

## Trombocytopenie

# Diferenciální diagnostika trombocytopenie

## Trombocytopenie a automatické měření hladiny trombocytů

Trombocytopenie je stav charakterizovaný abnormálně sníženou hladinou trombocytů pod normální hodnotu, která se u dospělých pohybuje v rozmezí  $150 \times 10^9/L$  až  $450 \times 10^9/L$ . Závažná trombocytopenie, s hladinou trombocytů méně než  $20 \times 10^9/L$ , je spojena se spontánním krvácením (krvácením, které není způsobeno poraněním). Těžká forma trombocytopenie může mít pro pacienta vážné následky, proto je spolehlivé zjišťování hladiny trombocytů zásadně důležité pro klinické rozhodování.

Získávání přesných údajů o počtu trombocytů, zejména ze vzorků od pacientů s trombocytopenií, není vždy snadné a laboratoř s tím mívá často problémy. Sysmex nabízí řešení v podobě speciální analýzy PLT-F. Více informací o tomto tématu naleznete v části *Výzvy při stanovení přesného a správného počtu trombocytů*.

## Etiologie trombocytopenie

I když trombocytopenii charakterizují nízké koncentrace trombocytů v krvi, samotný počet trombocytů v krevním obraze neodhaluje její příčiny, které mohou být vrozené, nebo získané. Tyto příčiny lze rozdělit na dvě hlavní kategorie: snížená produkce trombocytů v kostní dřeni

a zvýšená destrukce/spotřeba destiček v periferní krvi. Častou klinickou otázkou je, zda trombocytopenie vznikla z důvodu poruchy krvetvorby v kostní dřeni, kterou můžeme pozorovat například při aplastické anémii (AA) nebo myeloplastických syndromech (MS), nebo z důvodu zvýšené destrukce/spotřeba trombocytů v periferní krvi, jako například u idiopatické trombocytopenie (ITP), trombotické trombocytopenické purpury (TTP) nebo diseminované intravaskulární koagulace (DIC). Pro zjištění etiologie poruchy se obvykle doporučuje invazivní biopsie kostní dřene.

## Diferenciální diagnostika trombocytopenie

Diferenciální diagnostika trombocytopenie je komplexní. Vyžaduje zjištění anamnézy pacienta, vyhodnocení klinických příznaků, funkční testy trombocytů a posouzení parametrů trombocytů v periferní krvi. Kliničtí lékaři doposud využívali střední objem trombocytů (MPV) jako nepřímý marker produkce trombocytů, protože nezralé trombocyty bývají obvykle větší než zralé. Avšak zjištění MPV může být zkresleno přítomností schistocytů, mikrocytů nebo jiných elementů s podobným objemem jako trombocyty. Zejména u vzorků s velmi nízkou hladinou PLT, kdy je informace o produkci trombocytů nejvíce potřebná, nejsou hodnoty MPV přesné, nebo je nelze určit.

Frakce nezralých trombocytů IPF (retikulované trombocyty) je lepším markerem produkce destiček, protože vyjadřuje procento nezralých trombocytů v poměru k celkovému počtu trombocytů. Tento marker popsali v roce 1992 autoři Ault *et al.*, kteří pojem *retikulované trombocyty* zavedli, aby popsali nově uvolněné trombocyty se zvýšeným obsahem RNA, jejichž počet koreloval s aktivitou megakaryocytů [1]. IPF je reprodukovatelný parametr, který dobře koreluje s hodnotou hladiny retikulovaných trombocytů ověřených průtokovou cytometrií CD61 [2]. Korelace s MPV je jen částečná, přestože nezralé trombocyty mají tendenci být větší než zralé. Jedna ze studií zjistila, že 61% retikulovaných trombocytů bylo v tercilu obsahujícím největší trombocyty, zatímco v tercilu středních trombocytů se nacházelo 32% a v tercilu malých 7% retikulovaných trombocytů [3]. Kromě toho jsou nezralé trombocyty reaktivnější než zralé. Obsahují více RNA a jsou schopny produkovat různé proteiny typické pro aktivní trombocyty (např. GPIIb/IIIa, P-selektin) [3].

## Referenční rozsahy IPF

Několik studií stanovilo referenční rozsahy hodnoty IPF na přístrojích Sysmex XE a XN [4–12]. Obecně se tyto studie do značné míry shodují na referenčním rozsahu, ale v nedávné rozsáhlé studii L van Pelt *J et al.* analyzovali 12 782 vzorků krve zdravých jedinců v Nizozemsku a stanovili referenční rozsah pro IPF v rozmezí 1,2–8,9% [13]. Jedna ze studií stanovila referenční rozsah IPF pro novorozence: 0,7–7,9% [14]. Avšak referenční rozsah je třeba ověřit z hlediska vhodnosti pro každou studovanou skupinu pacientů metodou doporučovanou International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [15].

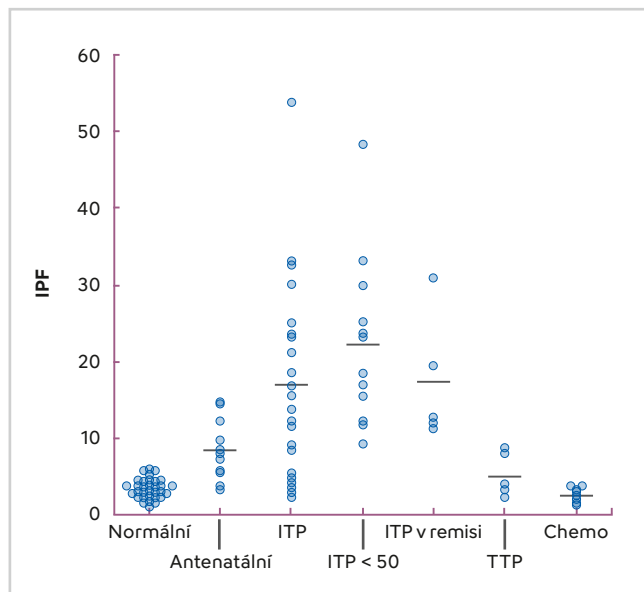
Trombocytopenie se zvýšenou hodnotou IPF může poukazovat na vyšší destrukci destiček v periferní krvi, vyšší ztráty trombocytů, nebo na hereditární makrotrombocytopenii [2, 5, 10–12, 16–20, 22].

Trombocytopenie s normální nebo sníženou hodnotou IPF může poukazovat na sníženou produkci destiček v kostní dřeni [2, 5, 10–12, 16–20].

Některé publikace uvádějí, že hodnota IPF, získaná z analyzátorů Sysmex řady XE a XN, je vyšší u pacientů s trombocytopenií způsobenou zvýšenou destrukcí/spotřebou trombocytů, než u pacientů s trombocytopenií způsobenou sníženou produkcí trombocytů v kostní dřeni [2, 5, 10–12, 16–20].

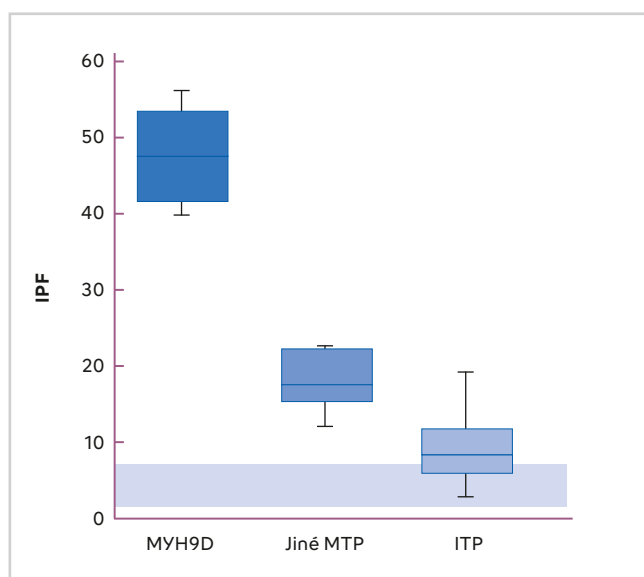
## Například:

- Briggs *et al.* sledovali pacienty s ITP a TTP způsobenými nadměrnou spotřebou trombocytů: zatímco hodnoty IPF byly v obou skupinách pacientů výrazně zvýšené, u pacientů na chemoterapii (způsobující snížení produkce trombocytů v kostní dřeni) a u pacientů s ITP a TTP v remisi byly zjišťovány normální hodnoty IPF (obr. 1) [10].
- Kickler *et al.* uvádějí vysoké hodnoty IPF u pacientů s trombocytopenií způsobenou zvýšenou destrukcí trombocytů, zatímco u pacientů se sníženou produkcí trombocytů pozorovali normální nebo jen mírně zvýšené hodnoty (tab. 1) [11].
- Abe *et al.* použili cut-off hodnotu 7,7% se senzitivitou 86,8% a specifitou 92,6% pro diferenciální diagnostiku ITP a AA. Kromě toho měla hodnota IPF výrazně vyšší výpovědní hodnotu než střední objem trombocytů [16].
- Jung *et al.* zjistili, že hodnota IPF je vyšší u pacientů s ITP než u pacientů s AA a pro odlišení ITP od AA lze použít cut-off hodnotu 7,3% se senzitivitou 54,0% a specifitou 92,2% [12]. (Nižší senzitivita ve srovnání se studií autorů Abe *et al.* mohla být způsobena odlišností zkoumané kohorty pacientů: pacienti s akutní ITP mají obvykle vysoké hodnoty IPF, zatímco pacienti v remisi mohou mít hodnoty IPF normální.)
- Strauss *et al.* studovali děti s trombocytopenií a zjistili, že u dětí s defektem produkce trombocytů byla hodnota IPF nízká, zatímco u pacientů s ITP byla znatelně zvýšená a indikovala zrychlený obrat trombocytů [18].
- Sakuragi *et al.* zjistili, že hodnota IPF změřená analyzátorů XN je přesnější a má méně interferencí než hodnota IPF získaná z analyzátorů XE. Použití cut-off hodnoty 5,8% vedlo k senzitivitě 85,1% a specifitě 89,3% při rozlišování ITP od aplastické trombocytopenie [20].



**Obr. 1** Hodnoty IPF u různých skupin pacientů.

ITP: idiopatická trombocytopenie; ITP < 50: ITP pacientů s hladinou PLT pod  $50 \times 10^9/L$ ; TTP: trombotická trombocytopenická purpura; Chemo: pacienti na chemoterapii. Převzato od Briggs *et al.* [10].



**Obr. 2** Hodnoty IPF u různých skupin pacientů.

MYH9D: poruchy MYH9; MTP: makrotrombocytopenie; ITP: idiopatická trombocytopenie. Převzato od Miyazaki *et al.* [22].

**Tab. 1** Hodnoty IPF u různých skupin pacientů.

ITP: idiopatická trombocytopenie; DIC: diseminovaná intravaskulární koagulace; AA: aplastická anémie; PNH: paroxysmální noční hemoglobinurie; NS: bez statistické významnosti v porovnání s kontrolní skupinou. Převzato od Kickler *et al.* [11].

| Subjekt          | Velikost skupiny | Průměr | $p^*$  |
|------------------|------------------|--------|--------|
| <b>Kontrola</b>  | 80               | 3,1    | –      |
| <b>Destrukce</b> |                  |        |        |
| ITP              | 37               | 15,0   | <,0001 |
| DIC              | 25               | 9,5    | <,0001 |
| Souhrnně         | 62               | 12,8   | <,0001 |
| <b>Suprese</b>   |                  |        |        |
| AA/PNH           | 3                | 6,1    | ,019   |
| Karcinomy        | 16               | 3,8    | NS     |
| Souhrnně         | 19               | 4,1    | ,05    |

\* Statistická hodnota  $p$  v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků

Shrnutí: Parametr IPF umožňuje posouzení produkce trombocytů v kostní dřeni a pomáhá diferencovat mezi trombocytopenií způsobenou sníženou produkcí trombocytů v kostní dřeni a trombocytopenií způsobenou zvýšenou destrukcí/spotřebou trombocytů. Poskytuje další informace, které mohou snížit četnost invazivních biopsií kostní dřene.

### Přínos posouzení IPF pro diferenciální diagnostiku kongenitální trombocytopenie

IPF může rovněž přispět k diferenciální diagnostice při podezření na kongenitální trombocytopenii. Podezření na kongenitální trombocytopenii obvykle vzniká v případech: novorozenecké trombocytopenie, vzniku krvácivých syndromů v dětství, pozitivní rodinné anamnézy trombocytopenie, nebo pokud hladina trombocytů nereaguje na léčbu ITP. Pro diferenciální diagnostiku dědičné trombocytopenie se často používá MPV [21], ale, jak již bylo zmíněno, stanovení MPV je ovlivněno interferencemi a jeho hodnota je často nepřesná, nebo ji ve vzorcích s velmi nízkou hladinou trombocytů nelze určit vůbec.

Řada nedávných publikací uvádí, jak může IPF přispět k diferenciální diagnostice kongenitální trombocytopenie. Například autoři Miyazaki *et al.* zjistili, že hodnota IPF byla asi pětkrát vyšší u poruch May-Hegglin MYH9 ( $48,6\% \pm 1,9$ ) a asi dvojnásobná v případech jiných makrotrombocytopenií ( $18,4\% \pm 2,1$ ) v porovnání s pacienty s ITP ( $9,2\% \pm 0,3$ ) s podobnými hladinami IPF (obr. 2) [22]. Naproti tomu pacienti s Wiskott-Aldrich kongenitální trombocytopenií (WAS) měli hodnoty IPF nižší, než by odpovídalo jejich stavu trombocytopenie, a hodnota IPF u těchto pacientů byla nižší než u pacientů s ITP [23]. Podobná zjištění byla uvedena u sedmi dětí s WAS, které měly nižší absolutní počet IPF než pacienti stejného věku s chronickou ITP [24].

## Výzvy při stanovení přesného a správného počtu trombocytů

Automatické hematologické analyzátoři obecně poskytují přesná a správná měření počtu trombocytů použitím impedanční metody (PLT-I). Interferující částice mohou vést k falešně vysokým hladinám trombocytů. U pacientů se závažnou trombocytopenií ( $PLT \leq 20 \times 10^9/L$ ) může být přesnost limitována z důvodu nízkého počtu analyzovaných částic. V případě podezření na interferující částice nebo závažnou trombocytopenii provádějí analyzátoři řady XR a XN reflexní měření alternativními metodami pomocí průtokové cytometrie (PLT-O or PLT-F) (tab. 2).

U analyzátorů řady XR a XN vybavených PLT-I a PLT-O rozhoduje přepínací algoritmus automaticky o tom, zda je pro stanovení přesného počtu PLT nutné reflexní měření PLT-O; u analyzátorů vybavených PLT-I a PLT-F může být vyžadováno reflexní měření PLT-F, které se provede obdobně. Při podezření na těžkou trombocytopenii je potřeba přesnější měření, aby bylo dosaženo spolehlivých výsledků pro správná klinická rozhodnutí. V těchto případech je PLT-F metodou první volby.

## Závěr

Samotný počet trombocytů neurčuje etiologii trombocytopenie. Příčinami trombocytopenie může být snížená produkce trombocytů v kostní dřeni nebo zvýšená destrukce/spotřeba destiček v periferní krvi. IPF je parametr speciálně vyvinutý jako vodičko pro klinické lékaře k určování etiologie trombocytopenie, jak je uvedeno v tomto dokumentu.

Vysoká hodnota IPF indikuje trombocytopenické poruchy způsobené zvýšenou konzumpcí trombocytů, nebo vrozenou makrotrombocytopenií, a může být také známkou správné reakce kostní dřene na trombocytopenii. Naproti tomu nízká nebo normální hodnota IPF se vyskytuje u aplastických stavů (tab. 3). Měření IPF lze požadovat pro určité skupiny pacientů, nebo je změřeno jako reflexní test u pacientů s těžkou trombocytopenií, či s interferencí měření.

Tab. 2 Srovnání různých metod zjišťování počtu trombocytů, které jsou k dispozici v analyzátořích Sysmex řady XN a XR.

|   | Impedanční metoda (PLT-I)  | Optická metoda (PLT-O)  | Fluorescenční metoda (PLT-F)   |
|---|--|---|--|
| <b>Pracovní postup</b>                        | Standardní rutinní automatická metoda  | Obvykle reflexní metoda   | Obvykle reflexní metoda  |
| <b>Analýza</b>                                | Součást krevního obrazu  | Součást stanovení retikulocytů  | Speciální stanovení PLT  |
| <b>Přesnost, správnost a interference</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nízká přesnost u <math>PLT &lt; 20 \times 10^9/L</math></li> <li>Nízká správnost u vzorků s interferencemi: částicemi s objemem podobným objemu trombocytů (krytaly v reagenii, vzduchové bubliny, mikrocyty, fragmenty RBC)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nízká přesnost u <math>PLT &lt; 20 \times 10^9/L</math></li> <li>Vysoká správnost v případě přítomnosti abnormalit RBC</li> <li>Nízká správnost u vzorků s fragmenty WBC (apoptóza/nekróza)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Vysoká přesnost až do <math>PLT = 3 \times 10^9/L</math> díky pětinasobnému analyzovanému objemu oproti impedanční metodě</li> <li>Téměř žádné interference</li> <li>Srovnatelné s referenční metodou (CD41/CD61) [25, 26]</li> </ul> |
| <b>Diagnostické parametry kromě počtu PLT</b> | PDW, MPV, PCT, P-LCR   | None  | IPF, IPF#  |

Tab. 3 Etiologie trombocytopenie a související hodnoty IPF. Rozsahy v tabulce jsou pouze informativní, výklad IPF je vždy třeba provádět v úplném klinickém kontextu včetně klinických příznaků a dalších laboratorních testů.

| Získaná  |  | Hereditární   |
|--|--|---|
| Inefektivní trombopoéza  | Zvýšená destrukce/konzumpce  | Kongenitální makrotrombocytopenie   |
| IPF 1,2 – 8,9%   | IPF > 8,9%   | IPF > 12%   |
| <b>Poškození kostní dřene</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Myelodysplastické syndromy</li> <li>Neoplastická infiltrace kostní dřene</li> <li>Aplastická anémie způsobená chemikáliemi, léky nebo infekcí</li> <li>Chronická ITP s apoptotickými megakaryocyty</li> </ul> | <b>Imunitní příčiny</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Idiopatická trombocytopenie (ITP)</li> <li>Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) typ II</li> </ul>   | <b>IPF &gt; 12%</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Bernard-Soulierův syndrom</li> <li>ACTN1-trombocytopenie</li> <li><math>\alpha\delta</math>-poruchy granulace trombocytů</li> <li>Variální forma Glanzmannovy thrombastenie</li> </ul> |
| <b>Inefektivní produkce</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Megaloblastová anémie</li> </ul>  | <b>Neimunitní příčiny</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Trombotická trombocytopenická purpura (TTP)</li> <li>Hemolyticko uremický syndrom (HUS)</li> <li>Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC)</li> <li>HIT typ I</li> <li>Krvácení</li> </ul> | <b>IPF &gt; 40%</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>May-Hegglinova anomálie MYH9</li> </ul>  |

## Reference

- [1] **Ault A et al. (1992):** The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol.* 98(6): 637–46.
- [2] **Pons I et al. (2010):** Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 85(2): 158–63.
- [3] **Guthikonda S et al. (2008):** Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 52(9): 743–9.
- [4] **Zucker MJ et al. (2006):** Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. *Lab Hematol.* 12(3): 125–30.
- [5] **Cho YG et al. (2007):** Clinical usefulness of the simple technique to diagnose thrombocytopenia using immature platelet fraction. *Korean J Lab Med.* 27(1): 1–6.
- [6] **Pekelharing JM et al. (2010):** Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. *Sysmex J Int.* 20(1): 1–11.
- [7] **Ko YJ et al. (2013):** Establishment of reference interval for immature platelet fraction. *Int J Lab Hematol.* 35(5): 528–33.
- [8] **Systemex Corporation (2014):** Reference ranges analysis document for XN-Series.
- [9] **Seo A et al. (2015):** Reference intervals for immature platelet fraction and immature platelet count. *Int J Lab Hematol.* 37(1): e1–2.
- [10] **Briggs C et al. (2004):** Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 126(1): 93–9.
- [11] **Kickler T et al. (2006):** A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol.* 125(2): 282–7.
- [12] **Jung H et al. (2010):** Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean J Lab Med.* 30(5): 451–9.
- [13] **L van Pelt J et al. (2022):** Reference intervals for Sysmex XN hematological parameters as assessed in the Dutch Lifelines cohort. *Clin Chem Lab Med.* 60(6): 907–920.
- [14] **Cremer M et al. (2004):** Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 144(4): 619–21.
- [15] **Solberg HE. (2004):** The IFCC recommendation on the estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med.* 42(7): 710–4.
- [16] **Abe Y et al. (2006):** A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res.* 118(4): 463–9.
- [17] **Cannavo I et al. (2010):** Assessment of an immature platelet fraction (IPF%) in the diagnosis of thrombocytopenia. *Ann Biol Clin (Paris).* 68(4): 415–20.
- [18] **Strauss G et al. (2011):** Immature platelet count: a simple parameter for distinguishing thrombocytopenia in pediatric acute lymphocytic leukemia from immune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer.* 57(4): 641–7.
- [19] **Adly AA et al. (2015):** Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia. *Platelets.* 26(7): 645–50.
- [20] **Sakuragi M et al. (2015):** Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol.* 101(4): 369–75.
- [21] **Cremer M et al. (2016):** Thrombocytopenia and platelet transfusion in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med.* 21(1): 10–8.
- [22] **Miyazaki K et al. (2015):** Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematology.* 20(10): 587–92.
- [23] **Sokolic R et al. (2015):** Assessment of immature platelet fraction in the diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Front Pediatr.* 3: 1–10.
- [24] **Gerrits AJ et al. (2015):** Effects of eltrombopag on platelet count and platelet activation in Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia. *Blood* 126(11): 1367–78.
- [25] **Tanaka Y et al. (2014):** Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-Series Automated Hematology Analyzers. *J Clin Lab Anal.* 28(5): 341–8.
- [26] **Park S et al. (2014):** The Sysmex XN-2000 Hematology Autoanalyzer Provides a Highly Accurate Platelet Count than the Former Sysmex XE-2100 System Based on Comparison with the CD41/CD61 Immunoplatelet Reference Method of Flow Cytometry. *Ann Lab Med.* 34(6): 471–4.

Stáhněte si z našich stránek White Papers s dalšími tématy:  
[www.sysmex.cz/whitepapers](http://www.sysmex.cz/whitepapers)