

Tolkning av trombocytvärden

I den initiala utredningen av sjuka djur bör det ingå en fullständig hematologianalys med trombocyträkning då antalet trombocyter kan ge viktig klinisk information. Hos ett djur med blödning börjar man med att undersöka om djuret har kraftigt trombocytopeni, men även lindrigt till måttligt minskat antal trombocyter kan vara en indikation på många olika sjukdomar. Veterinärer hoppar ibland över tolkning av trombocytantal, men låga värden bör fastställas och utredas. I den sjätte artikeln från Klinisk kemiska laboratoriet på SLU Universitetsdjursjukhuset (UDS) får vi lära oss mer om rasskillnader, optimal provtagning, analysmetodernas begränsningar och hur man går vidare för att försöka fastställa korrekt trombocytantal.

Författare: Inger Lilliehöök, professor i veterinärmedicinsk klinisk kemi, diplomate ECVCP (europeisk specialistutbildning i klinisk patologi). Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU.

Harold Tvedten, professor emeritus Michigan State University, diplomate ACVP (amerikansk specialistkompetens i patologi). Klinisk kemiska laboratoriet, UDS, SLU.

Foto: Harold Tvedten

Trombocyter är små cytoplasmfragment som knoppats av från megakaryocyter i benmärgen och frisätts till blodet, där de cirkulerar i 5–9 dagar (1). Åldrade eller defekta trombocyter bryts ner av makrofager i framförallt mjälten. Trombocyter saknar kärna och är oftast mindre än erythrocyter (Bild 1). Speciellt när de är aktiverade har de oregelbunden cellyta och kan likna små spindlar (Bild 2). Trombocyternas funktion är att förhindra blödningar genom att kontinuerligt reparera skador i blodkärlsväggen. De startar upp bildningen av koagel (primära hemostasen) och därefter, under den sekundära hemostasen, bildar koagulationsfaktorerna ett olösligt fibrinkoagel. Bristande primär hemostas ger upphov till petekiella blödningar i synliga slemhinnor och hud, men kan även leda till blödningar i mag-tarmkanalen och uro-genitalia.

Spontana blödningar är ovanliga vid trombocytvärden över $50 \times 10^9/L$. Blödningar ses sällan förrän antalet är under $20 \times 10^9/L$ och vanligtvis först när trombocytvärdena är under $10 \times 10^9/L$ (1). Om ett djur med spontana blödningar har ett

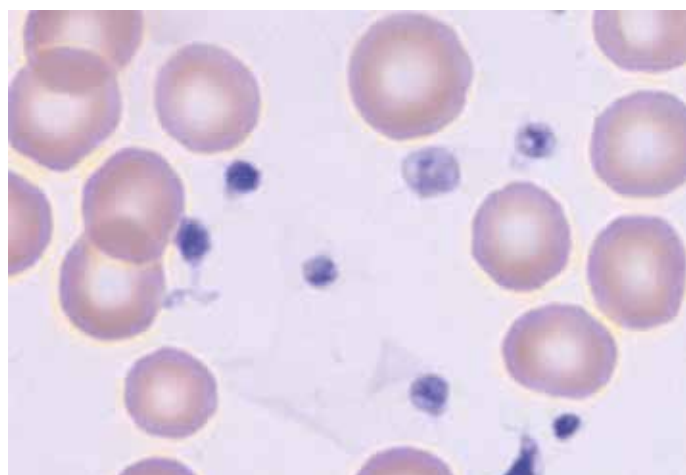


Bild 1. Normala trombocyter i blod från hund. I alla bilder är blodutstryken färgade med May-Grunwald Giemsa.

trombocytantal på $80 \times 10^9/L$ finns det sannolikt fler orsaker än bara trombocytopeni som påverkar djurets hemostasförmåga, till exempel koagulationsfaktorbrist vid disseminerad intravasal koagulation (DIC). Det finns även sjukdomar som ger minskad trombocytfunktion som till exempel von Willebrands sjukdomar som kan leda till blödningar trots att trombocytantalet är normalt.

Det är djurets totala trombocytmassa, och inte antalet trombocyter, som är viktigast för hemostasförmågan. Detta gör att ett djur med lågt antal trombocyter, där trombocyterna är större än normalt, kan ha normalt fungerande hemostas (2).

Provtagning

För trombocyträkning är det viktigt med optimal provtagning. Blodprov tas med försiktig stas från lämplig ven. Det är en fördel om EDTA-röret för hematologi inte fylls först, detta för att undvika att få med vävnadsmaterial som aktiverar trombocyter. Efter provtagningen vickas röret försiktigt så att blodet blandas med EDTA, blanda om möjligt även under provtagningen. EDTA fungerar ofta bra men vid problem med trombocyttaggregat kan i vissa fall citrat eller CTAD-rör fungera bättre. För att undvika trombocyttaggregat kan man använda rör med tillsatt syntetiskt prostaglandin (iloprost 20ug/ml) 2–4µl till ½-1ml EDTA-blod (3). Prostaglandintillsats fungerar men används av praktiska skäl ganska sällan.

Pseudotrombocytopeni på grund av trombocyttaggregat

Trombocyternas funktion i kroppen är att aggregera vid skada i blodkärl, men det händer ganska ofta att trombocyterna aggregerar även i provrör efter blodprovstagning. Detta leder till att trombocyterna i aggregaten inte räknas av hematologi-instrumentet och antalet blir falskt lågt. Detta kallas för pseudo-trombocytopeni och är vanligast hos katt, men kan uppstå i prov från alla djurslag. Låga trombocytvärden skall därför alltid kontrolleras. Man börjar med att kontrollera om det finns trombocyttaggregat genom att i mikroskop med låg förstoring undersöka fransen på ett färgat blodutstryk (Bild 3). Enstaka små aggregat

har ingen stor betydelse för antalet och har sannolikt liten effekt på den kliniska tolkningen, men ses flera stora trombocyttagregat (>50 trombocyter) är trombocytvärdet falskt lågt och ska ej användas (3). Trombocyttagregat ger felaktigt låga värden oberoende av analysmetod och därför krävs nytt blodprov.

Storleken hos trombocyter har betydelse

Trombocyternas storlek hos ett djur har stor betydelse ur flera aspekter. Det är den totala trombocytmassan som avgör hemostasförmågan. Detta innebär till exempel att en cavalier king charles spaniel med makrotrombocytos som har få men stora trombocyter kan ha normal trombocytmassa (4) och därigenom inga tecken på bristande hemostas (5). Dessa hundar har ingen brist på trombocytmassa, det vill säga ingen egentlig trombocytbrist trots lågt antal trombocyter. Plateletcrit (PCT) är ett mått på totala trombocytmassan i procent, vilket är det bästa för att bedöma om risk för blödning föreligger (4). PCT beräknas utifrån antal trombocyter och MPV (mean platelet volume) som är medelstorleken på trombocyterna. Det är dock viktigt att känna till att MPV och PCT kan vara felaktiga om trombocyterna är större än vad instrumentet kan mäta.

Stora trombocyter ger ofta problem vid trombocyträknningar i hematologiinstrument. Många hematologiinstrument är anpassade för storleken av trombocyter hos människa, hund och häst. Stora trombocyter, som ofta ses hos katter och vissa hundraser som cavalier king charles spaniels, kan missas av hematologiinstrumenten. Speciellt med hematologiinstrument som använder impedansteknik går det inte att skilja mellan erythrocyter och trombocyter om trombocyterna är för stora, eftersom tekniken baserar sig på skillnad i storlek mellan erythrocyter och trombocyter. Hur vet man om man har ett instrument som använder impedansteknik? Om de grafiska resultaten presenteras som histogram (Fig. 1), så är det troligen ett impedansinstrument. Hematologiinstrumentet Sysmex XT-2000iV har både optisk metod och impedansmetod för trombocyträkning. Vid utvärdering av instrumentets förmåga att analysera trombocyter i kattprover låg antalet trombocyter i medeltal 62 % högre med den optiska metoden jämfört med impedansteknik (6).

Analys av trombocytantal

Räkning av trombocyter utförs vanligtvis automatiskt med hematologiinstrument, men kan även räknas manuellt i mikro-

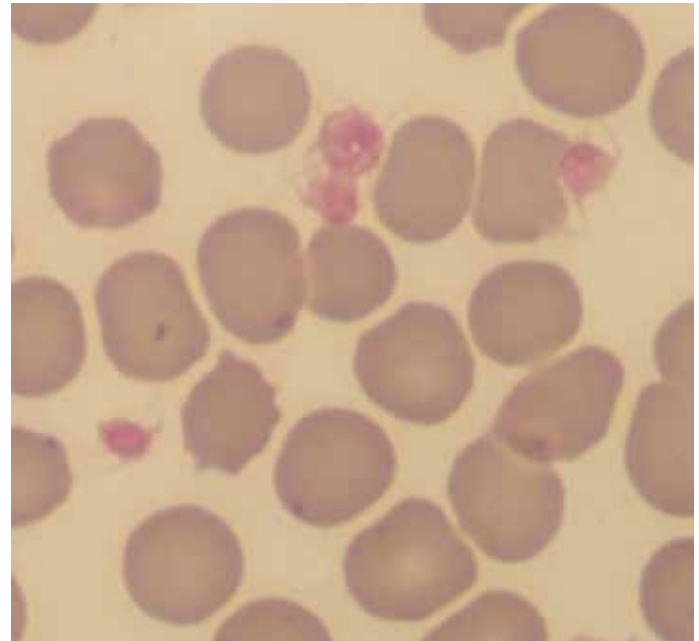


Bild 2. Fyra aktiverade trombocyter i blodutstryk från katt.

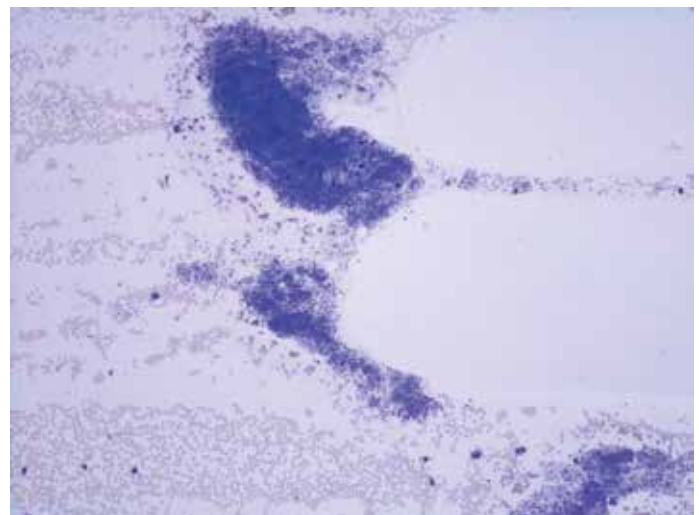
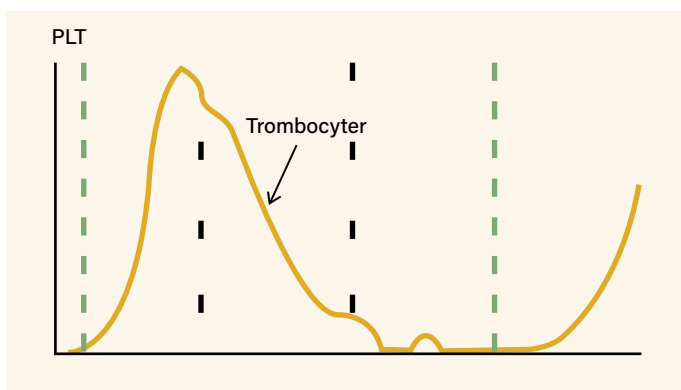
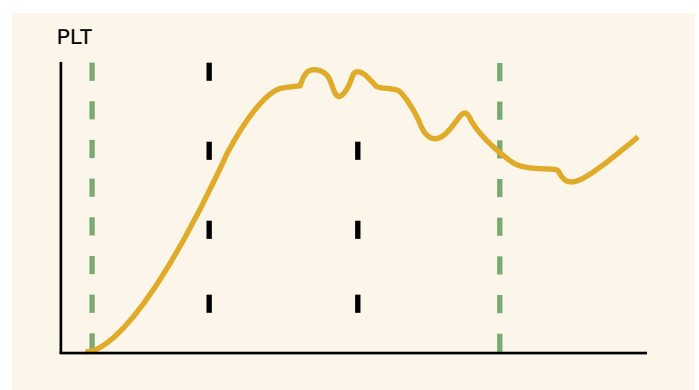


Bild 3. Flera stora trombocyttagregat i fransen av ett blodutstryk av blod från en hund.



Figur 1a.



Figur 1b.

Figur 1. Impedans-trombocythistogram från hematologiinstrument. Trombocyter ses till vänster och erythrocyterna anas till höger. A) Väl avgränsad trombocytkurva, vilket indikerar en sannolikt korrekt trombocyträkning. B) Trombocytkurva från en katt med stora trombocyter där det inte är bra uppdelning mellan trombocyter och erythrocyter och det numeriska trombocyt-resultatet är inkorrekt. Antal celler på y-axeln och cellstorlek på x-axeln.

skop med räknekammare eller uppskattas i blodutstryk. Räkning av trombocyter kan vara tekniskt besvärligt då trombocyter har stor benägenhet att aggregera och storleksmässigt kan vara mycket lika erythrocyter varför vissa elektroniska cellräknare (framförallt impedansinstrument) har svårt att särskilja erythrocyter och trombocyter. De moderna hematologiinstrument som använder optisk metod med laserbaserad flödescytometri klarar räkning av stora trombocyter bättre. Trombocyträkningar från hematologiinstrument bör alltid kontrolleras för att undvika felaktiga diagnostiska slutsatser. Man bör kontrollera att det inte finns trombocytaggregat i blodutstryk, bedöma trombocyternas storlek och uppskatta antalet trombocyter i blodutstryket. Antalet trombocyter kan uppskattas genom att i mikroskop räkna antal trombocyter per synfält med 100x oljeobjektiv i tio synfält i ett färgat blodutstryk (7). Det genomsnittliga antalet per synfält multipliceras med 15 för att få ett ungefärligt antal i enheten $\times 10^9/L$. På det sättet kan man kontrollera att antalet överensstämmer med räkningen från hematologiinstrumentet. Räkningen ska utföras i det så kallade "monolagret", där erythrocyterna ligger en och en intill varandra.

Det förekommer även falskt höga trombocyträkningar. Små partiklar i blodprovet kan leda till falskt högt trombocyttantal. Exempelvis kan lyserade erythrocyter (vid hemolys), där mycket av hemoglobinet har läckt ut, vara av samma storlek som trombocyter. Dessa kallas för "ghost cells" och kan ibland ses vid hemolytisk anemi som till exempel IMHA. Även lipemi kan leda till hemolys och ge liknande erythrocytförändringar. Dessutom kan fettdropparna i vissa fall räknas som trombocyter av instrumenten. Det är därför bra om blodprov för hematologisk undersökning tas från djur som har fastat. Andra partiklar som kan vara lika stora som trombocyter är erythrocytfragment, mikrocytära erythrocyter vid järnbristanemi, bakterier, protozoer med mera. Det är viktigt att kontrollera instrumentets eventuella larm och grafiska presentation av trombocyträkningen.

Kontrollera om instrumentets trombocyt-histogram/cytogram ser normalt ut. Att undersöka blodutstryk för uppskattning om antal trombocyter verkar överensstämma med räkningen från ett hematologiinstrument tar bara några minuter.

Cavalier king charles spaniel och andra rasskillnader

Många cavalier king charles spanielhundar har macrotrombocytos, som är en medfödd genetisk defekt (8), vilket leder till att de har få, men mycket stora trombocyter (Bild 4). Makrotrombocytos kan sporadiskt förekomma även hos andra hundraser som till exempel cairn och norfolk terrier (9). Trombocyterna kan vara så stora att de missas av hematologiinstrument. Trots att hundarna i vissa fall har mycket få trombocyter har de inga tecken på bristande hemostas, eftersom totala trombocytvolymen (plateletkrit, PCT) oftast är normal (4). I en studie där hemostasförmågan undersöktes i helblod med tromboelastografi (TEG) hade cavalierier med lågt antal trombocyter inga tecken på bristande funktion (5). Vid analys av blodprov med hematologiinstrumentet IDEXX QBC-vet, som analyserar provets totala trombocytvolym, får cavalierier med makrotrombocytos normala trombocytvärden (10), medan när antalet analyserades med impedansinstrument kan vissa av dessa hundar felaktigt få trombocytvärden under $10 \times 10^9/L$. Det är viktigt att känna till denna egenskap hos cavalierier så att de inte behandlas för trombocytopeni i onödan. Trombocyter hos cavalierier med makrotrombocytos bör bedömas med PCT (total trombocytvolym) som analyseras bäst med IDEXX QBC eller Advia 2120. Ifall det inte finns tillgång till dessa instrument kan trombocyternas antal och storlek bedömas i mikroskop. Om det finns >2–3 stora trombocyter per synfält (100x oljelins), och hunden inte har några tecken på blödningar, så kan det vara normalt för den hunden. Om antalet är mycket lågt bör prov skickas till laboratorium med stor vana av hematologiprover från hund för bedömning av specialist.

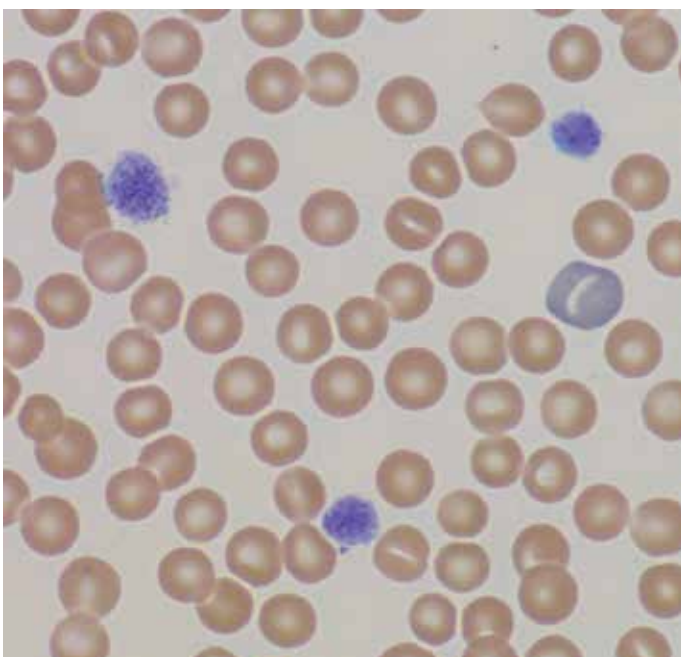


Bild 4. Tre stora trombocyter i blodet från en cavalier king charles spaniel. Jämför trombocyternas storlek med erythrocyterna och de normala trombocyterna i bild 1.



Bild 5. Petekiella blödningar i munsleminnan hos en hund med immunmedierad trombocytopeni.

Friska greyhound har ofta lite lägre trombocytantal än andra hundraser, men för det mesta överstiger antalet $100 \times 10^9/L$ (11).

Klinisk utredning vid trombocytopeni

När det är fastställt att en patient har trombocytopeni behöver orsaken identifieras. Trombocytopeni kan bero på minskad produktion i benmärgen, patologisk destruktion eller ökad perifer förbrukning. Eftersom trombocytopeni kan uppstå av många olika anledningar varierar den vidare diagnostiska utredningen. Fullständig hematologisk undersökning med bedömning av antal och morfologi på alla celltyper bör alltid ingå. Andra vanliga undersökningar är hemostasutredning, specifika test för infektionssjukdomar och benmärgsprov.

Immunmedierad trombocytopeni (IMTP) leder ofta till grav trombocytopeni (12). Hos hundar med grav trombocytopeni (under $10 \times 10^9/L$) är IMTP den vanligaste orsaken. Hos hund är cocker spaniel den hundras som drabbas oftast. Immunmedierad trombocytopeni kan initieras eller vara sekundärt till olika grundlidanden som infektioner, vaccination, lymfom, läkemedel, toxiner, med mera. Hundar med IMTP kommer ofta till veterinär på grund av petekier i munslemhinna (Bild 5) och på buken. Ibland har de inte så många andra sjukdomstecken. Trombocytopenin kan orsaka blödningar, till exempel i tarmen, vilket kan leda till regenerativ anemi. Det finns ingen specifik diagnostisk metod för IMTP utan man får försöka att utesluta andra orsaker till trombocytopenin. Oftast förväntar man sig ett ökat eller åtminstone normalt antal megakaryocyter i benmärgen vid IMTP, men eftersom antikropparna ibland angriper megakaryocyter i benmärgen kan det även vara ett minskat antal.

Hemostasrubbningar med förbrukning av trombocyter och koagulationsfaktorer orsakas av underliggande sjukdomar som vävnadsskada, inflammation, infektion, endotoxiner, neoplasi, ormbett, warfarin med mera. Dessa processer kan vara akuta, subakuta eller kroniska. Omfattningen av hemostasrubbningen och trombocytopenin kan variera. Diagnostiskt klassas hemostasförändringarna som disseminerande intravaskulär koagulation (DIC) när förändringar är kraftiga och kan påvisas i flera hemostasanalyser (trombocytantal, protrombintid (PT), aktiverad tromboplastintid (aPPT), d-dimer och fibrinogen).

Anaplasma phagocytophilum, en bakterie som förökar sig i neutrofiler, är en vanlig orsak till lindrig-måttlig trombocytopeni hos hundar och hästar i Sverige. I sällsynta fall kan trombocytopenin vara kraftig. Vid aktiv *Anaplasma*-infektion är neutrofilantalet vanligtvis i det nedre referensområdet, trots att hunden har feber (13). Diagnos ställs genom att påvisa *Anaplasma*-inklusioner i neutrofilerna (Bild 6) eller med PCR-analys. *Anaplasma phagocytophilum* påverkar blodbildningen på olika sätt hos olika djurslag, till exempel hos katt hade fler än 40 % av de infekterade katterna normalt antal trombocyter (14).

Infektioner som *Ehrlichia* ssp, *Leishmania* och vissa andra infektioner kan ge måttlig till kraftig trombocytopeni. De kan även orsaka kraftig ickeregenerativ anemi. Diagnos ställs med serologi, PCR eller påvisande av mikroorganismen i till exempel cytologiskt prov från benmärg/lymfknuta.

Benmärgsdepression som leder till trombocytopeni ger ofta även neutropeni och anemi (det vill säga bicytopeni eller pancytopeni). Orsaken kan vara läkemedel, östrogenproducerande tumör, lymfom, idiopatisk skada, mm.

Läkemedel som till exempel kemoterapi, tiamazol, fenobarbital, furosemid, östrogen, gentamycin och sulfonamider kan orsaka trombocytopeni. Mekanismen kan vara immunmedierad

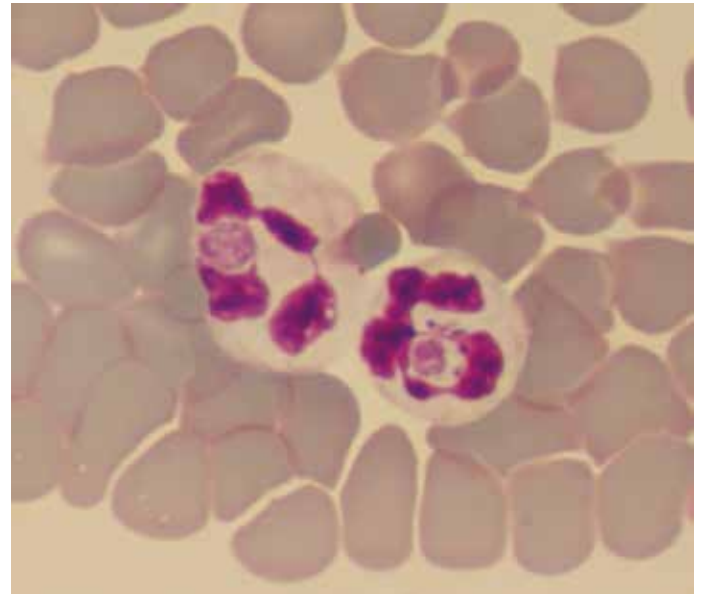


Bild 6. Två neutrofiler med *Anaplasma phagocytophilum*-morula i cytoplasman.

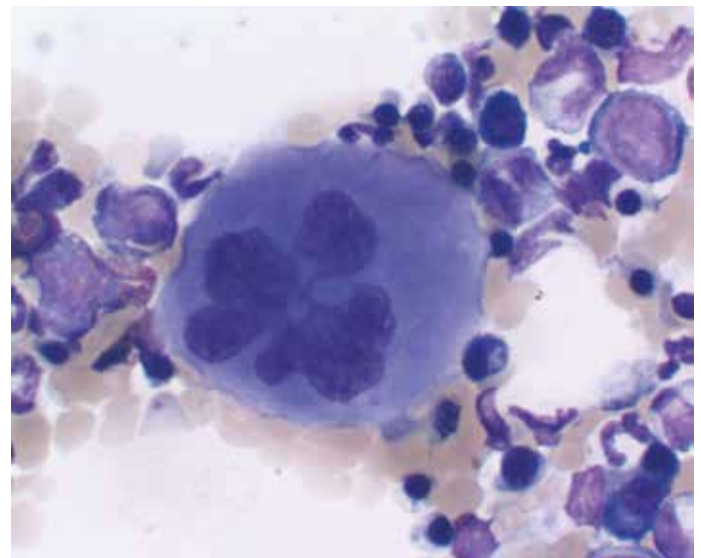


Bild 7. Mogen megakaryocyt i benmärgen från en hund.

nedbrytning eller benmärgsskada, vilken kan vara reversibel eller irreversibel.

Blödningar leder sällan till trombocytopeni

Blödning, till exempel vid trauma, orsakar hypoproteinemi, men sällan trombocytopeni eller leukopeni. Megakaryocyterna i benmärgen (Bild 7) har mycket stor kapacitet att producera trombocyter som knoppas av från megakaryocyten cytoplasma. Vid behov kan trombocytproduktionen snabbt ökas kraftigt (15).

Trombocytos

Ökat antal trombocyter ses oftast som sekundär reaktion (reaktiv trombocytos) vid vävnadsskada, inflammation, neoplasi, med mera. Trombocytosen är oftast kortvarig och påverkar inte djuret kliniskt. Kronisk blödning leder till järnbristanemi och trombocytos (16). Primär essentiell trombocytemi är en leukemilik-

nande process som är väldigt ovanlig, men med dålig prognos.

Glukokortikoidbehandling av friska hundar leder inte till trombocytos (17). Trombocytos hos sjuka hundar som får kortisonbehandling orsakas sannolikt av djurets underliggande sjukdom.

Sammanfattning

Sammanfattningsvis ger analys av trombocytantal hos sjuka djur

viktig diagnostisk information. För att få optimal trombocyträkning behövs genomtänkta rutiner vid analys, eftersom trombocyträkning påverkas av preanalytiska och analytiska problem. Om man analyserar hematologiprover på sin klinik är det viktigt att ha kunskap om hur man ska verifiera trombocytresultaten från sitt instrument. Annars bör man skicka sina hematologiprover till laboratorium som har instrument för optimal cellräkning och rutiner för att kontrollera eventuella felkällor. •



REFERENSER

- Russell KE. Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In: Weiss DJ & Wardrop KJ, editors. *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed. Wiley-Blackwell Ames; 2010. p 576-585.
- Mohr R, Martinowitz U, Golan M, Ayala L, Goor DA, Ramot B. Platelet size and mass as an indicator for platelet transfusion after cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 1986; 74:III153-8.
- Tvedten HW, Bäcklund K, Lilliehöök I. Reducing error in feline platelet enumeration by addition of Iloprost to blood specimens: comparison to prostaglandin E1 and EDTA. *Vet Clin Pathol*. 2015;44(2):179-87.
- Tvedten HW, Lilliehöök IE, Oberg J, Häggström J, Höglund K, Ljungvall I. Validation of Advia plateletcrit for assessing platelet mass in dogs, including Cavalier King Charles spaniels. *Vet Clin Pathol*. 2012;41:336-343.
- Öberg, J, Lilliehöök I, Höglund K, Häggström J, Ljungvall I. Hemostatic function in Cavalier King Charles Spaniels assessed using thromboelastography. *Vet Clin Pathol*. 2019;48(4):636-644.
- Lilliehöök I, Tvedten HW. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet Clin Pathol*. 2009;38(2):163-74.
- Tvedten HW, Grabski S, Frame L. Estimating platelets and leukocytes on canine blood smears. *Vet Clin Pathol*. 1988;17:4-6.
- Davis B, Toivio-Kinnunen M, Schuller S, Boudreaux MK. Mutation in beta-1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. *J Vet Intern Med*. 2008;22:540-545.
- Gelain ME, Bertazzolo W, Tutino G, Pogliani E, Cian F, Boudreaux MK. A novel point mutation in the β 1-tubulin gene in asymptomatic macrothrombocytopenic Norfolk and Cairn Terriers. *Vet Clin Pathol*. 2014;43(3):317-21.
- Tvedten H, Lilliehöök I, Hillström A, Häggström J. Plateletcrit is superior to platelet count for assessing platelet status in Cavalier King Charles spaniels. *Vet Clin Pathol*. 2008;37:266-271.
- Zaldívar-López S, Marin LM, Iazbik MC, Westendorf-Stingle N, Hensley S, Couto CG. Clinical Pathology of greyhounds and other sighthounds. *Clinical pathology of Greyhounds and other sighthounds*. *Vet Clin Pathol*. 2011;40(4):414-425.
- Scott MA, Jutkowitz LA. Immune-mediate thrombocytopenia. In: Weiss DJ & Wardrop KJ, editors. *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed. Wiley-Blackwell Ames; 2010. p 586-595.
- Lilliehöök I, Egenwall A, Tvedten HW. Hematopathology in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic Ehrlichia species. *Vet Clin Pathol*. 27: 116-122, 1998.
- Schäfer I, Kohn B. Anaplasma phagocytophilum infection in cats: A literature review to raise clinical awareness. *J Feline Med Surg*. 2020;22(5):428-441.
- Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;1:147-152.
- Weiss DJ. Iron and copper deficiencies and disorders of iron metabolism. In: Weiss DJ & Wardrop KJ, editors. *Schalm's Veterinary hematology*. 6th ed. Wiley-Blackwell Ames; 2010. p 167-171.
- Romão FG, Campos EF, Mattoso CRS, Takahira RK. Hemostatic profile and thromboembolic risk in healthy dogs treated with prednisone: a randomized controlled trial. *BMC Vet Res*. 2013;9:268-274.

Vill du växa med oss?

- utvecklas i din yrkesroll och bli framtidens veterinär, vi söker:

- **ET-veterinär** i Uppsala
- **Djurhälsoveterinär** i Kristianstad

Läs mer och sök tjänsterna på www.vxa.se/ledigatjanster. Ansökan senast 5 april 2021.

Frågor: kontakta Helena Kättström, Avdelningschef Djurhälsa fält, 010-471 05 30

Sara Wiklert Petersson, Regionchef väst Avel, 010-471 07 02

Ansökan
senast
5 april

