

## Trombocytentelling in citraat-bloed: is iedere afnamebuis geschikt?

H.J. HUIJGEN<sup>1,3</sup>, M. de HAAN<sup>2</sup> en M. RUBENS<sup>2</sup>

De trombocytenconcentratie van bloed wordt meestal bepaald in monsters die ontsteld zijn met EDTA. Er kunnen zich echter situaties voordoen, zoals bij pseudotrombocytopenie, waarbij naar een ander anticoagulans moet worden uitgeweken. Natriumcitraat is dan één van de mogelijke opties.

Uit metingen in citraat- en EDTA-bloed afgenomen bij vijf gezonde vrijwilligers bleken vier van de zeven door ons geteste citraatbuizen geschikt voor de meting van de trombocytenconcentraties. Trombocytentellingen in overgebleven drie buizen resulteerde, in vergelijking met tellingen in EDTA-bloed, in afwijkingen tot -25%. Geconcludeerd kan worden dat men op het klinisch-chemisch laboratorium bij gebruik van citraat als anticoagulans voor de telling van trombocyten vooraf vast dient te stellen of de citraatbuizen die voorhanden zijn, wel geschikt zijn voor dit doel.

*Trefwoorden: trombocyten; citraat; anticoagulantia; pseudotrombocytopenie*

Pseudotrombocytopenie is een welbekend fenomeen in het klinisch-chemisch laboratorium. Dit verschijnsel doet zich vooral voor in bloed dat ontsteld wordt met EDTA. Gezien de prevalentie, die varieert van 1 per 50 tot 1 per 1000 opgenomen patiënten (1,2), hebben klinisch-chemische laboratoria maatregelen getroffen om deze monsters te identificeren. Op het klinisch-chemisch laboratorium van het Rode Kruis Ziekenhuis bestaat deze maatregel uit het visueel beoordelen van een bloeduitstrijkje bij iedere trombocytentelling beneden de  $70 \cdot 10^9/l$ . Tevens wordt in geval van twijfel een microscopische telling volgens Feissly verricht. Wanneer er vervolgens aanwijzingen voor pseudotrombocytopenie zijn, wordt bloed afgenomen in een natriumcitraat-buis en wordt de telling herhaald. De trombocytentelling in citraat-bloed bleek afhankelijk te zijn van het type citraat-buis. Dit deed ons besluiten een onderzoek te starten naar de betrouwbaarheid van de trombocytentelling in citraat-

bloed. Het doel van het onderzoek was om te achterhalen welke citraatbuizen, verkrijgbaar bij de huidige leverancier van ons laboratorium (Becton & Dickinson BV, Leiden, Nederland), al dan niet geschikt zijn voor de telling van trombocyten. Tevens onderzochten wij de houdbaarheid van trombocyten in zowel EDTA- als citraat-bloed.

### Uitvoering

Bij vijf vrijwilligers werden door middel van één venuze afname zeven verschillende citraat-buizen en één EDTA-buis (Becton & Dickinson BV, Leiden, Nederland) gevuld met bloed. De specificaties van de gebruikte bloedafnamebuizen staan vermeld in tabel 1. Direct na afname werden de buizen aangeboden aan een hematologie analyzer (Cell-Dyn 4000 system, Abbott, Santa Clara CA, USA). De trombocyten werden zowel met behulp van een optische flow cell als een impedantie transducer geteld. Naast de trombocytentelling werden ook de overige hematologische parameters geregistreerd. Na de eerste meting werden de buizen bij kamertemperatuur bewaard en vervolgens 1, 2, 4 en 8 uur later opnieuw geanalyseerd. De houdbaarheid van trombocyten in EDTA-bloed is bepaald door het gemiddelde verschil in de trombocytentelling, inclusief bijbehorende standaard deviatie (SD), voor de tijdstippen 1 tot en met 8 uur na afname te vergelijken met de telling uitgevoerd op het tijdstip  $t=0$ . Het verschil werd uitgedrukt als de gemiddelde procentuele afwijking. De geschiktheid van de zeven verschillende citraat-buizen is bepaald door voor ieder tijdstip, na correctie voor verdunning, de gemiddelde afwijking, inclusief bijbehorende SD, van de trombocytentelling ten opzichte van de telling in EDTA-bloed vast te stellen. Significantie van het gemiddelde verschil voor zowel het trombocytenverloop in de tijd in EDTA-bloed, als het gemiddelde verschil tussen de trombocytentelling in citraat- en EDTA-bloed, is bepaald met de gepaarde t-test. Het significantieniveau is op  $p=0,05$  gesteld. Uitslagen waaraan de Cell-Dyn 4000 analyzer de melding plateletclumps, short sample of clog toevoegde, zijn verwijderd. Bij discrepantie tussen de optische- en impedantietelling (pic/poc alarm) zijn de uitslagen in de dataverwerking wel meegenomen.

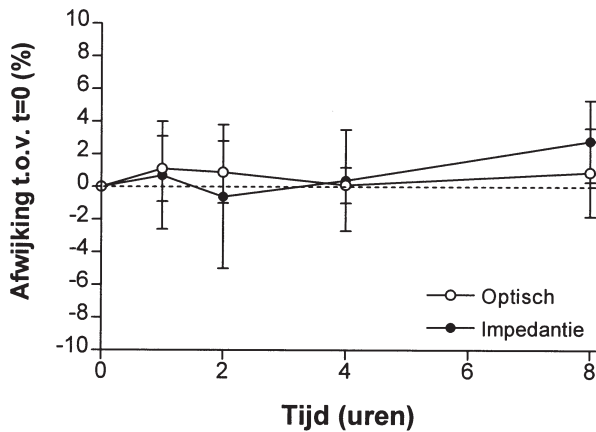
### Resultaten

De trombocytenconcentratie gemeten in EDTA-bloed van de vijf vrijwilligers varieerde op  $t=0$  van 204 tot  $411 \cdot 10^9/l$ . In figuur 1 staan de gemiddelde procentuele afwijkingen inclusief bijbehorende SD's voor de trombocytentelling in EDTA-bloed voor de eerste

*Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam<sup>1</sup> en Klinisch Chemisch Laboratorium, Rode Kruis Ziekenhuis, Beverwijk<sup>2</sup>, Klinisch Chemisch Laboratorium, Boven IJ Ziekenhuis, Amsterdam<sup>3</sup>.*

Correspondentie: Dr. M. Rubens, Klinisch Chemisch Laboratorium, Rode Kruis Ziekenhuis, Vondellaan 13, 1942 LE Beverwijk.

Ingekomen: 11.11.99



**Figuur 1.** Procentuele afwijking (gem $\pm$ SD) in de trombocytentelling in EDTA-bloed 1 t/m 8 uur na afname, ten opzichte van de telling direct na afname.

acht uur na afname, ten opzichte van t=0 weergegeven. Op t=8 was dit aantal volgens de optische meetmethode met gemiddeld  $1,6 \cdot 10^9/l$  trombocyten ( $=0,9\%$ ) gestegen ( $p=0,614$ ), en volgens de impedantie methode met gemiddeld  $6,6 \cdot 10^9/l$  ( $=2,8\%$ ) toegenomen ( $p=0,058$ ). Voor beide type metingen (optisch en impedantie) geldt dat de afwijkingen in de telling niet significant afwijken van de telling op t=0 ( $p>0,05$ ). Deze bevinding maakte het mogelijk om in het tweede gedeelte van het experiment de trombocytentellingen in citraat-bloed te vergelijken met de tellingen in EDTA-bloed op de corresponderende tijdstippen. Een overzicht van de verkregen data staan weergegeven in de figuren 2A (optische telling) en 2B (impedantie telling). Voor de optische tellingen in citraat-bloed geldt dat op alle tijdstippen lagere resultaten gevonden werden dan in EDTA-bloed dat op hetzelfde tijdstip afgenomen en gemeten was. De minst afwijkende resultaten werden gevonden met de

citraatbuisen nr. 4 en 6 met op t=0 een gemiddelde afwijking van respectievelijk  $-8,5 \cdot 10^9/l$  ( $-2,4\%$ ,  $p=0,213$ ) en  $-18,0 \cdot 10^9/l$  ( $-5,1\%$ ,  $p=0,017$ ). Na t=4 nam het verschil toe tot  $>10\%$ . Voor de impedantie tellingen in citraat-bloed zijn de verschillen ten opzichte van de tellingen in EDTA-bloed voor alle buizen minder groot dan bij de optische tellingen. Evenals bij de optische tellingen werden de grootste afwijkingen gevonden voor de citraatbuisen 2, 5 en 7 en de kleinste afwijkingen voor de buizen 4 en 6; op t=0 respectievelijk  $+7 \cdot 10^9/l$  ( $+3,2\%$ ,  $p=0,129$ ) en  $+12 \cdot 10^9/l$  ( $+5,2\%$ ,  $p=0,015$ ). De afwijkingen bleven in de periode t/m 8 uur na afname voor beide citraatbuisen kleiner dan  $4\%$  ( $p>0,05$ ). Strikt genomen is de discrepantie tussen de optische trombocytentelling in EDTA- en citraat-bloed iets minder groot dan waargenomen aangezien de aanwezigheid van vloeibaar  $K_3EDTA$  in de vacuüm bloedafnamebuisen tot een monsterverdunning, en dus daling in de trombocytconcentratie, van circa  $2\%$  leidt.

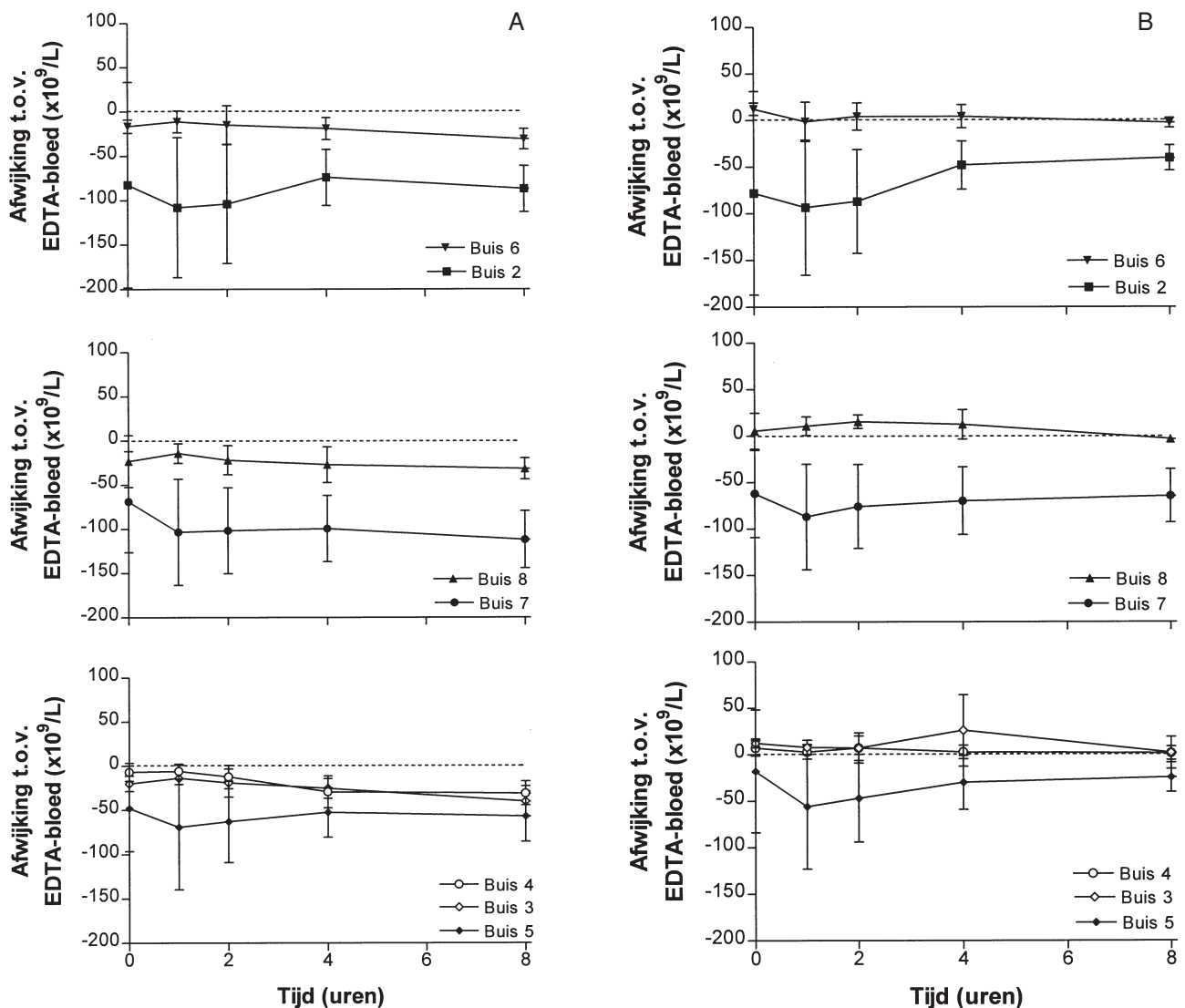
### Discussie en conclusie

De meting van de trombocytconcentratie vindt meestal plaats in EDTA-bloed zoals aanbevolen door de International Council for Standardization in Haematology (3). Echter, EDTA kan pseudotrombocytopenie veroorzaken en in dat geval moet bloed met een ander anticoagulans ontsteld worden. Sinds de eerste rapportage over dit fenomeen (4) zijn meerde publicaties gewijd aan de oorzaak van pseudotrombocytopenie (5,6,7,8). Alternatieve anticoagulantia waardoor een betrouwbare telling van trombocyten toch mogelijk is zijn beschreven (1,5,9,10). Onlangs vergeleken Schrezenmeier en collegae (10) zeven verschillende anticoagulantia en concludeerden zij dat pseudotrombocytopenie niet alleen optreedt in monsters die ontsteld werden met EDTA maar ook, zij het in mindere mate, met andere anticoagulantia zoals Na-oxalaat,

**Tabel 1.** Overzicht van de geteste citraat bloedafnamebuisen

Nr	Omschrijving	Volume citraatoplossing (ml)	Concentratie citraatoplossing (mmol/l)	Concentratie citraat in gevulde buis (mmol/l)
1	EDTA-buis* nr. 367652 bloedvolume 3,0 ml	—	—	—
2	Citraat-buis nr. 367710 volume 2,7 ml	0,3	105	10,5
3	BSE-buis nr. 367741 volume 2,4 ml	0,6	129	25,8
4	CTAD-buis nr. 367015 volume 4,5 ml	0,5	109	10,9
5	Citraat-buis nr. 367702 volume 3,15 ml	0,35	129	12,9
6	Citraat-buis nr. 367714 volume 4,5 ml	0,5	105	10,5
7	Citraat-buis nr. 367711 volume 1,8 ml	0,2	105	10,5
8	BSE-buis nr. 366641 volume 5,0 ml	1,25	105	21

\*:  $K_3EDTA$ : 7,5%, 0,072 ml



**Figuur 2.** Afwijking (gem $\pm$ SD) in de trombocytentelling in citraat-bloed, afgenomen in verschillende typen citraat-buizen, ten opzichte van de telling in EDTA-bloed voor de tijdstippen 0 t/m 8 uur na afname. A: optische telling, B: impedantie telling.

Na-citraat of heparine. Daarnaast bleek ook het type meetinstrument een belangrijke determinant in de door hen waargenomen trombopenie. Echter, in geen van de hier genoemde studies is gekeken naar de invloed van de citraat/bloed-verhouding, citraatconcentratie of additieven. De hier beschreven studie was opgezet om voor ons eigen laboratorium vast te stellen welke citraat-buis voor de trombocytentelling het meest geschikt is als alternatief voor de EDTA-bloedafnamebuis.

Wij vonden dat van de zeven typen door ons geteste citraat-buizen er drie niet geschikt zijn voor de telling van trombocyten in bloed. Het betreft de buizen 2, 5 en 7. Wij hebben hier geen verklaring voor kunnen vinden. Het was opvallend dat de buizen met de kleinste inhoud de slechtste resultaten gaven. Dit bleek niet een gevolg van een verdunningsfout want uit Hb metingen volgde dat alle zeven verschillende typen citraat-buizen niet goed gevuld werden (gemiddelde afwijking 4,5%, minimaal 3,6% $\pm$ 0,02% (buis 2), maximaal 5,6% $\pm$ 0,03% (buis 8)).

Wellicht speelt de eigenschap van de rubber stop een rol. Tevens is het niet denkbeeldig dat de door ons ge-

vonden bevindingen afhankelijk zijn van de fabricatie-batch. Vooralnog is het aan te bevelen om voor een optimale telling van trombocyten in citraat-bloed gebruik te maken van de CTAD-buis (buis nr. 4) waaraan immers reagentia speciaal ter remming van trombocytenaggregatie (theophylline, adenosine en dipyridamol) zijn toegevoegd. Bovendien correspondeerde de impedantie trombocytentelling in citraat beter met de tellingen in EDTA-bloed dan de optische trombocytentelling.

Aanvullend dient opgemerkt te worden dat onze resultaten gebaseerd zijn op metingen in bloed van gezonde vrijwilligers. Uit de studie van Schrezenmeier en collegae (10) bleek dat het verschil in trombocytenconcentratie tussen citraat-bloed (NaCitraat eindconcentratie 15 mmol/l) en EDTA-bloed van patiënten met pseudothrombocytopenie groter is dan in bloed van gezonde vrijwilligers.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat op het klinisch-chemisch laboratorium niet volstaan kan worden met het bedacht zijn op het verschijnsel pseudotrombocytopenie, maar dat ook, wanneer voor citraat als alternatief anticoagulans gekozen wordt,

vooraf vastgesteld moet worden of de voorhanden zijnde citraat-bloedafname buizen geschikt zijn voor de telling van trombocytten.

#### Literatuur

1. Lombarts AJPF, Kieviet W de. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 634-639.
2. Vicari A, Banfi G, Bonini PA. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a 12-month epidemiological study. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 537-542.
3. International Council for Standardization in Haematology. Recommendations of the international council for standardization in haematology for ethylenediaminetetra-acetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 371-372.
4. Gowland E, Kay HEM, Spillman JC, Williamson JR. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. *J Clin Pathol* 1969; 22: 460-464.
5. Shreiner DP, Bell WR. Pseudothrombocytopenia: manifestation of a new type of platelet agglutinin. *Blood* 1973; 42: 541-549.
6. Veenhoven WA, Schans GS van der, Huiges W, Metting-Scherphuis HE, Halie MR, Nieweg HO. Pseudothrombocytopenia due to agglutinins. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 1005-1008.
7. Pegels JG, Bruyines ECE, Engelfriet CP, Borne AEGKr von dem. Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetraacetate. *Blood* 1982; 59: 157-161.
8. Vliet HHDM van, Kappers-Klunne MC, Abels J. Pseudothrombocytopenia: a cold autoantibody against platelet glycoprotein GP IIb. *Br J Haematol* 1986; 62: 501-511.
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: 195-201.
10. Schrezenmeier H, Müller H, Günsilius E, Heimpel H, Seifried E. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 73: 506-513.

---

#### Summary

*Platelet count in seven different types of citrate test tubes. Huijgen HJ, Haan M de and Rubens M. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 178-181.*

Platelets are normally counted in blood drawn in EDTA. However, in circumstances like pseudothrombocytopenia other anticoagulants are recommended. Sodiumcitrate is one of the possibilities. Measurements performed in citrate- and EDTA-blood obtained from five healthy volunteers showed that only four of the seven different types of citrate tubes tested were suitable. Measurements in the three remaining tubes resulted in deviations of the platelet count up to -25%, when compared with measurements performed in EDTA blood.

It can be concluded that every clinical chemistry laboratory should test its own citrate-tubes for its suitability in the measurement of platelets in blood.

*Key-words: platelets; citrate; anticoagulants; pseudothrombocytopenia*