

# Efecto de distintos anticoagulantes sobre índices plaquetarios

Gonzalo A. Sujeros, Elsa C. Pieri, Miguel A. Orsilles

Laboratorio de Hematología e Inmunología Clínica, Hospital Rawson, Bajada Pucará 2025, Barrio Crisol, Córdoba. Tel: 0351-4348754, FAX: 0351-4348752.

Correspondencia: Dr. Miguel A Orsilles, Igualdad 34 36, Alto Alberdi. (5003) Córdoba. TE: 0351-4895463

*Este trabajo fue premiado en el XIV Congreso Argentino de Hematología*



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 4 N° 1: 22-26  
Enero-Abril, 2000

## RESUMEN

El efecto de anticoagulantes sobre el recuento de plaquetas (CP), plaquetocrito (PCT), volumen plaquetario medio (VPM) y amplitud de la distribución plaquetaria (PDW) fue evaluado en sangre venosa de pacientes ambulatorios a distintos intervalos de tiempo luego de la extracción. El CP basal fue realizado en cámara a partir de sangre capilar. La media del CP basal y CP inicial (tiempo 0) con EDTA, heparina o citrato fueron similares, al igual que las medias del PCT, VPM y PDW inicial con EDTA o heparina. Durante el período de evaluación, el CP y el PDW en muestras con EDTA se mantuvieron constantes, mientras que el PCT y el VPM evidenciaron un aumento. Con heparina hubo disminución del CP y PCT, aumento sostenido del VPM y PDW. Además se constataron agregados plaquetarios en los frotis, perfiles de histogramas y alarmas leucocitarias asociados con un incremento de leucocitos. Con citrato, el CP corregido y los índices plaquetarios se mantuvieron constantes. Estos resultados indican que: 1) el citrato sódico es más conveniente para evaluar índices plaquetarios, 2) Con EDTA, se debe estandarizar el tiempo de análisis de las muestras para obtener resultados comparables, especialmente al evaluar VPM y 3) la heparina produce marcadas modificaciones de los índices plaquetarios.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, existen analizadores hematológicos que además de proporcionar el número de plaquetas, suministran índices derivados de la distribución del tamaño plaquetario como son, el valor plaquetocrito (PCT), el volumen plaquetario medio (VPM) y la amplitud de la curva de distribución plaquetaria según volumen (PDW). La evaluación de éstos índices ha sido realizada en situaciones de normalidad (1,2) y de patología. Algunos autores les han encontrado útiles para el diagnóstico etiológico de algunas trombocitopenias (3,4), predicción de riesgo hemorrágico en enfermos trombocitopénicos (5) o diagnóstico diferencial entre trombocitosis primaria y secundaria (6,7). Sin embargo, la utilidad de los índices plaquetarios en la práctica clínica no está totalmente determinada debido a que éstos parámetros son sensibles a numerosas variables como, el efecto de los anticoagulantes utilizados, la tecnología del analizador empleado que dificulta la comparación de los re-

sultados y diferencias en los controles de calidad (8-10).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos anticoagulantes y del tiempo de conservación de las muestras sobre el número de plaquetas y los índices plaquetarios. Este análisis permitió determinar las mejores condiciones de procesamiento de las muestras para que puedan utilizarse en la obtención de valores de referencia y para evaluar el comportamiento de los índices plaquetarios en distintas situaciones clínicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron 35 muestras de sangre venosa de pacientes adultos ambulatorios sin enfermedades hematológicas asociadas. La sangre fue anticoagulada con EDTA sódico/potásico (6,8 mM), heparina (100 UI/ml) o citrato sódico (15 mM). Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente y analizadas a distintos intervalos de tiempo luego de la extracción (0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 y 300 min.).

El número de plaquetas y los índices plaquetarios fueron obtenidos en el analizador hematológico Cell Tac  $\alpha$  MEK-6108 K (Nihon Kohden) que proporciona los siguientes parámetros plaquetarios: número de plaquetas, PCT medido en tanto por ciento del volumen de sangre total, VPM, PDW y curva de distribución de tamaños plaquetarios (histograma). Para los conteos celulares, éste aparato utiliza la tecnología basada en la medida del tamaño celular por impedancia. El sistema estuvo sometido a programas de control de calidad. En las muestras anticoaguladas con citrato, el conteo de plaquetas fue corregido debido a la dilución de la muestra. El conteo de plaquetas corregido fue calculado aplicando la siguiente fórmula, a partir de las cifras de hemoglobina (Hb) en EDTA y en citrato y el conteo de plaquetas obtenido automáticamente (11):

$$\text{Plaquetas-citrato corregidas} = \frac{\text{Hb-EDTA}}{\text{Hb-citrato}} \times \text{plaquetas-citrato obtenidas}$$

Los histogramas de distribución plaquetaria y leucocitaria fueron analizados en todos los tiempos evaluados.

El conteo de plaquetas basal fue realizado en cámara a partir de sangre obtenida por punción del pulpejo del dedo en un microscopio con el condensador bajo. Por otro lado, en los distintos intervalos de tiempo se realizaron frotis sanguíneos a partir de las muestras anticoaguladas y que fueron coloreados con May Grünwald-Giemsa para evaluar la presencia y tamaño de agregados plaquetarios.

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  ES y analizados mediante la prueba "t" de Student para datos no apareados.

## RESULTADOS

Los valores medios del conteo de plaquetas en cámara e iniciales (tiempo 0 min.) con EDTA, heparina o citrato no mostraron variación significativa (Tabla 1). El PCT y el VPM iniciales en muestras con citrato fueron menores ( $p < 0,05$ ) respecto a los valores de las muestras con EDTA o heparina, mientras que el PDW fue similar con los tres anti-coagulantes.

Durante el período de conservación de las muestras, el conteo de plaquetas en las muestras con EDTA y citrato se mantuvo constante mientras que en las muestras con heparina hubo una disminución progresiva (Figura 1). En este último caso, se constataron agregados plaquetarios en los frotis, perfiles de histogramas y alarmas leucocitarias (Figura 2). Además, se observó un leve incremento del número de leucocitos.

El PCT en las muestras con EDTA evidenció un aumento a los 15 min. que se mantuvo durante todo el período de evaluación, mientras que en las muestras con heparina hubo una progresiva disminución y en las muestras con citrato se mantuvo constante (Figura 1).

El VPM en las muestras con EDTA manifestó un aumento progresivo desde los 15 min. que se estabilizó a partir de las 2 hs. Con heparina hubo un aumento sostenido del VPM desde los 15 min. mien-

Tabla 1. Conteo de plaquetas en cámara e índices plaquetarios en sangre con EDTA, Heparina o Citrato al momento de la obtención de las muestras (tiempo 0 min.).

Muestra	Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	PCT (%)	VPM (fL)	PDW (%)
EDTA	300 $\pm$ 29	0,16 $\pm$ 0,01	5,4 $\pm$ 0,2	17,9 $\pm$ 0,3
Heparina	304 $\pm$ 48	0,17 $\pm$ 0,02	5,3 $\pm$ 0,3	18,2 $\pm$ 0,4
Citrato	270 $\pm$ 24	0,11 $\pm$ 0,01*	4,4 $\pm$ 0,2*	17,8 $\pm$ 0,4
Sangre capilar	275 $\pm$ 36	-	-	-

Datos expresados como media  $\pm$  ES.

\*  $p < 0,05$  respecto a muestras con EDTA y con Heparina.

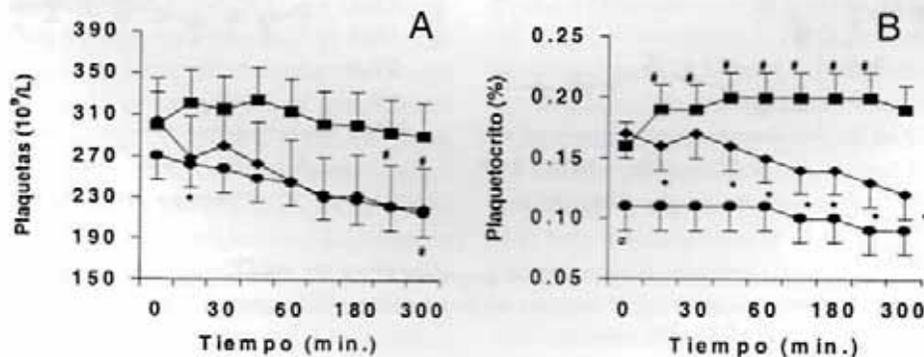


Figura 1. Variación del conteo de plaquetas (A) y plaquetocrito (B) en sangre con EDTA (■), heparina (◆) o citrato (●) durante la conservación de las muestras. \*  $p < 0,05$  respecto a muestras con EDTA. #  $p < 0,05$  respecto a tiempo 0 min.  $\emptyset$   $p < 0,05$  respecto a muestras con EDTA y heparina.

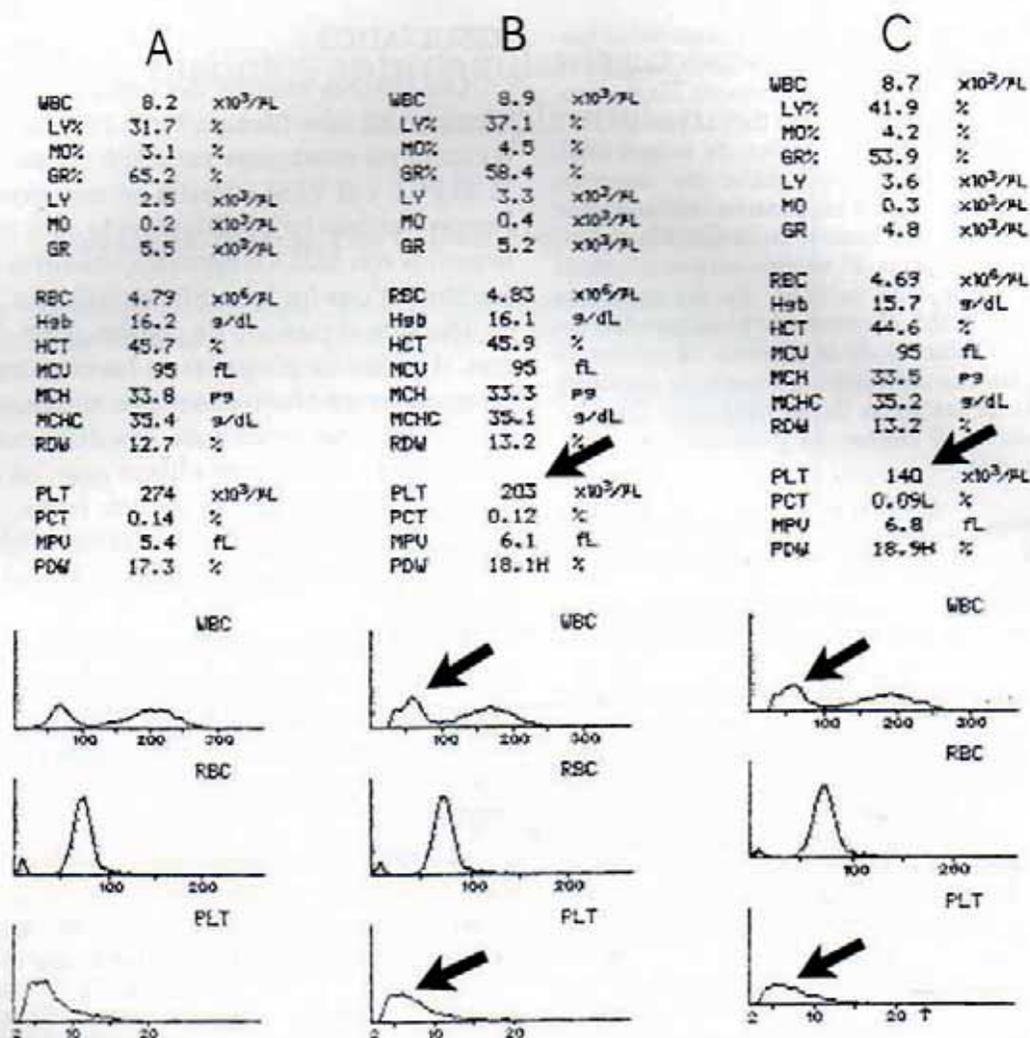


Figura 2. Perfiles del Hemograma en sangre con heparina a tiempo 0 hs (A), 1 hs (B) y 5 hs (C). Las flechas indican la variación del número de plaquetas e histogramas leucocitario y plaquetario.

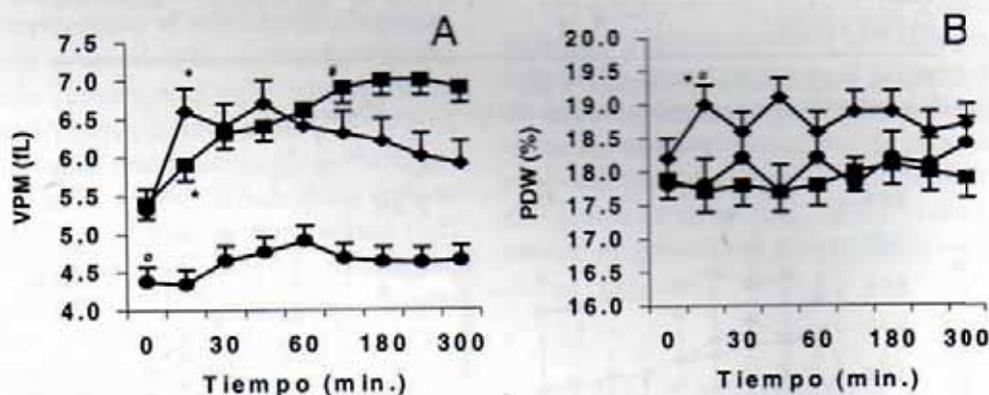


Figura 3. Modificación del VPM (A) y PDW (B) en sangre con EDTA (■), heparina (▲) o citrato (●) durante la conservación de las muestras. \*  $p < 0,05$  respecto a tiempo 0 min. #  $p < 0,05$  respecto a tiempo 15 min. Ø  $p < 0,05$  respecto a muestras con EDTA y con heparina.

Tabla II. Porcentajes de incremento medio del VPM respecto al valor basal durante la conservación de sangre con EDTA o con Heparina.

Muestras	Tiempo (min.)					
	30	60	120	180	240	300
EDTA	17	22	28	29	29	28
Heparina	21	21	19	17	13	11

tras que con citrato se mantuvo constante (Figura 3). La Tabla II muestra los porcentajes de incremento del VPM en las muestras con EDTA y heparina en los distintos tiempos de evaluación.

El PDW en las muestras con EDTA y citrato se mantuvo constante, mientras que con heparina hubo un aumento sostenido desde los 15 min.

## DISCUSIÓN

La automatización ha introducido importantes avances en el conteo numérico de las células sanguíneas así como en la determinación del tamaño de las células y su distribución. El reconocimiento de los efectos producidos por los anticoagulantes sobre las células sanguíneas es muy importante para evitar diagnósticos erróneos e inapropiadas medidas terapéuticas. En este trabajo evaluamos el efecto de los anticoagulantes más utilizados en los análisis hematológicos de rutina sobre el número de plaquetas y los índices plaquetarios. La mayoría de los estudios previos que han evaluado índices plaquetarios han sido referidos principalmente al efecto de los anticoagulantes sobre el VPM y utilizando sistemas Coulter. En este trabajo, extendimos la evaluación a todos los índices plaquetarios utilizando otro instrumento.

El número de plaquetas se mantuvo constante durante el período de conservación de la sangre anticoagulada con EDTA o con citrato. Con respecto al EDTA, se ha determinado que la estabilidad del número de plaquetas es similar en sangre anticoagulada con distintas sales de EDTA (12). En las muestras con citrato, los valores medios fueron menores respecto al EDTA y este comportamiento puede ser debido a la dilución de la muestra o al analizador utilizado (13). Sin embargo, Perrota G y col. (14) han sugerido el uso del citrato sódico debido a que muestra excelente concordancia con el EDTA luego de la aplicación de un factor de corrección por la dilución utilizada. Durante la conservación de las muestras los valores de plaquetas en las muestras con citrato se mantuvieron constantes. Con ambos anticoagulantes hay que estar prevenido del fenómeno de pseudotrombocitopenia inducida por anticoagulantes

que en nuestro caso no fue evidenciado posiblemente debido al reducido número de pacientes evaluados ya que su incidencia es baja (0,1 a 1,9 %) (15,16). Con heparina hubo una disminución progresiva del número de plaquetas como consecuencia de la formación de agregados plaquetarios que fueron evidenciados en los histogramas y por el aumento del número de leucocitos. La formación de agregados plaquetarios inducida por anticoagulantes dificulta el reconocimiento de las plaquetas y conduce a una subestimación del conteo de plaquetas por los analizadores. El tamaño de éstos agregados puede mimetizar a los leucocitos y condicionar una pseudoleucocitosis (17). Existe información contradictoria sobre el uso de la heparina. En algunos casos se ha observado el fenómeno de agregación (9,17) mientras que en otros casos se recomienda su uso como anticoagulante alternativo (16). Nuestros resultados no permiten confirmar su recomendación.

Con respecto al efecto de los anticoagulantes sobre los índices plaquetarios, el EDTA indujo un aumento del VPM durante las dos horas posteriores a la obtención de la sangre y luego se estabilizó. Este hallazgo coincide con el de Small y Bettigole (6) pero no con los de otros autores (18-20) quienes informaron que el aumento del VPM se estabiliza a los 60 min. El EDTA induce un cambio en la forma de las plaquetas de discoide a esférica y según nuestros resultados este efecto es más acentuado durante las dos primeras horas por lo que las muestras deben ser evaluadas pasado este tiempo. Concomitantemente hubo un aumento del valor PCT con PDW constante. El citrato sódico fue el anticoagulante con menos efecto sobre el VPM. La heparina produjo un aumento del VPM y PDW pero asociado a una disminución del valor PCT consecuencia de la formación de agregados que son falsamente enumerados como leucocitos lo que imposibilita su uso para evaluar éstos parámetros. Estos hallazgos indican que, según el anticoagulante utilizado, el índice plaquetario más afectado es el VPM que condiciona una modificación del PCT.

Además del efecto de los anticoagulantes que hemos evidenciado en este trabajo, la tecnología utilizada puede introducir variaciones en los índices plaquetarios (21). Si bien la comparación entre distintos analizadores no ha sido el objeto de este estudio, se ha determinado una variabilidad de los valores de los índices plaquetarios que depende del tipo de analizador utilizado. A este respecto, Schrezenmeier y col. (13) han informado que el número de plaquetas en personas sanas es significativamente diferente durante el tiempo de conservación de las muestras entre dos analizadores diferentes. Además, los valores de PDW y del VPM difieren según la tecnología utilizada de forma que los resultados no son comparables (22).

Tomados en su conjunto, nuestros resultados y los informados en la literatura indican la necesidad de establecer, en primer lugar, las condiciones óptimas para la obtención de la sangre y seguidamente obtener valores de referencia de los índices plaquetarios para el analizador utilizado. Podemos concluir que para la obtención de la sangre, el citrato sódico es el anticoagulante más conveniente para evaluar índices plaquetarios, pero en caso de utilizar el EDTA se debe estandarizar el tiempo de análisis de las muestras para obtener resultados comparables especialmente al evaluar VPM. La heparina produce marcadas modificaciones de los índices plaquetarios lo que imposibilita su uso.

Para la evaluación de las plaquetas resulta imprescindible realizar sistemáticamente una observación microscópica del frotis de sangre para hacer una estimación del número y morfología de las plaquetas y eventualmente confirmar o no el conteo automatizado con el conteo por microscopía. Además, el histograma de distribución plaquetaria y los códigos de alarma constituyen parámetros para el control de calidad del sistema ya que permiten descartar aquellos conteos en los que la gráfica se encuentre distorsionada o aparezcan señales de alarma.

## BIBLIOGRAFÍA

- Graham SS, Traub B, Mink IB. Automated platelet-sizing parameters on a normal population. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:3 65-369.
- Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR. Platelet size in health and hematologic disease. *Am J Clin Pathol* 1982; 78: 150-153.
- Nelson RB, Kehl D. Electronically determined platelet indices in thrombocytopenic patients. *Cancer* 1981; 48: 954-956.
- Sassier P. The relation of platelet size and count: its importance in diagnosing platelet disorders. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 275-276.
- Eldor A, Avitzour M, Or R, Hanna R, Penchas S. Prediction of haemorrhagic diathesis in thrombocytopenia by mean platelet volume. *Br Med J* 1982; 285: 397- 400.
- Small BM, Bettigole RE. Diagnosis of myeloproliferative disease by analysis of the platelet volume distribution. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 685-691.
- Osselaer JC, Jamart J, Scheiff JM. Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. *Clin Chem* 1997; 43: 1072-1076.
- Lippi U, Schinella M, Modena N, et al. Unpredictable effects of K<sub>2</sub>EDTA on mean platelet volume. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 391-393.
- Thompson CB, Diaz DD, Quinn PG, et al. The role of anticoagulation in the measurement of platelet volumes. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 327-332.
- Lippi U, Cappelletti P. Quality control of mean platelet volume: a chimera? *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 648-650.
- Salvadó Piera S, Pujol Moix N. "Coulter STKS" y macrotrombocitopenia. Descripción de un patrón característico muy útil para su detección. *Biol Clín Hematol* 1995; 17: 140-144.
- Phillips J, Coiner J, Smith E, Becker D, Leong L. Performance of K<sub>2</sub>EDTA vs K<sub>3</sub>EDTA collected blood specimens on various hematology analyzers. *Lab Hematol* 1998; 4: 17-20.
- Schrezenmeier H, Müller H, Gunsilius E, Heimpel H, Seifried E. Anticoagulant induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Throm Haemost* 1995; 73: 506-513.
- Perrotta G, Roberts L, Glazier J, Schumacher HR. Use of sodium citrate anticoagulant for routine hematology analysis on the Cell-Dyn 4000: An opportunity to enhance efficiency in the clinical laboratory. *Lab Hematol* 1998; 4: 156-162.
- Onder O, Weinstein A, Hoyer LW. Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood* 1980; 56: 177-182.
- Savage RA. Pseudoleukocytosis due to EDTA-induced platelet clumping. *Am J Clin Pathol* 1984; 81: 317-322.
- Lombarts AJ, de Kieviet W. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 634-639.
- Bessman JD. New parameters on automated hematology instruments. *Lab Med* 1983; 14: 488-491.
- Giles C. The platelet count and mean platelet volume. *Br J Haematol* 1981; 48: 31-37.
- Lippi U, Cappelletti P, Schinella M, Signori D. Mean platelet volumes: facts or artifacts? *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 111-113.
- Mayer K, Chin B, Magnes J, Thaler T, Lotspeich C, Baisley A. Automated platelet counters. A comparative evaluation of latest instrumentation. *Am J Clin Pathol* 1980; 74: 135-150.
- Reardon DM, Hutchinson D, Bradey L, Trowbridge. Automated haematology: a comparative study of cell counting and sizing using aperture impedance and flow cytometric system. *Med Lab Sci* 1987; 44: 320-325.