

# Plaquetopenias: diagnóstico usando citometria de fluxo e anticorpos antiplaquetas

Thrombocytopenia: diagnosis with flow cytometry and antiplatelet antibodies

João Carlos de Campos Guerra<sup>1</sup>, Ruth Hissae Kanayama<sup>2</sup>, Sonia Tsukasa Nozawa<sup>2</sup>, Márcia Regina Ioshida<sup>3</sup>, Irina Yoko Takiri<sup>3</sup>, Robson José Lazaro<sup>3</sup>, Nelson Hamerschlak<sup>4</sup>, Luiz Gastão Mange Rosenfeld<sup>5</sup>, Celso Carlos de Campos Guerra<sup>6†</sup>, Nydia Strachman Bacal<sup>2</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Identificar anticorpos antiplaquetas por citometria de fluxo (método direto) em pacientes com plaquetopenia. **Métodos:** No período de Janeiro de 1997 a Março de 2004, foram encaminhados ao Centro de Hematologia de São Paulo 15.100 pacientes para investigação hematológica, com vários diagnósticos (anemia, leucopenia, plaquetopenia, alteração da coagulação, adenomegalias, leucemia e outros) dos quais 1.057 apresentavam plaquetopenia. Esses pacientes, conforme diagnóstico, foram separados em dois grupos: Grupo Púrpura Trombocitopênica Idiopática, quando não foi descoberta a etiologia da plaquetopenia; e Grupo Outra Trombocitopenia, que incluía faixa de normalidade a esclarecer, infecção pelo vírus da hepatite C, HIV, hipersplenismo, artefato EDTA, erro laboratorial e outras. Em 115 casos, foi realizada imunofenotipagem, para identificação de anticorpo antiplaquetas (método direto), por citometria de fluxo. **Resultados:** Dos 1.057 casos (7%) encaminhados por plaquetopenia, 670 casos (63,4%) eram do sexo feminino. As idades variavam entre 1 e 75 anos. Dos 115 casos (9,7%) em que foi realizada imunofenotipagem, houve positividade em 40% e o exame foi duvidoso em 5%. A púrpura trombocitopênica idiopática foi encontrada em 52% dos casos, sendo mais frequente no sexo feminino, em crianças e adultos jovens. A prevalência do vírus da hepatite C foi encontrada em 7% dos casos e HIV em 1% dos casos. Faixa de normalidade foi encontrada em 17%; erro laboratorial em 6% e artefato laboratorial em 1% dos casos. **Conclusão:** O anticorpo antiplaquetas é um exame útil, quando positivo, para confirmar o diagnóstico de púrpura trombocitopênica idiopática e, quando negativo, sugere outras causas de trombocitopenia.

**Descritores:** Citometria de fluxo; Plaquetas

## ABSTRACT

**Objective:** To identify antiplatelet antibodies by flow cytometry (direct method) in patients with thrombocytopenia. **Methods:** Between January 1997 and March 2004 a total of 15100 patients were referred to the Centro de Hematologia de São Paulo for hematological investigation of several diagnoses (anemia, leukopenia, thrombocytopenia, coagulation abnormalities, adenomegaly, leukemia and others). Of those, 1057 were referred because of thrombocytopenia and were divided into two groups: Group Idiopathic thrombocytopenic purpura, with no identifiable cause; and Group Other thrombocytopenia, which included low normal platelet counts cause to be established, hepatitis C and HIV infection, hypersplenism, EDTA-induced artifacts, laboratory error, and other causes. Flow cytometry immunophenotyping was done in 115 cases to identify platelet autoantibodies (direct method). **Results:** Of the total number of patients, 1057 (7%) presented low platelet counts, 670 were females (63.4%) and age range of one to 75 years. Of the 115 cases (9.7%) submitted to immunophenotyping, the results were positive in 40% and the test was inconclusive in 5%. Idiopathic thrombocytopenic purpura was found in 52% of patients, more often in women. Hepatitis C virus infection was found in 7% and HIV infection in 1%. Low normal platelet counts were found in 17%, laboratory errors in 6%, and laboratory artifacts in 1% of cases. Platelet autoantibodies were found in 76.9% of all idiopathic thrombocytopenic purpura cases. It was negative in 83.3% of the low normal counts. **Conclusion:** antiplatelet autoantibodies when present help to diagnose idiopathic thrombocytopenic purpura. When absent, suggest other causes of thrombocytopenia.

**Keywords:** Flow cytometry; Blood platelets

Trabalho realizado no Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE, São Paulo (SP), Brasil; Centro de Hematologia de São Paulo - CHSP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Hematologia, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Setor de Citometria de Fluxo, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório Clínico, Centro de Hematologia de São Paulo - CHSP - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Hematologia e Transplante de Medula Óssea, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Diagnósticos da América S/A -DASA - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>6</sup> *In memoriam*, Professor Livre Docente em Hematologia, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: João Carlos de Campos Guerra - Av. Albert Einstein, 627 - Morumbi - CEP 05651-901 - São Paulo (SP), Brasil - Tel.: (11) 2151 2530 - e-mail: jcgueira@einstein.br

Conflito de interesse: não há

Data de submissão: 10/8/2010 - Data de aceite: 16/4/2011

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da medicina, nos últimos anos, impôs a realização do hemograma como exame de rotina. Com o advento dos modernos contadores de células, a contagem de plaquetas passou a ser informada ao médico.

Atualmente, o hematologista recebe em seu consultório pacientes que são encaminhados por alterações no hemograma (anemia, leucopenia e plaquetopenia), na maioria das vezes como achado laboratorial. A plaquetopenia é responsável por 9,1% dos atendimentos de primeira vez no Centro de Hematologia de São Paulo (CHSP).

A classificação das trombocitopenias está dividida em diminuição na produção de plaquetas, aumento na destruição e outras causas de plaquetopenia<sup>(1)</sup> (Figura 1).

A pseudotrombocitopenia (PTCP) é um fenômeno laboratorial de falsa baixa contagem de plaquetas (falsa plaquetopenia), ocasionada pela aglutinação *in vitro* das plaquetas na presença de autoanticorpos plaquetários e anticoagulantes, sendo mais comum o EDTA. Apesar de ser um achado laboratorial raro (0,1% dos casos), a PTCP vem aumentando com os contadores eletrônicos de células. A falha no reconhecimento dessa alteração pode resultar em diagnósticos errôneos e tratamentos inapropriados<sup>(2-4)</sup>.

## OBJETIVO

Identificar anticorpos antiplaquetas por citometria de fluxo (método direto) em pacientes com plaquetopenia.

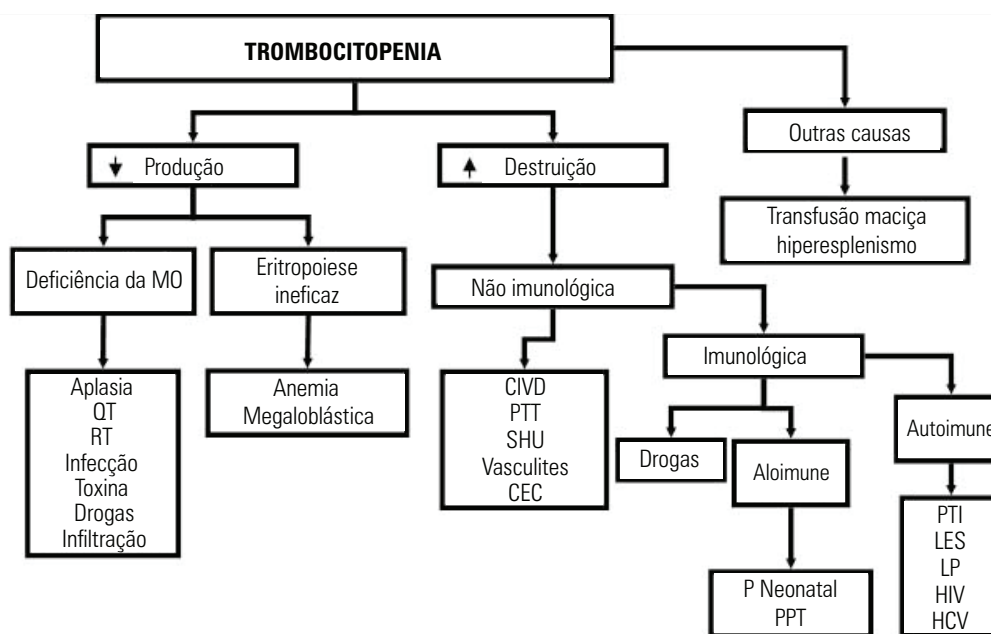
## MÉTODOS

No período de Janeiro de 1997 a Março de 2004, foram encaminhados ao CHSP 15.100 pacientes para investigação hematológica (anemia, leucopenia, plaquetopenia, alteração da coagulação, adenomegalias, leucemia e outros). Desse total, foram identificados os casos encaminhados por plaquetopenia que fizeram parte do estudo.

Os pacientes, conforme o diagnóstico da plaquetopenia, foram separados em dois grupos: Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI) e Outras Trombocitopenias, que incluía contagem normal baixa de plaquetas a esclarecer, infecção pelo vírus da hepatite C (VHC), HIV, hiperesplenismo, artefato EDTA-PTCP, erro laboratorial e outras causas. O grupo de plaquetopenia denominado “faixa de normalidade” foi assim definido por ter contagem de plaquetas entre 120.000 e 150.000/mm<sup>3</sup>, não sendo encontrada qualquer outra alteração clínica e laboratorial nesses pacientes, num período de 8 anos de acompanhamento.

Para identificação do anticorpo antiplaquetas, foi realizada a imunofenotipagem por citometria de fluxo (método direto).

As contagens de plaquetas foram realizadas pelo aparelho Coulter T-890, em EDTA K3 e citrato de sódio, com repetição após 24 horas a 4°C, contagem manual em fônio e câmara de Neubauer. Os exames da medula óssea foram feitos pelas técnicas convencionais. Os exames bioquímicos e sorológicos foram realizados no aparelho Cobas Core da Roche. Utilizou-se o citômetro da Coulter Epics XL-MCL, e os anticorpos CD41 PE Immuno-



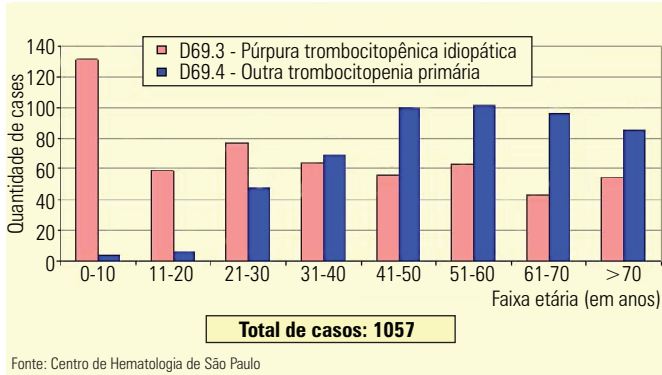
MO = medula óssea, QT = quimioterapia, RT = radioterapia, CIVD = coagulação intravascular disseminada, PTT = púrpura trombocitopênica trombótica, SHU = síndrome hemolítico-urêmica, CEC = Circulação Extra Corpórea, P Neonatal = púrpura neonatal, PPT = púrpura pós transfusional, PTI = púrpura trombocitopênica imunológica, LES = lúpus eritematoso sistêmico, LP = doenças linfoproliferativas, HIV = vírus da imunodeficiência adquirida, HCV = hepatite por vírus C.

Figura 1. Causas de Trombocitopenia

tech e anti-Human IgG FITC conjugate SIGMA, para a identificação do anticorpo antiplaquetas.

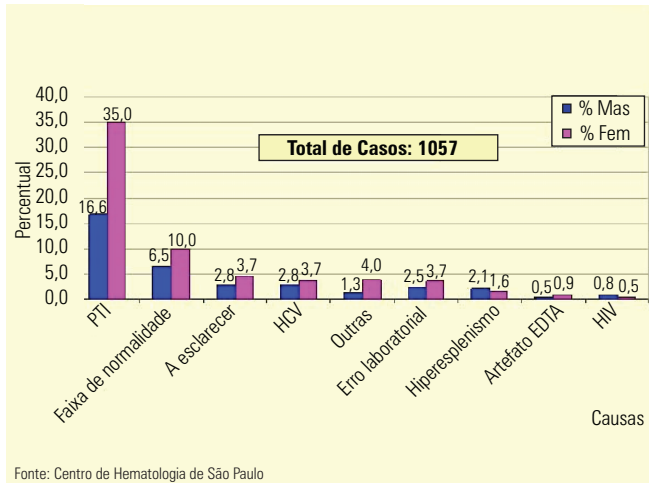
**RESULTADOS**

Do total de casos, 1.057 (7%) foram encaminhados por plaquetopenia e, destes, 670 eram do sexo feminino (63,4%). As idades variavam entre 1 e 75 anos (Figuras 2 e 3).



Fonte: Centro de Hematologia de São Paulo

**Figura 2.** Distribuição de pacientes em função da idade e da afecção (CHSP, Janeiro/1997 a Março/2004)



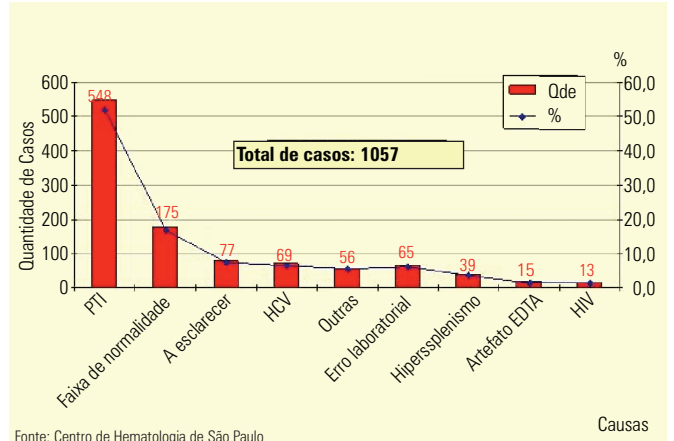
Fonte: Centro de Hematologia de São Paulo

**Figura 3.** Distribuição de causas por sexo (CHSP, Janeiro/1997 a Março/2004)

A PTI foi encontrada em 52% dos casos de plaquetopenia, sendo mais frequente no sexo feminino, em crianças e adultos jovens. A prevalência do VHC foi de 7% e HIV de 1% dos casos. A faixa de normalidade foi encontrada em 17%; erro laboratorial em 6%; e artefato laboratorial em 1% dos casos. As figuras 4 e 5 demonstram os percentuais das causas das afecções que levaram os pacientes ao CHSP.

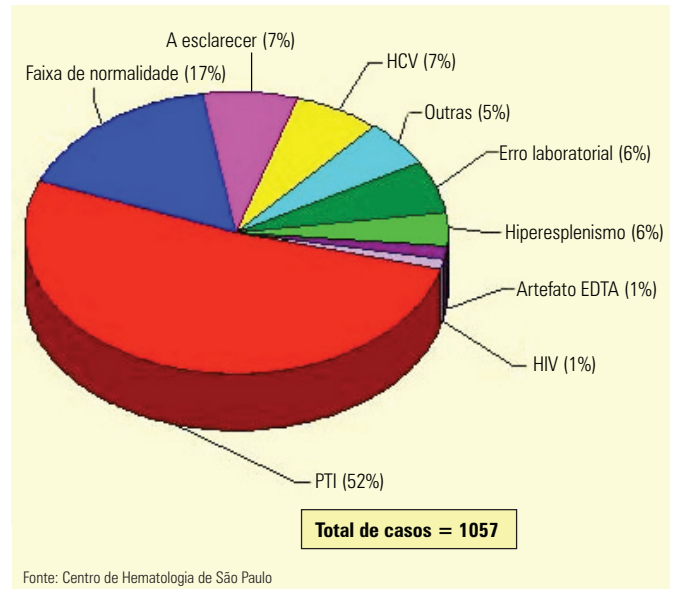
A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada em 115 casos (9,7%), a fim de se identificar o anticorpo antiplaquetas (método direto), sendo positiva em 40% dos casos, negativa em 55% e duvidosa em 5% (Figuras 6, 7 e 8).

O anticorpo antiplaquetas foi positivo em 76,9% dos casos de PTI e negativo em 83,3% dos casos de faixa de normalidade (Figuras 6, 7 e 8).



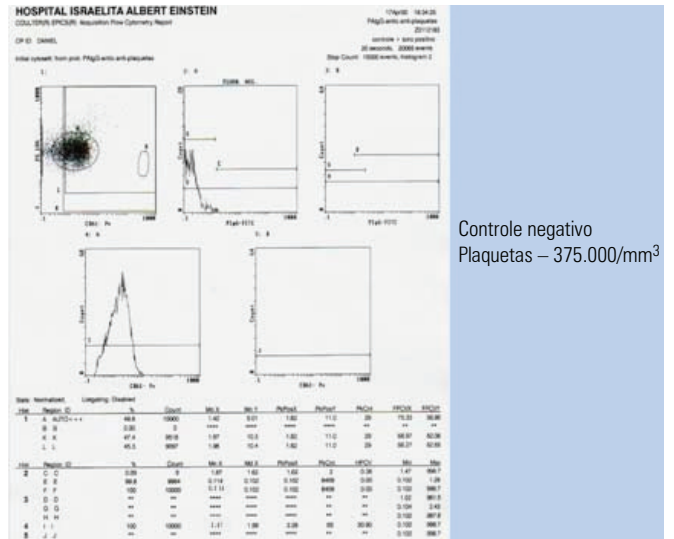
Fonte: Centro de Hematologia de São Paulo

**Figura 4.** Distribuição das causas das afecções (CHSP, Janeiro/1997 a Março/2004)



Fonte: Centro de Hematologia de São Paulo

**Figura 5.** Percentual de causas das afecções (CHSP, Janeiro/1997 a Março/2004)



**Figura 6.** Imunofenotipagem por citometria de fluxo

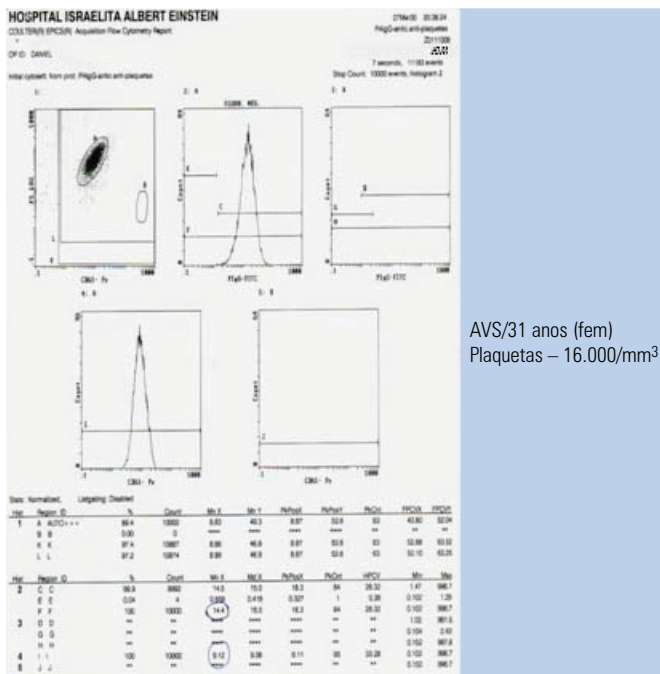


Figura 7. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

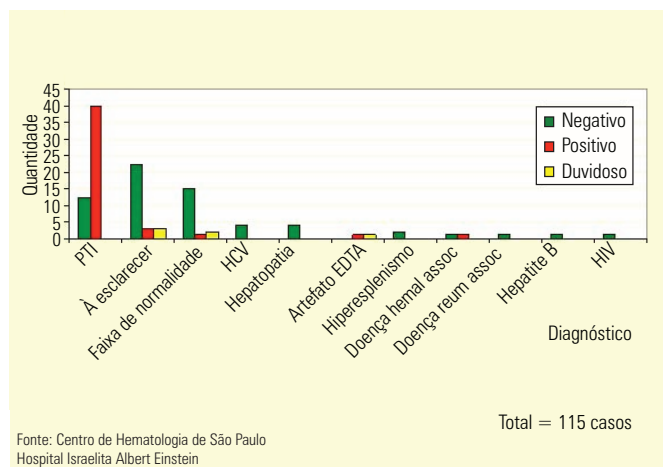


Figura 8. Distribuição por diagnóstico e resultado (CHSP/HIAE, Janeiro/1997 a Março/2004)

**DISCUSSÃO**

A plaquetopenia é uma achado laboratorial frequente. Neste trabalho, a PTI foi a causa mais comum de plaquetopenia, com maior frequência no sexo feminino, em crianças entre 1 a 10 anos e adultos jovens entre 15 a 40 anos, conforme dados da literatura<sup>(2-4)</sup>.

No presente estudo, a faixa de normalidade baixa foi a segunda maior causa de plaquetopenia, o que nos faz questionar os valores de normalidade para contagem de plaquetas utilizados na maioria dos laboratórios, com plaquetometria automatizada. Não temos, em nosso meio, trabalho populacional, com foco em valores de referência.

A análise microscópica do esfregaço a fresco, sem anticoagulante, foi importante na identificação de PTCP, macroplaquetas e alterações morfológicas das linhagens hematopoiéticas<sup>(3-5)</sup>.

O anticorpo antiplaquetas foi um exame útil, quando positivo, para confirmar PTI e importante, quando negativo, para descartar diagnósticos errôneos de plaquetopenias, como é o caso de se tratar de faixa de normalidade baixa<sup>(6,7)</sup>.

A plaquetopenia de causa imunológica é um diagnóstico de exclusão. Este estudo poderá esclarecer e orientar os exames laboratoriais que devem ser solicitados para a elucidação da etiologia, conclusão diagnóstica e orientação terapêutica.

O exame do anticorpo antiplaquetas realizado no presente estudo foi feito pelo método direto, por citometria de fluxo, que identifica a imunoglobulina G (IgG) ligada à membrana plaquetária. Existe disponível outro teste, representado por um pool de anticorpos – IgA, IgM e IgG (método indireto), que pode ser solicitado numa investigação quando existe suspeita de causa imune. O fato de termos realizado apenas um teste na investigação do anticorpo antiplaquetas pode explicar os 20% de resultados negativos nos casos de PTI, sendo que, para esses pacientes, podemos apenas descartar causa imune pelo anticorpo IgG<sup>(6-9)</sup>.

A plaquetopenia, sendo um achado laboratorial frequente, implica uma correta investigação de suas possíveis causas, o que é fundamental para evitar falhas no diagnóstico e nos tratamentos inapropriados. Para o sucesso nesse diagnóstico, é muito importante o trabalho em conjunto e a troca de informações, entre o médico assistente e o laboratório clínico.

**CONCLUSÃO**

O anticorpo antiplaquetas é um exame útil, quando positivo, para confirmar o diagnóstico de púrpura trombocitopênica idiopática e, muito importante, quando negativo, para descartar diagnósticos errôneos.

Na prática diária, o exame de anticorpo antiplaquetas não deve ser solicitado na rotina, sendo indicado para os casos de plaquetopenia, quando o médico assistente quiser aprofundar a investigação de uma causa imunológica.

**REFERÊNCIAS**

1. Lee RG, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, et al . Wintrobe's clinical hematology. 10a ed. New York: Williams & Wilkins; 1999. p.1579-82.
2. Lombarts AJ, Zijlstra JJ, Peters RH, Thomasson CG, Franck PF. Accurate platelet counting in an insidious case of pseudothrombocytopenia. Clin Chem Lab Med. 1999;37(11-12):1063-6.

3. Ahn HL, Jo YI, Choi YS, Lee JY, Lee HW, Kim SR, et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia confirmed by supplementation of kanamycin; a case report. *Korean J Intern Med.* 2002;17(1): 65-8.
4. Schrezenmeier H, Müller H, Gunsilius E, Heimpel H, Seifried E. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb Haemost.* 1995;73(3):506-13.
5. McMillan R. The pathogenesis of chronic immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 2000;37(1 Suppl 1): 5-9.
6. Fabris F, Scandellari R, Randi ML, Carraro G, Luzzatto G, Girolami A. Attempt to improve the diagnosis of immune thrombocytopenia by combined use of two different platelet autoantibodies assays (PAIgG and MACE). *Haematologica.* 2002;87(10):1046-52.
7. Latorraca A, Lanza F, Moretti S, Ferrari L, Reverberi R, Galluccio L, et al. Flow cytometric analysis of anti-platelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 1994;79(3):269-72.
8. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol.* 2003;120(4):574-96.
9. Tomer A. Flow cytometry for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep.* 2006;5(1):64-9.