

Diagnostic d'une anémie hémolytique en réanimation

Hemolytic anemia diagnosis in the intensive care unit

M. Michel

Reçu le 3 avril 2013 ; accepté le 25 juin 2013
© SRLF et Springer-Verlag France 2013

Résumé La survenue d'une anémie hémolytique est une éventualité non exceptionnelle chez l'adulte qui implique une démarche diagnostique hiérarchisée. Le caractère parfois brutal de l'hémolyse et la profondeur de l'anémie peuvent mettre en jeu le pronostic vital et conduire les patients en réanimation. Si la mise en évidence du caractère hémolytique de l'anémie est relativement aisée, le diagnostic étiologique peut s'avérer nettement plus difficile. La démarche diagnostique repose en priorité sur les données de l'interrogatoire, du frottis sanguin et du test direct à l'antiglobuline (ou test de Coombs direct). Si la prise en charge reste avant tout symptomatique, certaines causes d'anémie hémolytique justifient la mise en route d'un traitement « spécifique » en urgence, conditionné par la rapidité de l'enquête diagnostique préalable.

Mots clés Anémie hémolytique · Anémie hémolytique corpusculaire · Anémie hémolytique extracorpulaire · Test direct à l'antiglobuline · Frottis sanguin

Abstract Hemolytic anemia is not an exceptional situation in adults. The abrupt onset of hemolysis and the severity of anemia may sometimes be life-threatening and require admission to the intensive care unit. Establishing the hemolytic mechanism of an anemia is rather easy, but finding its etiology can be quite difficult. The diagnosis of severe hemolytic anemia requires a rapid multiple-step procedure taking into account patient and family history, a careful analysis of the blood smear as well as the result of a direct antiglobulin test. While management is mainly supportive, some causes of hemolytic anemia may require “specific” and emergent therapy, based only on a rapid diagnosis procedure.

M. Michel (✉)

Service de médecine interne,
centre de référence pour les cytopénies auto-immunes de l'adulte,
CH Henri Mondor,
52 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny,
F-94010 Créteil cedex
e-mail : marc.michel@hmn.aphp.fr

Keywords Hemolytic anemia · Corpuscular haemolytic anemia · Extracorporeal haemolytic anemia · Direct antiglobulin test · Peripheral blood smear

Introduction

Bien que la plupart des anémies hémolytiques (AH) soient constitutionnelles et liées à des anomalies corpusculaires révélées majoritairement dans l'enfance, la survenue d'une AH est une éventualité non exceptionnelle chez l'adulte. Si la reconnaissance du mécanisme hémolytique de l'anémie est généralement aisée, l'identification de sa cause, qu'elle soit constitutionnelle ou acquise, peut être difficile et nécessite une démarche diagnostique hiérarchisée. Cette démarche doit être initialement orientée par l'interrogatoire du patient et l'analyse précise et rapide d'examen biologiques simples et facilement accessibles. Dans un deuxième temps, le recours à des examens plus spécialisés et orientés par les premiers résultats peut s'avérer nécessaire. Le but pour le réanimateur est d'une part de pouvoir confirmer ou infirmer rapidement certaines causes d'AH acquises pouvant mettre en jeu le pronostic vital et justifier la mise en route urgente d'un traitement « ciblé » (corticothérapie, échanges plasmatiques, éculizumab...) et d'autre part ne pas méconnaître une complication évolutive source d'exacerbation d'une AH constitutionnelle préexistante.

Les objectifs de cette mise au point sont donc les suivants : 1) rappeler brièvement les différentes causes d'AH potentiellement graves pouvant survenir à l'âge adulte et leurs critères diagnostiques ; et 2) proposer une démarche diagnostique hiérarchisée qui puisse être utile au réanimateur dans la pratique.

Rappels : définition et diagnostic positif d'une anémie hémolytique

La durée de vie normale d'un globule rouge (GR) mature est d'environ 120 jours ; la perte physiologique quotidienne

(1/120° de la masse globulaire totale) a lieu principalement dans la moelle osseuse, le foie et la rate. Les mécanismes physiologiques de sénescence et d'apoptose des GR sont encore partiellement méconnus et dépassent l'objectif de cette mise au point [1]. L'hémolyse est définie par la diminution de la durée de vie des GR ; elle peut être intravasculaire ou intratissulaire (extravasculaire). Le diagnostic positif d'une AH, suspecté cliniquement à partir de signes fonctionnels non spécifiques, repose sur des examens biologiques simples.

Signes cliniques

Les patients souffrant d'une AH présentent un syndrome anémique d'intensité variable, évocateur d'AH lorsqu'il survient brutalement en l'absence de saignement extériorisé et lorsqu'il s'associe à un ictère (Tableau 1).

Signes biologiques

L'hémoglobine libérée dans le plasma suite à l'hémolyse se lie à l'haptoglobine, sa protéine de transport, dont le taux diminue. La diminution de l'haptoglobine est le signe biolo-

gique d'hémolyse le plus sensible (sensibilité ~ 95 % en l'absence de syndrome inflammatoire associé) (Tableau 2). Les autres marqueurs d'hémolyse sont l'augmentation de la bilirubine non conjuguée et du taux de lactico-déshydrogénases (LDH, sensibilité ~80 %) [2]. En cas d'AH intravasculaire, et plus rarement d'AH extravasculaire sévère, une hémoglobinurie – pouvant parfois entraîner une insuffisance rénale sévère d'origine tubulo-interstitielle – et une hémossidérinurie sont également présentes. Les AH sont le plus souvent régénératives (réticulocytose >120 G/mm³ ± érythroblastose), et de fait macrocytaires et normochromes. Une hyperleucocytose, une thrombocytose et/ou une érythromyélémie « d'entraînement » liées à la forte régénération médullaire peuvent également s'observer. Aucun des paramètres précédents n'est toutefois spécifique d'hémolyse. Le Tableau 3 résume les différentes données de la numération formule sanguine (NFS) selon la cause de l'AH et les pièges diagnostiques à éviter.

Principales causes et mécanismes des anémies hémolytiques révélées à l'âge adulte

On distingue classiquement les hémolyses corpusculaires, liées à une anomalie d'un des constituants du GR (hémoglobine, enzyme du métabolisme énergétique du GR ou protéine constitutive de la membrane), des AH extracorporelles, où l'hémolyse du GR est secondaire à un facteur

Tableau 1 Signes cliniques évocateurs d'anémie hémolytique	
Syndrome anémique Pâleur cutanéomuqueuse Asthénie Dyspnée d'effort d'intensité variable Tachycardie / palpitations Hypoxie cérébrale : céphalées, acouphènes, myodésopsies...	
Hémolyse aiguë, intravasculaire Syndrome anémique bruyant Installation aiguë et brutale +/- fièvre / frissons État de choc / hypotension Hémoglobinurie* (urine rouge « porto ») Douleurs lombaires Ictère souvent retardé	Hémolyse chronique, intratissulaire Syndrome anémique d'intensité variable Installation subaiguë, progressive TRIADE : pâleur / splénomégalie / ictère Lithiase biliaire ± ulcères de jambe (AH corpusculaire constitutionnelle) Urines foncées, selles non décolorées (sauf complication biliaire intercurrente) Douleurs osseuses
* Une hémoglobinurie peut mimer une hématurie macroscopique avec laquelle elle ne doit pas être confondue (y compris sur une bandelette urinaire = intérêt de l'examen cyto-bactériologique des urines)	

Tableau 2 Signes biologiques évocateurs d'anémie hémolytique	
Anémie hémolytique : anémie normochrome, normocytaire, régénérative (réticulocytes >120 000/mm³)* avec signes d'hémolyse : haptoglobine abaissée voire effondrée (< 0,5 g/L), lactico-déshydrogénases élevées et bilirubine libre augmentée	
Hémolyse aiguë, intravasculaire : Macrocytose (passage d'érythroblastos) ± Thrombocytose, hyperleucocytose, érythromyélémie si régénération massive ± Insuffisance rénale aiguë ± Hémoglobinémie, hémoglobinurie, hémossidérinurie	Hémolyse chronique, intratissulaire : Microcytaire, si hémoglobinopathie ou dysérythropoïèse congénitale Normocytaire (drépanocytose) ± Thrombopénie modérée (hypersplénisme) Parfois hémolyse compensée : pas d'anémie ! ± hypocholestérolémie
* Les réticulocytes peuvent être <120 G/L dans d'authentiques anémies hémolytiques (voir Tableau 3)	

Tableau 3 Autres causes de modifications des paramètres d'hémolyse et présentations biologiques inhabituelles, source potentielle de « pièges diagnostiques »

Autres causes de modifications des paramètres d'hémolyse	
Autres causes de baisse de l'haptoglobine	Insuffisance hépatocellulaire
Bilirubine libre augmentée	Déficit congénital (~ 3 % des sujets de race noire)
Élévation des LDH	Maladie de Gilbert (déficit en glucuronyl-transférase hépatique)
Pièges diagnostiques	Lyse cellulaire (foie, muscle, poumon, tumeur...)
AH avec haptoglobine normale	Inflammation sous-jacente (intérêt du rapport haptoglobine / orosomucoïde)
AH avec réticulocytes normaux (< 120 G/L) voire réticulocytopenie (< 20 G/L)	Carence en folates secondaire à l'hémolyse chronique (macrocytose)
	Hémolyse intramédullaire par carence en vitamine B12 (macrocytose, maladie de Biermer)
	Carence martiale associée (microcytose)
	AH au tout début (avant régénération)
	Anticorps antiréticulocytes (~ 10 % des AHAI)
	Primo-infection à <i>Parvovirus</i> B19
AH régénérative microcytaire	Thalassémies
	Dysérythropoïèse congénitale
AH régénérative normocytaire	Drépanocytose
AH : anémie hémolytique ; AHAI : anémie hémolytique auto-immune ; LDH : lactico-déshydrogénases	

extrinsèque (anticorps, agent infectieux, facteur mécanique, toxique...). Les causes d'AH sont par ailleurs classées en constitutionnelles ou acquises en sachant que, hormis l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) et l'acanthocytose, les AH corpusculaires sont toutes d'origine constitutionnelle alors que les AH extracorporelles sont acquises (Fig. 1).

Anémies hémolytiques corpusculaires

Anomalies de membrane

• Constitutionnelles

Elles ne sont que très peu susceptibles de conduire le patient en réanimation en dehors d'une complication intercurrente. Les anomalies de la membrane sont de deux sortes, il peut s'agir :

- d'une perte de déformabilité : sphérocytose héréditaire (SH) [3] ou elliptocytose héréditaire (EH) ;
- d'anomalies de perméabilité entraînant une fragilité accrue du GR par modification de son état d'hydratation : stomatocytoses héréditaires (stomatocytose héréditaire à cellules déshydratées ou DHS et stomatocytose héréditaire à cellules hyperhydratées ou OHS) [4].

Le diagnostic d'une AH constitutionnelle d'origine membranaire doit être évoqué devant une AH chronique à test de Coombs direct (ou test direct à l'antiglobuline, TDA) négatif

et repose sur un faisceau d'arguments centrés sur la notion d'antécédents familiaux [3,4]. L'anémie est modérée et relativement bien tolérée. Une splénomégalie, un antécédent de splénectomie, la notion d'un ictère chronique et/ou des lithiases vésiculaires survenues à un âge « précoce » chez des apparentés sont notamment évocateurs. Plus rarement, le diagnostic est révélé par un épisode brutal d'érythroblastopénie secondaire à une primo-infection par le parvovirus B19, source d'anémie potentiellement profonde avec un taux de réticulocytes alors <20 G/L [5].

• Acquises

- L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est liée à l'expansion clonale de cellules hématopoïétiques non malignes ayant une mutation somatique du gène PIG-A (codant pour la sous-unité A de la phosphatidylinositol N-acétylglucosaminyltransférase). Il en résulte un défaut de synthèse des molécules d'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) [11], responsables de la fixation de nombreuses protéines à la surface membranaire, notamment des protéines inhibitrices du complément telles que CD59 ou CD55. C'est une maladie rare dont le sex-ratio est de 1, et l'âge médian de survenue d'environ 35 ans [6,7]. L'hémolyse intravasculaire liée à l'activation non régulée du complément est l'une des principales manifestations de la maladie. Elle est en règle générale modérée, chronique, entrecoupée de poussées favorisées par des circonstances entraînant une activation du complément (fièvre, acidose, hypoxie).

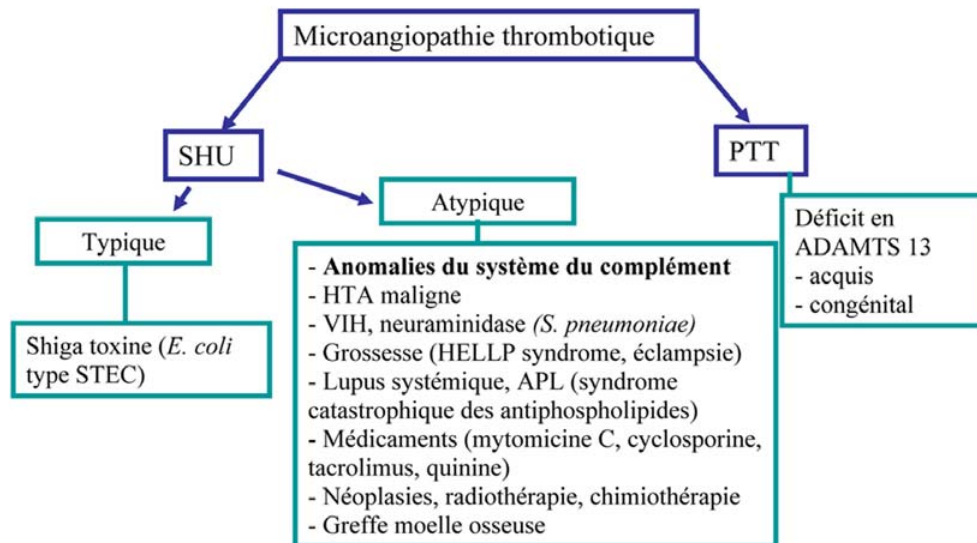


Fig. 1 Classification des microangiopathies thrombotiques. SHU = syndrome hémolytique et urémique ; PTT = purpura thrombotique thrombocytopenique ; HTA = hypertension artérielle ; VIH = virus de l'immunodéficience humaine ; STEC = *shiga toxin producing Escherichia coli*, ADAMTS 13 = *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*

Parallèlement à l'AH, l'HPN dans sa forme dite « classique » peut se compliquer de manifestations thromboemboliques veineuses dans des sites inhabituels (syndrome de Bud-Chiari, thrombose mésentérique, thrombose veineuse cérébrale) qui font toute la gravité de la maladie et qui peuvent conduire le patient en réanimation. La notion de dysphagie, de douleurs abdominales et/ou d'une dysfonction érectile chez l'homme sont également des éléments évocateurs du diagnostic. Biologiquement, l'AH peut s'associer à une carence martiale, à une autre cytopénie, voire à une pancytopenie, marquée en cas d'aplasie médullaire. Le frottis sanguin est classiquement normal. Le diagnostic repose sur la cytométrie en flux [8], qui met en évidence le déficit d'expression en CD55 et CD59, liées au GPI, au niveau des GR et des leucocytes (PN et monocytes). Le développement chez ces derniers d'un traitement ciblé (eculizumab) a transformé la prise en charge de l'HPN dans sa forme classique ;

- l'acanthocytose au cours des cirrhoses : l'hémolyse est une des causes d'anémie au cours des cirrhoses, le plus souvent due à une acanthocytose [9]. Celle-ci correspond à une déformation des GR, qui deviennent spiculés suite à la modification de la composition lipidique de leur membrane [10], et sont ainsi détruits après séquestration splénique. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'acanthocytes sur le frottis (>20 %). L'acanthocytose survient habituellement à un stade avancé de la cirrhose (Child C de Child-Pugh) et en est un des signes de gravité. De façon relativement exceptionnelle, la présence d'acanthocytes a été rapportée lors de syndromes myélodysplasiques [11].

Anomalies de l'hémoglobine

- Les syndromes thalassémiques

Seules les thalassémies intermédiaires (hémoglobinoses H ou certaines β -thalassémies intermédiaires) peuvent être responsables d'une AH révélée à l'âge l'adulte [12]. Les patients présentent un tableau d'AH chronique avec une splénomégalie, de discrètes déformations osseuses, parfois des lithiases pigmentaires. Là encore, la maladie peut être révélée par une exacerbation importante de l'anémie lors d'une érythroblastopénie induite par une primo-infection à parvovirus B19, ou encore liée à la prise de médicaments oxydants ou à syndrome infectieux. Le diagnostic de thalassémie est évoqué devant l'origine ethnique (Afrique, bassin méditerranéen et/ou Asie selon les formes de thalassémie), les signes d'hémolyse chronique et les anomalies du frottis et des indices érythrocytaires : microcytose, corps de Heinz, hématies en cible. Le diagnostic de certitude repose sur l'électrophorèse de l'hémoglobine (EPH).

- Anomalies structurales de l'hémoglobine

La drépanocytose est la plus fréquente des anomalies structurales de l'hémoglobine [13], et sa prévalence est croissante dans les pays occidentaux (1^{ère} maladie génétique en Île-de-France). Elle se transmet sur un mode autosomique récessif, et dans 10 % des cas environ, elle n'est diagnostiquée qu'à l'âge adulte, notamment en cas de forme hétérozygote composite (S/C ou S/ β thal.). Outre l'AH, la drépanocytose peut être révélée chez l'adulte par diverses manifestations

vaso-occlusives : syndrome thoracique aigu, accident vasculaire cérébral, ostéonécrose aseptique de hanche, rétinopathie ou encore épisode de priapisme chez l'homme. La numération et le frottis sanguin montrent une anémie normocytaire régénérative et la présence d'hématies en « faux », ainsi que la présence très fréquente de corps de Jolly reflet de l'asplénie fonctionnelle sous-jacente. La confirmation diagnostique repose sur l'électrophorèse de l'hémoglobine (EPH).

Anomalies enzymatiques

Les trois principaux déficits enzymatiques responsables d'une AH sont le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), lié à l'X et de loin le plus fréquent [14], le déficit en pyruvate kinase et le déficit en 5' pyrimidine nucléotidase [15-17]. Ces déficits peuvent passer longtemps inaperçus et être découverts à l'occasion d'un stress oxydatif, généré notamment par une prise médicamenteuse ou une infection entraînant une AH de révélation aiguë. Les caractéristiques génétiques, cliniques et biologiques de ces déficits sont rappelées dans le Tableau 4.

Anémies hémolytiques extracorporelles

Immunologiques

- Allo-immunes

L'hémolyse par allo-immunisation ne se rencontre chez l'adulte qu'en cas d'incompatibilité transfusionnelle. Les anticorps anti-érythrocytaires en cause sont de deux types :

- les anticorps naturels, ou anticorps « d'hétéro-immunisation », préexistants à toute exposition à des GR hétérologues, sont dirigés contre les sucres du système ABO et provoquent un accident hémolytique immédiat et sévère dès la première transfusion ABO-incompatible ;
- les agglutinines irrégulières, ou anticorps d'allo-immunisation, nécessitant une première exposition à des GR hétérologues. Ils sont dirigés contre des protéines des systèmes Rhesus, Kell, Duffy, Kidd et MNS pour la plupart et provoquent un accident hémolytique immédiat ou retardé uniquement après la deuxième transfusion incompatible.

Le diagnostic est confirmé par la positivité des agglutinines irrégulières (ou test indirect à l'antiglobuline-TIA). L'hémolyse par allo-immunisation est une hémolyse intravasculaire dans les formes graves et précoces, avec parfois un risque vital. Elle est intratissulaire dans les formes retardées mineures (fréquence des réactions fébriles) avec comme principale conséquence une absence de rendement transfusionnel [18-20]. Au cours de la drépanocytose, l'hémolyse post-transfusionnelle retardée (HPTR) est une

complication potentiellement grave survenant à distance d'une transfusion, elle peut mettre en jeu le pronostic vital du patient. Les signes cliniques d'hémolyse intravasculaire surviennent en moyenne à J10 de la transfusion, ils peuvent s'accompagner d'une crise vaso-occlusive (CVO) de novo parfois sévère et, de fait, inhabituelle au décours d'une transfusion ou d'exacerbation d'une CVO toute récente. L'étude de l'hémoglobine post-transfusionnelle sur l'électrophorèse de l'hémoglobine permet de confirmer le diagnostic d'HPTR. Les patients drépanocytaires ne produisant pas d'hémoglobine A, la diminution rapide du pourcentage d'hémoglobine A ou sa disparition totale reflète la destruction prématurée des globules rouges transfusés. À noter que la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) est négative dans un tiers des cas environ [21]. En cas de suspicion d'HPTR, il faut surtout s'efforcer ne pas retransfuser le patient et mettre en route des mesures symptomatiques (traitement de la CVO ± érythropoïétine recombinante). Le recours aux corticoïdes doit être évité dans le contexte de la drépanocytose compte tenu du risque de CVO graves, la place des traitements immunomodulateurs tels que les immunoglobulines polyvalentes ou le rituximab est actuellement en cours d'évaluation et doit être discuté au cas par cas avec le centre de référence [21].

- Auto-immunes

Les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) se caractérisent par une hémolyse liée à la présence d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes de la membrane érythrocytaire. L'incidence annuelle des AHAI est estimée entre un et quatre nouveaux cas sur 100 000 habitants ; elles peuvent survenir à tout âge de la vie avec une discrète prédominance féminine [22,23]. La classification des AHAI dépend essentiellement des caractéristiques immunochimiques et de l'isotype des auto-anticorps en cause (Tableau 5). Les AHAI sont caractérisées au frottis sanguin par l'absence classique de schizocytes, par une polychromasie (par augmentation du nombre de réticulocytes) et par la présence fréquente d'assez nombreux sphérocytes liée à une phagocytose incomplète des GR sensibilisés. En présence d'agglutinines froides, l'auto-agglutination des hématies est régulièrement observée à température ambiante [24]. Le TDA est l'examen clé du diagnostic ; il est positif dans plus de 95 % des cas d'AHAI. Il peut toutefois être faussement négatif lorsque l'auto-anticorps est présent en trop faible quantité ou faible affinité, ou en présence d'un anticorps de type IgA ou IgM non recherchés systématiquement [25]. En pratique courante, le TDA est nécessaire et suffisant pour affirmer la nature auto-immune d'un AH ; le TIA et le test d'élution peuvent dans certains cas particuliers permettre de préciser l'optimum thermique et la

Tableau 4 Caractéristiques principales des AH par déficit enzymatique			
	Déficit en G6PD [19]	Déficit en pyruvate kinase [21]	Déficit en 5' pyrimidine nucléotidase [22]
Transmission	Liée à l'X	Autosomique récessif	Autosomique récessif
Mutation	Locus <i>Xq28</i> => 150 variantes de G6PD	Locus <i>1q21</i> => 150 mutations	Locus <i>7p15-p14</i> => 14 mutations
Fréquence	Fréquent, ≥ 400 millions de personnes dans monde	Rare, non connue avec précision. Prévalence des hétérozygotes : 0,1 à 6 %	Très rare : 40 patients décrits (sous-diagnostiqué)
Répartition géographique	Ubiquitaire Prédominant dans les pays impaludés	Ubiquitaire	Ubiquitaire
S. cliniques	<i>Surtout chez l'homme, rarement symptomatique chez la femme (lyonnisation ou hétérozygotes composites)</i> - Symptomatologie en fonction du type biologico-clinique - Ictère néonatal => crise hémolytique sévère après stress oxydant (classes II et III) - Anémie hémolytique chronique non sphérocytaire (classe I)	<i>Que chez les homozygotes ou hétérozygotes composites</i> - Anémie hémolytique variable - Grave si associé à une hémoglobine S : syndrome drépanocytaire majeur néonatal	Ictère néo-natal Anémie hémolytique chronique avec splénomégalie et épisodes ictériques Sensibilité aux métaux lourds (saturnisme)
Frottis	Normal en dehors des crises hémolytiques En phase hémolytique aiguë : - Corps de Heinz (non spécifiques) - <i>Blister cells</i> - Kératocyte - Hématies « mordues » ou « fantômes »	Normal +/- ecchinoscytes	- Ponctuations basophiles (accumulation de pyrimidine nucléotides)
Diagnostic	À distance d'un épisode hémolytique : Dosage enzymatique par spectrophotométrie (N>8UI) +/- biologie moléculaire pour caractériser les mutations	Dosage enzymatique	Dosage enzymatique +/- biologie moléculaire (recherche)

G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase

spécificité de l'auto-anticorps ou encore aider à distinguer un auto- d'un allo-anticorps chez des patients polytransfusés. Au-delà de la classification dépendante des caractéristiques immunochimiques de l'auto-anticorps en cause (Tableau 5), les AHAI sont qualifiées de primitives lorsqu'elles sont isolées et de secondaires lorsqu'elles s'associent à une maladie sous-jacente, au premier rang desquelles figurent les hémopathies lymphoïdes B justifiant, en l'absence de contexte évident, la réalisation notamment d'un immunophénotypage des lymphocytes circulants et d'un scanner thoraco-abdomino-pelvien.

- Médicamenteuses et/ou immuno-allergiques

Les hémolyses immuno-allergiques sont liées à la destruction de GR par des anticorps dirigés contre un médicament ou un complexe médicament-GR. Ce diagnostic est donc à évoquer dans un contexte d'introduction médicamenteuse ou de réintroduction récente (Tableau 6). Même si une centaine de médicaments ont été incriminés comme potentiellement responsables d'AH, il s'agit d'une éventualité devenue exceptionnelle (1 pour 1 à 2 millions d'individus). En pratique, seules quelques classes médicamenteuses doivent

Tableau 5 Principales caractéristiques des anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) [45]

	AHAI à Ac « chauds »	MAF	AHAI à Ac « froids » transitoires	Hémoglobinurie paroxystique <i>a frigore</i>	AHAI « mixte »
Terrain / clinique	Adulte>enfant - Hémolyse extravasculaire - Installation subaiguë	>50ans - Hémolyse extravasculaire +/- acrosyndrome	Enfant, adulte jeune Hémolyse intravasculaire	Exceptionnelle chez l'adulte Hémolyse aiguë intravasculaire	Adulte
Fréquence au sein des AHAI [26]	63 %	29 %		1 %	7 %
Formes secondaires	≈ 50 % des cas	IgM kappa monoclonale : 90 % des cas +/- lymphome lymphoplasmocytaire	Infections (mycoplasme, EBV...)	Infections (mycoplasme, syphilis, virus)	LMNH
Classe d'Ig	IgG>>IgA, IgM	IgM>>IgA ou IgG AF>1/500	IgM polyclonale AF≥1/64	IgG (hémolysine biphasique de Donath- Landsteiner)	IgG, IgM +/- AF≈ 1/500
Optimum thermique de l'Ac	37°C	4°C	4°C	>30°C	Large amplitude 4-37°C
Spécificité TDA	IgG +/- C3d	C3	C3	C3	IgG +/- C3
Éluat	IgG	Négatif	Négatif	Négatif	IgG
Spécificité de l'anticorps	Pan-spécifique (anti-rhésus)	I>i>>Pr	I>i	P+c	Pan-sp écifique

Ac : anticorps ; AHAI : anémie hémolytique auto-immune ; MAF : maladie des agglutinines froides ; LMNH : lymphome malin non hodgkinien ; EBV : Epstein-Barr Virus

être retenues : céphalosporines de troisième génération, pénicilline et anti-inflammatoires non stéroïdiens [26,27]. L'hémolyse apparaît en moyenne après six jours de traitement lors d'une première administration et peut survenir à tout moment lors d'une réintroduction. Le TDA est le plus souvent positif, de type IgG, plus rarement de type IgG+C3d [26,28]. Les différents mécanismes présumés et les principaux médicaments responsables sont repris dans le Tableau 7.

Mécaniques

L'hémolyse mécanique se caractérise par la présence de nombreux schizocytes sur le frottis sanguin. Elle se rencontre dans deux situations principales : 1) la désinsertion de valve cardiaque mécanique ; et 2) le syndrome de microangiopathie thrombotique (MAT) pouvant relever de différentes causes ou mécanismes : purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), syndrome hémolytique et urémique (SHU)... Dans le premier cas, le contexte (présence d'une valve mécanique) est évident mais il faut savoir répéter les examens morphologiques (échographie cardiaque transœso-

phagienne) afin d'authentifier la désinsertion et/ou le dysfonctionnement de valve parfois uniquement confirmé en peropératoire. Le diagnostic de MAT repose sur la mise en évidence d'une AH mécanique avec TDA négatif, classiquement associée à une thrombopénie d'intensité variable et/ou une insuffisance rénale (SHU surtout) et/ou une cytolysé hépatique (HELLP syndrome). La reconnaissance rapide du diagnostic de MAT est capitale devant une AH de l'adulte car elle conditionne la prise en charge et le pronostic vital du patient à court terme. Les différentes causes de MAT et leur classification sont résumées dans la Figure 1 [29-32].

Infectieuses

Certains pathogènes peuvent déclencher des hémolyses par une action directe sur les GR [33,34]. L'agent infectieux le plus fréquemment responsable d'AH est de loin le *Plasmodium* (type *falciparum*, *vivax* ou *ovale*), à évoquer systématiquement en contexte fébrile au retour d'une zone d'endémie. D'autres parasitoses (trypanosomiase africaine

Tableau 6 Anémies hémolytiques d'origine médicamenteuse : mécanismes de destruction évoqués et principaux médicaments impliqués [26,27]

Toxicité directe

ribavirine, disulone, fludarabine...

Mécanisme immuno-allergique « Ac anti-médicament ou anti-GR/médicament »

– Liaison forte covalente / adsorption, Ac anti-haptène

=> hémolyse extravasculaire, TDA + IgG

céphalosporines de troisième génération (ceftriaxone, cefotetan), pénicilline... [27]

– Liaison faible, complexe médicament/Ac

=> hémolyse intravasculaire, TDA + C3

AINS, quinine, oxaliplatine, pénicilline, céphalosporines de troisième génération, lévofloxacine...

Mécanisme auto-immun « Ac anti-GR »

– α -méthyl-dopa : >10 % des patients traités >trois mois ont un TDA+, et 0,3 à 1 % => AHAI (IgG anti-Rh) [27]

– pénicilline à fortes doses IV : 3 % des patients ont un TDA+, AHAI rarissime

– fludarabine, cyclosporine, IFN- α ...

Induction de stress oxydatif dans le cadre des déficits enzymatiques (déficit en G6PD) ou hémoglobinopathies

Sulfamides, fluoroquinolones, anthracyclines...

Induction de microangiopathie

Quinine, ciclosporine, antiagrégants (ticlopidine >> clopidogrel)...

Ac : anticorps ; AHAI : anémie hémolytique auto-immune ; AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens ; G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; IFN- α : interféron-alpha ; TDA : test direct à l'antiglobuline

[35], babésiose chez le sujet splénectomisé...) peuvent beaucoup plus rarement être responsables d'AH. Le diagnostic repose sur le frottis sanguin et la goutte épaisse. *Bartonella bacilliformis*, bactérie intracellulaire rencontrée en Amérique du Sud, est responsable d'un tableau associant fièvre, arthralgies, polyadénopathies et AH sévère [36]. Les bactériémies à *Clostridium perfringens* devenues très rares sont classiquement sources d'hémolyses intravasculaires sévères liées à l'action d'une toxine [37], mais d'autres bactéries peuvent épisodiquement causer des toxoinfections responsables d'AH : *Escherichia coli*, streptocoque, staphylocoque, entérocoque, salmonelle, leptospire [34]. Enfin, certains agents infectieux peuvent déclencher d'authentiques AHAI (Epstein-Barr virus, mycoplasme...) voire une MAT (SHU induit par la vérotoxine de *E. Coli* de type STEC) ou encore révéler ou aggraver des AH corpusculaires sous-jacentes (déficit en G6PD, thalassémies, drépanocytose...).

Toxiques

Les AH provoquées par des toxiques sont rares. Leur mécanisme implique une agression directe de la membrane ou une altération du métabolisme globulaire et exclut les mécanismes allergiques, d'auto-immunisation ou d'altération du métabolisme lors d'enzymopathies. Les toxiques industriels responsables d'AH aigus parfois sévères doivent être évoqués dans un contexte d'exposition évident [20]. Les intoxications au sulfate de cuivre sont à rapprocher de l'hémolyse observée au cours de la maladie de Wilson [38,39]. Le saturnisme est désormais devenu très rare chez l'adulte en France. Le diagnostic de certitude repose sur l'augmentation de la plombémie et de la plumburie. Les autres causes, plus rares, s'observent dans des contextes souvent évidents : piqûres de guêpes [40] ou d'araignées [41], morsures de serpents [42] ou ingestion de champignons toxiques.

Autres

Il existe d'autres causes rares d'AH révélées à l'âge adulte, survenant dans des contextes particuliers :

- une grande hypophosphatémie (nutrition parentérale, alcoolisme) entraîne une perte de déformabilité des GR avec sphérocytose, responsable d'une hémolyse aiguë [43] ;
- le syndrome de Zieve [9] est une complication rare et transitoire de l'alcoolisme chronique, déclenchée par une alcoolisation aiguë, associant AH, hypertriglycéridémie et douleurs abdominales.

Démarche pour le diagnostic étiologique d'une AH révélée à l'âge adulte

Compte tenu de la diversité des causes possibles d'AH, et du pronostic potentiellement grave à court terme de certaines d'entre elles, la démarche diagnostique doit être suffisamment simple et rapide pour être applicable en pratique. Elle repose avant tout sur les données de l'interrogatoire lorsque celui-ci est possible et sur les résultats de deux examens simples et facilement accessibles en milieu hospitalier que sont le frottis sanguin et le TDA. En l'absence d'orientation diagnostique évidente, ce n'est que dans un deuxième temps que le recours à des tests ciblés et moins accessibles doit être envisagé.

Intérêt de l'interrogatoire, du contexte et de l'examen clinique

Contexte aigu

Certains contextes orientent immédiatement le diagnostic : exposition à certains toxiques, morsure de serpents,

Tableau 7 Exemples d'anomalies du frottis au cours d'une anémie hémolytique de l'adulte et orientation diagnostique [53,54]			
Type anomalie du gr	Définition / description	Orientation diagnostique	Examens complémentaires de confirmation
Schizocytes	Fragment de GR ou GR endommagés	MAT, valve cardiaque mécanique, brûlures étendues Hémolyses (peu) Biermer (« pseudo-MAT ») Fibrose médullaire	Aucun si contexte évident Dosage activité ADAMTS 13 si suspicion PTT
Poïkilocytose	GR de formes différentes	Hémolyse (non spécifique) Dysérythropièse	
Sphérocytes ou microsphérocytes	GR de forme sphérique	Sphérocytose héréditaire AHAI (fréquent), allo-immunisation Agression chimique ou thermique	Aucun si TDA + EMA, test d'autohémolyse, ektacytométrie
Drépanocyte	GR en faux	Drépanocytose SS ou SC	EPH ± HPLC
Elliptocytes	GR de forme ovale	Elliptocytose héréditaire	Aucun ou ektacytométrie en cas de doute diagnostique
Stomatocytes	GR en forme de bouche	Stomatocytose héréditaire Alcool	Ektacytométrie en cas de doute diagnostique
Acanthocytes	GR irrégulièrement crénelés, spiculés, irréguliers, renflés	Cirrhose abêtalipoprotéïnémie	Bilan hépatique Dosage lipoprotéines
Échinocytose	GR « chevelus »	Artefact Urémie Déficit en pyruvate kinase	Rien si contexte Dosage pyruvate kinase
Kératocytes	GR en forme de demi-lune	Déficit enzymatiques Même contexte que schizocytes	Dosage des enzymes érythrocytaires
« Blister cells »	GR en « ampoule »	Déficits enzymatiques	Dosage des enzymes érythrocytaires
Hématies en « piles d'assiettes »	GR « entassés »	Agglutinines froides	TDA + recherche agglutinines froides dans le sérum
Corps de Heinz	Précipitation d'hémoglobine, visibles uniquement après coloration au bleu Crésyl	Déficit G6PD, autres déficits enzymatiques Thalassémies Hémoglobine instable	Dosages enzymatiques EPH Test de stabilité de l'hémoglobine Dosage de toxiques
Ponctuations basophiles	Granulations fines et bleutées dans le cytoplasme, taille et formes hétérogènes	Saturnisme Dysérythropoïèse Thalassémie mineure Hb instable Déficit en 5' pyrimidine nucléotidase Maladie de Wilson	EPH Test de stabilité de l'hémoglobine Plombémie, plomburie Ceruleoplasmie, cuprurie Dosages enzymatiques
Hématies en cibles	GR clair à centre foncé	Hémoglobinoopathies	EPH
Corps de Jolly	Granules sphériques de grande taille	Splénectomie Asplénie fonctionnelle	Selon le contexte
Corps de Pappenheimer	Granules en grappe	Thalassémies	EPH

ADAMTS 13 : *a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13* ; EMA : cytométrie de flux après marquage à l'éosine-5'-maléimide ; EPH : électrophorèse de l'hémoglobine ; GR : globule rouge ; HPLC : *high-performance liquid chromatography* ; MAT : microangiopathie thrombotique ; PTT : purpura thrombocytopenique ; TDA : test direct à l'antiglobuline

association AH + thrombopénie + fièvre chez un patient de retour d'une zone d'endémie évoquant en priorité un accès palustre... La prise récente d'un médicament oxydant oriente d'emblée vers un possible déficit enzymatique. Une grossesse au 3^e trimestre (prééclampsie et/ou HELLP) ou encore une transfusion récente (HPTR) sont autant de circonstances susceptibles d'orienter le diagnostic.

Contexte chronique ou évolution par poussées

La réalisation d'un arbre généalogique détaillé est une étape importante de l'interrogatoire. Des antécédents familiaux d'anémie, de splénectomie ou des antécédents personnels évoquant des crises hémolytiques (ictère, pâleur, anémie, hémoglobinurie) ou des lithiases biliaires orientent le diagnostic vers des anomalies constitutionnelles du GR. L'origine ethnique est également un élément d'orientation puisque certaines AH corpusculaires se rencontrent préférentiellement, voire exclusivement chez les patients originaires selon les cas d'Afrique (drépanocytose), du bassin méditerranéen (β thalassémies) et/ou du sud-est asiatique (α thalassémies).

Examens biologiques d'orientation

Indices érythrocytaires et frottis sanguin

Les indices érythrocytaires (volume globulaire moyen [VGM], concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine [CCMH] et teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine [TCMH]) sont utiles à l'orientation diagnostique devant une anémie, les automates modernes représentent les populations érythrocytaires et réticulocytaires en fonction de leur volume ou de leur CCMH sous la forme d'histogrammes. Ainsi, il est possible de visualiser des sous-populations érythrocytaires hypochromes et microcytaires sans que les valeurs globales de VGM et de CCMH ne soient modifiées. À l'inverse, une proportion anormalement élevée de GR hyperchromes (CCMH augmentée) doit faire d'emblée évoquer une microsphérocytose ou encore une maladie des agglutinines froides selon le contexte. Les réticulocytes sont notamment facilement identifiés par leur taille et leur contenu en acide ribonucléique (ARN). Même si ces outils diagnostiques sont insuffisamment utilisés en regard du nombre important d'informations qu'ils apportent, ils ne peuvent se substituer à l'analyse du frottis sanguin qui permet d'apprécier la morphologie des GR et des autres éléments figurés du sang. Il doit être systématiquement demandé dans un contexte d'AH. Le Tableau 7 résume les principales anomalies du frottis rencontrées lors d'une AH, les diagnostics associés et les examens complémentaires nécessaires.

Le test direct à l'antiglobuline ou test de Coombs direct

Le TDA est une méthode semi-quantitative d'agglutination des hématies permettant de révéler la présence d'anticorps +/- de complément (C₃d) fixés à membrane des GR [2]. Antérieurement réalisé sur tube, ce test avait une très bonne sensibilité (≥ 95 %) pour le diagnostic d'AHAI [44,45] et une spécificité variable selon le contexte. Chez des sujets sains donneurs de sang, le TDA n'est positif que dans un cas sur 14 à 35 000 [45]. En revanche, jusqu'à près de 10 % des patients hospitalisés ont un TDA positif en l'absence d'AH et ce du fait de différents facteurs non mutuellement exclusifs : hypergammaglobulinémie polyclonale, leucémie lymphoïde chronique, transfusions répétées, traitement par immunoglobulines polyvalentes, prise de certains médicaments [22,24,45]. Chez les sujets ayant une AH, la valeur prédictive positive du TDA pour le diagnostic d'AHAI est de 83 %, alors qu'elle n'est que de 1,4 % chez le sujet sain [44]. La positivité du TDA est donc une condition nécessaire mais non suffisante pour poser le diagnostic d'AHAI. Afin d'améliorer la spécificité du test, de nouvelles techniques ont donc été développées, notamment le TDA sur gel et le TDA par cytométrie de flux :

- le TDA sur microcolonnes de gel, actuellement largement utilisé, a de meilleures sensibilité et spécificité (respectivement de 98,4 à 100 % et de 83 à 95,2 % sur des études récentes [46-48] ;
- le TDA par cytométrie en flux peut également représenter un complément d'investigation pour sensibiliser la détection des auto-anticorps fixés aux GR [49,50].

• Interprétation du TDA et tests complémentaires

TDA positif : la spécificité du TDA, essentiellement de type IgG et/ou C₃d, détermine le type d'AHAI : un TDA de type IgG isolé ou IgG + C₃ traduit habituellement la présence d'auto-anticorps « chauds », alors qu'une spécificité C₃d isolée traduit généralement la présence d'un auto-anticorps « froid » de type IgM (Tableau 7). La présence d'IgM à la surface des GR est en effet difficile à mettre en évidence, les IgM étant le plus souvent éluées de la membrane érythrocytaire in vitro [51]. Lorsque le TDA est positif, il peut être complété par un TIA à la recherche d'auto-anticorps dans le sérum. En cas de TIA positif chez des patients préalablement transfusés, un test d'adsorption du sérum sur GR autologues est habituellement nécessaire pour s'assurer de l'absence d'allo-anticorps associé. Le TIA peut également être réalisé sur gel avec une sensibilité, une spécificité, une valeur prédictive positive et une valeur prédictive négative estimées respectivement à 100 % / 97,7 % / 81,4 % et 100 % pour le diagnostic d'AHAI [48].

Le TIA permet également de préciser la spécificité de l'anticorps : anti-I, anti-i, anti-rhésus. Par ailleurs, il peut être réalisé à différentes températures (4°C, 22°C et 37°C) permettant ainsi de préciser l'optimum thermique et/ou l'amplitude thermique de l'anticorps. La même technique est appliquée à la recherche d'agglutinines froides, présentes à taux faible dans environ un tiers des AHAI « chaudes » et d'en préciser le titre [45]. Inversement, de rares cas d'AHAI peuvent être associés à une IgM à large amplitude thermique voire avec un optimum thermique entre 30 et 37°C [51].

Le test d'élution (à la chaleur, avec solvant ou acide) permet de préciser la spécificité des auto-anticorps fixés sur les GR à l'aide d'un panel de GR tests de phénotype connu. Il est surtout utile dans un contexte d'hémolyse post-transfusionnelle pour distinguer des auto-anticorps d'allo-anticorps ou en cas d'hémolyse immuno-allergique, circonstance au cours de laquelle le TDA est fréquemment positif et l'éluat souvent négatif [27].

TDA négatif : compte tenu de la très bonne sensibilité du TDA avec les techniques actuelles, sa négativité permet d'éliminer quasi formellement le diagnostic d'AHAI. Toutefois, en l'absence de diagnostic alternatif pouvant expliquer l'AH, un TDA négatif doit être complété par un TDA à l'aide d'une anti-globuline anti-IgA et/ou une anti-IgM et par une élution [2]. En théorie cependant, dans une infime minorité de cas, on ne peut exclure complètement une

authentique AHAI à TDA négatif. De nouvelles techniques sont à l'étude pour encore améliorer la sensibilité et détecter la présence d'auto-anticorps présents même en faible quantité [52]. Le diagnostic d'AHAI à TDA négatif ne peut être envisagé qu'après exclusion de toutes les autres causes d'AH. Les principes de la démarche diagnostique basée sur l'interrogatoire, le contexte clinique et le « couple d'examen » formé par le frottis sanguin + le TDA sont résumés dans la Figure 2.

Conclusion

Afin d'éviter une errance diagnostique potentiellement préjudiciable au patient et/ou la réalisation d'examen complémentaires inadaptés et/ou coûteux, la démarche diagnostique devant une AH de l'adulte se doit d'être à la fois simple et hiérarchisée. Des lors que le caractère hémolytique de l'anémie est confirmé, un interrogatoire complet couplé au binôme d'examen biologiques simples que constitue le frottis sanguin et le TDA nous paraît être l'étape essentielle pour orienter rapidement vers l'étiologie de l'AH. L'analyse soignée et rapide de ces éléments clinicobiologiques simples assortie de l'analyse des indices érythrocytaires en collaboration directe avec les médecins biologistes permet dans la majorité des cas d'orienter sinon de préciser la cause de l'AH

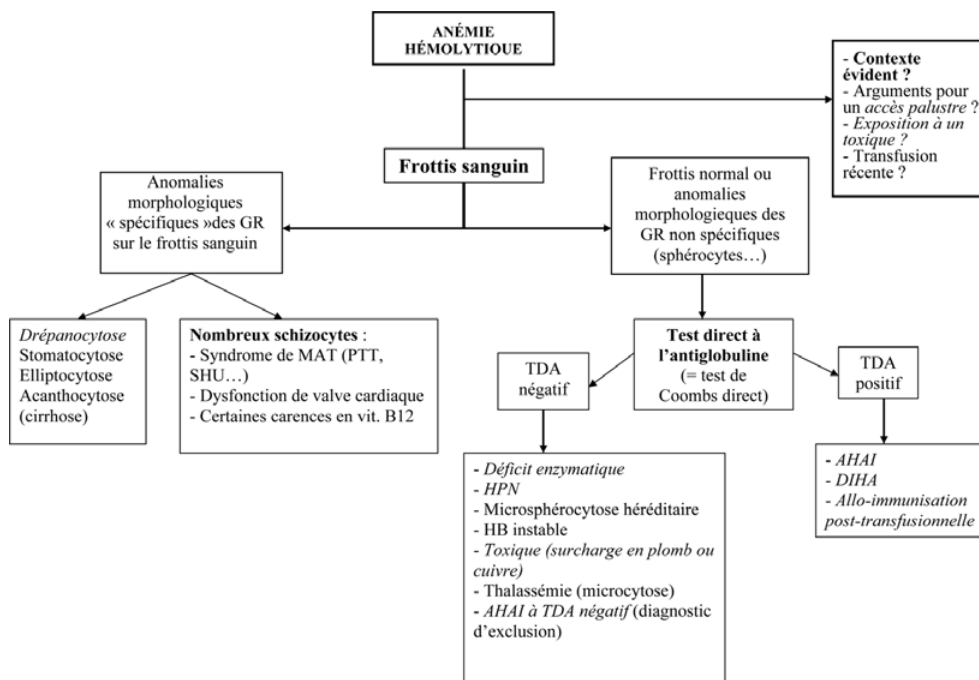


Fig. 2 Démarche diagnostique devant une anémie hémolytique de l'adulte. Hb = hémoglobine ; TDA = test direct à l'antiglobuline ; GR = globules rouges ; HPN = hémoglobinurie paroxystique nocturne ; MAT = microangiopathie thrombotique ; AHAI = anémie hémolytique auto-immune ; DIHA = drug-induced immune hemolytic anemia ; Pb = plomb ; Cu = cuivre.

* les cases à fond coloré correspondent aux causes d'AH pouvant conduire « directement » le patient en réanimation

et de mettre en place le cas échéant un traitement « spécifique » adapté (plasmaphèreses en cas de PTT par exemple). Dans les cas plus complexes (absence d'élément d'orientation initial, patient polyopathologique et/ou polytransfusé), le recours à des tests plus spécifiques peut s'avérer nécessaire. Dans ces cas particuliers, la collaboration entre cliniciens et biologistes est plus importante encore, afin de juger au cas par cas la pertinence et/ou la rentabilité attendue des différents tests et garantir une bonne interprétation des résultats notamment chez les patients récemment transfusés. En dehors de cas particuliers comme le PTT, les accidents d'hémolyse post-transfusionnelle, ou à un degré moindre les AHAI, la démarche diagnostique ne doit toutefois pas retarder/empêcher le recours éventuel à un support transfusionnel.

Conflit d'intérêt : l'auteur déclare ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, et al (1998) Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80:173–95
- Michel M (2008) [Warm autoimmune hemolytic anemias and Evans syndrome in adults]. *Rev Med Interne* 29:105–14
- Bolton-Maggs P, Langer JC, Iolascon A, et al (2001) Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis – 2011 update. *Br J Haematol* 156:37–49
- Garçon L (2009) [Biological diagnosis of red cell membrane disorders]. *Arch Pediatr* 16:553–5
- Summerfield GP, Wyatt GP (1985) Human parvovirus infection revealing hereditary spherocytosis. *Lancet* 2:1070
- Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al (1993) Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73:703–11
- De Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, et al (2008) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 112:3099–106
- Hall SE, Rosse WF (1996) The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87:5332–40
- Bladé J, Desramé J, Corberand D, et al (2007) [Diagnosis of anemia in alcoholic cirrhosis]. *Rev Med Interne* 28:756–65
- Allen DW, Manning N (1994) Abnormal phospholipid metabolism in spur cell anemia: decreased fatty acid incorporation into phosphatidylethanolamine and increased incorporation into acylcarnitine in spur cell anemia erythrocytes. *Blood* 84:1283–7
- Doll DC, List AF, Dayhoff DA, et al (1989) Acanthocytosis associated with myelodysplasia. *J Clin Oncol* 7:1569–72
- Lal A, Goldrich ML, Haines DA, et al (2011) Heterogeneity of hemoglobin H disease in childhood. *N Engl J Med* 364:710–8
- Bartolucci P, Galactéros F (2012) Clinical management of adult sickle-cell disease. *Curr Opin Hematol* 19:149–55
- Wajcman H (2006) Déficit en glucose-6-phosphate-deshydrogénase. EMC (Elsevier SAS Paris), *Hématologie* 13-006-D-10
- Wajcman H (2006) Anémies hémolytiques dues à des déficits en enzymes érythrocytaires autres que la G6PD. EMC (Elsevier SAS Paris), *Hématologie*, 13-006-D-11
- Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Valentini G (2005) Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *Br J Haematol* 130:11–25
- Marinaki AM, Escuredo E, Duley JA, et al (2001) Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. *Blood* 7:3327–32
- Gehrs BC, Friedberg RC (2002) Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 69:258–71
- Nance ST, Arndt PA (2004) Review: what to do when all RBCs are incompatible--serologic aspects. *Immunohematology* 20:147–60
- Levy J, Varet B (2008) Les anémies hémolytiques. In: *Hématologie et transfusion*. 88-104
- Caractéristiques et évolution de 78 épisodes d'hémolyse post transfusionnelle retardée (HPTR) chez des patients atteints d'un syndrome drépanocytaire majeur (11 – 16) A. Habibi, C. Guillaud, M. Michel, et al Congrès Annuel de la Société Française d'Hématologie du 27 au 29 mars 2013, Paris
- Valent P, Lechner K (2008) Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wien Klin Wochenschr* 120:136–51
- Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R (1992) The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *J Clin Pathol* 45:1047–52
- Garratty G (2008) The James Blundell Award Lecture 2007: do we really understand immune red cell destruction? *Transfus Med* 18:321–34
- Grimaldi D, Limal N, Noizat-Pirenne F, et al (2008) Anémie hémolytique auto-immune à IgA révélant une infection par le virus C. *Rev Med Int* 29:135–8
- Salama A (2009) Drug-induced immune hemolytic anemia. *Expert Opin Drug Saf* 8:73–9
- Mayer B, Yürek S, Salama A (2010) Piperacillin-induced immune hemolysis: new cases and a concise review of the literature. *Transfusion* 50:1135–8
- Johnson ST, Fueger JT, Gottschall JL (2007) One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia--a new paradigm. *Transfusion* 47:697–702
- Patel A, Patel H, Patel A (2009) Thrombotic thrombocytopenic purpura: the masquerader. *South Med J* 102:504–9
- Sadler JE (2008) Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 112:11–8
- George JN (2006) Clinical practice. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 354:1927–35
- Fremaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, et al (2013) Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol* 8:554–62
- Potasman I, Prokocimer M (2008) The added value of peripheral blood cell morphology in the diagnosis and management of infectious diseases--part 2: illustrative cases. *Postgrad Med J* 84:586–9
- Prokocimer M, Potasman I (2008) The added value of peripheral blood cell morphology in the diagnosis and management of infectious diseases--part 1: basic concepts. *Postgrad Med J* 84:579–85
- Wéry M, Mulumba PM, Lambert PH, Kazymba L (1982) Hematologic manifestations, diagnosis, and immunopathology of African trypanosomiasis. *Semin Hematol* 19:83–92
- Bauduer F (2000) Hémolyses extracorporelles non immunologiques. *Encycl Méd Chir (Elsevier Eds), Hématologie* 13-006-D-18
- Bätge B, Filejski W, Kurowski V, et al (1992) Clostridial sepsis with massive intravascular hemolysis: rapid diagnosis and successful treatment. *Intensive Care Med* 18:488–90
- Michel M, Lafaurie M, Noël V, et al (2001) [Hemolytic anemia disclosing Wilson's disease. Report of 2 cases]. *Rev Med Interne* 22:280–3

39. Chappuis P, Bost M, Misrahi M, et al (2005) [Wilson disease: clinical and biological aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)* 63:457–66
40. Monzon C, Miles J (1980) Hemolytic anemia following a wasp sting. *J Pediatr* 96:1039–40
41. Vetter RS, Isbister GK (2008) Medical aspects of spider bites. *Annu Rev Entomol* 53:409–29
42. Reid HA (1964) Cobra-bites. *Br Med J* 2:540–5
43. Jacob HS, Amsden T (1971) Acute hemolytic anemia with rigid red cells in hypophosphatemia. *N Engl J Med* 85:1446–50
44. Philippe P (2007) [Autoimmune hemolytic anemia: diagnosis and management]. *Presse Med* 36:1959–69
45. Michel M (2008) [Characteristics of warm autoimmune hemolytic anemia and Evans syndrome in adults]. *Presse Med* 37:1309–18
46. Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, et al (2007) Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. *J Clin Lab Anal* 18:255–8
47. Das SS, Chaudhary R, Khetan D (2007) A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test. *Hematology* 12:175–8
48. Jaiprakash M, Gupta PK, Kumar H (2006) Role of gel based technique for Coomb's test. *Indian J Pathol Microbiol* 49:370–2
49. Lin J, Hao T, Lyou J, et al (2009) Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion* 49:1335–46
50. Wang Z, Shi J, Zhou Y, Ruan C (2001) Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 73:188–93
51. Arndt PA, Leger RM, Garratty G (2009) Serologic findings in autoimmune hemolytic anemia associated with immunoglobulin M warm autoantibodies. *Transfusion* 49:235–42
52. Kamesaki T, Oyamada T, Omine M, et al (2009) Cut-off value of red-blood-cell-bound IgG for the diagnosis of Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 84:98–101
53. Bain BJ (2005) Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 353:498–507
54. An X, Mohandas N (2008) Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol* 141:367–75