

Foutieve trombocytentelling veroorzaakt door apoptose

W. van der MEER¹, A. van HEIJST², F. WAGENER³, C. SCHOLTUS⁴, R. BAUMGARTEN⁴ en E. van DONGEN-LASES¹

Inleiding

Automatische celtellers zijn prima in staat om op een snelle en accurate wijze trombocyten te tellen. De telling van trombocyten gebeurt met behulp van de impedantiemethode en aan de hand van lichtspreadingpatronen. Echter, in uitzonderlijke gevallen wordt een foutieve telling verricht. Bij aanwezigheid van trombocytenuitstapelingen of trombocytensatellitisme worden minder trombocyten geteld, wat kan resulteren in pseudotrombopenie (1). Aanwezigheid van celfragmenten leiden tot een te hoog gerapporteerd trombocytenaantal, soms zelfs tot een pseudotrombocytose (2-6). Deze celfragmenten kunnen afkomstig zijn van erythrocyten (bijvoorbeeld schizocyten of kogelcellen) of leukocyten. Omdat de fragmenten net zo groot zijn als trombocyten worden deze ook wel pseudotrombocyten genoemd. De pseudotrombocyten afkomstig van leukocyten zijn hoofdzakelijk cytoplasma-afsplittingsproducten van blasten en kunnen bij acute leukemie worden gezien. In dit onderzoek wordt een patiënt beschreven waarbij pseudotrombocyten werden waargenomen die afkomstig waren van apoptotische cellen. Dit fenomeen is voor zover ons bekend nog niet eerder beschreven.

Casus

De beschreven patiënt is een jongetje, geboren na een probleemloze zwangerschap van 41 weken. Het geboortegewicht bedroeg 3,8 kg en de bevalling vond thuis plaats. Op dag 3 na de geboorte werd hoge koorts vastgesteld en werd het jongetje opgenomen in het ziekenhuis. Vanwege verdenking op sepsis werd een antibioticakuur gestart, hoewel de kweken negatief waren. De ziekte verergerde en enkele laboratoriumtesten waren sterk afwijkend: alanine-aminotransferase 8887 U/l (referentiewaarde <45 U/l), asparagine-aminotransferase 2147 U/l (referentiewaarde <45 U/l), lactaat in bloed 17 mmol/l (referentiewaarde <2 mmol/l) en ammoniak in bloed 128 µmol/l (referentiewaarde <47 µmol/l).

De patiënt werd overgebracht naar de intensive-care afdeling van het Universitair Medisch Centrum St Radboud. Daar ontwikkelde zich in rap tempo een multi-orgaanfalen gevolgd door overlijden ondanks intensieve behandeling. Enkele dagen later bleek dat uit

een keelkweek het herpes simplex virus type 1 was geïsoleerd. Hiervan is eerder beschreven dat daarbij een fulminante sepsis kan ontstaan (8). Het aantal trombocyten bedroeg op de dag van opname $137 \times 10^9/l$, maar daalde in de loop van de ziektegeschiedenis tot $64 \times 10^9/l$ op de dag van overlijden.

Methoden

De bloedceltellingen werden uitgevoerd op de Sysmex XE-2100 (Toa, Kobe, Japan) uit EDTA-ontstold bloed. Binnen één uur werden de celtellingen verricht en werd een uitstrijkje van het bloed gemaakt. Het bloeduitstrijkje werd gekleurd volgens de May-Grünwald-Giemsamethode. Er werden 500 deeltjes geteld ter grootte van trombocyten, deze deeltjes werden gedifferentieerd in trombocyten en cytoplasmatische fragmenten (6).

Voor de caspase-3/7-activiteitsmeting, als parameter voor apoptose, werd serum verkregen door bloed gedurende 3 minuten te centrifugeren bij $8.240 \times g$ en kamertemperatuur. Het serum werd bewaard bij $-20^\circ C$. Met behulp van een fluorimetrische bepaling (APO-One caspase-3/7 kit, Promega, Madison, Wisconsin, USA) werd de caspase-3/7-activiteit gemeten in het serum van de patiënt en in het serum van een gezonde controle. Het serum werd blootgesteld aan het caspase-3/7-profluorescentiesubstraat Z-DEVD-R110. Vervolgens werd het lysaat gedurende twee uur bij kamertemperatuur geïncubeerd waarna de fluorescentie werd gemeten bij 485/530 nm. Als negatieve controle werd serum zonder substraat, verdund met Dulbecco's Modified Eagle's Medium gebruikt.

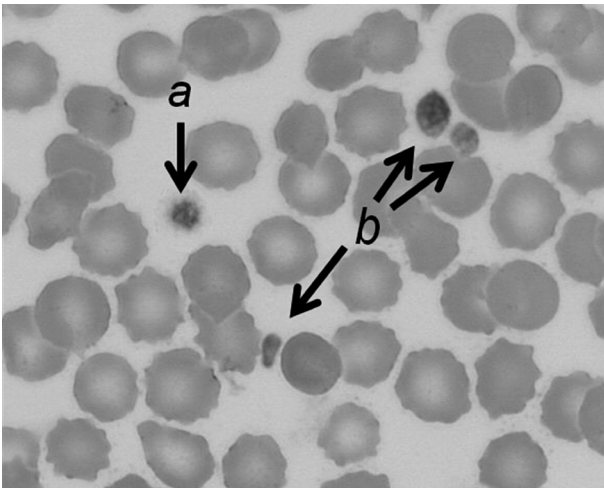
Resultaten

Hoewel op de opnamedag de automatische celtelling aanleiding gaf tot het uitvoeren van een microscopische differentiatie, waren geen abnormale afwijkingen in het bloeduitstrijkje te zien. Echter, op de tweede ziekenhuisdag werden cytoplasmatische deeltjes waargenomen ter grootte van trombocyten. Het trombocytenscattergram was inmiddels afwijkend en bovendien werden apoptotische cellen in het uitstrijkje gevonden (figuur 1). Van het uitstrijkje verkregen op de dag van overlijden, werd een 500-deeltjestelling uitgevoerd om onderscheid te maken tussen echte trombocyten en pseudotrombocyten. Deze telling leidde tot een correctie van $64 \times 10^9/l$ naar slechts $13 \times 10^9/l$ wat past bij een ernstig bloedingsrisico.

Om vast te stellen of de cytoplasmatische fragmenten het gevolg waren van apoptose werd van restserum de caspase-3/7-activiteit gemeten. Bij de patiënt werd een sterke activiteit gemeten, terwijl bij de controle (serum

Afdeling Klinische Chemie¹, Afdeling Kindergeneeskunde², Afdeling Farmacologie en Toxicologie³, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Nijmegen; Afdeling Klinische Chemie, Ziekenhuis Gelderse Vallei, Ede⁴

E-mail: w.vandermeer@akc.umcn.nl



Figuur 1. Bloeduitstrijkje van de patiënt met een echte trombocyt (a) en pseudotrombocyten (b).

van gezond persoon) geen activiteit werd gevonden (tabel 1). Als aanvullende controle werd ook geen activiteit gemeten bij het serum zonder substraat, noch was er sprake van autofluorescentie. Dit wijst er op dat de pseudotrombocyten het gevolg kunnen zijn van apoptose.

Conclusie

Dat apoptose leidt tot vorming van micropartikels is uitvoerig in de literatuur beschreven (7). Echter, deze micropartikels zijn met behulp van lichtmicroscopie niet waar te nemen. In de beschreven casus zijn de gevonden partikels zo groot dat zij interfereren met de trombocyten en tot een onjuiste uitslag leiden. Herpes-simplex-virus-type-1-infectie kan resulteren in een fulminante sepsis (8) en kan bovendien ook apoptose opwekken (9). In de gevallen waarbij sepsis ontstaat als gevolg van herpes simplex virus type 1 en het trombocytenscattergram afwijkend is, dient het bloeduitstrijkje gecontroleerd te worden op aanwezigheid van apoptotische partikels ter grootte van trombocyten. Indien deze gevonden worden dient men een 500-deeltjstelling (6) uit te voeren en het aantal trombocyten te corrigeren.

Tabel 1. Resultaten van de caspase-3/7 activiteitsmeting (arbitraire eenheden)

	Caspase-3/7-activiteit
Autofluorescentie	432
Controleserum zonder substraat	655
Patiëntenserum zonder substraat	918
Promega Kit + controleserum	645
Promega Kit + patiëntenserum	42370

Referenties

1. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, et al. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: A review. Part I: Platelets. *Int J Lab Hem* 2007; 29: 4-20.
2. Savage RA, Lucas FV, Hoffman GC. Spurious thrombocytosis caused by red blood cell fragmentation. *Am J Clin Pathol* 1983; 1: 144.
3. Hanker JS, Giamarra BL. Neutrophil pseudoplatelets: Their discrimination by myeloperoxidase demonstration. *Science* 1983; 220: 415-417.
4. Ahsen N von, Ehrlich B, Scott CS, et al. Cryoglobulins interfere with platelet counts by optical and impedance methods but not with the CD61 immunoplatelet count. *Clin Chem* 2001; 47: 1858-1860.
5. Kakkar N. Spurious rise in the automated platelet count because of bacteria. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1096-1097.
6. Meer W van der, Mackenzie MA, Dinissen JWB, et al. Pseudoplatelets: A retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. *J Clin Pathol* 2003; 10: 772-774.
7. Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, Del Carpio Muñoz F, Canoniero M, et al. Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 2184-2189.
8. Benador N, Mannhardt W, Schranz D, et al. Three cases of neonatal herpes simplex virus infection presenting as fulminant hepatitis. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 555-559.
9. Han J, Sloan DD, Aubert M, et al. Apoptosis and antigen receptor function in T and B cells following exposure to herpes simplex virus. *Virology* 2007; 359: 253-263.