

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Dosage des hémoglobines A2 et F
Activité anti-Xa
Frottis sanguin (leucémie à tricholeucocytes)

Stéphanie ALBAREDE et Anne GUYARD (Afssaps)
Josiane BARDAKDJIAN-MICHAU (CHU Henri Mondor – Créteil)
Marie-Hélène HORELLOU (Hôtel-Dieu - Paris)
Nicole CASADEVALL et Christophe MARZAC (Hôtel-Dieu - Paris)

Expédition : 17 novembre 2004

Clôture : 13 décembre 2004

Edition des compte-rendus individuels :

Paramètres contrôlés : **04CH – Dosage des hémoglobines A2 et F**
04B3 – Activité anti-Xa
04CF – Frottis sanguin

Nombre de laboratoires concernés* : 4230

Nombre de laboratoires participants** : 3948

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer les analyses concernées par l'envoi

**Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

Selon leur activité déclarée, les laboratoires ont reçu un échantillon 04CH pour dosage de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F, un échantillon 04B3 pour dosage de l'activité anti-Xa avec présentation du cas clinique et un frottis sanguin 04CF coloré au MGG pour détermination de la formule sanguine et proposition d'hypothèses diagnostiques.

Sur l'échantillon 04CH d'un sujet non porteur d'anomalie de l'hémoglobine, la moyenne des résultats des 305 participants ayant effectué le dosage de l'hémoglobine A2 est de 2,51 % (CV = 16,3 %). En outre, 90,4 % des laboratoires ont rendu un résultat d'hémoglobine F inférieur à 1 %. Par rapport à 2002 et suite aux recommandations de la SFBC, l'utilisation de l'HPLC a augmenté de 4 % au dépens de l'électrophorèse.

Le dosage de l'activité anti-Xa par 1506 laboratoires montre une réduction de la dispersion des résultats par rapport à l'opération de l'année 2003 (CV = 14,5 % en 2004 versus 19,1 % en 2003) pour un résultat à 0,86 UI/ml. Compte tenu du cas clinique présenté (patient équilibré en héparine de bas poids moléculaire) et de la zone thérapeutique recommandée, 87 % des laboratoires ont jugé qu'il n'était pas nécessaire de réduire les doses.

Sur les 3732 participants ayant analysé le frottis d'une « leucémie à tricholeucocytes », 65 % des laboratoires ont rendu la réponse attendue. Le corollaire de ce diagnostic était l'absence de monocytes sur le frottis.

Méthode statistique et exploitation des résultats

Les paramètres statistiques : effectif, moyenne et écart-type sont calculés à partir des données fournies par les laboratoires. Les paramètres statistiques sont ensuite recalculés après une troncature à 3 écarts-types. Dans les tableaux de résultats figurent, pour les groupes supérieurs à 10 participants, les effectifs non tronqués (n), les effectifs tronqués (nTr), la moyenne tronquée (mTr), l'écart-type tronqué (sTr) et le coefficient de variation tronqué (CVTr) calculé par la formule $100 \times sTr / mTr$. Pour les résultats de la formule sanguine, la médiane a été calculée car seuls les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes présentent une répartition gaussienne des valeurs.

Echantillon 04CH

Dosage des hémoglobines A2 et F

Définition de l'échantillon

L'échantillon 04CH provenait d'un sang frais natif d'un sujet sain non porteur d'anomalie de l'hémoglobine.

Les résultats des experts J. BARDAKDJIAN-MICHAU, Créteil – R. DUCROCQ, Paris – P. MABOUDOU, Lille – A.M. SOUMMER, Nice – sont présentés dans le tableau I.

tableau I – résultats des experts

	Réactif	HbA2 (%)	HbF (%)
Expert 1	Biorad Variant II HbA2/HbA1c Dual programm	2,1	0,2
Expert 2	Biorad Variant II HbA2/HbA1c Dual programm	2,1	0,2
Expert 3	Biorad Variant bêta thalassemia short programm	2,7	0
Expert 4	Biorad Variant bêta thalassemia short programm	2,6	0,2

Résultats des participants

L'échantillon 04CH a été adressé aux 407 inscrits pour l'item « étude des hémoglobinopathies » et 309 réponses ont été collectées pour l'ensemble HbA2 et/ou HbF.

La date d'analyse de l'échantillon a été recueillie et montre que 81 % des dosages ont été effectués au cours de la semaine qui a suivi l'expédition des flacons.

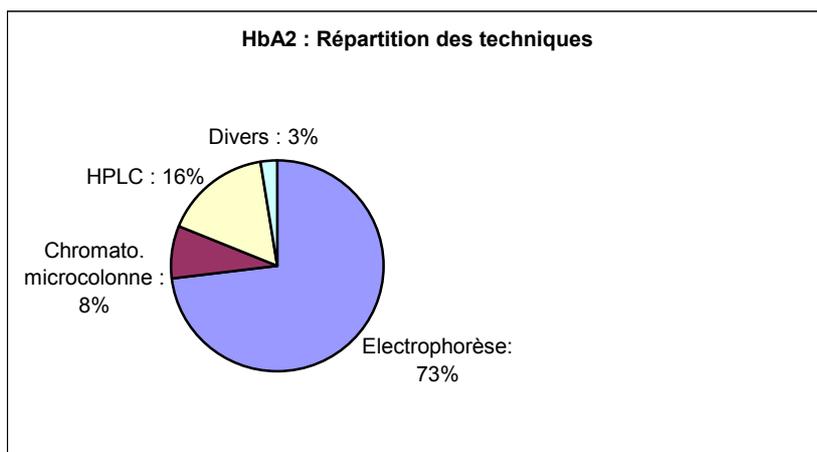
1 – Hémoglobine A2

L'analyse des 305 résultats est présentée sur les tableaux II et la figure 1.

tableau II – résultats Hémoglobine A2

Réactif HbA2	n	nTr	mTr (%)	sTr (%)	CVTr (%)
Ensemble des résultats	305	277	2,51	0,41	16,3
Electrophorèse	222				
BECKMAN COULTER Hb (Paragon) EP pH alcalin	2				
HELENA bandes acétate Titan III-H hémoglobine	14	12	2,36	0,41	17,3
HELENA kit Titan Hb-alc	16	16	2,46	0,52	21,3
HELENA kit REP Hb alcalines	7				
HELENA SAS-1 Hb-alcaline	1				
SEBIA Hydragel (7/15) Hb	133	123	2,62	0,47	17,9
SEBIA Hydragel Hémoglobine K20	49	46	2,68	0,45	16,7
Chromatographie sur microcolonne	25				
BIORAD HbA2 sur microcolonne	4				
HELENA coffret bêta-thal HbA2	19	16	2,56	0,29	11,5
HELENA coffret sickle-thal quick column	2				
Chromatographie liquide haute performance	50				
BIORAD Variant bêta thalassemia short programm	23	22	2,44	0,23	9,4
BIORAD Variant II HbA2/HbA1c Dual programm	22	18	2,05	0,12	5,6
BIORAD Variant Hemoglobinopathy programm	2				
BIORAD D-10 HbA2/HbF/HbA1c Dual kit programm	2				
HPLC (divers réactifs)	1				
Autres ou non précisé	8				

figure 1 – répartition des techniques Hémoglobine A2



2 – Hémoglobine F

Le tableau III et la figure 2 présentent les réactifs utilisés pour le dosage de l'hémoglobine F par les 293 laboratoires participants. Compte tenu du type des valeurs rendues pour l'hémoglobine F : 264 valeurs chiffrées (dont 187 résultats à zéro) et 29 valeurs semi-quantitatives (« inférieures à ...»), les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes. Les résultats semi-quantitatifs, inférieurs à un seuil, sont rendus avec des réactifs d'électrophorèse ou de chromatographie liquide haute performance (HPLC). Les résultats quantitatifs apparaissent en figure 3 et les résultats semi-quantitatifs en figure 4. On constate que 265 laboratoires sur 293 soit 90,4 % ont rendu un résultat d'HbF inférieur à 1 %.

tableau III – réactifs Hémoglobine F

Réactifs HbF	Nombre d'utilisateurs
Electrophorèse	205
BECKMAN COULTER Hb (Paragon) EP pH alcalin	2
HELENA bandes acétate Titan III-H hémoglobine	15
HELENA kit Titan Hb-alc	15
HELENA kit REP Hb alcalines	4
HELENA SAS-1 Hb-alkaline	1
SEBIA Hydragel (7/15) Hb	122
SEBIA Hydragel Hémoglobine K20	46
Chromatographie sur microcolonne	1
HELENA coffret béta-thal HbA2	1
Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	62
BIORAD Variant II HbA2/HbA1c Dual programm	26
BIORAD Variant béta thalassemia short programm	21
BIORAD Variant Hemoglobinopathy programm	2
BIORAD D-10 HbA2/HbF/HbA1c Dual kit programm	2
MENARINI HA-8160 mode diabète	5
TOSOH BIOSCIENCE HLC 723 G7	5
HPLC (divers réactifs)	1
Immunodiffusion radiale	2
HELENA Hb fœtale par IDR	2
Résistance à la dénaturation alcaline	14
Technique de Betke	14
Autres ou non précisé	9

figure 2 – répartition des techniques Hémoglobine F

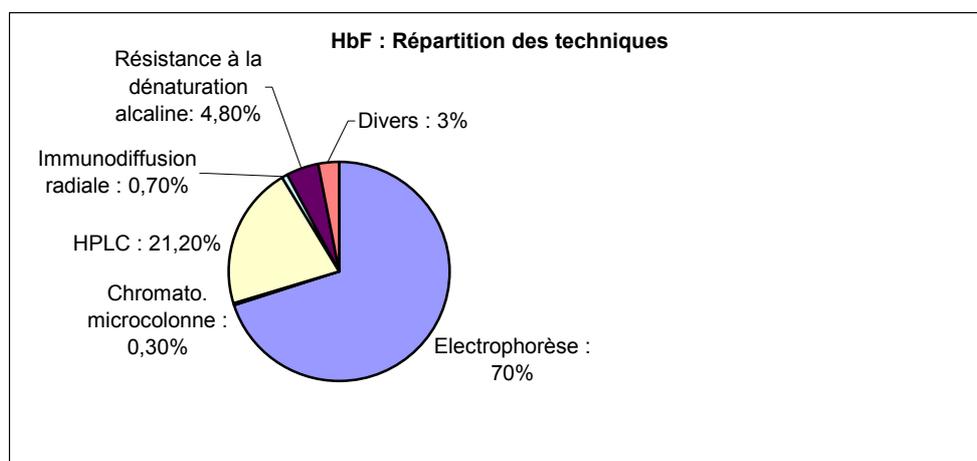


figure 3 – résultats Hémoglobine F quantitatifs (264 valeurs)

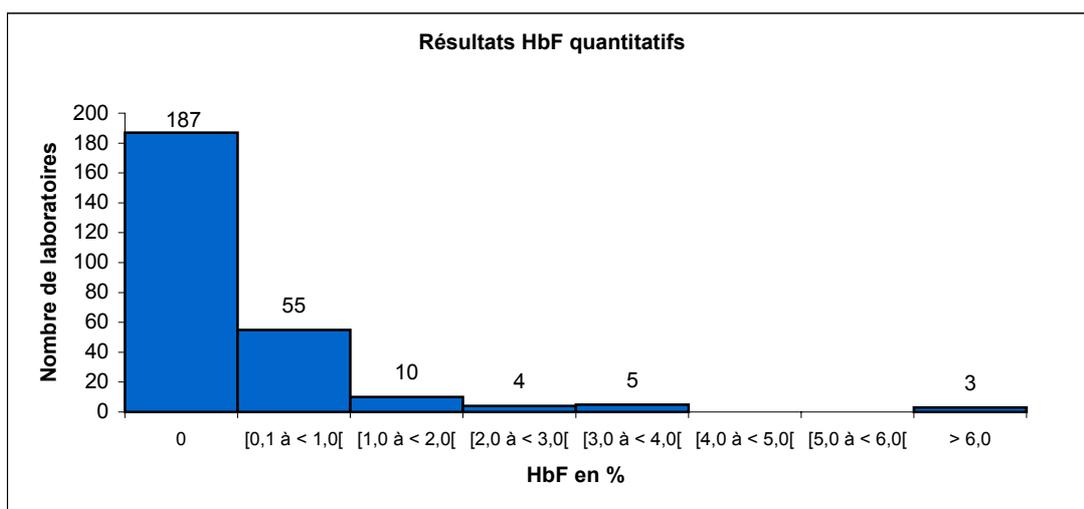
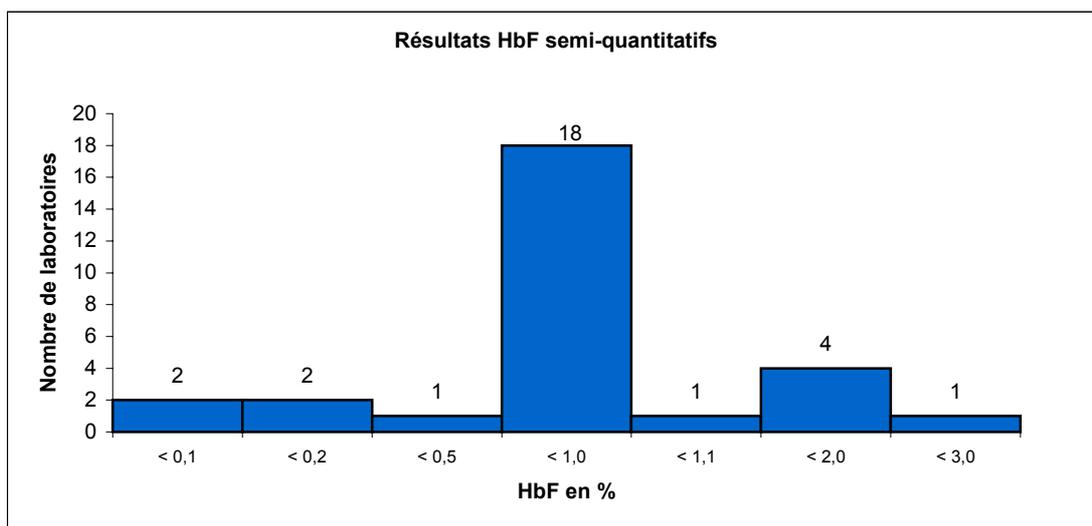


figure 4 – résultats Hémoglobine F semi-quantitatifs (29 valeurs)



Commentaires

L'effectif de 305 laboratoires participants est relativement stable comparé à l'opération de 2002 qui avait rassemblé 321 laboratoires. L'évolution de l'utilisation des différentes techniques est présentée sur le tableau IV. On note que l'utilisation de l'électrophorèse diminue de 2 % pour l'HbA2 et l'HbF. Quant à l'HPLC, on constate une progression de 4 et 5 % respectivement. Cette progression est faible compte tenu des recommandations SFBC (1) parues en 2003 qui préconisent le dosage de l'HbA2 en microcolonne ou en HPLC et le dosage de l'HbF par la méthode de Betke (résistance à la dénaturation alcaline) ou en HPLC.

tableau IV – Evolution de l'utilisation des techniques

	Effectifs (%)			
	HbA2		HbF	
	2002	2004	2002	2004
Electrophorèse	75	73	72	70
Chromatographie sur microcolonne	10	8	-	<1
HPLC	12	16	16	21
Immunodiffusion radiale	-	-	1	1
Résistance à la dénaturation alcaline	-	-	6	5

Pour les laboratoires qui ont trouvé des fractions anormales, il faut s'assurer que le prélèvement a été conservé à + 4°C et que l'hémolysat a été effectué dans les bonnes conditions.

L'analyse des résultats d'HbA2 montre que l'ensemble des groupes techniques est situé dans la zone basse de la fourchette des normales (2,2 à 3,2 %) (1), la moyenne des résultats des experts étant de 2,38 %.

La différence de résultats entre les réactifs Biorad Variant β thalassemia short programm et Variant II Dual programm est due à la différence de composition de la phase mobile (2).

L'ensemble des réactifs d'électrophorèse montre des CV plus élevés (CV > 16 %) que ceux des réactifs chromatographiques (CV < 10 %).

Cette observation démontre que pour des valeurs à la limite supérieure de la normale, par exemple 2,9 à 3,1 %, ces laboratoires concluraient à une présence de β -thalassémie, s'ils ne disposaient pas de la valeur du VGM, ce qui est le cas le plus souvent. En effet, une HbA2 augmentée sans microcytose doit interpeller le biologiste.

Par ailleurs, la différence de résultats entre les deux réactifs Biorad rappelle qu'il est nécessaire de déterminer les valeurs normales pour chaque réactif voire pour chaque laboratoire.

Cette opération du Contrôle national de qualité démontre, si cela est encore nécessaire, que la quantification des fractions mineures (notamment l'hémoglobine A2) par densitométrie (intégration de l'électrophorèse) est à proscrire (1).

Bibliographie

(1) Groupe de travail SFBC « Recommandations dans le domaine des diagnostics des hémoglobinopathies » : J. Bardakdjian-Michau, J.L. Dhondt, R. Ducrocq, F. Galactéros, A. Guyard, F.X. Huchet, A. Lahary, D. Lena-Russo, P. Maboudou, M.L. North, C. Prehu, A.M. Soummer, M. Verschelde, H. Wajcman. « Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine ». Annales de Biologie Clinique, juillet-août 2003, vol. 61, n° 4, p401-409.

(2) Evaluation of the Bio-Rad VARIANTtm II HbA₂/HbA_{1c} Dual Program for measurement of haemoglobin concentrations and detection of variants : J.Riou, C.Godart, M.Mathis, D.Hurtrel, H.Wajcman, C.Prehu and J. Bardakdjian. Clin Chem Lab Med 2005, vol. 43, n° 2, p237-243

Echantillon 04B3 Activité anti-Xa

Définition des échantillons

L'échantillon 04B3 est un plasma lyophilisé d'origine humaine.

Les résultats des experts Dr M-H. HORELLOU, Paris - Dr M-F. AILLAUD, Marseille - Dr M. ALHENC-GELAS, Paris – Pr. B. BONEU, Toulouse - Dr E. FRESSINAUD, Nantes - Dr M. WOLF, Clamart – sont présentés dans le tableau V.

tableau V – résultats des experts : activité anti-Xa – échantillon 04B3

	Réactif	Technique	Résultat 04B3 Anti-Xa UI/ml	Réponse au cas clinique *
Expert n°1	BIOGENIC Biophen heparin 3/6	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	1,04	« Non »
Expert n°2	BIOGENIC Biophen Heparin 3/6	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	0,94	« Non »
Expert n°3	IL Coamatic Héparine	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	0,84	« Non »
Expert n°4	STAGO STA Rotachrom heparin	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	0,77	« Non »
Expert n°5	STAGO STA Rotachrom heparin	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	0,79	« Oui »
Expert n°6	STAGO STA Rotachrom heparin	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	0,83	« Non »
	IL Coamatic Héparine	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	0,81	

* voir énoncé dans le chapitre cas clinique

Résultats des participants

Le nombre de participants (1506) a encore diminué depuis 2003 (tableau VI). Il avait baissé de 21,3 % en 2003 par rapport à 2000 et en un an, le nombre de participants s'est encore réduit de 13,7 %.

Douze réactifs différents ont été utilisés par les participants (tableau VII). Les réactifs de la société Stago représentent 79 % des réactifs utilisés.

On note une amélioration de la dispersion des résultats (tableau VII). Pour une valeur cible identique, le CV a diminué d'un quart entre 2003 (19,1 %) et 2004 (14,5 %). L'analyse statistique des résultats par groupe technique est présentée dans le tableau VII. Les coefficients de variation vont de 6,2 % à 38,3 %.

tableau VI – résultats de l'activité anti-Xa en 2000, 2003 et 2004

	Nombre de participants	Activité anti-Xa	
		mTr (UI/ml)	CVTr (%)
Echantillon 00A4 (2000)	2219	0,70	18,9
Echantillon 03B4 (2003)	1745	0,86	19,1
Echantillon 04B3 (2004)	1506	0,83	14,5

tableau VII – résultats de l'activité anti-Xa – échantillon 04B3

Réactif	Technique	Activité anti-Xa 04B3				
		n	nTr	mTr (UI/ml)	sTr (UI/ml)	CVTr (%)
ENSEMBLE DES RESULTATS	Toutes techniques confondues	1506	1475	0,83	0,12	14,5
BIOGENIC Biophen Heparin 3/6	Toutes techniques confondues	97	95	0,95	0,07	7,8
	BIOMERIEUX Thrombolyzer	26	26	0,97	0,06	6,4
	DADE BEHRING / SYSMEX CA	13	13	0,94	0,10	10,4
	DADE BEHRING BCT/BCS	21	21	0,95	0,07	7,1
	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	27	27	0,96	0,07	6,8
BIOMERIEUX Chromostrate Heparin anti-Xa		5				
BIOPEP Chromopep 3/6	Toutes techniques confondues	24	24	0,89	0,14	15,6
DADE BEHRING Berichrom Héparine		7				
IL Coacute héparine	Toutes techniques confondues	13	13	0,64	0,24	36,5
	Spectrophotomètre	12	12	0,64	0,24	38,3
IL Coamatic Héparine	Toutes techniques confondues	11	11	0,82	0,10	11,7
IL HemosIL héparine	Toutes techniques confondues	138	134	0,89	0,10	10,7
	IL ACL	129	125	0,89	0,10	10,8
IL Coatest héparine		5				
INGEN Accucolor heparin kit		4				
STAGO STA Rotachrom heparin	Toutes techniques confondues	655	643	0,78	0,07	8,4
	DADE BEHRING BCT/BCS	16	15	0,79	0,05	6,2
	ROCHE Hitachi	19	18	0,82	0,10	12,3
	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	569	561	0,78	0,07	8,4
STAGO STA Staclot heparin	Toutes techniques confondues	476	462	0,87	0,14	16,5
	Agitation manuelle	23	23	0,85	0,17	20,0
	Bain électromagnétique	14	14	0,86	0,16	18,1
	BIOMERIEUX Option	61	61	0,82	0,18	22,2
	DADE BEHRING / SYSMEX CA	11	11	0,98	0,14	14,8
	Epsilon	14	14	0,81	0,17	20,3
	SIGMA / AMELUNG KC	25	24	0,90	0,19	20,6
	STAGO ST4, START	182	178	0,89	0,16	17,9
	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	117	116	0,85	0,08	9,7
STAGO Stachrom heparin	Toutes techniques confondues	37	37	0,81	0,10	12,0
	STAGO STA, STAR, STACompact, Satellite	19	19	0,79	0,08	9,6
Autres ou non précisé		31				

Cas clinique

Le cas clinique suivant accompagnait l'échantillon 04B3 : « Le plasma 04B3 est celui d'un patient de 77 ans, dont la clairance de la créatinine calculée à l'aide de la formule de Cockcroft, est de 50 ml/min. Il est traité par HBPM (héparine de bas poids moléculaire) Innohep® : 175 UI/Kg, 1 fois par 24 heures pour une thrombose fémoro-poplitée gauche. Le prélèvement a été fait le 4ème jour de traitement par HBPM, 4 heures après l'injection. **Le résultat de l'activité anti-Xa fait-il envisager une modification des doses ?** ».

Nous avons recensé 1387 réponses dont 180 « oui » soit 13 % et 1207 « non » soit 87 %.

La moyenne des résultats des participants au dosage de l'activité anti-Xa ayant répondu « oui » est de 0,88 UI/ml contre 0,82 UI/ml pour ceux ayant répondu « non ». Selon le test T de Student, la moyenne des résultats correspondant à la réponse « oui » est très significativement supérieure à celle des résultats correspondant à la réponse « non ».

La réponse « non » a très souvent été accompagnée d'un commentaire de type « à surveiller compte tenu de la clairance de la créatinine basse ».

Cinq experts sur six ont répondu « non » au cas clinique (voir tableau V).

L'expert n°1 a donné le commentaire suivant : « le cas est bien choisi : obligation de surveillance chez les insuffisants rénaux. On ne se trouve pas en zone de surdosage ».

L'expert n°2 a fait l'observation suivante : « Sur le plasma 04B3 dont il fallait mesurer l'héparinémie, nous avons trouvé la valeur de 0,94 unités/ml. Cette valeur est proche de la valeur cible qui est donnée dans le Vidal pour Innohep® administrée une fois par jour à la dose de 175 U/kg. Je pense donc qu'il n'est pas nécessaire de modifier la dose ».

L'expert n°3 a fait les remarques suivantes : « le patient, âgé de 77 ans, a une légère insuffisance rénale (clairance de la créatinine calculée à 50 ml/min) qui ne contre-indique pas la prescription de HBPM à doses curatives. La dose de 175 UI anti-Xa/kg en une injection par jour est correcte. Compte tenu de l'âge du patient et de la fonction rénale, la recommandation de surveillance de l'activité anti-Xa après plusieurs administrations afin de détecter une possible accumulation, a été appliquée, avec un prélèvement réalisé à un horaire adapté, c'est à dire 4 heures après une injection. L'activité anti-Xa détectée chez le patient est de 0,84 UI/ml, ce qui est tout à fait conforme à la valeur attendue. Il n'y a donc pas de modification de dose à envisager. Un contrôle ultérieur peut être réalisé 2 à 3 jours plus tard ».

Commentaires

Les modalités de la surveillance biologique ont été redéfinies dans les recommandations de l'Afssaps en 2002 (1) et la zone thérapeutique habituelle des HBPM située entre 0,5 et 1 UI/ml anti-Xa a été révisée (cf Vidal 2005).

La majorité des études cliniques qui ont démontré l'efficacité des HBPM, ayant été conduites avec une dose adaptée au poids et sans surveillance particulière, l'utilité d'une surveillance biologique n'a pas été établie pour apprécier l'efficacité d'un traitement par HBPM. Toutefois la surveillance biologique, par détermination de l'activité anti-Xa peut être utile pour gérer le risque hémorragique, dans certaines situations fréquemment associées à un risque de surdosage. Ces situations concernent essentiellement les indications curatives des HBPM, en raison des doses administrées, quand existent :

- une insuffisance rénale légère à modérée (clairance estimée selon la formule de Cockcroft de l'ordre de 30 ml/min à 59 ml/min) (2) : en effet contrairement à l'héparine standard non fractionnée, les HBPM s'éliminent en partie par le rein et toute insuffisance rénale peut conduire à un surdosage relatif.

L'insuffisance rénale sévère (15 à 29 ml/min) constitue, quant à elle, une contre-indication à l'utilisation des HBPM aux doses curatives.

- un poids extrême (maigreur voire cachexie, obésité)
- une hémorragie inexplicquée.

A l'inverse, la surveillance biologique (en dehors de la numération de plaquettes) n'est pas recommandée aux doses prophylactiques si le traitement est conforme aux modalités thérapeutiques conseillées (en particulier pour la durée du traitement) ainsi qu'au cours de l'hémodialyse.

Afin de détecter une possible accumulation après plusieurs administrations, il est, le cas échéant, recommandé de prélever le sang du patient au pic maximal d'activité c'est à dire 4 heures après la 3ème injection lorsque le médicament est administré en 2 injections SC par jour.

La répétition du dosage de l'activité anti-Xa tous les 2 ou 3 jours sera discutée au cas par cas en fonction des résultats du dosage précédent et une éventuelle modification de la dose sera envisagée. Pour chaque HBPM et chaque schéma thérapeutique, l'activité anti-Xa générée est différente (tableau VIII).

tableau VIII – Valeurs moyennes d'anti-Xa observées pour des doses curatives d'HBPM au cours des essais cliniques (données : VIDAL 2005)

2 injections par jour	Dose	Activité anti-Xa (UI/ml) mesurée à la 4ème heure après injection
Fragmine®	100 UI/kg	J2 : 0,59 ± 0,25
		J4 : 0,60 ± 0,21
		J6 : 0,62 ± 0,22
		J8 : 0,67 ± 0,21
		J10 : 0,69 ± 0,26
Fraxiparine ®	83 UI/kg	1,01 ± 0,18
Lovenox ®	100 UI/kg	1,20 ± 0,17

1 injection par jour	Dose	Activité anti-Xa (UI/ml) mesurée à la 4ème heure après injection
Fraxodi ®	166 UI/kg	1,34 ± 0,15
Innohep ®	175 UI/kg	0,87 ± 0,15

Le plasma 04B3 est celui d'un patient de 77 ans dont la clairance de la créatinine calculée à l'aide de la formule de Cockcroft est de 50 ml/min. Cette insuffisance rénale modérée justifie la surveillance biologique pour éliminer un risque d'accumulation. La valeur moyenne de l'activité anti-Xa trouvée par les participants est de 0,83 UI/ml chez ce patient traité par Innohep® ; cette valeur est proche de la valeur observée sous Innohep® au cours des essais cliniques (tableau X). Il n'y a donc pas de modification de dose à envisager. Un contrôle ultérieur peut être réalisé 2 à 3 jours plus tard si le traitement est poursuivi jusqu'à efficacité du traitement par anti-vitamine K .

Bibliographie

(1) Mise au point sur les Héparines de bas poids moléculaire – Afssaps - avril 2002

(2) Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte – Recommandation de la Haute Autorité de Santé - 2002

Lame 04CF Frottis sanguin

Définition de l'échantillon

Les laboratoires disposaient du cas clinique suivant :

Mr. L, âgé de 69 ans, arrive aux urgences pour bilan d'une bicytopenie, suite à une numération formule sanguine (NFS) effectuée dans le cadre d'une asthénie. Le patient ne présente aucun antécédent. L'examen clinique met en évidence une splénomégalie isolée. La NFS réalisée au laboratoire montre :

Hémoglobine : 15 g/dl, VGM : 91,4 fL, Hte : 42,4 %, CCMH : 35,4 g/dL, TCMH : 32,3 pg,

Réticulocytes : 45 G/L, Leucocytes : 2,0 G/L, Plaquettes : 34 G/L

Formule rendue par l'automate : PNN : 24%, PNE : 2%, PNB : 0%, Lymphocytes : 66%, Monocytes : 8%.

L'échantillon 04CF, frottis sanguin coloré au MGG, provenait d'un patient présentant une leucémie à tricholeucocytes (figures 5 et 6).

Les experts suivants ont examiné le frottis 04CF : N. CASADEVALL, Paris – Ch. MARZAC, Paris – R. ALTERESCU, 92 Boulogne – J.X. CORBERAND, Toulouse – S. MARION, Villejuif – C. MATHIOT, Paris – F. PICARD, Paris – G. SEBAHOUN, Marseille.

Les résultats de la formule sanguine figurent dans le tableau IX.

tableau IX - résultats attendus

	Valeurs cibles
Polynucléaires neutrophiles	24
Polynucléaires éosinophiles	3
Polynucléaires basophiles	0
Lymphocytes	64
Monocytes	0
Autre catégorie : tricholeucocytes	9

Commentaires des experts : Tricholeucocytes
Réponse attendue : Leucémie à tricholeucocytes

figure 5 - éléments cellulaires caractéristiques du frottis 04CF : tricholeucocytes

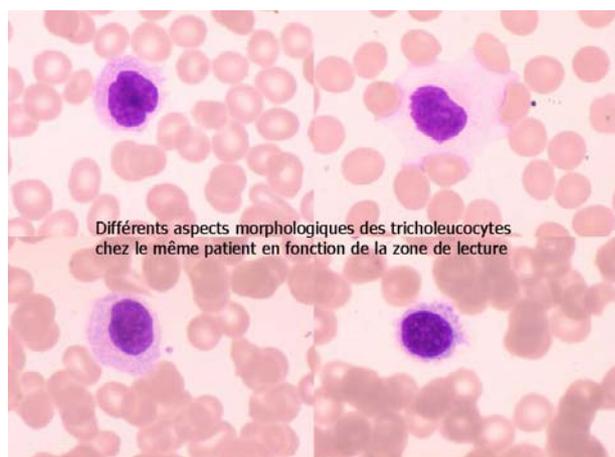
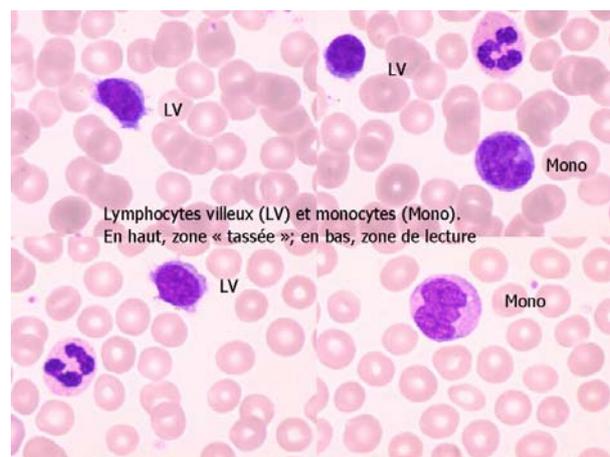


figure 6 : éléments cellulaires pour le diagnostic différentiel : lymphocytes velleux



Ces photos peuvent être consultées et agrandies sur le site internet de l'Afssaps – contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale – bilan 2004 – 04HEM2.

Résultats des participants

1 - Analyse des réponses

Le frottis 04CF a été analysé par 3732 laboratoires. Les différents types de réponses sont détaillées dans le tableau X.

tableau X – types de réponses

Formule	Commentaires	Hypothèses diagnostiques	Nombre de laboratoires
X	X	X	3212
X		X	199
X	X		147
X			170
	X	X	4
		Total	3732

2 - Formule sanguine

Les résultats des participants sont présentés sur le tableau XI.

tableau XI - formule 04CF

	n	moyenne (%)	STr (%)	CVTr (%)	Médiane (%)
Polynucléaires neutrophiles	3728	25,3	3,9	15,5	25
Polynucléaires éosinophiles	3728				2
Polynucléaires basophiles	3727				0
Lymphocytes	3720	64,7	6,7	10,3	65
Monocytes	3723				2
Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	3728				0
Myélémie	3728				0
Blastes	3728				0
Autre catégorie non prévue	3728				2
Erythroblastes	1383				0

Les résultats de la formule rendue par les laboratoires correspondent à ceux fournis dans le cas clinique sauf pour les monocytes (surestimés par l'automate à 8 %) et pour la catégorie « autre » car l'automate n'avait pas signalé de cellules anormales.

Le nombre de monocytes rendu sur la formule figure sur le tableau XII

tableau XII - monocytes

Nombre de monocytes %	Nombre de laboratoires	Nombre de monocytes %	Nombre de laboratoires
0	645	[11– 20]	26
[1 – 5]	2498	[21 – 70]	4
[6 – 10]	554		

Des cellules lymphoïdes hyperbasophiles ont été dénombrées par 467 laboratoires soit 12,5% (tableau XIII).

tableau XIII - cellules lymphoïdes hyperbasophiles

Nombre de CLH %	Nombre de laboratoires	Nombre de CLH %	Nombre de laboratoires
[1 – 5]	277	[31 – 40]	7
[6 – 10]	95	[41 – 50]	4
[11– 15]	30	[51 – 60]	6
[16 – 20]	20	[61 – 70]	6
[21 – 25]	8	[71 – 80]	1
[26 – 30]	13		

Une myélémie a été signalée par 130 laboratoires soit 3,5 % (tableau XIV).

tableau XIV - myélémie

Myélémie %	Nombre de laboratoires	Nombre de CLH %	Nombre de laboratoires
[1 – 5]	125	[11– 15]	3
[6 – 10]	2		

Des blastes ont été rendus par 126 laboratoires soit 3,4 % (tableau XV).

D'après leurs commentaires manuscrits, on peut penser que certains laboratoires ont compté des tricholeucocytes au niveau des blastes, voire même des lymphocytes.

tableau XV - blastes

Nombre de blastes %	Nombre de laboratoires	Nombre de blastes %	Nombre de laboratoires
[1 – 5]	91	[21 – 30]	2
[6 – 10]	21	[31 – 40]	0
[11– 15]	6	[41 – 50]	1
[16 – 20]	4	[51 – 60]	1

L'item « autre catégorie cellulaire » a fait l'objet de réponses de la part de 1983 laboratoires soit 53,1 % (tableau XVI).

tableau XVI - autre catégorie cellulaire

Nombre de « autres » %	Nombre de laboratoires	Nombre de « autres » %	Nombre de laboratoires
[1 – 5]	920	[21 – 30]	48
[6 – 10]	768	[31 – 40]	13
[11– 15]	159	[41 – 50]	4
[16 – 20]	66	[51 – 60]	5

L'item « autre catégorie cellulaire » regroupe ici plusieurs types cellulaires car on relève, pour les laboratoires ayant compté des cellules en « autre catégorie cellulaire », au niveau de l'item « commentaires » 1689 tricholeucocytes, 248 lymphocytes villeux et 1760 commentaires comportant ces deux cellules.

Les laboratoires qui n'ont cité aucune de ces deux cellules signalent, pour la plupart d'entre eux, « autres cellules lymphoïdes anormales » (63 réponses).

Des érythroblastes ont été comptés par 142 laboratoires soit 3,8 % (tableau XVII).

tableau XVII - érythroblastes

Nb d'érythroblastes %	Nombre de laboratoires	Nb d'érythroblastes %	Nombre de laboratoires
[1 – 5]	136	[11 – 30]	3
[6 – 10]	3		

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 3363 ; leur répartition figure dans le tableau XVIII.

tableau XVIII - nombre de commentaires descriptifs du frottis 04CF

Nombre de commentaires	Nombre de laboratoires
1	1337
2	1127
3	535
4	359

Les tableaux XIX, XX et XXI listent les commentaires cités par les laboratoires pour les trois lignées cellulaires.

tableau XIX - commentaires descriptifs du frottis 04CF : hématies

Commentaires : hématies	Nombre de laboratoires
Anisocytose	312
Poikilocytose	87
Hématies en rouleaux	49
Dacryocytes	41
Erythroblastes circulants	24
Hypochromie	22
Anisochromasie	18
Schizocytes	17
Corps de Jolly	14
Macrocytose	9
Ponctuations basophiles	7
Sphérocytose	6
Polychromatophilie	6
Hématies cibles	6
Double population	6
Parasite intraérythrocytaire	4
Ovalocytose	3
Elliptocytose	2
Autres anomalies érythrocytaires	2
Granules de Pappenheimer	2
Hématies falciformes	1

tableau XX - commentaires descriptifs du frottis 04CF : plaquettes

Commentaires : plaquettes	Nombre de laboratoires
Macroplaquettes	482
Autres anomalies plaquettaires	92
Agrégats plaquettaires	10
Mégacaryocyte circulant	6

tableau XXI - commentaires descriptifs du frottis 04CF : leucocytes

Commentaires : leucocytes	Nombre de laboratoires
Tricholeucocytes	2166
Grands lymphocytes granuleux	854
Cellules lymphoïdes encochées ou à noyau irrégulier	590
Lymphocytes « villeux »	480
Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	379
Autres cellules lymphoïdes anormales	317
Ombres de Gümprrecht	124
Neutrophiles hyposegmentés (anomalie type Pelger)	98
Neutrophiles hypogranuleux (grains peu visibles)	70
Lymphocytes binucléés	52
Neutrophiles hypergranuleux (granulations « toxiques »)	49
Cellules plasmocytaires normales ou anormales	38
Neutrophiles hypersegmentés	34
Prolymphocytes (nucléole unique évident)	34
Neutrophiles autres anomalies	26
Cellules blastiques	26
Cellules de Sézary	23
Myélémie/précurseurs granuleux (PML/ML/MML)	22
Immunoblastes	12
Promonocytes ou monocytes immatures	11
Anomalies des éosinophiles	4
Neutrophiles vacuolisés	3
Agrégats de polynucléaires	2
Neutrophiles corps de Döhle	1
Anomalies des basophiles	1

4 - Hypothèses diagnostiques

Les laboratoires pouvaient émettre 3 hypothèses diagnostiques dans un ordre décroissant de probabilité : 3415 laboratoires ont posé au moins un diagnostic. Le nombre de participants ayant rendu une seule hypothèse est de 1739, deux hypothèses de 967 et trois hypothèses de 705.

Le tableau XXII liste l'ensemble des hypothèses diagnostiques émises.

Le tableau XXIII présente par ordre de fréquence l'hypothèse considérée comme étant la plus probable par les laboratoires.

tableau XXII - ensemble des hypothèses diagnostiques émises sur le frottis 04CF

Hypothèses diagnostiques	Nombre de laboratoires
Leucémie à tricholeucocytes	2416
Lymphome splénique à lymphocytes villeux	769
Hémopathie à grands lymphocytes à grains (LGL)	517
Hémopathie lymphoïde chronique (autre type)	288
Lymphocytose non spécifique	211
Affections lymphoïdes non malignes (autre type)	156
Suspicion de syndrome myélodysplasique (autre type)	152
Phase leucémique de lymphome (autre type)	149
Susp. de leucémie/lymphome de l'adulte(ATLL)	95
Syndrome mononucléosique	93
Leucémie lymphoïde chronique	91
Myélofibrose	88
Suspicion de lymphome folliculaire	83
Suspicion de splénomégalie myéloïde	77
Suspicion de lymphome à cellules du manteau	74
Anomalies prédominantes des cellules lymphoïdes	61
Suspicion de métastases médullaires	44
Suspicion de leucémie aiguë lymphoblastique	39
Suspicion de lymphome à grandes cellules	38
Anomalies prédominantes des plaquettes	37
Suspicion de syndrome myéloprolifératif (autre type)	30
Pathologie myéloïde non spécifique (autre type)	29
Leucémie lymphoïde chronique "mixte"	26
Suspicion de leucémie aiguë autre	26
Leucémie prolymphocytaire	25
Autre parasitose	23
Plasmocytose ou lymphoplasmocytose non spécifique	21
Anomalies prédominantes des granuleux	21
Sang normal pour la classe d'âge	17
Thrombocythémie ou thrombocytose	17
Pathologie constitutionnelle (autre type)	17
Lymphocytose à lymphocytes binucléés	12
Suspicion d'anémie réfractaire	11
Suspicion de leucémie aiguë myéloïde	7
Monocytose	7
Paludisme	6
Polyglobulie	5
Anémie (autre type)	5
Leucémie myéloïde chronique	4
Myélémie	4
Suspicion de leucémie myélomonocytaire chronique	3
Suspicion d'anémie mégaloblastique	3
Anémie hémolytique	2
Erythroblastose	2
Suspicion de leucémie aiguë monocytaire	1
Anémie macrocytaire	1
Suspicion d'anomalie de l'hémoglobine	1
Eosinophilie	1

tableau XXIII - hypothèse diagnostique la plus probable émise sur le frottis 04CF

Hypothèse diagnostique la plus probable	Nombre de laboratoires
Leucémie à tricholeucocytes	2166
Hémopathie à grands lymphocytes à grains (LGL)	253
Lymphome splénique à lymphocytes villeux	196
Lymphocytose non spécifique	126
Suspicion de syndrome myélodysplasique (autre type)	91
Leucémie lymphoïde chronique	57
Affections lymphoïdes non malignes (autre type)	52
Syndrome mononucléosique	47
Phase leucémique de lymphome (autre type)	44
Suspicion de splénomégalie myéloïde	42
Hémopathie lymphoïde chronique (autre type)	39
Suspicion de lymphome folliculaire	35
Susp. de leucémie/lymphome de l'adulte (ATLL)	30
Suspicion de lymphome à cellules du manteau	27
Myélofibrose	24
Anomalies prédominantes des cellules lymphoïdes	22
Suspicion de leucémie aiguë lymphoblastique	15
Sang normal pour la classe d'âge	14
Anomalies prédominantes des granuleux	13
Suspicion de métastases médullaires	12
Suspicion de syndrome myéloprolifératif (autre type)	11
Thrombocythémie ou thrombocytose	9
Pathologie myéloïde non spécifique (autre type)	9
Suspicion de lymphome à grandes cellules	8
Suspicion d'anémie réfractaire	8
Pathologie constitutionnelle (autre type)	8
Lymphocytose à lymphocytes binucléés	7
Suspicion de leucémie aiguë autre	7
Anomalies prédominantes des plaquettes	6
Autre parasitose	6
Suspicion de leucémie aiguë myéloïde	5
Leucémie polylmphocytaire	4
Plasmocytose ou lymphoplasmocytose non spécifique	4
Paludisme	4
Anémie (autre type)	3
Monocytose	3
Suspicion de leucémie myélomonocytaire chronique	2
Polyglobulie	2
Suspicion d'anémie mégaloblastique	2
Leucémie lymphoïde chronique "mixte"	1
Leucémie myéloïde chronique	1
Suspicion d'anomalie de l'hémoglobine	1
Myélémie	1
Erythroblastose	1

Des mentions manuscrites telles que : « hypersplénisme », « infection virale » ont été relevées plusieurs fois.

5 – Bilan des réponses au frottis

Sur les 3732 participants, 2416 (64,7 %) ont rendu la réponse attendue (réponse unanime des experts) « leucémie à tricholeucocytes » et 2166 (58,0 %) l'ont considérée comme la réponse la plus probable.

Par ailleurs, 2166 laboratoires ont noté la présence de tricholeucocytes, ce qui permet de comptabiliser 2452 laboratoires (65,7 %) ayant cité la réponse attendue (leucémie à tricholeucocytes) et/ou la cellule spécifique de la pathologie (tricholeucocyte). On note cependant que 247 laboratoires ont rendu « leucémie à tricholeucocytes » sans avoir fait mention des tricholeucocytes, ni au niveau des commentaires codés ni de façon manuscrite.

La seconde réponse la plus citée « Lymphome splénique à lymphocytes villeux » l'a été par 769 participants, lesquels ont pour 83,1 % d'entre eux également rendu « leucémie à tricholeucocytes ». Ceci montre qu'en fait 2543 laboratoires (68,1 %) ont reconnu une pathologie caractérisée par une cellule « à projections cytoplasmiques ».

Cependant, si l'on ne prend en compte que l'association « leucémie à tricholeucocytes » et « monocytes inférieurs à 1 % », selon les commentaires ci-après, seuls 591 laboratoires soit 15,8 % ont rendu la bonne réponse.

Commentaires

1 – Introduction

Le cas clinique présenté était celui d'une bicytopenie avec splénomégalie chez un homme de 50 ans, sans antécédent particulier. Bien que le taux d'hémoglobine soit normal, le nombre très diminué des réticulocytes pouvait suggérer que l'anémie allait suivre. En toute rigueur il n'était pas licite de doser les réticulocytes. Il s'agissait donc d'orienter la recherche étiologique devant une bicytopenie.

Différentes étiologies doivent être évoquées pour orienter l'analyse du frottis sanguin :

(En gras : les éléments cytologiques à rechercher sur le frottis sanguin,

En italique : les cas où la splénomégalie est constante)

- 1) Leucémie aiguë : **blastés circulants ?**
- 2) *Leucémie à tricholeucocytes* : présence de **cellules typiques ? monocytopenie absolue ?**
- 3) *Myéofibrose idiopathique* : **érythromyélie ? dacryocytes ?**
- 4) *Hémoglobinurie paroxystique nocturne*, aplasie médullaire
- 5) Myélodysplasie : **polynucléaires dégranulés ? pseudo-Pelger ? anomalies des plaquettes ?**
- 6) Hypothèses improbables dans ce contexte :
 - Carence en folates ou vitamine B12
 - Syndrome d'activation macrophagique*
 - Hypersplénisme*
 - Cytopenies auto-immunes

2 - Cytologie

L'étude du frottis sanguin permettait de constater :

- l'absence de cellules blastiques
- l'absence de signes évidents de dysmyélopoïèse
- l'absence d'érythromyélie et de dacryocytes
- l'absence de monocytes
- la présence de tricholeucocytes

Compte tenu de la présentation clinico-biologique, on évoquait le diagnostic de leucémie à tricholeucocytes.

3 - Difficultés diagnostiques

- La monocytopenie absolue est une caractéristique des leucémies à tricholeucocytes mais celle-ci n'apparaissait pas sur la formule de l'automate : en effet, les automates ne sont pas capables de différencier les tricholeucocytes des monocytes.
- Les tricholeucocytes sont souvent peu nombreux. On doit donc regarder l'ensemble du frottis sanguin, notamment les « zones tassées », souvent plus riches en cellules mais d'interprétation plus délicate. Il existe alors un risque de confusion avec des lymphocytes villeux. Pourtant ni la taille des cellules ni la chromatine n'étaient évocateurs (figures 5 et 6 – définition de l'échantillon).

4 – Diagnostic positif

- L'immunophénotypage des tricholeucocytes (**CD25** et CD103 +) est indispensable et souvent suffisant.
- Le dosage du récepteur soluble à l'interleukine 2 (CD25s) est surtout un marqueur précoce de la rechute.
- Explorations médullaires :
 - Le myélogramme, non indispensable, est souvent de mauvaise qualité à cause de la fibrose associée.
 - La biopsie ostéo-médullaire est utile lorsqu'il y a très peu de cellules circulantes et/ou lorsqu'il existe un doute sur le phénotype. Elle montre une myélofibrose et l'infiltration par les tricholeucocytes.

5 – Commentaires sur les résultats

La présence de monocytes doit absolument faire remettre en cause le diagnostic de leucémie à tricholeucocytes. En toute rigueur, seules les formules rendues avec moins de 1 % de monocytes nous semblent valables ce qui réduit alors considérablement le taux de bonnes réponses.

Bibliographie

Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues : Jaffe, Harris, Stein, Vardiman et al, IARC press, Lyon 2001.

Conclusion

Cette deuxième opération portant sur le dosage de l'hémoglobine A2 a montré une dispersion des résultats plus élevée avec les réactifs d'électrophorèse (CV de 16 à 21 %) qu'avec les réactifs chromatographiques (HPLC) (CV de 5 à 9 %). Malgré les recommandations de la SFBC parues en 2003 qui récusent la densitométrie après électrophorèse comme technique de quantification de l'HbA2, les utilisateurs de ces techniques représentent encore 73 % des participants.

Concernant le dosage de l'activité anti-Xa, avec une activité à 0,83 UI/ml, semblable à celle de 2003, le CV des résultats a diminué de 4,6 %. Le cas clinique incluait la notion d'une insuffisance rénale légère à modérée avec une clairance de la créatinine à 50 ml/mn qui justifiait la surveillance biologique de ce patient sous traitement curatif. Les valeurs moyennes d'anti-Xa observées pour des doses curatives d'HBPM au cours des essais cliniques sont rappelées et permettent d'interpréter les résultats de l'activité obtenue. Ainsi, à la valeur moyenne d'activité anti-Xa de 0,83 UI/ml trouvée par les participants chez ce patient traité par Innohep®, il n'y a pas de modification de dose à envisager. Les laboratoires ont effectivement, pour 87 % d'entre eux, proposé de ne pas modifier les doses d'HBPM.

Le frottis sanguin montrait la présence de 9 % de tricholeucocytes et l'absence de monocytes alors que la formule obtenue sur automate avait rendu 8 % de monocytes. Le diagnostic de leucémie à tricholeucocytes a été rendu par 65 % des laboratoires. Seuls 15 % des laboratoires ont cité ce diagnostic associé à un comptage de monocytes inférieur à 1 %, ce qui correspondait en réalité à la réponse attendue. Par ailleurs, 21 % des laboratoires ont évoqué le diagnostic de lymphome à lymphocytes villeux ; cependant la morphologie des cellules ne correspondait pas à des lymphocytes villeux.