

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

Hématologie

15HEM2 NOVEMBRE 2015

D-dimères

Frottis sanguin

JUILLET 2016

Anne GUYARD (Ansm)
Christophe MARZAC (Hôpital Saint-Antoine - Paris)
Marie-Hélène HORELLOU (Hôpital Cochin - Paris)

Expédition : 4 novembre 2015
Clôture : 30 novembre 2015
Edition des compte-rendus individuels : 4 mars 2016
Paramètres contrôlés : **15B3 et 15B4 : D-dimères**
15BF : Frottis sanguin

Nombre de laboratoires concernés* : 1122
Nombre de laboratoires participants** : 1088

* Laboratoires ayant déclaré à l'Ansm pratiquer les analyses concernées par l'envoi
** Laboratoires ayant saisi leurs résultats sur le site de l'ANSM avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

L'opération 15HEM2 comportait deux échantillons pour dosage des D-dimères et un frottis sanguin.

Les D-dimères ont été déterminés par 968 laboratoires. L'échantillon 15B3 « négatif » a été rendu proche de la limite de détection ou de la limite inférieure de linéarité de la plupart des réactifs. La réponse au cas clinique proposé a été en faveur de l'exclusion du diagnostic de maladie thromboembolique veineuse (93 % des participants). L'échantillon 15B4 de concentration plus élevée a montré une dispersion inter-réactifs importante (moyennes de 603 à 1685 ng/mL selon les réactifs) avec cependant une dispersion intra-réactif satisfaisante. Le cas clinique associé concernait un patient de 85 ans, ce qui a permis de communiquer l'information concernant les seuils adaptés à l'âge et en fonction du type de thrombose suspectée.

Le frottis 15BF, provenant d'un patient présentant une microangiopathie thrombotique, comportait 90 % de lymphocytes et était caractérisé par la présence de schizocytes à un taux significatif signalés par 88,6 % des 1060 laboratoires participants. Les hypothèses diagnostiques attendue (microangiopathie thrombotique) ou acceptable (anémie hémolytique) ont été rendues par 78,3 % des laboratoires. Plus que de poser un diagnostic précis de microangiopathie thrombotique, l'important était de signaler dès la lecture du frottis la présence de nombreux schizocytes dans ce contexte d'urgence.

Méthode statistique et exploitation des résultats

Les paramètres statistiques : effectif, médiane, moyenne et écart-type sont calculés à partir des données fournies par les laboratoires.

L'élimination des valeurs extrêmes est réalisée par la méthode de Tukey, puis les paramètres statistiques sont déterminés après 2 troncatures à 2 écarts-types. Cette procédure a été appliquée au groupe toutes techniques et à chaque groupe technique. Les paramètres statistiques ont été rendus pour des effectifs > 10.

Dans les tableaux de résultats figurent selon les cas :

- les effectifs non tronqués (n) après élimination des valeurs aberrantes (méthode de Tukey)
- la médiane et l'intervalle interquartile (percentiles 25 et 75 : P25 - P75) ou la moyenne tronquée (mTr), l'écart-type tronqué (sTr) et le coefficient de variation tronqué (CVTr) calculé par la formule $100 \times sTr / mTr$.

Echantillons 15B3 et 15B4

Dosage / Détermination des D-dimères

Définition des échantillons

Les échantillons 15B3 et 15B4 sont des plasmas lyophilisés d'origine humaine. Les résultats des référents M-H. Horellou, Paris – M.F. Aillaud, Marseille – M. Alhenc-Gelas, Paris – D. Lasne, Paris sont présentés dans le tableau I.

tableau I – résultats des référents

Réactif	D-dimères (ng/mL)	
	Echantillon 15B3	Echantillon 15B4
BIOMERIEUX Vidas D-Dimer Exclusion II	197	753
	200	727
IL HemosiL D-Dimer HS 500	235	1676
STAGO STA Liatest D-Di Plus	<270	890
	270	920

Résultats des participants

Le nombre de laboratoires ayant pratiqué le dosage des D-dimères est de 968.

1 – Réactifs utilisés

Les réactifs utilisés par les participants figurent dans le tableau II. Les réactifs majoritairement utilisés relèvent de techniques immuno-turbidimétriques : Stago STA Liatest D-Di Plus (51 %) et IL HemosiL D-Dimer HS 500 (14 %) et immuno-enzymatique : Biomérieux Vidas D-Dimer Exclusion II (21 %).

Les réactifs utilisés sont tous des réactifs quantitatifs. On ne relève plus de technique d'agglutination au latex sur lame. La majorité des réactifs rendent des résultats exprimés en FEU (fibrinogen equivalent unit), excepté les réactifs dont les libellés sont suivis de * dans le tableau II qui rendent des résultats exprimés en unités D-Dimères (D-Di, D-DU, DD-U). La quantité de D-dimères obtenue à partir d'un caillot lysé représente environ 50 % du taux de fibrinogène initialement présent, par conséquent une quantité (x) de D-dimères exprimée en FEU correspond à environ la moitié (x/2) si elle est exprimée en unité de D-Dimères.

Par ailleurs, afin de recueillir des résultats exprimés dans la même unité, il avait été demandé que les laboratoires rendent leurs résultats en ng/mL, unité la plus fréquemment utilisée. En effet, des réactifs utilisent également les unités suivantes : mg/L et µg/mL.

tableau II – réactifs D-dimères utilisés par les participants

Réactifs	Nombre d'utilisateurs
ABBOTT Quantia D-dimer / Architect *	11
ALERE Triage D-dimères *	16
BIOMERIEUX Vidas D-Dimer Exclusion II	202
IL HemosiL AcuStar D-Dimer	1
IL HemosiL D-Dimer *	2
IL HemosiL D-Dimer 500	6
IL HemosiL D-Dimer HS *	1
IL HemosiL D-Dimer HS 500	134

ROCHE Tina-quant D-dimer Gen.2	11
SIEMENS Immulite 2000/Xpi D-dimères	1
SIEMENS Innovance D-dimères	32
SIEMENS Stratus SCS D-Dimer	3
STAGO STA Liatest D-Di	46
STAGO STA Liatest D-Di Plus	494
TOSOH AIA-Pack D-dimer *	4
Autres ou non précisé	4
Total	968

* Réactif dont les résultats ne sont pas exprimés en FEU

Il était demandé aux laboratoires de rendre un résultat (quantitatif ou semi-quantitatif ou qualitatif) en fonction du réactif utilisé. Parmi les 968 laboratoires ayant rendu un résultat de D-dimères, 964 ont rendu des résultats quantitatifs, 258 des résultats qualitatifs et 72 des résultats semi-quantitatifs.

2 – Résultats qualitatifs

Le nombre de laboratoires ayant rendu un résultat qualitatif est de 258 pour 15B3 et 15B4. Les réactifs utilisés permettaient de rendre un résultat autre que qualitatif et de fait, l'ensemble de ces laboratoires a rendu également un résultat semi-quantitatif et/ou un résultat quantitatif qui sont présentés dans les tableaux suivants (III, IV et V).

3 – Résultats semi-quantitatifs

Le nombre de laboratoires ayant rendu un résultat semi-quantitatif est de 71 pour 15B3 et 66 pour 15B4. Le formulaire de réponse proposait des intervalles de valeurs : <250, 250 à 500, <500... La plupart de ces laboratoires a rendu également un résultat quantitatif.

Les résultats semi-quantitatifs sont présentés dans le tableau III.

tableau III – résultats semi-quantitatifs

Réactif	Résultats semi-quantitatifs (ng/mL)						
	15B3			15B4			
	<250	250 à 500	<500	<500	500 à 1000	1000 à 1500	1500 à 2000
ABBOTT Quantia D-dimer / Architect *			1		2		
BIOMERIEUX Vidas D-Dimer Exclusion II	6	1	3		10		
IL HemosiL D-Dimer HS 500	7	1	1				8
ROCHE Tina-quant D-dimer Gen.2			1				
SIEMENS Innovance D-dimères	3		1			1	3
SIEMENS Stratus SCS D-Dimer	1						1
STAGO STA Liatest D-Di	1	3	2		6		
STAGO STA Liatest D-Di Plus	10	11	18	1	31	3	
Total	28	16	27	1	49	4	12

* Réactif dont les résultats ne sont pas exprimés en FEU

La totalité des résultats semi-quantitatifs de l'échantillon 15B3 est inférieure à 500 ng/mL. Inversement tous les résultats, sauf un, de l'échantillon 15B4 sont supérieurs ou égaux à 500 ng/mL. Ce résultat « <500 » est concordant avec le résultat quantitatif rendu à 475 ng/mL.

4 – Résultats quantitatifs

Le nombre de laboratoires ayant rendu un résultat quantitatif est de 959 pour 15B3 et 964 pour 15B4. L'échantillon 15B3 était de niveau faible. Les résultats ont été rendus par les laboratoires, soit sous forme de résultats quantitatifs, soit sous la forme « <x » lorsque le résultat était inférieur à la limite de détection ou de linéarité du réactif. Pour le réactif Biomérieux Vidas D-Dimer Exclusion II seul, dont la limite de détection et de linéarité est de 45 ng/mL, il était possible de calculer la moyenne des résultats. Pour les autres réactifs dont la limite de détection ou de linéarité est située entre 200 et 300 ng/mL, il n'était pas possible de calculer la moyenne. L'ensemble des résultats par réactif figure dans le tableau IV. Les résultats étant inférieurs à 500 ng/mL, l'échantillon 15B3 peut être considéré « négatif ».

tableau IV – D-dimères : résultats quantitatifs 15B3

Réactif	Effectif	Résultats quantitatifs 15B3
Toutes techniques	959	Résultats proches de la limite de détection ou de la limite inférieure de linéarité de la plupart des réactifs. Résultats de l'ordre de 200 à 300 ng/mL. Résultats négatifs
ABBOTT Quantia D-dimer / Architect *	10	Résultats proches de la limite inférieure de linéarité
ALERE Triage D-dimères *	16	Résultats inférieurs à la limite de détection
BIOMERIEUX Vidas D-Dimer Exclusion II	200	Moyenne = 203,6 ng/mL, CV = 4,9 %
IL HemosiL D-Dimer HS 500	134	Résultats proches de la limite de détection
ROCHE Tina-quant D-dimer Gen.2	10	Résultats proches de la limite de détection
SIEMENS Innovance D-dimères	31	Résultats proches de la limite inférieure de linéarité
STAGO STA Liatest D-Di	34	Résultats proches de la limite de détection
STAGO STA Liatest D-Di Plus	391	Résultats proches de la limite de détection

* Réactif dont les résultats ne sont pas exprimés en FEU

Quant à l'échantillon 15B4 (tableau V et figures 1 et 2), la distribution des résultats est d'allure bimodale. Il présente une dispersion inter-réactifs importante (moyennes de 603 à 1685 ng/mL selon les réactifs) avec cependant une dispersion intra-réactif comprise entre 3,7 et 6,1 % pour 6 des 8 réactifs. Les résultats sont supérieurs à 500 ng/mL et supérieurs aux seuils des réactifs, l'échantillon 15B4 peut être considéré « positif ».

tableau V – D-dimères : résultats quantitatifs 15B4

Réactif	Résultats quantitatifs 15B4 (ng/mL)			
	n	mTr	sTr	CVTr (%)
ENSEMBLE DES RESULTATS	785	872,0**	86,5**	9,9**
ABBOTT Quantia D-dimer / Architect *	11	603,6	33,6	5,6
ALERE Triage D-dimères *	16	1023,6	97,0	9,5
BIOMERIEUX Vidas D-Dimer Exclusion II	200	757,3	36,1	4,8
IL HemosiL D-Dimer HS 500	132	1685,9	62,7	3,7
ROCHE Tina-quant D-dimer Gen.2	11	721,6	94,8	13,1
SIEMENS Innovance D-dimères	32	1674,7	101,6	6,1
STAGO STA Liatest D-Di	44	900,9	53,9	6,0
STAGO STA Liatest D-Di Plus	482	912,5	50,9	5,6

* Réactif dont les résultats ne sont pas exprimés en FEU

** Compte tenu de la dispersion inter-réactifs, la moyenne, l'écart-type et le CV de l'ensemble des résultats sont donnés à titre d'information – Médiane : 910

figure 1 : échantillon 15B4 : histogramme de distribution des résultats D-dimères « toutes techniques »

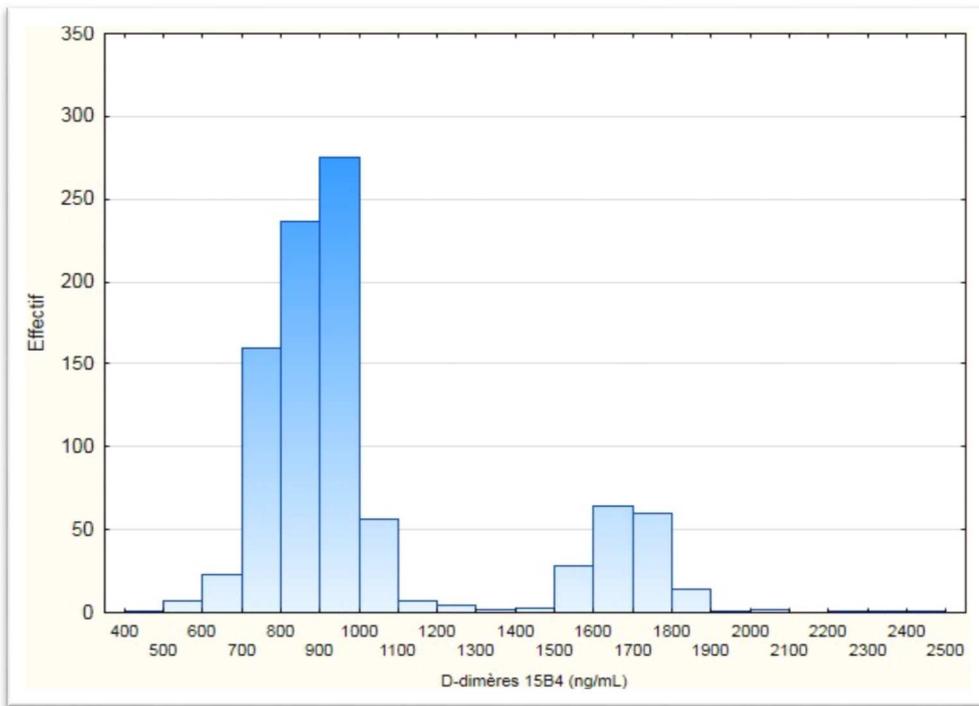
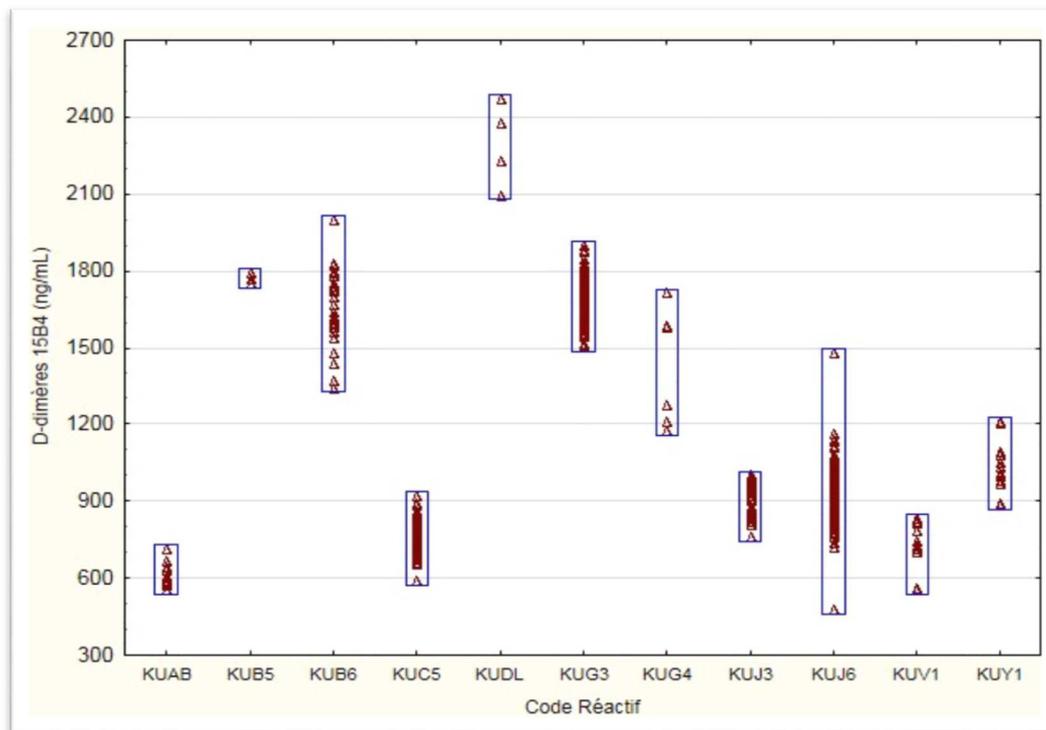


figure 2 : échantillon 15B4 - résultats individuels D-dimères en fonction du réactif. Les boîtes représentent la dispersion intra-réactif et les triangles représentent les résultats individuels.



code	Réactif	code	Réactif
KUAB	ABBOTT Quantia D-dimer / Architect	KUG4	IL HemosIL D-Dimer 500
KUB5	SIEMENS Stratus SCS D-Dimer	KUJ3	STAGO STA Liatest D-Di
KUB6	SIEMENS Innovance D-Dimères	KUJ6	STAGO STA Liatest D-Di Plus
KUC5	BIOMERIEUX Vidas D-Dimer Exclusion II	KUV1	ROCHE Tina-quant D-dimer Gen.2
KUDL	TOSOH AIA-Pack D-Dimer	KUY1	ALERE Triage D-Dimer
KUG3	IL HemosIL D-Dimer HS 500		

5 – Interprétation du cas clinique – échantillons 15B3 et 15B4

5.1 – Valeur-seuil d'exclusion d'un épisode aigu de maladie thromboembolique veineuse (MTEV) du réactif utilisé

De même que la conclusion interprétant les résultats, la valeur-seuil d'exclusion doit être précisée sur le compte-rendu d'un dosage quantitatif des D-dimères (acte 1022 de la NABM) (1).

Les valeurs-seuils rendues par les laboratoires figurent dans le tableau VI (pour les réactifs dont le nombre d'utilisateurs est supérieur à 10). La valeur-seuil majoritaire est 500 ng/mL, excepté pour le réactif ALERE Triage (400 ng/mL).

tableau VI – D-dimères : valeurs-seuils rendus par les laboratoires

	Valeur-seuil d'exclusion de MTEV (ng/mL)						
	220 à 270	400	450	500	550	600	700
ALERE Triage D-dimères		11		4			
BIOMERIEUX Vidas D-Dimer Exclusion II			1	194			
IL HemosiL D-Dimer HS 500				132			
ROCHE Tina-quant D-dimer Gen.2				11			
SIEMENS Innovance D-dimères				31	1		
STAGO STA Liatest D-Di	1	2		43			
STAGO STA Liatest D-Di Plus	2	10	4	472		1	1

La valeur-seuil demandée sur le formulaire de réponse correspondait à la valeur seuil figurant dans la notice du réactif ou le plus couramment utilisée par les laboratoires pour l'exclusion d'un épisode aigu de MTEV, notamment pour des patients d'au plus 50 à 59 ans.

Deux cas cliniques identiques, si ce n'est l'âge du patient, étaient présentés, correspondant l'un à l'échantillon 15B3, l'autre à 15B4. Les laboratoires devaient se prononcer sur l'exclusion de la thrombose veineuse. Les réponses proposées étaient « Oui », « Non » et « Le réactif utilisé ne permet pas un diagnostic d'exclusion de la MTEV ».

5.1 – Cas clinique 15B3

Plasma 15B3 : une thrombose veineuse profonde du membre inférieur est suspectée chez un patient de 45 ans. Le score de probabilité clinique (Wells) est à 2 (douleur localisée sur le trajet veineux du mollet gauche, chirurgie récente) indiquant une probabilité intermédiaire de thrombose veineuse profonde. Peut-on exclure la thrombose veineuse profonde sur les résultats des D-Dimères ?

Les 955 réponses au cas clinique de l'échantillon 15B3, majoritairement « Oui », figurent dans le tableau VII.

tableau VII – réponses au cas clinique - échantillon 15B3

Peut-on exclure la thrombose veineuse profonde sur les résultats des D-Dimères de l'échantillon 15B3 ?	Effectif	%
Oui	892	93,4
Non	57	6,0
Le réactif utilisé ne permet pas un diagnostic d'exclusion de la MTEV	6	0,6

Les référents ont répondu unanimement « Oui ».

La réponse attendue à la question « Peut-on exclure la thrombose veineuse profonde sur les résultats des D-Dimères de l'échantillon 15B3 ? » est « Oui ». Les résultats de D-dimères de l'ordre 200 à 300 ng/mL, nettement inférieurs au seuil usuel de 500 ng/mL, permettaient d'exclure la thrombose veineuse profonde chez ce patient de 45 ans.

Les 6 réponses « Le réactif utilisé ne permet pas un diagnostic d'exclusion de la MTEV » proviennent pourtant de laboratoires ayant utilisé des réactifs avec lesquels l'ensemble des laboratoires ont donné une réponse (Stago STA

Liatest D-Di Plus, Biomérieux Vidas D-Dimer Exclusion II et Siemens Innovance D-dimères). Quant aux 57 laboratoires ayant répondu « Non », 4 ont rendu un résultat supérieur à leur seuil, leur réponse est donc erronée mais cohérente et 53 ont répondu « Non » alors qu'ils ont bien rendu un résultat inférieur au seuil.

L'éventualité d'avoir des D-dimères négatifs en présence d'une thrombose distale est connue mais l'évolution montre un taux d'évènement thromboembolique à 3 mois de moins de 0,5 % dans ces situations. La mesure des D-dimères, associée à la probabilité clinique, est maintenant incluse dans tous les arbres décisionnels du diagnostic de maladie thromboembolique veineuse. Ce test ne serait pas proposé dans l'arbre décisionnel de la MTEV si cette possible négativité dans les thromboses veineuses distales avait un impact clinique majeur (2).

5.2 – Cas clinique 15B4

Plasma 15B4 : une thrombose veineuse profonde du membre inférieur est suspectée chez un patient de 85 ans. Le score de probabilité clinique (Wells) est à 2 (douleur localisée sur le trajet veineux du mollet gauche, chirurgie récente) indiquant une probabilité intermédiaire de thrombose veineuse profonde. Peut-on exclure la thrombose veineuse profonde sur les résultats des D-Dimères ?

Les 954 réponses au cas clinique de l'échantillon 15B4 figurent dans le tableau VIII.

tableau VIII – réponses au cas clinique - échantillon 15B4

Peut-on exclure la thrombose veineuse profonde sur les résultats des D-Dimères de l'échantillon 15B4 ?	Effectif	%
Oui	52	5,5
Non	893	93,6
Le réactif utilisé ne permet pas un diagnostic d'exclusion de la MTEV	9	0,9

Les réponses des référents sont partagées : 2 « Non » et 2 « Oui ». Leurs résultats, obtenus avec des réactifs différents (tableau I), vont de 727 à 1676 ng/mL. L'un d'entre eux a précisé utiliser un seuil ajusté à l'âge (âge x 10) de 850 pour un patient de 85 ans.

L'interprétation de ce cas dont le but était de communiquer sur la notion de seuil lié à l'âge s'est révélée complexe. En effet, un seuil de D-dimères ajusté à l'âge a été validé dans le diagnostic d'exclusion de l'embolie pulmonaire (3) : chez les patients de plus de 50 ans, la valeur seuil correspond à l'âge multiplié par 10, soit un seuil à 850 ng/ml chez le patient de 85 ans. Cependant, une étude de validation de ce seuil ajusté à l'âge dans la suspicion de thrombose veineuse profonde, du même type que l'étude réalisée et validée dans l'embolie pulmonaire, reste à réaliser. Par conséquent, le résultat de D-dimères de l'échantillon 15B4 étant supérieur à 500 ng/ml, pour les valeurs inférieures à 850 ng/ml, seuil adapté à l'âge, la réponse aurait été "oui" en cas de suspicion d'embolie pulmonaire, mais est "non" dans la suspicion de thrombose veineuse profonde, ceci dans l'attente des études de validation dans cette situation (2). Sur l'échantillon 15B4, les résultats étant supérieurs à 500 ng/mL, quelle que soit la concentration des D-dimères obtenue, on ne pouvait pas exclure le diagnostic de thrombose veineuse profonde dans le cas présenté.

Commentaires

Les résultats sur l'échantillon 15B3 « négatif », quoique difficiles à évaluer en raison de valeurs proches des limites de détection ou de linéarité, sont homogènes et de l'ordre de 200 à 300 ng/mL, nettement inférieurs au seuil usuel de 500 ng/mL.

Quant à l'échantillon 15B4, il présente une dispersion inter-réactifs importante avec des moyennes supérieures à 500 ng/mL pour les différents réactifs. La dispersion inter-réactifs sur des échantillons de contrôle est attestée par les résultats d'autres évaluations externes de qualité, par exemple l'ECAT, organisme néerlandais. La préparation des échantillons de contrôle fait que l'échantillon de contrôle lyophilisé n'est pas identique à un échantillon de plasma frais patient. Par conséquent, on ne peut pas juger de la dispersion inter-réactifs constatée sur l'opération de contrôle.

Le dosage des D-dimères est caractérisé d'une part par la grande hétérogénéité des mélanges de produits de dégradation de la fibrine possibles dans un échantillon et d'autre part par les différences de réactivité des anticorps vis-à-vis de chacun de ces produits (4). De plus, il n'existe pas de standard international.

La précédente opération du CNQ sur les D-dimères, en 2006 (06HEM2), avait également montré une dispersion inter-réactifs. Les résultats étaient plus élevés (médiane ~2500 ng/mL) avec des moyennes allant de 192 à 6675 ng/mL et une distribution plurimodale. Les réactifs utilisés ont évolué (disparition, apparition et nouvelles générations) et la dispersion intra-réactif s'est améliorée : médiane des CV = 13 % en 2006 et 5,8 % en 2015.

Pour rappel, le dosage des D-dimères est utilisé comme test d'exclusion dans le diagnostic de la maladie thromboembolique veineuse ; la stratégie diagnostique découlant de la probabilité clinique établie à l'aide d'un score est schématisée sur la figure 3.

figure 3 : représentation schématique des stratégies diagnostiques de l'embolie pulmonaire et de la thrombose veineuse profonde - d'après Righini M., Le Gal G. (2)

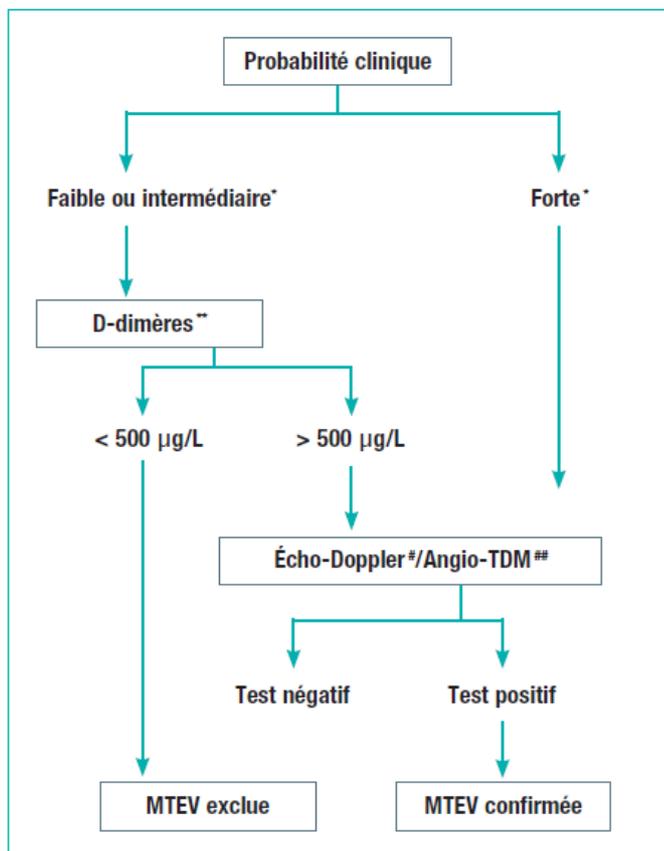


FIGURE Représentation schématique des stratégies diagnostiques de l'embolie pulmonaire et de la thrombose veineuse profonde

* Unlikely/Likely : également possible.

** En cas de suspicion d'embolie pulmonaire, il est possible d'utiliser le seuil ajusté à l'âge (âge x 10 après 50 ans). Non validé pour la suspicion de thrombose veineuse profonde.

Écho-Doppler avec compression veineuse.

Angiotomodensitométrie.

MTEV : maladie veineuse thromboembolique ; TDM : tomodensitométrie.

Evaluation des résultats individuels par des limites acceptables

Lors de l'opération 15HEM2, les résultats des laboratoires des D-dimères - 15B4 : niveau >500 ng/mL ont été évalués à l'aide de la limite acceptable suivante : 13 %.

Ces limites acceptables tiennent compte des performances analytiques des systèmes de dosage présents sur le marché et permettent de délimiter, de part et d'autre de la cible (moyenne tronquée obtenue avec le même groupe technique, ici le réactif), un intervalle à l'intérieur duquel un résultat est considéré comme « acceptable ».

Pour l'échantillon 15B3, les résultats étant proches de la limite de détection ou de la limite inférieure de linéarité de la plupart des réactifs, il n'a donc pas pu être calculé de cible et les résultats n'ont pas pu être évalués.

Bibliographie

1- Décision du 11 février 2013 de l'union nationale des caisses d'assurance maladie relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'assurance maladie. Sous-chapitre 5-02. – Hémostase et coagulation. Publiée le 11 juin 2013

2- Righini M., Le Gal G. Diagnostic positif de la maladie veineuse thromboembolique - Revue du Praticien, 2015, 65 (2) : 176-181

3- Righini M, Van Es J, den Exter P.L., et al. Age-adjusted D-dimer cutoff levels to rule out pulmonary embolism. The ADJUST-PE study. JAMA. 2014;311(11):1117-24.

4- Nougier C, Marijon A. Caractéristiques immuno-analytiques des D-dimères. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2012, 27 (2) : 83-88

Echantillon 15BF Frottis sanguin

Définition de l'échantillon

L'échantillon 15BF, frottis sanguin coloré au MGG, provenait d'un patient qui présentait une microangiopathie thrombotique (figure 4). Les résultats de la formule sanguine sont présentés dans le tableau IX.

Les laboratoires disposaient du cas clinique suivant :

Patient de 52 ans connu pour une leucémie lymphoïde chronique (LLC) traitée antérieurement par chimiothérapie type « RFC » (Rituximab-fludarabine-cyclophosphamide). Il est hospitalisé en urgence pour apparition d'une anémie mal tolérée. Le bilan biochimique montre des stigmates d'hémolyse, le test de Coombs direct est négatif. Le bilan d'hémostase (TP, TCA, fibrinogène) est normal. Urée : 10,8 mmol/L (3,0-7,0), créatinine : 140 µmol/L (50-120). CRP normale. Le bilan hépatique montre une cholestase modérée sans cytolyse.

Numération globulaire :

Leucocytes 9,14 G/L (4,00-10,00), Hématies 2,25 T/L (4,00-6,20), Hémoglobine 6,4 g/dl (12,0-18,0), Hématocrite 17,6 % (40,0-55,0), Volume Globulaire Moyen 78 fl (80-100), T.C.M.H. 28,4 pg (27,0-33,0), C.C.M.H. 36,4 g/dl (32,0-36,0), Indice Distribution Hématies 20 % (12-15)

Plaquettes 25 G/L (150-400), Réticulocytes 1,59 % soit 35 780 / mm³ (21 000-90 000)

L'automate rend des alarmes "anémie", "thrombopénie" et la formule leucocytaire est rejetée.

Les biologistes référents ont examiné le frottis 15BF : Ch. Marzac, Paris – V. Baccini, Marseille – V. Bardet, Paris – E. Ronez, Paris – C. Settegrana, Paris.

tableau IX - résultats attendus - frottis 15BF

	Résultats des référents (médiane en %)
Polynucléaires neutrophiles	5
Polynucléaires éosinophiles	0
Polynucléaires basophiles	0
Lymphocytes	91
Monocytes	4
Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	0
Myélémie / précurseurs granuleux	0
Blastes	0
Erythroblastes	0

Commentaires attendus : schizocytes, ombres de Gümprecht, anisocytose, poïkilocytose, hématies cibles

Réponse attendue : Microangiopathie thrombotique

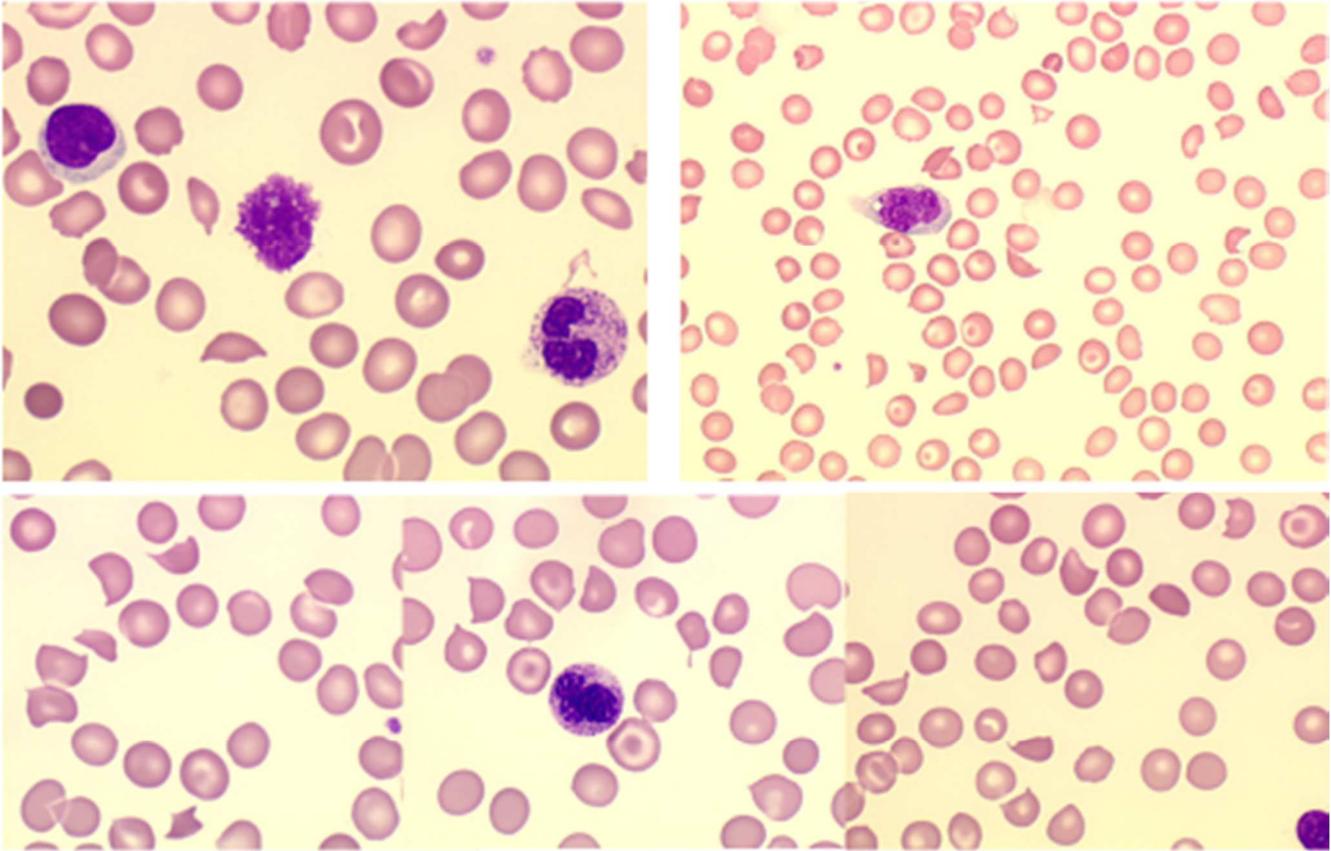
Réponse acceptable : Anémie hémolytique, Leucémie lymphoïde chronique

Remarques : La présence de schizocytes, à un taux significatif, élément remarquable de ce frottis, oriente vers une anémie hémolytique mécanique. Associée à une thrombopénie profonde, la présence de schizocytes doit orienter vers un diagnostic de microangiopathie thrombotique.

L'importance de la prise en charge biologique était, plus que de poser un diagnostic précis de microangiopathie thrombotique, de signaler la présence de nombreux schizocytes. Il s'agit en effet d'une urgence vitale, dans laquelle le biologiste a un rôle majeur permettant d'orienter le diagnostic dès la revue du frottis et d'alerter le clinicien pour une prise en charge du patient la plus précoce possible.

Par ailleurs, dans le cadre d'une LLC connue, les ombres de Gümprecht doivent être comptées en lymphocytes afin de ne pas sous-estimer la lymphocytose.

figure 4 – éléments caractéristiques du frottis 15BF



Résultats des participants

1 – Analyse des réponses

Le frottis 15BF a été analysé par 1060 laboratoires. Le bordereau-réponse permettait de rendre la formule sanguine, de donner 1 à 4 commentaires sur l'aspect des 3 lignées cellulaires et de formuler 1 ou 2 hypothèses diagnostiques, à choisir dans des listes préétablies. Les différents types de réponses sont détaillés dans le tableau X.

tableau X – types de réponses

Formule	Commentaires	Hypothèses diagnostiques	Nombre de laboratoires
X	X	X	1048
X	X		9
X		X	2
X			1
Total			1060

2 – Formule sanguine

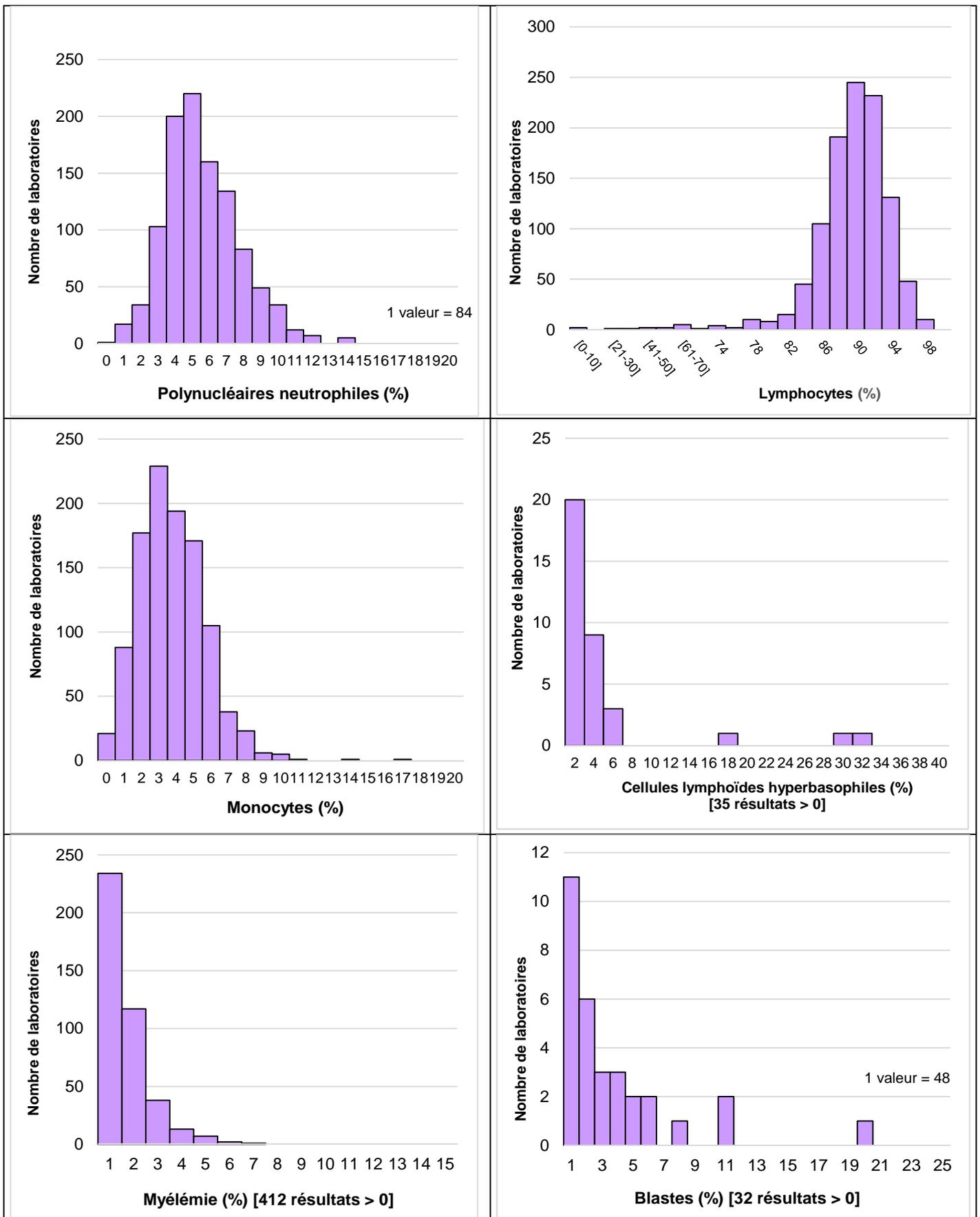
Les résultats des participants figurent dans le tableau XI.

Les histogrammes de distribution des résultats des participants pour les polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, cellules lymphoïdes hyperbasophiles, myélémie et blastes du frottis **15BF** sont présentés sur la figure 5.

tableau XI – résultats des participants du frottis **15BF**

	n	Médiane (%)	Intervalle interquartile (%)
Polynucléaires neutrophiles	1045	5	4 - 7
Polynucléaires éosinophiles	1045	0	0 - 0
Polynucléaires basophiles	1045	0	0 - 0
Lymphocytes	1045	90	87 - 92
Monocytes	1045	4	2 - 5
Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	1045	0	0 - 0
Myélémie / précurseurs granuleux	1045	0	0 - 0
Blastes	1045	0	0 - 0
Autres	1045	0	0 - 0
Erythroblastes	450	0	0 - 0

figure 5 : histogramme de distribution des polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, cellules lymphoïdes hyperbasophiles, myélémie et blastes du frottis **15BF**



3 – Commentaires descriptifs

Le bordereau réponse offrait la possibilité de faire quatre commentaires descriptifs sur les trois lignées cellulaires. Le nombre de laboratoires ayant fait au moins un commentaire est de 1057 ; leur répartition figure dans le tableau XII. Les tableaux XIII, XIV et XV listent les commentaires cités par les laboratoires pour chacune des trois lignées cellulaires.

tableau XII - nombre de commentaires descriptifs du frottis **15BF**

Nombre de commentaires	Nombre de laboratoires
1	54
2	198
3	262
4	543

tableau XIII- commentaires descriptifs du frottis **15BF**: hématies

Commentaires : hématies	Nombre de laboratoires
Schizocytes	939 (88,6 %)
Anisocytose	442 (41,7 %)
Hématies cibles	423 (39,9 %)
Poïkilocytose	355 (33,5 %)
Microcytose	84
Hypochromie	61
Sphérocytes	35
Hématies en rouleaux	34
Dacryocytes (hématies en larme)	22
Anisochromasie	17
Acanthocytes	3
Elliptocytes	2
Polychromatophilie	2
Hématies falciformes	2
Ecchinocytes	2
Corps de Jolly	2
Erythroblastes circulants	2
Macrocytose	1
Ovalocytes	1
Autres anomalies érythrocytaires	1
Commentaire attendu	

tableau XIV - commentaires descriptifs du frottis **15BF**: plaquettes

Commentaires : plaquettes	Nombre de laboratoires
Macroplaquettes	40
Autres anomalies plaquettaires	8
Agrégats plaquettaires	2
Mégacaryocyte circulant	1

tableau XV - commentaires descriptifs du frottis **15BF** : leucocytes

Commentaires : leucocytes	Nombre de laboratoires
Ombres de Gümprecht	794 (74,9 %)
Autres cellules lymphoïdes anormales	39
Myélémie/précurseurs granuleux (PML/ML/MML)	21

Neutrophiles hypergranuleux (granul. "toxiques")	17
Prolymphocytes (nucléole unique évident)	10
Lymphocytes binucléés	6
Neutrophiles hyposegmentés (anom. type Pelger)	5
Neutrophiles hypogranuleux (grains peu visibles)	5
Lymphocytes villeux	5
Cellules blastiques	5
Corps apoptotiques	5
Neutrophiles autres anomalies	4
Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	3
Tricholeucocytes	2
Lymphocytes activés	2
Neutrophiles hypersegmentés(>10%)	1
Grands lymphocytes granuleux (en excès)	1
Cellules de Sézary	1
Cellules plasmocytaires normales ou anormales	1
Commentaire attendu	

4 – Hypothèses diagnostiques

Les laboratoires pouvaient émettre 2 hypothèses diagnostiques dans un ordre décroissant de probabilité : 1050 laboratoires ont rendu au moins un diagnostic. Le nombre de participants ayant rendu une seule hypothèse est de 400 et deux hypothèses de 650.

Le tableau XVI présente par ordre de fréquence l'ensemble des hypothèses diagnostiques émises ainsi que les hypothèses considérées comme les plus probables par les laboratoires. Les pourcentages indiqués entre parenthèses sont calculés par rapport au nombre total de laboratoires ayant participé à l'analyse du frottis soit 1060.

tableau XVI - hypothèses diagnostiques émises sur le frottis 15BF

Diagnostic	Ensemble des hypothèses diagnostiques	Hypothèse diagnostique la plus probable
Microangiopathie thrombotique	652 (61,5 %)	525 (49,5 %)
Leucémie lymphoïde chronique	471 (44,4 %)	317 (29,9 %)
Anémie hémolytique	389 (36,7 %)	143 (13,5 %)
Anémie (autre type)	40	12
Hémopathie lymphoïde chronique (autre type)	36	7
Syndrome myélodysplasique	27	12
Anémie microcytaire hypochrome	17	3
Leucémie/lymphome de l'adulte (ATLL)	9	1
Lymphome splénique à lymphocytes villeux	7	5
Anomalies prédominantes des cellules lymphoïdes	7	4
Leucémie prolymphocytaire	6	4
Phase leucémique de lymphome (autre type)	6	3
Leucémie à tricholeucocytes	4	2
Lymphocytose non spécifique	4	1
Leucémie aiguë lymphoblastique	3	3
Anomalies prédominantes des plaquettes	3	-
Lymphome à cellules du manteau	2	2
Lymphocytose à lymphocytes binucléés	2	1
Leucémie aiguë autre	2	-
Splénomégalie myéloïde / myélofibrose primaire	2	2
Anomalie de l'hémoglobine	2	1
Myélémie	2	-
Autre parasitose	2	-

Myélome	1	-
Lymphome à grandes cellules	1	1
Syndrome myéloprolifératif (autre type)	1	-
Leucémie myéloïde chronique (phase accélérée)	1	-
Pathologie constitutionnelle (autre type)	1	1

Diagnostic attendu
Diagnostic acceptable
Diagnostic inapproprié
Diagnostic erroné : toutes les hypothèses diagnostiques différentes des hypothèses attendues, acceptables ou inappropriées sont considérées comme erronées.

5 – Bilan des réponses au frottis

Le frottis 15BF comportait 90 % de lymphocytes que les laboratoires participants ont dénombré avec une faible dispersion (CV 3,1 %). Ce frottis était caractérisé par la présence de schizocytes, signalés par 88,6 % des laboratoires, élément d'orientation vers la pathologie à diagnostiquer, et d'ombres de Gümprécht, identifiées par 75 % des laboratoires, en relation avec la leucémie lymphoïde chronique énoncée dans le cas clinique. L'anisocytose et la poïkilocytose mises en évidence par respectivement 42 et 33 % des laboratoires sont complémentaires de la schizocytose. Les schizocytes ont été dénombrés spontanément par 163 laboratoires qui ont rendu un résultat médian de 4 % (1). Des hématies cibles ont été citées par 39,9 % des laboratoires. La présence de ces quelques hématies cibles et d'une légère microcytose peut supposer une pathologie mineure du globule rouge sous-jacente.

Alors que presque 9 laboratoires sur 10 ont vu les schizocytes, l'hypothèse diagnostique attendue (microangiopathie thrombotique) n'a été rendue que par 61,5 % des participants et, comme la plus probable, par 50 %.

En revanche, 830 laboratoires (78,3 %) ont rendu au moins une des deux hypothèses diagnostiques : microangiopathie thrombotique (réponse attendue) ou anémie hémolytique (réponse acceptable).

Parmi les 200 laboratoires qui n'ont rendu ni microangiopathie thrombotique ni anémie hémolytique, la plupart ont rendu le diagnostic de leucémie lymphoïde chronique, seul diagnostic rendu pour la moitié d'entre eux. Le diagnostic de leucémie lymphoïde chronique figurant dans l'énoncé du cas clinique est de fait une réponse acceptable, alors qu'il ne constituait pas à la lecture de ce frottis le diagnostic le plus pertinent ni le plus évocateur d'un caractère d'urgence. On rappelle que dans le cadre d'une leucémie lymphoïde chronique connue, les ombres de Gümprécht (« smudge cells ») doivent être comptées dans les lymphocytes (2) afin de ne pas sous-estimer la lymphocytose.

A titre de comparaison, sur le frottis de microangiopathie thrombotique de l'opération de 2009 (09AF), la présence de schizocytes avait été rendue par 78 % des 1735 laboratoires. Le diagnostic « microangiopathie thrombotique » ne figurant pas dans les diagnostics proposés en 2009, le diagnostic « anémie hémolytique » avait été rendu par 92 % des laboratoires. Le taux de réponse attendue (anémie hémolytique et/ou microangiopathie thrombotique) est moins élevé en 2015 qu'en 2009 (78,3 % *versus* 92 %) mais le cas de 2015 présente la particularité de comporter une pathologie additionnelle (leucémie lymphoïde chronique). Le point positif est que la détection des schizocytes s'est améliorée par rapport à 2009 (88,6 % *versus* 78 %).

6 – Score

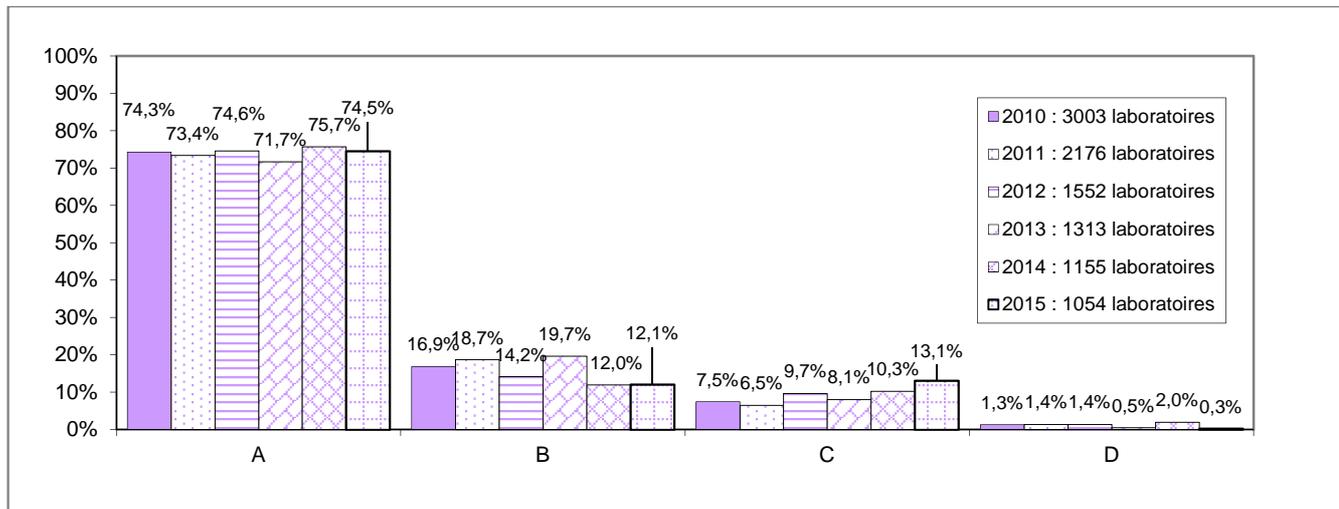
Les résultats des frottis sanguins ont été évalués sur la base d'un score prenant en compte pour chaque laboratoire le pourcentage de lymphocytes, les commentaires et les hypothèses diagnostiques.

Les critères étaient un compte de lymphocytes ≥ 80 % ou compris entre 72 et 80 % ou <72 %. Le commentaire pris en compte dans le score était exclusivement la présence de schizocytes. Enfin, était retenu le meilleur des deux diagnostics rendus : microangiopathie thrombotique (coté 4), anémie hémolytique (coté 3), leucémie lymphoïde chronique (coté 2) ; les diagnostics inappropriés : anémie (autre type), anomalies prédominantes des cellules lymphoïdes, anomalies prédominantes des plaquettes, anomalie de l'hémoglobine, myélémie et pathologie constitutionnelle (autre type) étaient cotés 1, alors que les autres diagnostics, erronés, étaient cotés 0.

L'application de ce score a permis d'évaluer les réponses des laboratoires en A (Bonne réponse), B (Réponse acceptable), C (Réponse à contrôler) et D (Réponse erronée). Une évaluation A ou B a été obtenue par 86,6 % des laboratoires. Les 3 laboratoires ayant obtenu D ont dénombré moins de 66 % de lymphocytes, n'ont pas signalé de schizocytes et ont rendu des diagnostics erronés.

La figure 6 montre la répartition des scores pour l'analyse « frottis sanguin », relativement stable, entre 2010 et 2015.

figure 6 : répartition des scores - années 2010 à 2015



Commentaires

La priorité absolue pour ce cas d'anémie aiguë mal tolérée était la reconnaissance des schizocytes et dans une moindre mesure leur dénombrement. Quel que soit le degré de spécialisation d'un laboratoire, toute anémie hémolytique et/ou régénérative doit mener à un examen morphologique attentif des globules rouges à la recherche d'une pathologie constitutionnelle ou acquise. En particulier, le paludisme, la drépanocytose et la présence de schizocytes dans le cadre d'une microangiopathie thrombotique peuvent mettre en jeu le pronostic vital du patient à court terme. Bien qu'il n'existe pas de corrélation absolue entre le pourcentage de schizocytes et la gravité du tableau clinique, il est important de retenir quelques valeurs seuils : au-delà de 1 %, il existe presque toujours une expression clinique de la maladie (coagulation intravasculaire disséminée, insuffisance rénale, signes neurologiques). Entre 0,5 % et 1 %, l'expression peut s'avérer moins franche mais une surveillance évolutive est nécessaire au minimum toutes les 24 heures. En deçà de 0,5 %, l'expression clinique est généralement fruste ou absente. Il existe néanmoins des microangiopathies intra-organe sans schizocytes circulants, diagnostiquées par exemple sur la biopsie rénale.

Dans cet exercice simple, compte tenu du nombre et des formes typiques présentes sur ce frottis : hématies en triangle, en casque, en « tête de chat », un laboratoire sur dix n'a pas reconnu les schizocytes alors que le cas clinique signalait explicitement une anémie hémolytique. Cette statistique est en amélioration (+10 %) par rapport au cas de 2009 mais doit encore progresser.

Une piste de progression pourrait être l'utilisation d'automates. En fonction des technologies utilisées, les automates signalent avec plus ou moins d'exactitude la présence de fragments d'hématies. Dans la plupart des cas cependant, il s'agit d'une poïkilocytose non spécifique et pas nécessairement de schizocytes, ce qui pourrait mener à un taux de relecture sur lame inadapté dans les structures qui tendent désormais vers le moyen voire le haut débit. Les lecteurs de lames automatisés (« scanners de lames »), tels notamment les systèmes Sysmex DI 60 et Siemens DM, couplés aux automates de cytologie présentent à cet égard de multiples intérêts : la réalisation du frottis peut être soumise à une règle d'expertise informatisée et donc stable, l'acquisition automatisée des champs constitue un gain de temps et permet si nécessaire une relecture par un second opérateur, enfin les lecteurs-scanners sont désormais capables de caractériser la morphologie des éléments, en particulier des hématies. En outre, l'archivage des cas contribue à l'habilitation et au maintien des compétences des techniciens comme des biologistes.

Bibliographie

- 1- ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. 2012 - G. Zin, G. D'Onofrio, C. Briggs, W. Erber, J. M. Jou, S. H. Lee, S. McFadden, J. L. Vives-Corrons, N. Yutaka, J. F. Lesesve – International Council for Standardization in Haematology - Int. Jnl. Lab. Hem. 2012, 34 (2) : 107-116
- 2- ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. L. Palmer, C. Briggs, S. McFadden - International Council for Standardization in Haematology - Int. Jnl. Lab. Hem. 2015, 37 (3) : 287-303

Conclusion

L'opération 15HEM2 comportait deux échantillons pour dosage des D-dimères, ainsi qu'un frottis sanguin.

Les D-dimères ont été déterminés par 968 laboratoires. L'échantillon 15B3 « négatif » a été rendu proche de la limite de détection ou de la limite inférieure de linéarité de la plupart des réactifs. La réponse au cas clinique proposé a été en faveur de l'exclusion du diagnostic de maladie thromboembolique veineuse pour 93 % des participants. L'échantillon 15B4 de concentration plus élevée a montré une dispersion inter-réactifs importante (selon les réactifs, moyennes de 603 à 1685 ng/mL sur cet échantillon de contrôle lyophilisé). Toutefois, les résultats supérieurs au seuil permettent une conclusion diagnostique similaire avec une dispersion intra-réactifs satisfaisante, en amélioration par rapport à 2006. Le cas clinique associé concernait un patient de 85 ans, ce qui a permis de communiquer l'information concernant les seuils adaptés à l'âge, au-delà de 50 ans, et en fonction du type de thrombose suspectée.

Le frottis 15BF, provenant d'un patient dont le cas clinique orientait notamment vers une anémie hémolytique, était caractérisé par la présence de schizocytes à un taux significatif signalés par 88,6 % des 1060 laboratoires participants. Les hypothèses diagnostiques attendue (microangiopathie thrombotique) ou acceptable (anémie hémolytique) ont été rendues par 78,3 % des laboratoires. Plus que de poser un diagnostic précis de microangiopathie thrombotique, l'important était, dans ce contexte d'urgence, de signaler dès la lecture du frottis la présence de schizocytes dont la quantification peut être importante en pratique.