

Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire

Partie 1. Les plaquettes sanguines

Automated hematology analysers and spurious counts

Part 1. Platelets

Anne Tessier-Marteau
Franck Geneviève
Alban Godon
Laurent Macchi
Marc Zandecki

Laboratoire d'hématologie,
CHU d'Angers
<anmarteau@chu-angers.fr>

Résumé. Les automates actuels d'hématologie cellulaire analysent les échantillons sanguins avec une cadence élevée et fournissent des résultats précis et reproductibles. Cependant, diverses conditions préanalytiques ou inhérentes au principe d'analyse des paramètres de l'hémogramme sont susceptibles d'induire des résultats erronés. Le biologiste doit connaître ces diverses situations autant que le principe de fonctionnement de son automate afin d'éviter de rendre des résultats erronés qui peuvent avoir un impact non négligeable pour le patient et sa prise en charge. Dans le cadre des fausses thrombopénies, l'agrégation plaquettaire induite *in vitro* en présence d'EDTA est la situation préanalytique la plus fréquente. Les automates les plus performants gèrent assez bien cette situation, en signalant son existence par un ou plusieurs messages d'alerte. Diverses situations plus rares, comme le satellitisme plaquettaire autour des leucocytes, peuvent également induire une sous-estimation du nombre des plaquettes, mais les messages d'alerte ne sont pas toujours explicites. A l'opposé, la difficulté à discriminer les plaquettes avec d'autres particules de taille, de densité ou de diffraction comparables, comme les hématies de taille réduite, les fragments cytoplasmiques de certains leucocytes, les cryoglobulines, les filaments de fibrine, les lipides ou les bactéries, peut aboutir à une fausse thrombocytose. Pour chacune de ces situations aboutissant à une erreur potentielle de la numération plaquettaire, les auteurs décrivent le mécanisme responsable de ces anomalies et la capacité des divers automates à gérer ces particularités en fonction de leur principe de mesure. Une conduite pratique est proposée le cas échéant pour obtenir un résultat exact.

Mots clés : *automates d'hématologie, compteurs de cellules, erreur de décompte, hémogramme automatisé, numération globulaire, plaquettes sanguines*

Abstract. Hematology analysers provide now quick, accurate, and reproducible cell blood counts. However, depending on detection methods, spurious counts may occur. If undetected, such spurious counts may lead to inappropriate medical care and to unneeded explorations. Focusing first on platelet counts, situations leading to spurious decrease include several preanalytical considerations, the major one corresponding to EDTA-induced platelet aggregation and to platelet satellitism around polymorphs. In other instances, related to the presence of small particles mimicking platelets, including fragmented red blood cells, lipids, cryoglobulins, fibrin strands, or cytoplasmic

Article reçu le 15 octobre 2009,
accepté le 13 novembre 2009

Tirés à part : A. Tessier-Marteau

fragments of leukocytes, spurious elevation of platelet count may occur. According to the analyser and to the methods used for the determination of the cell blood count, flags or messages related to these spurious changes differ. For each spurious change, the authors describe the mechanism leading to the anomaly, the way the analysers generate flags, and what should be done to provide accurate results.

Key words: *automated hematology, cell counters, error count, hemogram automated blood count, blood platelets*

Quelle que soit leur méthodologie d'analyse, les automates d'hématologie cellulaire (AHC) considèrent les cellules du sang comme des particules dont ils mesurent divers critères physiques, parmi lesquels la taille, la capacité à interrompre le passage du courant électrique, la résistance à la traversée d'un courant de haute fréquence, ou la dispersion et l'absorption lumineuses. Qu'il s'agisse d'héogrammes normaux ou anormaux, les AHC fournissent rapidement des résultats précis et exacts. Cependant, dans certaines circonstances, liées à des particularités de l'échantillon sanguin, à une pathologie particulière du patient étudié, à des modifications induites après le prélèvement, ou à la technologie utilisée pour la mesure, les AHC peuvent produire des résultats erronés pour un ou plusieurs des paramètres de la numération globulaire [1] et/ou de la formule leucocytaire. Ces anomalies ou erreurs de mesure ont été rapportées dans la littérature dès le début d'utilisation des AHC en biologie médicale [1, 2].

Les fabricants d'AHC ont tenu compte des diverses insuffisances signalées par les utilisateurs, ont amélioré avec les années la qualité d'analyse de leurs machines et, avec les progrès de l'analyse informatique, proposent maintenant des résultats fiables et précis pour les divers paramètres de la numération globulaire, une analyse automatisée de la formule leucocytaire et une numération des réticulocytes. A l'obtention de résultats chiffrés, s'est ajoutée une visualisation au moins partielle des particules énumérées, sous la forme d'histogrammes mono-, bi- ou multi-paramétriques. Outre des informations sur le fonctionnement des AHC (messages techniques), divers messages d'alerte sont apparus en parallèle des histogrammes pour signaler plus précisément certaines des anomalies de mesure ou d'analyse (messages quantitatifs sur des seuils de normalité ou de linéarité dépassés, messages analytiques et qualitatifs signalant la difficulté de réalisation d'une analyse ou la présence possible d'éléments anormaux ou inhabituels). Ces divers messages et histogrammes complètent aujourd'hui l'interprétation technique et biologique de l'héogramme : ils font habituellement l'objet d'une formation spécifique (formation « utilisateurs ») et sont inscrits dans le guide technique de l'automate.

Selon les performances de l'AHC, les histogrammes et messages d'alerte seront plus ou moins développés : chaque biologiste doit savoir comment son AHC réagit devant les diverses situations qui peuvent conduire à la validation de résultats erronés. Le document qui suit reprend les diverses circonstances pouvant perturber l'analyse automatisée de l'héogramme. Chaque AHC est affecté de manière variable par ces diverses anomalies de mesure, bien que le degré par lequel il est perturbé puisse varier. Certaines anomalies sont suffisamment fréquentes pour nécessiter la rédaction de procédures dégradées, mentionnant comment il faut agir sur le plan technique et sur le plan biologique, ainsi que les niveaux de pertinence et d'urgence médicale.

Principes généraux de la numération des plaquettes

Avec la technique de mesure par impédance initialement définie par Wallace Coulter (*tableau 1*), un échantillon de sang total prélevé sur EDTA est dilué dans une solution tampon iso-osmotique puis aspiré au travers d'un orifice qui sépare deux chambres, l'une contenant une électrode positive et l'autre une électrode négative [3]. Chaque particule traversant l'orifice produit momentanément une augmentation de la résistance électrique qui est enregistrée comme une impulsion. En outre, la taille de cette impulsion est proportionnelle à la taille de la particule correspondante. Les impulsions sont enregistrées individuellement puis classées au sein d'histogrammes : les AHC énumèrent les plaquettes (PLT) et les globules rouges (GR) sur le même canal de dilution et considèrent les particules de petite taille comme des PLT et les autres particules comme des GR. Selon les AHC, les seuils identifiant les particules comptées comme des PLT varient de 2 à 6 fL pour le seuil inférieur (discrimination des PLT et du bruit de fond) et de 20 à 40 fL pour le seuil supérieur (discrimination avec les GR). Diverses améliorations ont été apportées à cette analyse : étude du profil de l'histogramme des

Tableau 1. Principales technologies actuellement disponibles pour l'analyse automatisée de l'hémogramme avec les automates d'hématologie les plus performants.

		Techniques de numération	Formule leucocytaire
Siemens	Advia 2120i	Diffraction optique (leucocytes, PLT, GR) Quantification des érythroblastes (calcul à partir d'une analyse multicanaux) Réticulocytes : nombre, volume, fraction immature, contenu en Hb	Basophiles : lyse différentielle et diffraction optique Neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par diffraction optique en fonction de la taille et de l'absorption en fonction de la réactivité de la peroxydase
Sysmex	XE-2100	Variation d'impédance (GR, PLT) en première analyse Diffraction optique (GR, PLT) avec fluorochrome de l'ARN : déclenchement automatique ou à la demande Fraction PLT immature Leucocytes : diffraction laser (sans et avec fluorochrome) Quantification des érythroblastes (avec polyméthine : diffraction et intensité de fluorescence) Réticulocytes : nombre, fraction immature, contenu en Hb	Basophiles : lyse différentielle et diffraction optique Neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par diffraction optique aux petit et grand angles, et mesure de fluorescence Granulocytes immatures : détection avec un courant alternatif à haute fréquence (Radio Fréquence) et un courant continu à basse fréquence (courant continu ou DC)
Horiba Medical	Pentra 120 DX	Variation d'impédance (GR, PLT) Leucocytes : variation d'impédance et histogramme Lymphocytes, Monocytes, Granulocytes (LMG) Quantification des érythroblastes (thiazole orange ; diffraction et intensité de fluorescence) Réticulocytes : nombre, fraction immature, volume	Basophiles : impédance après lyse des autres leucocytes Neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par impédance électrique et transmission optique (absorption lumineuse) après coloration par le noir chlorazol E
Beckman - Coulter	LH 785	Variation d'impédance (GR et PLT) [pour les PLT : calcul de log-normalité, courbe lissée] Leucocytes : variation d'impédance et histogramme LMG Quantification des érythroblastes (calcul après expansion d'échelle et modélisation des données) Réticulocytes : nombre, fraction immature, volume	Basophiles, neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par variation d'impédance, courant électrique haute fréquence et diffraction d'un faisceau de lumière monochromatique (volume, conductivité, diffraction) puis analyse multidimensionnelle et individualisation des populations dans un espace cubique
Abbott diagnostics	Cell-Dyn Sapphire	GR et PLT : impédance et diffraction optique en parallèle PLT : cytofluorométrie en flux avec CD61 (à la demande) Leucocytes : diffraction optique Quantification des érythroblastes (iodure de propidium ; diffraction et intensité de fluorescence) Réticulocytes : nombre, fraction immature, volume	Basophiles, neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par diffraction optique MAPSS (<i>Multi Angular Polarised Scatter Separation</i> : transmission, diffraction à angle aigu et angle droit, dépolarisation) ; sans colorant ou cytochimie

volumes plaquettaires et production d'une courbe lissée (améliorant la précision du décompte) si la distribution est (Log) normale, ou/et présence d'un seuil mobile plutôt que fixe pour discriminer PLT et GR. Des messages d'alerte apparaissent quand l'AHC ne réussit pas à extrapoler une courbe lissée ou à séparer nettement les PLT des GR.

La technique de mesure par diffraction lumineuse (optique) utilise la cytométrie en flux (*tableau 1*) : les particules d'un échantillon de sang dilué sont aspirées et cheminent individuellement dans un capillaire. Chaque particule traverse un faisceau lumineux (ou laser) et va à la fois interrompre ce faisceau (chaque interruption correspond au passage d'une particule, ce qui permet ultérieurement d'en obtenir le nombre) et diffracter ce faisceau lumineux. La quantité de lumière diffractée à 1, 2, 3 ou même 4 angles (selon les AHC) est proportionnelle au volume, mais aussi renseigne sur le contenu de la particule. Les PLT sont identifiées sur un histogramme biparamétrique plaquettaire (volume/indice de réfraction). Plusieurs AHC réalisent la numération des PLT par impédance mais peuvent, soit à la demande soit systématiquement, énumérer en plus les PLT par technique optique. En incorporant un composé coloré ou fluorescent

au réactif de dilution, il est en outre possible de mesurer d'autres paramètres plaquettaires, comme par exemple la fraction immature (ou nombre de PLT réticulées).

La numération des PLT par technique immunologique, initialement proposée pour les cytofluoromètres généralistes, se réalise maintenant directement sur certains AHC (Abbott) avec un anticorps monoclonal anti-plaquettes (CD61). Bien que coûteuse, cette méthode est recommandée pour sa précision dans les situations de forte thrombopénie.

Si, dans la vaste majorité des cas, la numération des PLT produite par les AHC est précise et exacte, diverses situations peuvent conduire à des résultats erronés (*tableau 2*).

Situations conduisant à une fausse diminution de la numération plaquettaire

Pseudothrombopénie liée à l'anticoagulant EDTA (PTE)

Elle correspond à un phénomène provoqué *in vitro* par des anticorps particuliers, présents dans les échantillons sanguins prélevés sur EDTA, et qui réagissent avec les

Tableau 2. Principales situations associées à une anomalie de la numération plaquettaire automatisée.

Anomalies de la numération plaquettaire automatisée	Anomalies d'autres paramètres de la numération globulaire ou de la formule leucocytaire liées aux anomalies des PLT
<p>Fausse diminution</p> <p>Agrégabilité ou adhésivité excessive des PLT :</p> <ul style="list-style-type: none"> *Agrégation des PLT entre elles (essentiellement liée à l'EDTA) *Satellitisme des PLT autour des neutrophiles (parfois d'autres leucocytes) lié à l'EDTA *Agrégats mixtes de PLT et de neutrophiles <p>Plaquettes géantes (volume supérieur au seuil discriminant avec les GR)</p> <p>Conditions préanalytiques diverses :</p> <ul style="list-style-type: none"> *Ponction diluée (proximité d'une perfusion) *Coagulation partielle de l'échantillon de sang *Rapport quantité de sang/d'anticoagulant non respecté (ponction difficile) *Tube de sang trop rempli *Echantillon sanguin trop âgé <p>Fausse augmentation</p> <p>Hématies fragmentées (schizocytes, microcytes : microangiopathies, grands brûlés, carences en fer sévères)</p> <p>Fragments du cytoplasme de leucocytes (blastes, cellules de lymphome)</p> <p>Cryoglobulines, cryofibrinogène</p> <p>Lipides (hyperlipémies, prélèvement près d'une perfusion lipidique, ou parfois post-prandial)</p> <p>Micro-organismes : bactéries (septicémie, tube de prélèvement non stérile), champignons (Candida)</p>	<p>Agrégats de PLT comptés avec les leucocytes ; formule leucocytaire perturbée</p> <p>Erreur dans la formule leucocytaire par localisation anormale du nuage neutrophile sur le graphe de la formule leucocytaire</p> <p>Diminution du nombre de leucocytes ; fausse neutropénie</p> <p>Les PLT géantes sont comptées avec les GR, parfois les leucocytes</p> <p>Altération d'autres paramètres de la NG et de la formule</p> <p>Tous paramètres faussés</p> <p>Anomalies qualitatives des leucocytes, du VGM</p> <p>Diminution modérée de la numération des GR (anecdotique)</p> <p>Fausse augmentation du nombre des leucocytes et plus rarement des GR</p> <p>Hémoglobine faussement augmentée ; image anormale sur le graphe de la formule leucocytaire, formule leucocytaire automatisée perturbée</p>

PLT pour les agréger entre elles (*figure 1A*) [1, 4]. Les AHC ne sont pas responsables de ce phénomène mais sont incapables d'énumérer les PLT incluses dans les agrégats : ils ne proposent alors que le décompte des PLT non agrégées, ce qui induit une (pseudo) thrombopénie parfois majeure, jusqu'à moins de 20 G/L, alors que la numération réelle est normale [5]. En outre, les amas de PLT perturbent de manière variable la numération leucocytaire et la formule leucocytaire automatisée. Négliger ce phénomène peut conduire à la réalisation d'examen non nécessaires (ponction médullaire, transfusion de plaquettes) [4]. L'élément le plus important est que la PTE n'est jamais accompagnée de signes hémorragiques.

La prévalence de la PTE

Elle varie selon les études de 0,07 à 0,20 % des échantillons sanguins analysés dans la population générale et serait de 0,1 à 2,0 % pour les patients hospitalisés [6-9]. L'incidence est assez superposable chez les hommes, les femmes et les patients âgés. Les patients sont soit sains à la découverte de l'anomalie soit, quand des maladies existent, elles sont hétérogènes, bien que certains auteurs aient émis l'hypothèse d'une relation possible avec une maladie auto-immune, inflammatoire ou néoplasique [10]. Cependant, il n'a pas été constaté d'augmentation de l'incidence des pathologies précitées chez les patients sains chez qui une PTE était découverte, même après plus de dix ans de suivi [11]. Les PLT des syndromes myéloprolifératifs

seraient plus sensibles à l'agrégation, indépendamment d'une thrombopathie associée. La PTE peut survenir chez des patients par ailleurs déjà thrombopéniques, amplifiant la profondeur de celle-ci ou, à l'opposé, chez des patients hyperthrombocytaires, aboutissant à une numération des PLT faussement normale [12, 13]. La PTE est transitoire (disparition en quelques mois) ou permanente, et peut parfois augmenter en intensité pendant l'hospitalisation [14-16]. Elle n'a pas de relation avec l'augmentation de l'activation plaquettaire impliquée dans la pathogénie de la thrombose artérielle, l'infarctus du myocarde ou les accidents vasculaires cérébraux (dans ces circonstances, des agrégats de PLT peuvent être générés *in vivo*) [17].

Mécanisme de l'agrégation

Les études de transfert ont montré que le plasma EDTA des patients présentant une PTE était capable d'agréger les PLT de tous les patients sauf celles de la thrombasthénie de Glanzmann, suggérant que le complexe glycoprotéique α Ib/ β IIIa, récepteur du fibrinogène, était impliqué dans la PTE [11, 18]. Un anticorps monoclonal a d'ailleurs été produit qui reconnaît un épitope sur l'intégrine α Ib/ β IIIa, dont l'accessibilité est augmentée lors du contact des PLT avec l'EDTA [19]. La thrombopénie artéfactuelle qui apparaît fréquemment chez les patients traités par des antagonistes des récepteurs α Ib/ β IIIa en est une autre preuve indirecte [20]. Le mécanisme le plus vraisemblable

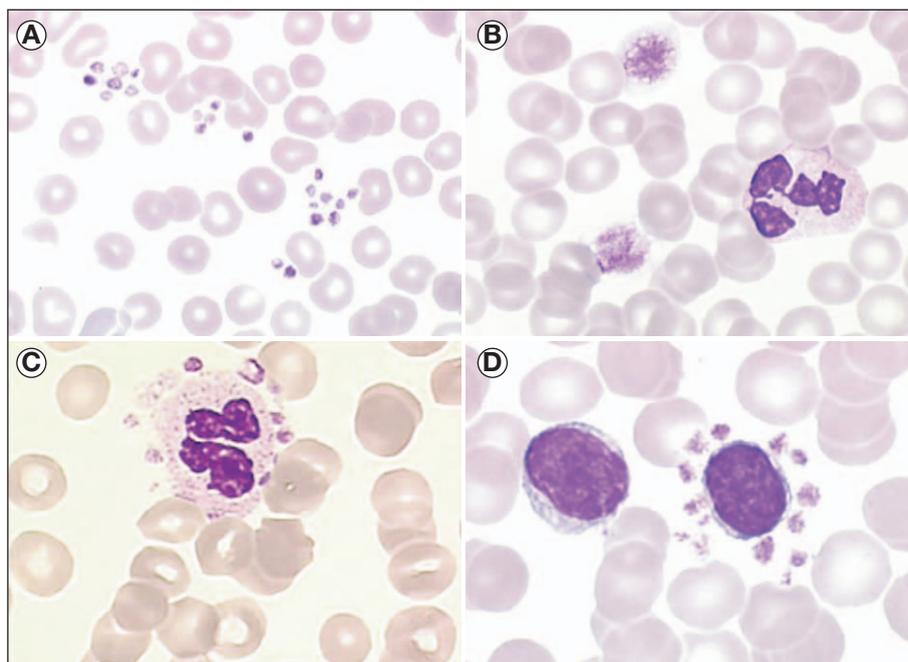


Figure 1. **A** : agrégats de plaquettes sur frottis sanguin (adulte sain). **B** : plaquettes géantes (maladie de Bernard et Soulier). **C** : satellitisme des plaquettes autour d'un polynucléaire neutrophile (adulte sain). **D** : satellitisme des plaquettes autour d'un lymphocyte (leucémie lymphoïde chronique). Frottis sanguins colorés au May Grünwald et Giemsa (fort grossissement).

de la PTE est qu'un site antigénique normalement caché (cryptique) du complexe $\alpha\text{IIb}/\beta\text{IIIa}$ est modifié ou exposé seulement en présence d'EDTA. Bien que plutôt restreinte à l'EDTA, l'agrégation des PLT se produit parfois avec d'autres anticoagulants, dont le citrate trisodique [11]. Quelques publications rapportent cependant que d'autres protéines que des anticorps pourraient être responsables de la PTE, voire que des complexes immuns interviendraient par un jeu d'interactions entre Fc des immunoglobulines et récepteurs plaquettaire [4-21].

Pourquoi ces anticorps apparaissent-ils ?

Ce sont des IgG (33 à 50 % des cas), des IgM (10 à 63 % des cas), ou des IgA (4 à 40 % des cas) selon les séries de la littérature [4, 22]. Les hypothèses d'auto-anticorps naturels ou d'anticorps acquis résultant de la destruction de PLT après septicémie, toxémie gravidique, microangiopathie thrombotique, syndromes myélodysplasiques, ou apparaissant pendant l'hospitalisation et particulièrement après une infection, ont été souvent évoquées [4]. Ces anticorps sont associés dans la plupart des cas à des anticorps antiphospholipides qui pourraient eux aussi intervenir dans le mécanisme d'agrégation [4]. La PTE peut parfois s'amplifier à froid ou au contraire être plus intense à 37 °C. La cinétique de l'agrégation est rapide, débutant dans les minutes qui suivent le contact du sang avec l'EDTA, devenant maximale soit après quelques minutes, soit, au

contraire, après quelques heures. Les amas sont de taille très variable, allant de 2 à 5 PLT jusqu'à plusieurs dizaines ou plusieurs centaines de PLT selon les cas. Pour certains auteurs, la numération des PLT serait d'autant plus basse que les amas seraient plus importants en taille [10].

Mise en évidence de la PTE sur les automates

La présence d'amas de PLT est plus ou moins facilement détectée selon les AHC et selon la taille des amas, les AHC les plus simples ayant un faible niveau de détection (figure 2). Lorsque l'agrégation est d'intensité modérée, avec un mélange de PLT libres et de petits amas (2-5 PLT), ces derniers sont considérés comme de grosses PLT. L'histogramme plaquettaire montre un excès d'éléments de grande taille, sans retour à la ligne de base vers 20 fL, et la séparation PLT-GR est difficile. Des messages d'alerte peuvent être générés : « présence de grandes plaquettes », « plaquettes géantes » ou « suspicion d'amas plaquettaires » (ou équivalents). Lorsque les amas sont plus volumineux, l'histogramme plaquettaire ne visualise que les PLT non agrégées, et les messages d'alerte issus de cet histogramme sont liés à la difficulté d'analyse de ces quelques PLT résiduelles : « absence de courbe lissée », « résultats bruts », « thrombopénie ». Par contre, les amas volumineux vont perturber l'analyse des leucocytes et sont visualisables sur l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire (taille/un autre critère,

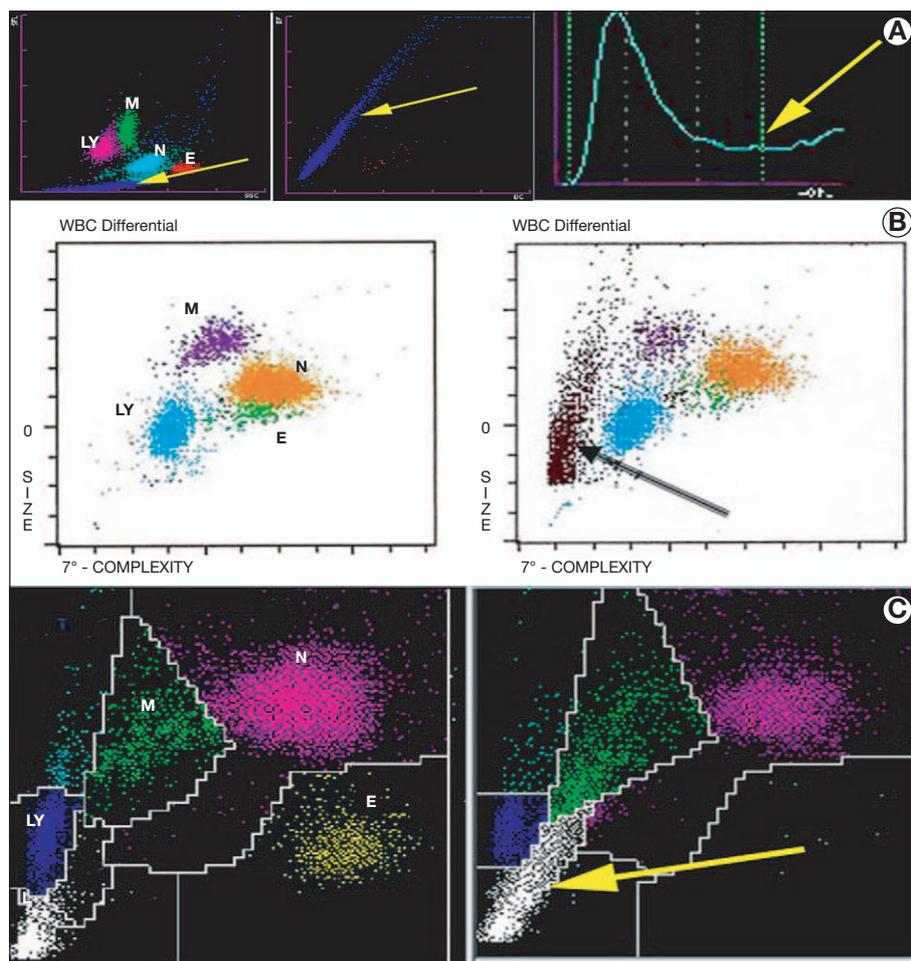


Figure 2. Visualisation des agrégats plaquettaires sur les histogrammes des automates. **A :** avec l'automate XE-2100 (Sysmex), les amas apparaissent sur l'histogramme DIFF (formule leucocytaire) sous forme d'un nuage allongé (graphe de gauche ; flèche). Sur le graphe qui visualise une éventuelle myélémie (IMI), ces amas forment un nuage qui prolonge le nuage des leucocytes (centre ; flèche). Sur le schéma de droite, on remarque l'absence de retour à la base de l'histogramme des volumes plaquettaires (flèche). **B :** avec l'automate Cell-Dyn Sapphire (Abbott), à côté des populations leucocytaires normales (image de gauche), l'histogramme taille/complexité visualise un nuage anormal (en noir, image de droite). **C :** avec l'automate Advia 2120 (Siemens) on observe sur l'histogramme de droite (formule Perox) un nuage de points (en blanc), absent de l'image normale (à gauche), et qui recouvre une zone particulière dans laquelle ces amas seront énumérés. E = éosinophiles ; Ly = lymphocytes ; M = monocytes ; N = neutrophiles.

variable selon l'AHC) sous la forme de particules anormales non leucocytaires. Des messages d'alerte apparaissent : « agrégats de plaquettes », « plaquettes de grande taille ou géantes », ou un message équivalent lié à l'existence de particules de taille modérée (parfois : « érythroblastes ? »). Sur certains AHC, la numération leucocytaire est réalisée sur deux canaux différents (voir les anomalies de décompte des leucocytes) : dans le canal qui utilise un agent de lyse puissant des GR, les membranes des leucocytes et des PLT (libres et en amas) sont détruites et la numération leucocytaire est exacte. À l'inverse, dans le canal dédié à la formule leucocytaire, l'agent de lyse des GR respecte les membranes des leucocytes, des PLT et des amas de PLT, et ces derniers seront comptés comme

leucocytes et vont surestimer la numération leucocytaire de ce canal. Une différence entre les 2 mesures est alors signalée, et cette discordance doit faire évoquer, entre autres, la présence d'amas plaquettaires.

Les AHC qui réalisent la numération et la formule leucocytaires sur le même canal seront moins sensibles à la détection des amas de PLT, et une observation attentive des histogrammes sera d'autant plus nécessaire. Les AHC les plus simples qui ne réalisent pas de formule, même approchée, visualisent mal les agrégats. Avec les AHC qui analysent les particules du canal de numération leucocytaire en trois populations (lymphocytes, monocytes, granulocytes) (Beckman, Horiba Medical), les amas de PLT apparaissent sous forme d'un pic de particules de

petite taille : les messages d'alerte générés sont souvent communs aux trois principaux artefacts interférant dans cette région, c'est-à-dire les agrégats de PLT, les PLT géantes et les noyaux d'érythroblastes.

Conduite pratique

Lorsque l'on soupçonne une PTE (message d'alerte ou thrombopénie nouvellement découverte), l'examen du frottis sanguin coloré est nécessaire à la recherche d'amas plaquettaires : l'étude attentive des franges latérales et de l'extrémité est nécessaire, les amas très volumineux étant rejetés en périphérie lors de l'étalement. La présence d'un message d'alerte rend erroné ou au minimum suspect le résultat de numération des PLT rendue par l'AHC, et il n'est pas réaliste d'effectuer une numération plaquettaire par une autre technique à partir du même tube de sang (par exemple optique si la première numération a été réalisée par impédance). En pratique, un autre prélèvement doit être analysé. Mais il est nécessaire d'estimer approximativement le nombre de PLT (à partir du frottis sanguin) afin d'éviter de temporiser si l'agrégation survient dans un contexte de vraie thrombopénie. Un échantillon de sang prélevé sur citrate trisodique (1 volume pour 9 volumes de sang) et analysé dans les 2 heures qui suivent est la démarche habituelle (ne pas oublier la correction mathématique du fait de la dilution liée au citrate liquide). La détermination de la numération plaquettaire sur prélèvement hépariné est à déconseiller. Dans quelques cas, une agrégation avec l'EDTA et avec d'autres anticoagulants dont le citrate trisodique a été rapportée, et la dilution immédiate du sang capillaire avec le système Unopette® qui contient de l'oxalate d'ammonium (Becton Dickinson), ou un système équivalent, puis la numération en chambre hématimétrique permet d'obtenir un résultat. Quand l'agrégation survient avec tous les anticoagulants, l'emploi de mélanges spéciaux contenant diverses molécules (dextrose, théophylline, aminoglycosides) a été proposé. Dans certaines circonstances, l'agglutination a été rapportée comme faible ou absente dans les premières minutes suivant le prélèvement, l'analyse rapide permettant d'éviter l'écueil. Il a été également décrit qu'un échantillon prélevé et maintenu à 37 °C pouvait s'analyser convenablement, mais ceci n'est valable que dans quelques cas, et quand l'agrégation survient à température ordinaire, elle disparaît rarement après incubation à 37 °C : dans la plupart des cas, on constate plutôt une augmentation de taille des amas plaquettaires [6, 23].

Les plaquettes géantes

Dans les conditions normales et dans diverses situations pathologiques, quelques PLT ont un volume plus élevé, et, pour cette raison, les AHC considèrent que les PLT peuvent avoir un volume atteignant 36, 40, voire même 60 fL. Il faudra avoir à l'esprit que dans certaines pathologies

(syndromes myéloprolifératifs ou myélodysplasiques), quelques PLT peuvent présenter une taille (volume) identique ou proche de celle des leucocytes et ne sont pas identifiées comme telles, ou peuvent être incluses dans le décompte des GR ou/et celui des leucocytes (voir le chapitre consacré aux anomalies d'analyse des leucocytes). Mais c'est au cours des thrombopénies que l'absence d'identification convenable des grandes PLT constitue un réel problème (*figure 1B*). Même si des améliorations considérables ont été apportées afin de discriminer les grandes PLT et les autres particules (histogramme volumétrique avec courbe lissée, seuil mobile entre PLT et GR, diffraction lumineuse à plusieurs angles, analyse de l'indice de réfraction), la précision et l'exactitude de la numération des PLT restent faibles dans cette circonstance, comme le montre par exemple leur faible reproductibilité au cours des macrothrombopénies constitutionnelles [24].

Les AHC signalent le plus souvent ces grandes PLT (ou PLT géantes) avec un message d'alerte, mais dont la spécificité est faible car croisée avec la présence de petits agrégats de PLT, voire de noyaux d'érythroblastes. La présence de tels messages doit conduire à l'examen de l'histogramme volumétrique des PLT, à vérifier si l'AHC a réalisé une bonne discrimination des PLT-GR, et en cas de thrombopénie, surtout pour un patient inconnu, à regarder le frottis sanguin, au moins pour confirmer la présence de PLT géantes (ou visualiser des agrégats de PLT ou des érythroblastes). La numération des PLT par méthode optique est parfois moins imprécise. La présence d'un nombre élevé de grandes PLT, surtout en cas de thrombopénie vraie associée, est une situation de choix pour utiliser la méthode immunologique de numération des PLT à l'aide d'anticorps monoclonaux. Enfin, l'affichage d'un volume moyen plaquettaire élevé peut aider à identifier une macrothrombopénie, mais uniquement après avoir examiné l'étalement sanguin et éliminé l'existence de petits agrégats de PLT [24, 25].

Satellitisme des plaquettes autour des leucocytes

Le satellitisme des plaquettes, ou satellitose, ou rosettes leucoplaquettaires, est un phénomène acquis *in vitro* en présence d'EDTA et lié à l'adhésion des plaquettes à la membrane des polynucléaires neutrophiles (PNN) matures (*figure 1C*) ou parfois à d'autres cellules (*figure 1D*) [26-29]. Il s'agit d'une situation rare (estimée à environ 1 pour 12 000 échantillons sanguins), quelquefois reliée à un processus auto-immun mais, dans la plupart des cas, sans relation avec une maladie spécifique [29]. Sa signification clinique n'est pas connue. Il a été montré à plusieurs reprises, en utilisant soit des anticorps anti-Ig soit avec une absorption spécifique de chacune des fractions d'Ig, que les IgG étaient le médiateur, avec ou sans participation des récepteurs Fc gamma des PNN [29, 30]. L'implication

du complexe glycoprotéique α IIb/ β IIIa de la membrane des PLT a été également avancée [30], tout comme la présence d'auto-anticorps IgG dirigés contre un antigène cryptique commun au complexe α IIb/ β IIIa des PLT et au récepteur Fc gamma III (CD16) des PNN et possiblement démasqué en présence d'EDTA [30], ou la présence de cryofibrinogène ou de thrombospondine [31, 32].

Dans notre expérience concernant cette anomalie, des aspects morphologiques différents s'observent parfois avec le temps au sein de l'échantillon sanguin EDTA : le satellitisme observé dans les premières minutes suivant le prélèvement évolue en quelques heures par migration progressive des plaquettes à un pôle du PNN, conférant un aspect d'amas de PLT collées à la membrane leucocytaire, puis après quelques heures supplémentaires « l'amas plaquettaire » se détache de la membrane du PNN, conduisant à des PNN libres d'une part et des amas de plaquettes d'autre part. Selon le temps écoulé de l'échantillon à l'analyse, le satellitisme ou les agrégats plaquettaires sont l'élément dominant observable. Quand le satellitisme est présent, la numération des PLT est en général diminuée de 50 à 100 G/L (on peut énumérer approximativement le nombre de PLT adhérant aux PNN). Une (pseudo) thrombopénie n'est donc pas constante. Il n'y a pas de message d'alerte spécifique : dans la plupart des cas, c'est l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire qui montre une localisation anormale des PNN (*figure 3*), souvent de taille inhabituellement grande, et les messages d'alerte indiquent la localisation anormale des PNN et/ou la présence de granulocytes immatures (car de grande taille). Parfois, les amas de PLT libres vont polluer le nuage des lymphocytes. Un message signalant la présence de leucocytes avec une forte activité pero-

xydase est parfois généré sur les AHC réalisant la formule leucocytaire par cytochimie (Advia 2120i, Siemens). Le satellitisme ne survient pas avec l'anticoagulant citrate et un prélèvement de cette nature est alors préconisé.

Plus rarement, le satellitisme des PLT a pu être rapporté autour d'autres cellules, notamment autour des monocytes dans des échantillons de sang EDTA ou/et hépariné [33, 34], ou spécifiquement autour des polynucléaires basophiles dans un cas de leucémie myéloïde chronique [27], ou spécifiquement autour d'éosinophiles [29]. Le satellitisme des PLT autour des lymphocytes (*figure 1D*) ou autour de cellules de lymphome a été également rapporté, les quelques manipulations réalisées dans ces cas impliquant ou non une Ig et le CD16 [28, 35]. D'autres situations reliées à l'EDTA ont été décrites sous le terme de satellitisme, mais correspondent soit à des amas de lymphocytes, soit à des GR entourant des lymphocytes ou des PNN en présence d'EDTA [36].

Agrégation mixte neutrophiles-plaquettes en présence d'EDTA

L'observation de volumineux agrégats contenant des centaines de PLT et des centaines de PNN a été rapportée, semblant être le point final d'un processus initié par un satellitisme classique des PLT autour des PNN [37, 38]. Le nombre de cas rapportés est faible et il y a peu d'études sur ce phénomène et sur ses différences avec le satellitisme plaquettaire classique autour des PNN. Chez un patient qui montrait à la fois une agrégation des PLT et une agrégation mixte PLT-PNN, diverses différences entre les températures optimales d'agrégation, la restriction ou non à l'EDTA et l'abolition avec le dithiothréitol suggéraient des mécanismes différents entre ces deux phéno-

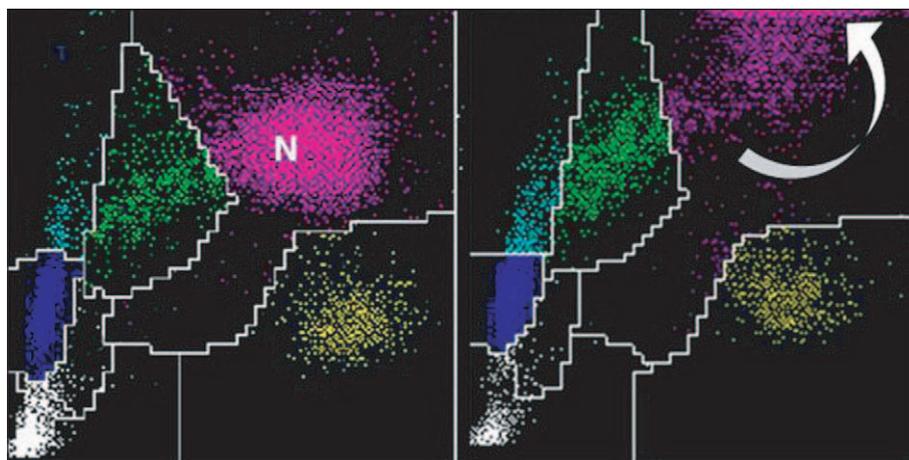


Figure 3. Satellitisme des plaquettes autour des polynucléaires neutrophiles (N). L'image de gauche montre un histogramme Perox de formule leucocytaire normale. Les plaquettes adhérant aux neutrophiles provoquent une augmentation du volume des neutrophiles et un décalage vers le haut et la droite du nuage habituel (image de droite) (Advia 2120, Siemens).

mènes [37]. Ces amas mixtes PLT-PNN sont suffisamment volumineux pour ne pas être détectés en tant que tels par les AHC et, dans les observations rapportées, on note une diminution de la numération des PLT (soit avec un résultat restant au sein de valeurs normales soit une (pseudo) thrombopénie) et une tendance à la leucopénie [37, 38]. C'est d'ailleurs par une tendance leucopénique qu'est parfois révélée la situation. Il y a peu de cas rapportés et analysés avec les AHC les plus récents : la numération leucocytaire par décompte des noyaux après lyse des membranes leucocytaires et plaquettaires ne devrait pas être perturbée, à l'inverse du décompte leucocytaire réalisé dans le canal formule. L'examen au faible grossissement du frottis sanguin est nécessaire devant chaque échantillon leucopénique d'un patient inconnu ou lorsque le nombre des leucocytes chute fortement : il faut avoir à l'esprit ce type d'artéfact et rechercher les amas, peu nombreux mais parfois très volumineux, localisés plutôt aux extrémités des frottis. Dans un cas, la fausse numération leucocytaire était liée à la fois à une diminution du nombre des PNN (localisés dans les amas) et à la présence d'amas de PLT faussement comptés comme leucocytes [37].

Le phénomène décrit ci-dessus est lié à la présence d'EDTA et apparaît *in vitro* : il est tout à fait différent de l'apparition *in vivo* des agrégats PLT-leucocytes rapportés dans divers états inflammatoires et thrombotiques et liés à une augmentation de l'expression de la P-sélectine après activation des PLT [38]. Une numération par cytométrie en flux est d'ailleurs proposée pour énumérer ce type d'agrégats mixtes leucocytaires et plaquettaires [39].

Considérations préanalytiques liées à l'échantillon

Les dysfonctionnements préanalytiques peuvent contribuer à des résultats anormaux et sont sans doute plus fréquents que les anomalies analytiques. Un décompte anormalement bas peut être retrouvé dans les échantillons sanguins dilués par prélèvement à proximité d'une perfusion ou sur une voie de perfusion. Indépendamment de l'anticoagulant utilisé, une augmentation de sa concentration dans l'échantillon (défaut de sang par ponction veineuse difficile ou prélèvement difficile comme chez le nouveau-né) ou un retard entre le prélèvement et l'analyse peuvent modifier le volume des PLT, conduisant à une difficulté de l'automate à générer une courbe lissée ou à retrouver précisément les critères habituels de définition des PLT [2]. Un retard de contact entre le sang prélevé et l'anticoagulant ou une difficulté de ponction peuvent initier la coagulation et générer des amas plaquettaires. Un prélèvement sous vide trop rempli a été rapporté comme pouvant générer des anomalies des divers paramètres de la numération globulaire, et notamment, une numération plaquettaire basse par la difficulté à homogénéiser

l'échantillon de manière adéquate (un retour progressif à des résultats proches des résultats réels était obtenu après plusieurs aspirations).

Situations conduisant à des fausses élévations de la numération des plaquettes

Les hématies fragmentées

La détermination de la numération des PLT et des GR se réalise sur le même canal ou les mêmes canaux. Pour les AHC utilisant la technique par impédance, le critère primordial de séparation entre PLT et GR est la taille (volume). Quand le sang est riche en GR de volume très réduit (carences martiales avec microcytose importante, nombre élevé de schizocytes, grands brûlés), ces particules peuvent se localiser dans une région correspondant habituellement aux grandes PLT et faire générer de fausses courbes lissées avec excès d'éléments de grande taille (*figure 4A,B*), qui conduisent à une numération plaquettaire faussement augmentée [40]. Une erreur par défaut de la numération des GR a également été rapportée dans ce cas, mais elle reste modeste (voir chapitre correspondant à la numération des GR). Dans les brûlures sévères, les GR qui éclatent en donnant naissance à de nombreux petits fragments perturbent la numération des PLT et génèrent des histogrammes assez superposables à ceux que l'on peut observer en présence d'autres types de petites particules, comme les cryoglobulines (voir paragraphe correspondant). Pour les AHC utilisant la mesure par diffraction optique, la détermination du volume, d'une part, et l'indice de réfraction (Abbott, Siemens) ou l'intensité de fluorescence des PLT (Sysmex), d'autre part, permet dans la plupart des cas une bonne séparation avec les GR très microcytaires ou les schizocytes. Certains AHC énumèrent les PLT avec la technique d'impédance, et à la demande ou systématiquement, ajoutent la numération par diffraction optique [Abbott (*figure 4C,D*), Sysmex] : l'affichage comparatif ou le plus réaliste est proposé. Dans des situations extrêmes, la numération par technique immunologique avec un anticorps monoclonal (CD61) sur le même échantillon (Abbott) permet d'obtenir le résultat exact.

Les messages d'erreur observables dans cette circonstance se rapportent à la présence de « plaquettes géantes » et/ou l'inaptitude à séparer convenablement PLT et GR. L'examen des histogrammes des volumes plaquettaires et érythrocytaires est crucial. L'examen du frottis sanguin, le décompte microscopique ou/et l'utilisation d'une autre méthode de comptage (diffraction optique plutôt qu'impédance) sont souhaitables quand l'histogramme des volumes plaquettaires ne revient pas à la ligne de base à 20 fL, quand une population de microcytes apparaît

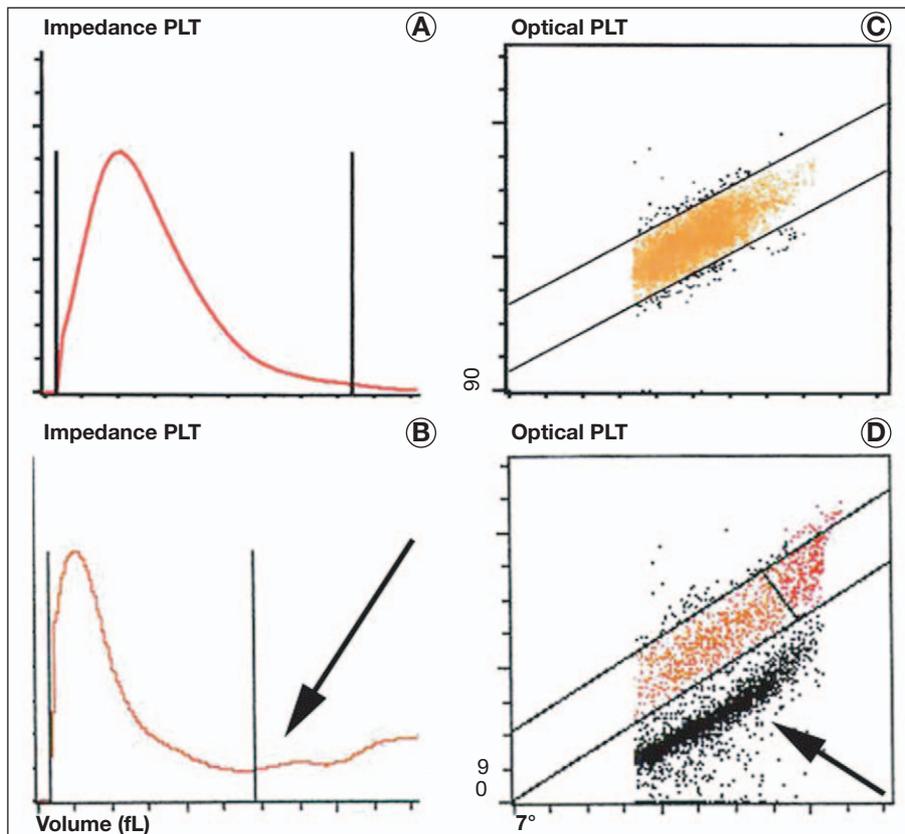


Figure 4. Perturbation de la numération plaquettaire en présence de microcytes ou de schizocytes au cours des microangiopathies thrombotiques. Les plaquettes et les fragments de globules rouges les plus petits ont des volumes comparables, et sont difficiles à séparer avec la technique par impédance (A : histogramme normal ; B : présence de schizocytes perturbant la séparation plaquettes-hématies), alors que la technique optique discrimine bien les deux types de particules par leurs réfringences très différentes (C : histogramme normal ; D : les schizocytes (en noir) sont bien en dehors de la fenêtre localisant les plaquettes (orange)). (Cell-Dyn Sapphire, Abbott).

sur l'histogramme plaquettaire et que celui-ci n'est pas lissé (Beckman), quand le volume plaquettaire moyen est exagérément élevé, ou quand la distribution des volumes des GR est très étendue [40].

Les fragments de cytoplasme de cellules nucléées

Comme les fragments de GR, les fragments du cytoplasme des leucocytes peuvent provoquer une augmentation de la numération des PLT. Il peut s'agir de fragments de blastes (monoblastes ou lymphoblastes), de cellules lymphomateuses lors de la phase de dissémination de lymphomes diffus à grandes cellules au diagnostic ou pendant la chimiothérapie, ou de tricholeucocytes [41-44]. La cytochimie (butyrate estérase), l'immunocytochimie (myéloperoxydase, CD61) ou la microscopie électronique confirment l'origine leucémique de ces particules. On peut les observer sur les frottis sanguins colorés : ces fragments cytoplasmiques sont plus hétérogènes en taille et en contenu que les PLT, et paraissent souvent plus nettement

basophiles (figure 5A). L'incidence de cette anomalie est loin d'être négligeable et une étude a récemment montré que l'on pouvait trouver au moins quelques fragments cytoplasmiques sur les frottis sanguins de 25,4 % des patients ayant une leucémie aiguë, et que dans 7 cas (4,1 %), la numération plaquettaire vraie était inférieure à 15 G/L, alors que le compte automatisé variait entre 21 et 75 G/L (moyenne = 39 G/L) [45]. Une transfusion de PLT a parfois été retardée du fait de cette fausse augmentation. Une telle situation doit être évoquée par le clinicien comme par le biologiste lorsqu'il existe un syndrome hémorragique alors que la numération des PLT n'est pas effondrée [42, 43].

Sur les AHC, un message d'alerte est en général présent, mais sans spécificité : « PLT géantes », « agrégats plaquettaires ? », « fantômes de globules rouges », ou divers autres messages liés à l'impossibilité de produire une courbe lissée. La numération des PLT est fautive, aussi bien avec la technique d'impédance que la technique de

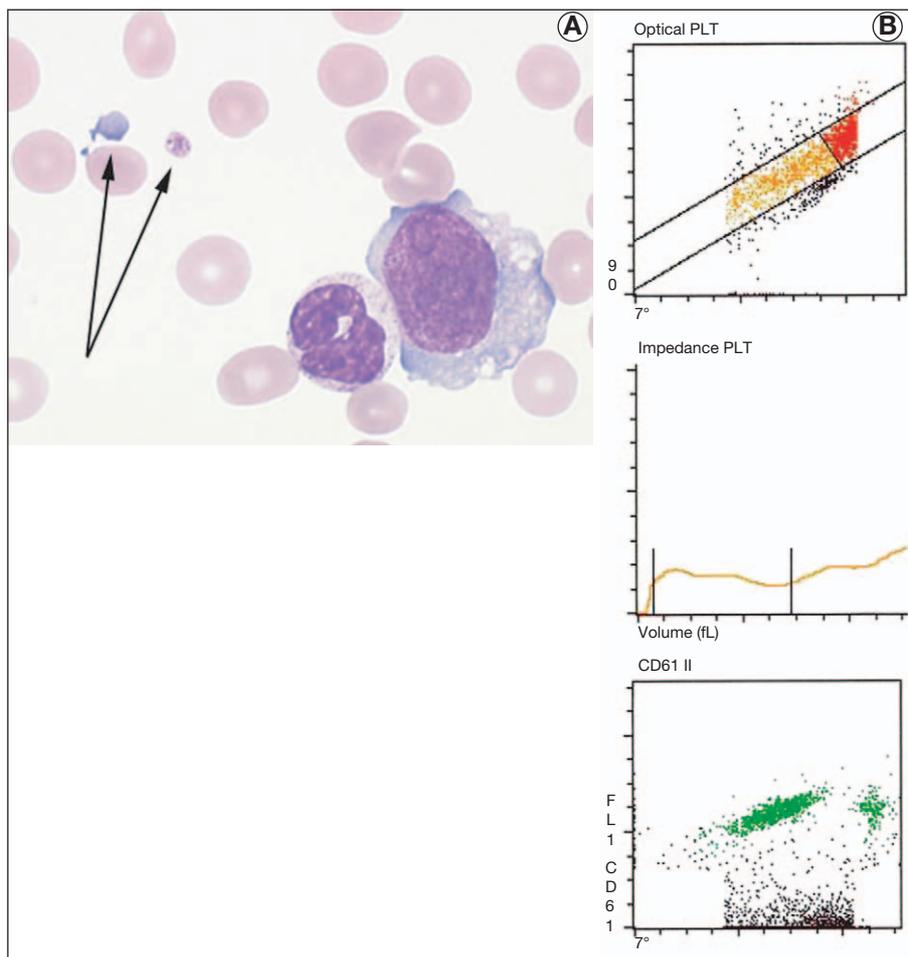


Figure 5. A : au cours de certaines leucémies aiguës, des fragments du cytoplasme de blastes leucémiques peuvent être présents dans le sang : leur taille est assez superposable à celle des plaquettes (flèche de droite), mais ils sont habituellement très basophiles (flèche de gauche) (leucémie aiguë monoblastique, frottis sanguin coloré au MGG ; fort grossissement). **B :** les fragments du cytoplasme de blastes ont une réfringence et une taille assez comparables à celles des plaquettes et perturbent le décompte des plaquettes par impédance et par technique optique (images du haut et du milieu). Par contre, la technique de décompte immunologique n'est pas influencée par ces fragments cellulaires : le nuage vert de fluorescence des plaquettes est bien séparé de celui des autres particules (Cell-Dyn Sapphire, Abbott) (image en bas).

diffraction optique (*figure 5B*). La mesure par technique immunologique a ici une place de choix (*figure 5B*). On peut réaliser sur frottis sanguin le décompte de ces fragments pour 100 PLT et faire ensuite la correction de la numération plaquettaire brute rendue par l'AHC, afin de proposer un résultat plus proche de la réalité.

Les micro-organismes

La présence *in vivo* de bactéries peut induire une fausse augmentation de la numération des PLT, bien qu'il s'agisse d'une situation rare, même chez les patients septiques [46, 47]. L'histogramme des volumes plaquettaires est anormal et montre un décalage vers un excès de particules de petite taille qui correspondent à des bactéries ou à

des amas de bactéries (*figure 6*). Dans notre expérience chez les patients présentant un sepsis sévère, lorsqu'un histogramme plaquettaire était anormal par présence de petites particules, des bactéries étaient constamment observées sur le frottis sanguin [48]. Une situation intermédiaire est celle liée à la croissance bactérienne au sein de l'échantillon sanguin provenant d'un patient infecté, quand le délai entre le prélèvement et l'analyse est important [47]. Enfin, la responsabilité d'un tube non stérile utilisé pour le prélèvement et dans lequel a eu lieu une croissance bactérienne peut être aussi évoquée : dans ce cas, l'histogramme des volumes et la numération des PLT sont anormaux, alors que la situation clinique est sans rapport avec un état infectieux sévère. Un pic de

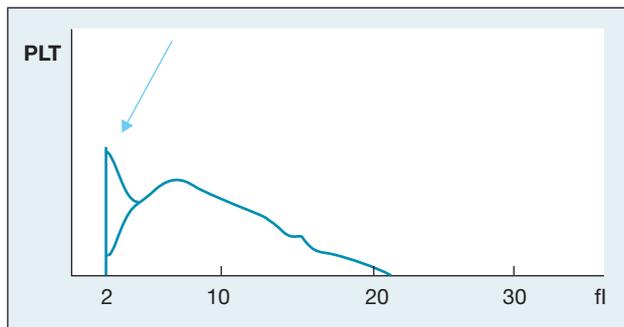


Figure 6. Présence d'un pic de particules de taille très réduite, correspondant à des bactéries libres ou en petits amas présents dans le sang lors d'une septicémie grave. Le pic étant très étroit, l'identification des plaquettes a été par ailleurs bien réalisée et la courbe log normale a été tracée, permettant de valider le résultat fourni par l'automate (STKS II, Beckman-Coulter).

particules de taille réduite à l'extrême gauche de l'histogramme des volumes plaquettaires ou un nuage de points dans la région proche de l'origine de l'histogramme bi- ou multiparamétrique de la formule leucocytaire doivent faire penser à ce type d'artéfact. Certains automates ont un seuil minimum de définition des PLT fixé à 3 fL ou variable de 2 à 6 fL qui améliore la fiabilité du résultat rendu par l'AHC.

Des champignons peuvent présenter la même taille que des PLT, et chez des patients thrombopéniques infectés par des *Candida*, ces derniers ont été observés sur les frottis sanguins et ont provoqué une fausse augmentation de la numération des PLT [49]. Chez un patient traité pour paludisme, de petits GR infectés par des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* ont été identifiés à tort comme étant des PLT (Abbott), conduisant à une numération plaquettaire faussement normale [50].

Les lipides

En présence d'un excès de chylomicrons ou avec des échantillons de sang prélevé après un repas, ou au cours de nutrition parentérale avec lipides, il peut se former de petites micelles lipidiques *in vitro*, lesquelles peuvent perturber la numération des PLT [51]. Cet excès de lipides peut également perturber la détermination de l'hémoglobine, de paramètres érythrocytaires et leucocytaires (voir les chapitres correspondants). Certains auteurs ont comparé l'influence de l'excès de chylomicrons sur la numération des PLT réalisée par deux types d'AHC : ils ont observé une augmentation modérée pour l'AHC utilisant une technique de comptage optique par rapport à celui utilisant la méthode de mesure par impédance, ce dernier ne paraissant pas affecté [51, 52]. Si l'augmentation était faible et négligeable chez les patients avec une numé-

ration plaquettaire normale (augmentation de 2 à 40 G/L), elle ne l'était plus chez les patients thrombopéniques, notamment en cas de leucémie traitée par L-asparaginase [51, 52]. Les lipides possèdent un indice de réfraction élevé et peuvent générer des signaux anormaux qui se localisent sur les histogrammes biparamétriques près de la région des PLT ou à la même place que les petits GR ou les débris de GR. Pour les AHC qui analysent les leucocytes sur deux canaux, les réactifs utilisés dans chaque canal ne sont pas sensibles de la même manière à la présence de lipides et, en fonction de la quantité et de la composition de ces derniers, une discordance entre la numération des leucocytes sur chacun des deux canaux peut être observée (Siemens, Sysmex). Des messages d'erreur (« schizocytes ? », « fragments de GR ? ») et l'analyse attentive des histogrammes leucocytaires (il existe des images particulières qui seront discutées plus loin dans le document consacré aux leucocytes) sont les points clés pour apprécier l'interférence potentielle des lipides sur la numération des PLT. Dans la mesure où les lipides perturbent la quantification de l'hémoglobine, des leucocytes et/ou la formule leucocytaire automatisée (tableau 2), des messages d'alarme correspondant à ces perturbations apparaissent (« turbidité cuve Hb », « interférence lipides »). Les méthodes proposées pour éliminer spécifiquement les lipides de l'échantillon (extraction à l'éther, remplacement du plasma par un volume identique de diluant iso-osmotique) sont à éviter car elles peuvent conduire elles-mêmes à de fausses numérations plaquettaires, soit par défaut soit par excès. Des modifications plus ou moins superposables à celles observées avec les micelles lipidiques ont été rapportées par ailleurs avec l'utilisation d'émulsions de perfluorocarbène [53].

Cryoglobulines et cryofibrinogène

La présence de cryoglobulines dans le sang (figure 7A) induit fréquemment des anomalies de la numération des PLT (figure 7B), des leucocytes, et plus rarement des anomalies de la numération des GR ou de l'hémoglobine [54]. Comme le mécanisme qui conduit à la fausse élévation des PLT et des leucocytes est similaire, ces deux modifications seront discutées plus en détail dans le document consacré aux anomalies de décompte des leucocytes, tout comme les fausses élévations de la numération des PLT observées en présence de cryofibrinogène. Quand la présence de cryoglobulines se traduit par la gélification plus ou moins totale de l'échantillon de sang, l'aspiration est difficile, insuffisante ou nulle, et se rapproche du cas de l'échantillon coagulé : un message d'erreur peut apparaître (« aspiration insuffisante ? »). Souvent, les cryoprotéines précipitent en amas plus ou moins volumineux qui perturbent les AHC en fonction de leur taille : les précipités de taille réduite induisent une fausse augmentation de

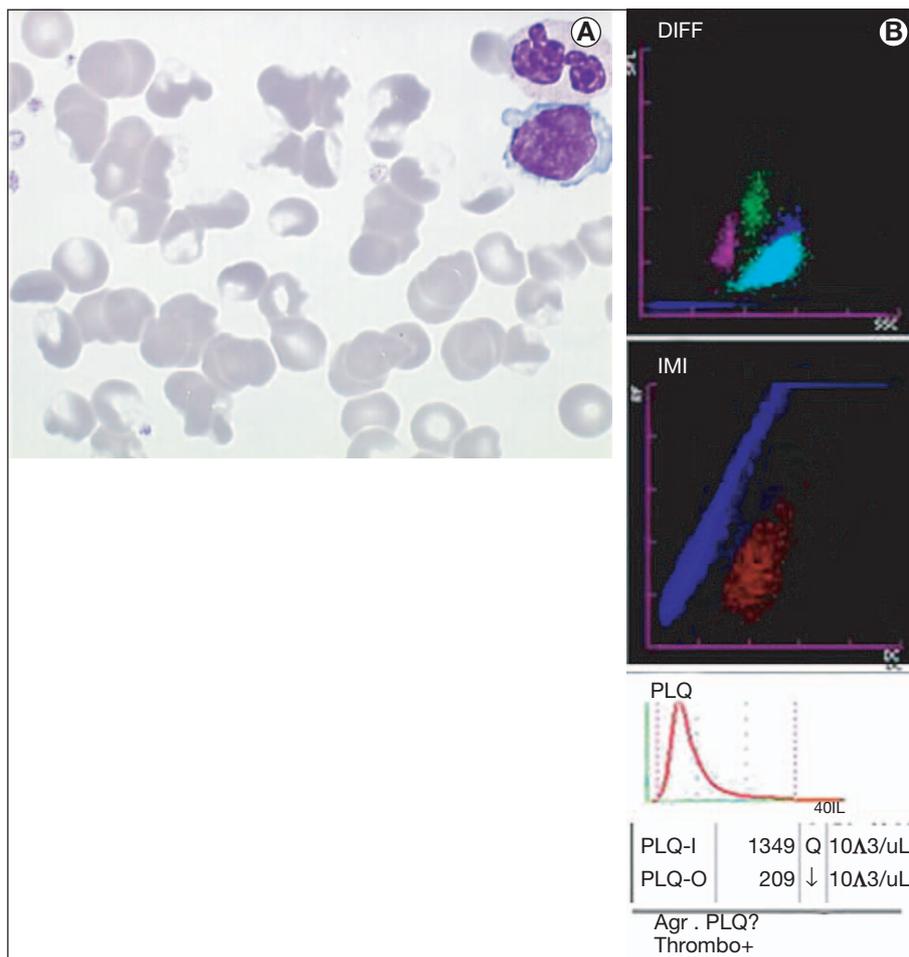


Figure 7. A : sur le frottis sanguin les cryoglobulines peuvent apparaître sous forme de petits agrégats variablement colorés ou totalement incolores mais déformant les hématies et leur conférant un aspect « mordu » ou « mangé aux mites » (coloration MGG, fort grossissement). **B :** en présence de cryoglobulines l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire (en haut) n'est pas perturbé, alors que celui visualisant la présence d'une éventuelle myélémie (au centre) montre un excès de particules (fusée de points bleus). La numération plaquettaire par impédance est nettement perturbée par la présence d'une grande quantité de particules anormales et de taille réduite (histogramme en bas). Le décompte par technique optique n'est pas perturbé et fournit un résultat convenable (PLQ-O). Les messages d'alerte sont peu spécifiques (patient au diagnostic d'une maladie de Waldenström avec cryoglobulinémie de type 1) (Sysmex XE-2100).

la numération des PLT (des valeurs jusqu'à huit fois la valeur vraie ont été rapportées), alors que les particules de plus grande taille ou les agrégats de petites particules perturbent la numération des leucocytes. Ces anomalies sont plus évidentes sur les AHC utilisant des réactifs à température du laboratoire, mais ceux qui utilisent des réactifs à 37 °C ne sont pas totalement dépourvus d'anomalies (Siemens).

Divers

Des bulles d'air résultant de fuites dans les tuyauteries des AHC peuvent se mélanger au flux de cellules et

perturber les techniques de numération par impédance [2]. De même, la contamination des réactifs (poussière, champignons) ou des débris introduits dans l'analyseur peuvent fausser la numération des PLT. Un nettoyage et des techniques de mesure du bruit de fond selon les préconisations des constructeurs sont nécessaires, tout comme le respect du contrôle de qualité, et permettent en général d'éviter de tels ennuis. Dans les échantillons sanguins trop âgés (au-delà de 1 à 2 jours) des variations du volume plaquettaire peuvent modifier la distribution Log normale des volumes des PLT et une impossibilité à générer une courbe lissée, ce qui diminue la précision de la mesure [2, 55].

Les automates des générations précédentes

Certains AHC des générations précédentes, comme l'Hemalog 8 (Technicon-Bayer), réalisaient la numération des PLT sur le sang total après lyse des GR. Avec cette technique, diverses particules intra-érythrocytaires comme le noyau des érythroblastes, les corps de Howell-Jolly, les parasites de type Plasmodium, et de gros agrégats de corps de Pappenheimer (le cas échéant) étaient libérés dans les AHC lors de l'hémolyse et perturbaient la numération des PLT [56]. D'autres anomalies comme des stromas érythrocytaires agrégés par des anticorps, dans le cadre d'anémies hémolytiques, ont été rapportées comme pouvant augmenter la numération des PLT sur certains anciens AHC [56].

Commentaires

La pseudothrombopénie induite par l'EDTA est certainement l'anomalie la plus fréquemment associée à des décomptes erronés sur les AHC, bien qu'elle soit liée à des conditions préanalytiques et non à l'AHC lui-même. Même avec les matériels les plus performants, un message d'alerte n'est pas constant et, chez un patient inconnu, une numération plaquettaire basse sur l'AHC doit au moins faire rechercher la présence d'éventuels amas plaquettaires, soit sur le frottis sanguin, soit dans une chambre hématimétrique. De tels échantillons ne devraient pas être réchauffés car la dissociation des agrégats est aléatoire ; dans la plupart des cas, un autre échantillon sanguin (sang prélevé sur citrate de sodium) sera utile. Les diverses autres situations qui peuvent induire de fausses numérations plaquettaires sont reportées dans le *tableau 2* et correspondent à des situations plus ou moins rares. Même si l'on possède l'explication d'une numération erronée, la même cause génère des écarts entre le résultat vrai et le résultat faux, variables d'un patient à l'autre. De plus, comme mentionné dans le *tableau 2*, certaines anomalies sont restreintes aux PLT, mais le plus souvent, une fausse numération plaquettaire est associée à une ou plusieurs autres anomalies de l'hémogramme. Il faut avoir à l'esprit que dans de nombreux cas, les messages d'alerte concernant la numération des PLT sont générés à partir de l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire : les AHC qui n'analysent pas les sous-populations leucocytaires (AHC sans formule leucocytaire 5 paramètres) vont donc plus fréquemment négliger ces anomalies de décompte. De même, pour le fonctionnement hospitalier, le choix d'utiliser le mode de décompte « numération globulaire » de son AHC sans le mode « formule leucocytaire » nécessite de bien comprendre quels messages d'erreur on supprime de ce fait.

Conflit d'intérêts : aucun.

Références

1. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers : a review. Part I : platelets. *Int Jnl Lab Hem* 2007 ; 29 : 4-20.
2. Bain BJ. *Blood cells : a practical guide*. Oxford : Blackwell Pub, 2006.
3. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int Jnl Lab Hem* 2007 ; 29 : 77-91.
4. Bizzaro N, Brandalise M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. Association with antiplatelet and antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol* 1995 ; 103 : 103-7.
5. Cohen A, Cycowitz Z, Mittelman M, Lewinski UH, Gardyn J. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analysers. *Haematologica* 2000 ; 30 : 117-21.
6. Payne BA, Pierre RV. Pseudothrombocytopenia : a laboratory artifact with potentially serious consequences. *Mayo Clin Proc* 1984 ; 59 : 123-5.
7. Bartels PC, Schoorl M, Lombarts AJ. Screening for EDTA-dependent deviations in platelet counts and abnormalities in platelet distribution histograms in pseudothrombocytopenia. *Scand J Clin Lab Invest* 1997 ; 57 : 629-36.
8. Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T, Nakahara K. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Br J Haematol* 1997 ; 99 : 817-23.
9. Bragnani G, Bianconcini G, Brogna R, Zoli G. Pseudothrombocytopenia : clinical comment on 37 cases. *Minerva Med* 2001 ; 92 : 13-7.
10. Casonato A, Bertomoro A, Pontara E, Dannhauser D, Lazzaro AR, Girolami A. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet GPIIb-IIIa. *J Clin Pathol* 1994 ; 47 : 625-30.
11. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia : a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol* 1995 ; 50 : 103-9.
12. Forscher CA, Sussman II, Friedman EW, Solomon V, Spaet TH. Pseudothrombocytopenia masking true thrombocytopenia. *Am J Hematol* 1985 ; 18 : 313-7.
13. Dahlqvist SR, Nilsson TK, Norberg B. Thrombocytosis in active rheumatoid arthritis. Relation to other parameters of inflammatory activity and confounding effect of automated cell counting. *Clin Rheumatol* 1988 ; 7 : 335-41.
14. Berkman N, Michaeli Y, Or R, Eldor A. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia : a clinical study of 18 patients and a review of the literature. *Am J Hematol* 1991 ; 36 : 195-201.
15. Takeuchi T, Yoshioka K, Hori A, Mukoyama K, Ohsawa A, Yokoh S. Cytomegalovirus mononucleosis with mixed cryoglobulinemia presenting transient pseudothrombocytopenia. *Intern Med* 1993 ; 32 : 598-601.
16. Mori M, Kudo H, Yoshitake S, Ito K, Shinguu C, Nogushi T. Transient EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a patient with sepsis. *Intensive Care Med* 2000 ; 26 : 218-20.
17. Shimizu M, Yamamoto M, Miyashi H, Shinohara Y, Ando Y. Simple, rapid, and automated method for detection of hyperaggregability of platelets using a hematology analyzer. *Am J Hematol* 2003 ; 72 : 282-3.
18. Schrezenmeier H, Muller H, Gunsilius E, Heimpel H, Seifried E. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb Haemost* 1995 ; 73 : 506-13.

19. Dabadie M, Valli N, Jacobin MJ, Laroche-Traineau J, Barat JL, Ducassou D, *et al.* Characterisation, cloning and sequencing of a conformation-dependent monoclonal antibody to the alphaIIb beta3 integrin : interest for use in thrombus detection. *Platelets* 2001 ; 12 : 397-405.
20. Sane DC, Damaraju LV, Topol EJ, Cabot CF, Mascelli MN, Harrington RA, *et al.* Occurrence and clinical significance of pseudothrombocytopenia during Abciximab therapy. *J Am Coll Cardiol* 2000 ; 36 : 75-83.
21. Manthorpe R, Kofod B, Wiik A, Saxtrup O, Svehag SE. Pseudothrombocytopenia. In vitro studies on the underlying mechanism. *Scand J Haematol* 1981 ; 26 : 385-92.
22. Van der Meer W, Allebes W, Simon A, van Berkel Y, de Keijzer MH. Pseudothrombocytopenia : a report of a new method to count platelets in a patient with EDTA- and temperature-independent antibodies of the IgM type. *Eur J Haematol* 2002 ; 69 : 243-7.
23. Fiorin F, Steffan A, Pradella P, Bizzaro N, Potenza R, de Angelis V. IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein IIb. *Am J Clin Pathol* 1998 ; 110 : 178-83.
24. Latger-Cannard V, Proust A, Devignes J, Salignac S, Bensoussan D, Salmon A, *et al.* Syndrome de Wiskott-Aldrich chez un enfant révélé par l'examen morphologique attentif des plaquettes. *Hématologie* 2008 ; 14 : 387-91.
25. Fohlen-Walter A, de Maistre E, Vigneron C, Lecompte T, Lesesve JF. Risque de sous-estimation de la numération plaquettaire par augmentation du volume plaquettaire moyen au cours de la grossesse. *Ann Biol Clin* 2003 ; 61 : 589-92.
26. Zeigler Z. In vitro granulocyte-platelet formation mediated by an IgG immunoglobulin. *Haemostasis* 1974 ; 3 : 282-7.
27. Liso V, Bonomo L. Platelet satellitism to basophils in a patient with chronic myelocytic leukaemia. *Blut* 1982 ; 45 : 347-50.
28. Cesca C, Ben-Ezra J, Riley RS. Platelet satellitism as presenting finding in mantle cell lymphoma. A case report. *Am J Clin Pathol* 2001 ; 115 : 567-70.
29. Lazo-Langner A, Piedras J, Romero-Lagarza P, Lome-Maldonado C, Sanchez-Guero J, Lopez-Karpovitch X. Platelet satellitism, spurious neutropenia, and cutaneous vasculitis : casual or causal association? *Am J Hematol* 2002 ; 70 : 246-9.
30. Bizzaro N, Goldschmeding R, Von dem Borne AE. Platelet satellitism is Fc gamma RIII (CD16) receptor-mediated. *Am J Clin Pathol* 1995 ; 103 : 740-4.
31. McGregor DH, Davis JW, Liu PI, Gates E, Pointdexter AR. Platelet satellitism : experimental studies. *Lab Invest* 1980 ; 42 : 343-55.
32. Christopoulos C, Mattock C. Platelet satellitism and alpha granule proteins. *J Clin Pathol* 1991 ; 44 : 788-9.
33. Greipp PR, Gralnick HR. Platelet to leukocyte adherence phenomena associated with thrombocytopenia. *Blood* 1976 ; 47 : 513-7.
34. Cohen AM, Lewinski UH, Klein B, Djaldetti M. Satellitism of platelets to monocytes. *Acta Haematol* 1980 ; 64 : 61-4.
35. Muglia B, Davis BH. Platelet satellitosis to lymphoma cells : case report and literature review. *Lab Hematol* 1997 ; 3 : 112-6.
36. Sherwood T, Shulman I, Pierre R. Satellitosis of erythrocytes about mature neutrophils. *Lab Hematol* 1998 ; 4 : 207-10.
37. Moraglio D, Banfi G, Arnelli A. Association of pseudothrombocytopenia and pseudoleukopenia : evidence for different pathogenic mechanisms. *Scand J Clin Lab Invest* 1994 ; 54 : 257-65.
38. Hu H, Varon D, Hjemdahl P, Savion N, Schulman S, Li N. Platelet-leukocyte aggregation under shear stress : differential involvement of selectins and integrins. *Thromb Haemost* 2003 ; 90 : 679-87.
39. Li N, Goodall AH, Hjemdahl P. Efficient flow cytometric assay for platelet-leukocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering. *Cytometry* 1999 ; 35 : 154-61.
40. Savage RA, Hoffman GC. Spuriously high platelet counts. *Am J Clin Pathol* 1985 ; 84 : 406-7.
41. Ballard HS, Sidhu G. Cytoplasmic fragments causing spurious platelet counts in hairy cell leukemia : ultrastructural characterization. *Arch Intern Med* 1981 ; 141 : 942-4.
42. Hammerstrom J. Spurious platelet counts in acute leukaemia with DIC due to cell fragmentation. *Clin Lab Haematol* 1992 ; 14 : 239-43.
43. Li S, Salhany KE. Spurious elevation of automated platelet counts in secondary acute monocytic leukemia associated with tumor lysis syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1999 ; 123 : 1111-4.
44. Kakkar N, Garg G. Cytoplasmic fragments of leukaemic cells masquerading as platelets in an automated haematology analyser. *J Clin Pathol* 2005 ; 58 : 224.
45. Van der Meer W, MacKenzie MA, Dinnessen JWB, de Keijzer MH. Pseudoplatelets : a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. *J Clin Pathol* 2003 ; 56 : 772-4.
46. Gloster ES, Strauss RA, Jimenez JF, Neuberger RW, Berry DH, Turner EJ. Spurious elevated platelet counts associated with bacteremia. *Am J Hematol* 1985 ; 18 : 329-32.
47. Kakkar N. Spurious rise in the automated platelet count because of bacteria. *J Clin Pathol* 2004 ; 57 : 1096-7.
48. Gerard J, Lebas E, Godon A, Genevieve F, Mercat A, Zandecki M. Bactéries libres et intraleucocytaires sur l'étalement sanguin : une situation rare mais de pronostic vital. *Ann Biol Clin* 2007 ; 65 : 87-91.
49. Latif S, Veillon DM, Brown D, Kaltenbach J, Linscott AJ, Oberle A, *et al.* Spurious automated platelet count. Enumeration of yeast forms as platelets by the Cell-Dyn 4000. *Am J Clin Pathol* 2003 ; 120 : 882-5.
50. Crabbe G, Van Poucke M, Cantinieaux B. Artefactually-normal automated platelet counts due to malaria-infected RBC. *Clin Lab Haematol* 2002 ; 24 : 179-82.
51. Cantero M, Conejo JR, Jimenez A. Interference from lipemia in cell count by hematology analysers. *Clin Chem* 1996 ; 42 : 987-8.
52. Kabutomori O, Iwatani Y, Kabutomori M. Effects of hypertriglyceridemia on platelet counts in automated hematology analysis. *Ann Intern Med* 1999 ; 130 : 452.
53. Cuiquet OY, Wood BL, Chandler WL, Spiess BD. A second-generation blood substitute (Perfluorodichlorooctane emulsion) generates spurious elevations in platelet counts from automated hematology analyzers. *Anesth Analg* 2000 ; 90 : 517-22.
54. Fohlen-Walter A, Jacob C, Lecompte T, Lesesve JF. Laboratory identification of cryoglobulinemia from automated blood cell counts, fresh blood samples, and blood films. *Am J Clin Pathol* 2002 ; 117 : 606-14.
55. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med* 2002 ; 126 : 336-42.
56. Morton BD, Orringer EP, LaHart LA, Stass SA. Pappenheimer bodies. An additional cause for a spurious platelet count. *Am J Clin Pathol* 1980 ; 74 : 310-1.