 |
| (PK) RDW | 12.0 | % | 9.0 – 15.0 |
| (PK) Leukociti | 7.4 | $\times 10^9/L$ | 3.4 – 9.7 |
| (PK) Trombociti | / | $\times 10^9/L$ | 158 – 424 |
| (PK) MPV | / | fL | 6.8 – 10.4 |

Napomena: Zbog sumnje na pseudotrombocitopeniju uzrokovanu EDTA antikoagulansom, potrebno je ponoviti vađenje krvi u spremnik s 3.2% natrijevim citratom kao antikoagulansom.

PK – puna krv, MCV – prosječni volumen eritrocita, MCH – prosječna količina hemoglobina u jednom eritrocitu, RDW – raspodjela eritrocita po veličini, MPV – prosječni volumen trombocita

SLIKA 4. Primjeri laboratorijskih nalaza: (A) nakupine trombocita nađene u uzorku s EDTA i sumnja se na pseudotrombocitopeniju uzrokovanu EDTA antikoagulansom, (B) izvještavanje broja trombocita i pripadajućih trombocitnih konstanti iz spremnika s natrijevim citratom, (C) izvještavanje broja trombocita i pripadajućih trombocitnih konstanti iz spremnika s natrijevim citratom ako su pretrage dostupne kao zasebni zahtjevi unutar laboratorijskog informacijskog sustava, (D) nakupine trombocita prisutne i u EDTA i u citratu; i (E) izvještavanje broja trombocita koristeći ručnu metodu brojanja po Fonio-u. Referentni intervali preuzeti iz Hrvatskog nacionalnog projekta harmonizacije referentnih intervala (18).

B)

| Parametar | Rezultat | Jedinica | Referentni interval |
|-----------------|----------|-----------------|---------------------|
| (PK) Trombociti | 223 | $\times 10^9/L$ | 158 – 424 |
| (PK) MPV | 10.1 | fL | 6.8 – 10.4 |

Napomena: Analiza provedena iz uzorka s 3.2% natrijevim citratom.

PK – puna krv, MPV – prosječni volumen trombocita

C)

| Parametar | Rezultat | Jedinica | Referentni interval |
|-----------------------------------|----------|-----------------|---------------------|
| (PK) Trombociti (natrijev citrat) | 223 | $\times 10^9/L$ | 158 – 424 |
| (PK) MPV (natrijev citrat) | 10.1 | fL | 6.8 – 10.4 |

PK – puna krv, MPV – prosječni volumen trombocita

D)

| Parametar | Rezultat | Jedinica | Referentni interval |
|-----------------------------------|----------|--------------------|---------------------|
| (PK) Eritrociti | 4.84 | $\times 10^{12}/L$ | 3.56 – 5.08 |
| (PK) Hemoglobin | 142 | g/L | 119 – 157 |
| (PK) Hematokrit | 0.422 | L/L | 0.356 – 0.470 |
| (PK) MCV | 87.2 | fL | 83.0 – 97.2 |
| (PK) MCH | 29.3 | pg | 27.4 – 33.9 |
| (PK) MCHC | 336 | g/L | 320 – 345 |
| (PK) RDW | 12.0 | % | 9.0 – 15.0 |
| (PK) Leukociti | 7.4 | $\times 10^9/L$ | 3.4 – 9.7 |
| (PK) Trombociti | / | $\times 10^9/L$ | 158 – 424 |
| (PK) MPV | / | fL | 6.8 – 10.4 |
| (PK) Trombociti (natrijev citrat) | / | $\times 10^9/L$ | 158 – 424 |
| (PK) MPV (natrijev citrat) | / | fL | 6.8 – 10.4 |

Napomena: Analiza provedena iz uzoraka s EDTA i 3.2% natrijevim citratom. Potvrđena je pseudotrombocitopenija uzrokovana EDTA antikoagulansom i citratom. Za buduće analize kompletne krvne slike, uz spremnik s EDTA potrebno je istovremeno uzorkovati i kapilarni uzorak za određivanje broja trombocita (ubodom u jagodicu izravno na predmetno stakalce).

PK – puna krv, MCV – prosječni volumen eritrocita, MCH – prosječna količina hemoglobina u jednom eritrocitu, RDW – raspodjela eritrocita po veličini, MPV – prosječni volumen trombocita

E)

| Parametar | Rezultat | Jedinica | Referentni interval |
|-----------------|----------|-----------------|---------------------|
| (PK) Trombociti | 221 | $\times 10^9/L$ | 158 – 424 |
| (PK) MPV | / | fL | 6.8 – 10.4 |

Napomena: Potvrđena pseudotrombocitopenija uzrokovana EDTA antikoagulansom i citratom. Broj trombocita određen je ručnom metodom brojenja iz razmaza kapilarne krvi. MPV nije moguće odrediti.

PK – puna krv, MPV – prosječni volumen trombocita

SLIKA 4. Nastavak.

Zagreb, prosinac 2024.

vim citratom (učestalost iznosi oko 10 - 20%), potvrđuje se prisutnost pseudotrombocitopenije uzrokovane i EDTA antikoagulansom i natrijevim citratom. U tom se slučaju broj trombocita određuje ručnom metodom brojanja po Fonio-u (vidi Dodatak 1) (17).

„Značajno viši“ broj trombocita (odnosno, točan porast broja trombocita određen iz citratnog uzorka kako bi se potvrdila pseudotrombocitopenija uzrokovana EDTA antikoagulansom) se ne može jednoznačno i strogo odrediti jer ovisi o više čimbenika (vremenu i temperaturi transporta uzorka s EDTA antikoagulansom, broju i morfologiji nakupina trombocita prisutnih u uzorku s EDTA, stvarnom broju trombocita, povijesti bolesti pacijenta itd.). Stoga je kvantifikacija „značajno višeg“ broja trombocita određenog iz epruvete s 3,2% natrijevim citratom subjektivna i ovisi o procjeni odgovornog medicinskog biokemičara/specijalista medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

4. Izvještavanje broja trombocita

Ako se sumnja na EDTA-pseudotrombocitopeniju zbog prisutnosti nakupina trombocita u razmazu periferne krvi, broj trombocita i pripadajuće trombocitne konstante (MPV, PCT, itd.) se ne izvještavaju. Svi ostali rezultati kompletne krvne slike određeni na hematološkom analizatoru se izvještavaju iz EDTA-uzorka. Na odgovarajućem laboratorijskom nalazu treba biti jasno naznačena napomena (Slika 4A): *Zbog sumnje na pseudotrombocitopeniju uzrokovanu EDTA antikoagulansom, potrebno je ponoviti vađenje krvi u spremnik s 3,2% natrijevim citratom kao antikoagulansom.*

Ako se u uzorku s citratom ne potvrde nakupine trombocita, broj trombocita i pripadajuće trombocitne konstante izvještavaju se iz uzorka s 3,2% natrijevim citratom određeni na hematološkom analizatoru. Sve to je potrebno jasno naznačiti na nalazu kao što je prikazano na Slici 4B. Dodatno, ako su analize iz uzorka s 3,2% natrijevim citratom dostupne kao zasebni zahtjevi u laboratorijskom informacijskom sustavu, broj trombocita i pripadajuće trombocitne konstante izvještavaju se na nalazu bez potrebe za napomenom (Slika 4C).

Ako je potvrđena pseudotrombocitopenija s obje vrste antikoagulansa (i EDTA i 3,2% natrij citrat), broj trombocita i pripadajuće trombocitne konstante (MPV, PCT, itd.) se ne izvještavaju. Svi ostali rezultati određeni na hematološkom analizatoru koji se odnose na kompletnu krvnu sliku se izvještavaju iz EDTA-uzorka. Izvještava se broj trombocita određen ručnom metodom brojenja po Fonio-u iz kapilarnog uzorka. Napomena treba biti jasno naznačena na laboratorijskom nalazu: *Analiza provedena iz uzoraka s EDTA i 3.2% natrijevim citratom. Potvrđena je pseudotrombocitopenija uzrokovana EDTA antikoagulansom i citratom. Za buduće analize kompletne krvne slike, uz spremnik s EDTA potrebno je istovremeno uzorkovati i kapilarni uzorak za određivanje broja trombocita (ubodom u jagodicu izravno na predmetno stakalce)* (Slika 4D).

Kada se broj trombocita određuje iz kapilarnog uzorka metodom ručnog brojanja po Fonio-u, MPV se ne izdaje i odgovarajuća napomena treba biti naznačena na laboratorijskom nalazu: *Potvrđena pseudotrombocitopenija uzrokovana EDTA antikoagulansom i citratom. Broj trombocita određen je ručnom metodom brojenja iz razmaza kapilarne krvi. MPV nije moguće odrediti* (Slika 4E).

5. Izvještavanje broja trombocita iz uzoraka s isključenom pseudotrombocitopenijom

Ako je pseudotrombocitopenija uzrokovana EDTA antikoagulansom i/ili citratom isključena, na nalazu se izdaje broj trombocita odre-

đen na hematološkom analizatoru iz uzorka s EDTA antikoagulansom. Na laboratorijskom nalazu potrebno je naznačiti napomenu: *Dobiveni rezultati isključuju prisutnost pseudotrombocitopenije uzrokovane EDTA antikoagulansom.*

LITERATURA

1. Izak M, Bussel JB. Management of thrombocytopenia. *F1000Prime Rep.* 2014;6:45. <https://doi.org/10.12703/P6-45>
2. Lardinois B, Favresse J, Chatelain B, Lippi G, Mullier F. Pseudothrombocytopenia - A Review on Causes, Occurrence and Clinical Implications. *J Clin Med* 2021;10:594. <https://doi.org/10.3390/jcm10040594>
3. Schuff-Werner P, Mansour J, Gropp A. Pseudo-thrombocytopenia (PTCP). A challenge in the daily laboratory routine?. *J Lab Med.* 2020;44:295-304. <https://doi.org/10.1515/labmed-2020-0099>
4. Tantanate C, Supavat Talabthong, Phenluck Lamyai. Kanamycin Supplement for the Disaggregation of Platelet Clumps in EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia Specimens. *Lab Med.* 2022;53:e69-e73. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmab090>
5. Tantanate C. Vortex mixing to alleviate pseudothrombocytopenia in a blood specimen with platelet satellitism and platelet clumps. *Clin Chem Lab Med.* 2020;59:e189-e191. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1432>
6. Gulati GL, Asselta A, Chen C. Using a Vortex To Disaggregate Platelet Clumps. *Lab Med.* 1997;28:665-7. <https://doi.org/10.1093/labmed/28.10.665>
7. Zhu J, Luo L, Guo W, Wang B, Pan B. A Vortex Method to Disaggregate Platelets for Correct Counting in Pseudothrombocytopenia. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2023;39:330-4. <https://doi.org/10.1007/s12288-022-01582-6>
8. Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50:1281-5. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0081>
9. Baccini V, Geneviève F, Jacqmin H, Chatelain B, Girard S, Wuilleme S, et al. Platelet Counting: Ugly Traps and Good Advice. Proposals from the French-Speaking Cellular Hematology Group (GFHC). *J Clin Med.* 2020;9:808. <https://doi.org/10.3390/jcm9030808>
10. International Consensus Group for Hematology Review. Suggested Criteria for Action Following Automated CBC and WBC Differential Analysis. Available at: https://www.islh.org/web/consensus_rules.php. Accessed 15th February, 2024.
11. Sysmex Corporation. XN-Series Flagging Interpretation Guide. Version 1.0. Sysmex Europe GmbH. August 2018.
12. Simundic AM, Dukic L, Radisic Biljak V, eds. Pre-analytical Variation and Pre-Examination Processes. In: Tietz Textbook of Laboratory Medicine, 7th edition. Ed: Nader Rifai. Elsevier, 2023:80-128.
13. Deng J, Chen Y, Zhang S, Li L, Shi Q, Liu M, Yu X. Mindray SFCube technology: An effective way for correcting platelet count in individuals with EDTA dependent pseudo thrombocytopenia. *Clin Chim Acta.* 2020;502:99-101. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.12.012>
14. Bao Y, Wang J, Wang A, Bian J, Jin Y. Correction of spurious low platelet counts by optical fluorescence platelet counting of BC-6800 hematology analyzer in EDTA-dependent pseudo thrombocytopenia patients. *Transl Cancer Res.* 2020;9:166-72. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.12.58>
15. Kratz A, Lee SH, Zini G, Riedl JA, Hur M, Machin S. International Council for Standardization in Haematology. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations. *Int J Lab Hematol.* 2019;41:437-47. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13042>
16. Kopicinovic LM, Pavic M. Platelet satellitism in a trauma patient. *Biochem Med (Zagreb).* 2012;22:130-4. <https://doi.org/10.11613/BM.2012.016>
17. Softić N, ed. Hematološke laboratorijske pretrage. Zagreb: Sveučilišna naklada Liber; 1988.
18. Hrvatska komora medicinskih biokemičara. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.

Dodatak 1. BROJANJE TROMBOCITA PO FONIO-U

Princip metode

Određivanje broja trombocita po Fonio-u ručna je metoda kojom se procjenjuje broj trombocita i koristi se isključivo u slučajevima kada nije moguće pouzdano odrediti broj trombocita automatiziranim metodama brojenja na hematološkom analizatoru (ako su nakupine trombocita i dalje prisutne i u uzorku s 3,2% natrijevim citratom) ili kada postoji sumnja u pouzdanost broja trombocita dobivenih automatiziranim metodama brojenja na hematološkim analizatorima (prisutnost makrotrombocita, neuobičajeni histogram ili dijagram raspršenja te ostali pojedinačni slučajevi na temelju procjene laboratorijskih stručnjaka) (17).

Ako se potvrdi pseudotrombocitopenija uzrokovana EDTA antikoagulansom i citratom, broj trombocita se može odrediti po Fonio-u tako da se krv uzorkuje kapilarno iz jagodice prsta, pripremi se razmaz obojen metodom po Pappenheimu (bojenje May-Grünwald-Giemsa) te se trombociti broje na tisuću eritrocita koristeći svjetlosni mikroskop. U slučajevima kada nisu prisutne nakupine, a trombociti se trebaju brojiti po Fonio-u, razmaz periferne krvi može se napraviti izravno iz epruvete bez potrebe za kapilarnim uzorkovanjem.

Postupak

Jagodica prsta se dezinficira i ubode mikrolancetom. Dobivena se kap krvi prenese direktno s prsta na predmetno stakalce stavljanjem gornje plohe predmetnog stakalca u kontakt s kapi krvi. Nakon toga se pripremi razmaz metodom po Pappenheimu (bojenje May-Grünwald-Giemsa). Trombociti se broje svjetlosnim mikroskopom pod imerzijom koristeći povećanje od 100x. Trombociti se broje uz eritrocite, dok se ne izbroji do tisuću eritrocita (obično 5 vidnih polja sa po 200 eritrocita u svakom vidnom polju). Broj trombocita se izračunava množenjem broja eritrocita, određenog na hematološkom analizatoru, s brojem trombocita izbrojenih u razmazu:

$$\text{Broj trombocita (x10}^9\text{/L)} = A \times \text{Erc} / 1000$$

gdje je A broj trombocita izbrojen na 1000 eritrocita, a Erc broj eritrocita određen na hematološkom analizatoru ($\times 10^{12}/\text{L}$).

Dragi članovi,

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu definiralo je unaprjeđenje kvalitete laboratorijskog rada u Hrvatskoj kao jedan od svojih glavnih strateških ciljeva. U tu svrhu osnovan je velik broj Radnih grupa čiji je cilj promicanje harmonizacije i standardizacije laboratorijskih postupaka u svim fazama laboratorijskog rada.

Kao rezultat rada Radne grupe za laboratorijsku hematologiju HDMBLM-a i Hrvatske komore medicinskih biokemičara nastale su ove preporuke, a još je nekoliko dokumenata u pripremi te će uskoro biti dostupne svim članovima Društva.

HDMBLM

ISBN: 978-953-96611-6-6