

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

Partie 3. Hémoglobine, hématies, indices érythrocytaires, réticulocytes*

*Automated hematology analysers and spurious counts
Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count
and indices, reticulocytes*

Alban Godon

Franck Genevieve

Anne Marteau-Tessier

Marc Zandecki

Laboratoire d'hématologie, Centre
hospitalier universitaire d'Angers,
Angers
<MaZandecki@chu-angers.fr>

Résumé. Une fausse augmentation de l'hémoglobine mesurée avec les automates d'héogrammes est rapportée au cours des grandes hyperlipémies, hyperleucocytoses et hémolyses, et parfois en grand excès d'immunoglobulines ou de cryoglobulines. À l'opposé, les fausses diminutions de l'hémoglobine sont avant tout liées à des erreurs préanalytiques et non aux automates. Le volume globulaire moyen ou VGM est lui aussi sujet à des erreurs de mesure, notamment en présence d'agglutinines froides, d'une grande hyperleucocytose ou d'une hyperglycémie sévère (diabète, dilution par perfusion glucosée) ; parfois la natrémie, l'excès d'anticoagulant ou la technique de mesure elle-même influencent également le VGM. La numération des hématies est faussement augmentée par les fortes hyperleucocytoses (surtout hyperlymphocytoses), et faussement diminuée en présence d'agglutinines froides ou par défaut de prise en compte des hématies de taille réduite (microcytes, schizocytes). Une anomalie de mesure de l'hémoglobine ou/et du VGM ou/et du nombre d'hématies provoque une anomalie de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, mettant en avant cet indice érythrocytaire comme première « alarme » d'une anomalie de mesure. La difficulté à appréhender ces diverses anomalies de mesure est liée à leur variabilité d'expression selon les cas et les automates. Les actions correctrices utilisent parfois les capacités analytiques de ces mêmes machines. La numération des réticulocytes présente elle aussi des limites analytiques, incluant le mauvais fenêtrage, l'interférence de particules intra-érythrocytaires, l'hyperleucocytose ou la présence d'érythroblastes, et diverses alarmes incitent à la réalisation d'un décompte microscopique.

Mots clés : automates d'hématologie, numération globulaire, hémogramme automatisé, erreur de décompte, globules rouges, hémoglobine, indices érythrocytaires

Abstract. Several situations lead to abnormal haemoglobin measurement or to abnormal red blood cells (RBC) counts, including hyperlipemias, agglutinins and cryoglobulins, haemolysis, or elevated white blood cells (WBC) counts.

* La première partie de ce travail de synthèse a été publiée sous la référence : Marteau-Tessier A, Genevieve F, Godon A, Macchi L, Zandecki M. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. Partie 1. Les plaquettes sanguines. *Ann Biol Clin* 2010 ; 68 : 393-407. La deuxième partie est publiée dans ce numéro.

Tirés à part : M. Zandecki

Mean (red) cell volume may be also subject to spurious determination, because of agglutinins (mainly cold), high blood glucose level, natremia, anticoagulants in excess and at times technological considerations. Abnormality related to one measured parameter eventually leads to abnormal calculated RBC indices: mean cell haemoglobin content is certainly the most important RBC parameter to consider, maybe as important as flags generated by the haematology analysers (HA) themselves. In many circumstances, several of the measured parameters from cell blood counts (CBC) may be altered, and the discovery of a spurious change on one parameter frequently means that the validity of other parameters should be considered. Sensitive flags allow now the identification of several spurious counts, but only the most sophisticated HA have optimal flagging, and simpler ones, especially those without any WBC differential scattergram, do not share the same capacity to detect abnormal results. Reticulocytes are integrated into the CBC in many HA, and several situations may lead to abnormal counts, including abnormal gating, interference with intraerythrocytic particles, erythroblastosis or high WBC counts.

Key words: haematology analysers, cell blood count, spurious counts, red blood cells, haemoglobin, red cell indices

Les automates d'hématologie cellulaire (AHC) déterminent simultanément, à partir d'un même canal, le nombre des globules rouges (GR), le volume globulaire moyen (VGM) et la numération des plaquettes (PLT). L'hématocrite (Ht) est soit calculé à partir du produit du nombre des GR par le VGM, soit mesuré à partir de la somme des volumes individuels des GR qui traversent l'orifice en un temps donné (ce qui correspond à un volume précis). Les indices érythrocytaires, utiles à la démarche diagnostique des anémies, doivent également être considérés comme les premiers messages d'alerte pour détecter une erreur de détermination du nombre des GR, du VGM et/ou de l'hémoglobine (Hb). Notamment, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) est calculée à partir de trois paramètres mesurés, et une anomalie de mesure de l'un d'entre eux va générer une CCMH anormale : cet indice doit donc être particulièrement surveillé avant la validation technique de l'hémogramme, des valeurs trop hautes ou trop basses pouvant être le signe d'une anomalie de mesure autant que d'une pathologie précise [1, 2]. La numération des réticulocytes est aujourd'hui incluse parmi les analyses réalisées par plusieurs AHC, soit sous forme d'une technique semi-automatisée (dilution et coloration manuelle puis analyse de la coloration par l'AHC) soit totalement automatisée : différents écueils et causes d'erreurs existent également pour ce paramètre et doivent être connus.

Perturbation de la mesure de l'hémoglobine

La concentration en Hb du sang est mesurée après dilution et lyse des GR (hypotonie, pH bas, addition d'agents

accélérateurs la lyse), et en présence de détergents non ioniques qui diminuent la turbidité liée aux membranes cellulaires et aux lipides plasmatiques. La mesure est spectrophotométrique, utilisant soit une modification de la technique à la cyanmethémoglobine soit divers agents dépourvus de cyanure tels que le laurylsulfate de sodium ou l'imidazole. Les AHC analysant les GR par une technique de diffraction optique mesurent également directement la quantité (ou la concentration) en Hb de chaque GR : divers indices sont alors proposés, tels que la concentration hémoglobinique corpusculaire moyenne (CHCM), superposable chez le sujet sain de la CCMH calculée (Siemens, Abbott), ou la teneur individuelle en hémoglobine des GR (Sysmex). Les principales situations perturbant la mesure de l'hémoglobine sont reprises dans le *tableau 1*.

Les lipides et l'hyperchylomicronémie

L'hyperlipémie peut induire, outre une numération erronée des PLT et des leucocytes, une turbidité excessive dans les cuves de lecture de l'Hb [3]. Ce phénomène s'observe principalement avec des échantillons de sang prélevés après un repas riche en lipides, et parfois chez des patients présentant une hypertriglycéridémie sévère constitutionnelle ou acquise [4], ou qui reçoivent des perfusions intraveineuses d'émulsions lipidiques [3, 5, 6]. Parmi les diverses hyperlipémies, des erreurs sont observées chez les patients ayant au moins 20 g/L de triglycérides (hyperlipoprotéïnémies de type I et une partie des types V) [7]. Tous les AHC, même les plus récents, sont sensibles à l'hyperlipémie, bien qu'à des degrés variables. Par exemple, les AHC Cell Dyn 4000 et Sapphire (Abbott) proposent des valeurs vraies

Tableau 1. Principales situations conduisant à une erreur de détermination de l'hémoglobine ou de la numération érythrocytaire.

Anomalies de mesure de l'hémoglobine totale	Anomalies d'autres paramètres de l'hémogramme
<i>Fausse augmentation</i> Lipides	Augmentation de la N° des leucocytes, des plaquettes, et de la CCMH
Grandes hyperleucocytoses Immunoglobulines (et cryoglobulines)	Augmentation de la N° des GR, diminution de la CCMH Augmentation de la N° des leucocytes, ou augmentation de la N° des PLT, et augmentation de la CCMH
Hémolyse <i>in vitro</i> Carboxyhémoglobine (forte quantité) Bilirubine (> 250-300 mg/L)	Augmentation de la CCMH, diminution de la N° des GR Augmentation de la CCMH
<i>Fausse diminution</i> Circonstances préanalytiques liées à l'échantillon : coagulation, remplissage excessif du tube Ponction à proximité d'une perfusion	 Si perfusion glucosée : augmentation du VGM et diminution de la CCMH
Sulfhémoglobine	
Numération érythrocytaire	
<i>Fausse augmentation</i> Grandes hyperleucocytoses	Augmentation du VGM, de l'Hb et augmentation ou diminution de la CCMH (variable selon les automates)
Plaquettes géantes (anecdotique)	Diminution de la N° des PLT
<i>Fausse diminution</i> Agglutinines froides Agglutinines chaudes (quelques cas) Microcytes, schizocytes Cryoglobulines : si aspiration insuffisante	Augmentation du VGM et de la CCMH Augmentation du VGM et de la CCMH (parfois) Augmentation de la N° des PLT Diminution du VGM, de la N° des PLT et de la N° des leucocytes (remarque : le plus souvent les cryoglobulines augmentent la N° des leucocytes et des PLT)
Hémolyse <i>in vitro</i> Coagulation dans l'échantillon de sang	Augmentation d'Hb et de la CCMH Diminution de tous les paramètres mesurés

de l'Hb jusqu'à des concentrations sériques de 13 g/L de triglycérides et 9 g/L de cholestérol, et deviennent progressivement sensibles à l'hyperlipémie au-delà.

On suspecte ce type d'interférence quand la CCMH est > 36 g/dL, et/ou quand il existe une image anormale sur l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire : les particules lipidiques peuvent en effet apparaître sous forme d'un nuage de points, revêtant des aspects variables selon les AHC (figure 1). Les AHC qui utilisent la méthode de mesure par diffraction optique proposent souvent une mesure de l'Hb intraérythrocytaire (CHCM), qui permet d'obtenir par calcul la valeur de l'Hb sanguine (Siemens Advia, Sysmex). Sinon, différentes méthodes ont été proposées pour retrouver la valeur approximative de l'Hb de l'échantillon, mais sont à éviter : remplacement isovolumétrique du plasma par un diluant iso-osmotique ou extraction à l'éther des lipides. Un calcul approximatif de la valeur de l'Hb à partir de la valeur de l'Ht centrifugé est utilisable en situation d'urgence (3 unités d'Ht correspondent approximativement à 1 g/dL d'Hb).

Bien qu'un excès de lipides soit surtout rapporté comme augmentant faussement la valeur de l'Hb, une valeur anormalement diminuée a été rapportée dans un cas [8].

Les grandes hyperleucocytoses

Un nombre élevé de leucocytes insuffisamment détruits par les agents d'hémolyse et les détergents peut provoquer une turbidité excessive dans la cuve de mesure de l'Hb et en perturber la mesure : il n'y a pas de seuil clairement défini, mais en pratique il faut être prudent quand l'hyperleucocytose dépasse 50 à 100 G/L [1-3]. Certains AHC définissent un seuil à 250 G/L, alors que d'autres sont insensibles à l'hyperleucocytose du fait de l'addition d'un mélange particulier d'agents lytiques et de détergents avant la mesure de l'Hb (Sysmex).

Il n'y a pas d'alarme spécifique, quoique certains AHC signalent la possibilité d'une turbidité excessive dans la cuve d'Hb, et c'est surtout l'existence d'une CCMH anormalement haute dans un contexte d'hyperleucocytose qui doit faire évoquer l'anomalie [9]. La CHCM proposée par les AHC utilisant la diffraction optique permet d'obtenir la vraie valeur de l'Hb. La dilution du prélèvement sanguin permet parfois de minimiser l'interférence, mais doit être utilisée avec précautions ; les méthodes de déleucocytation par centrifugation ménagée et échange de plasma riche en leucocytes avec du diluant sont sujettes à des

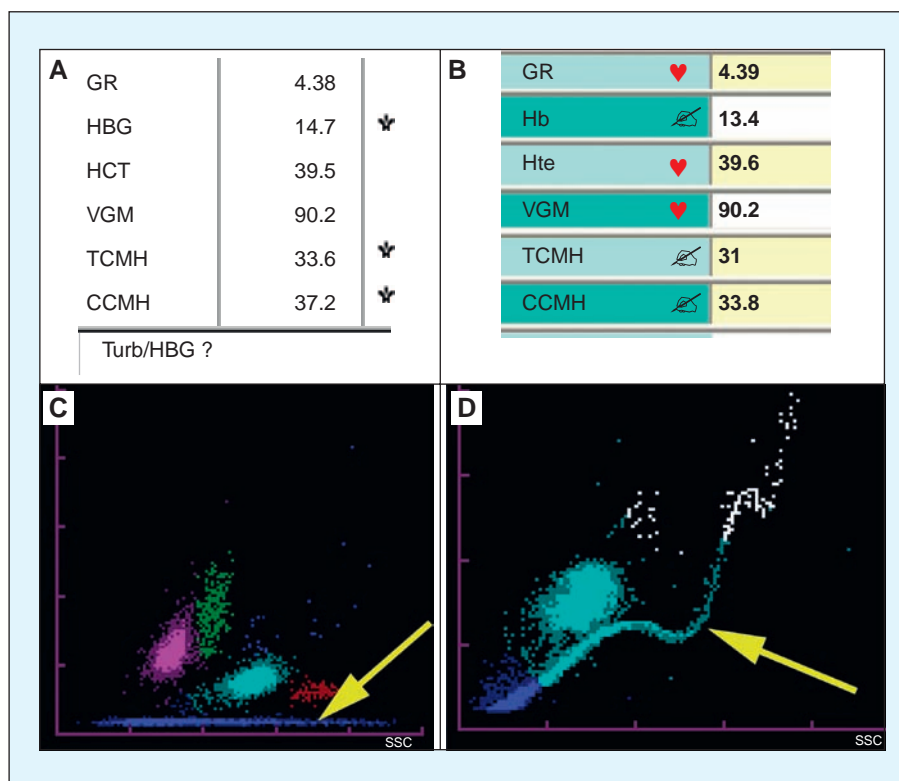


Figure 1. Interférence des lipides sur la mesure de l'hémoglobine. Les résultats initiaux de cette numération globulaire montrent une CCMH > 36 g/dL et un message signale la possible perturbation de la mesure de l'hémoglobine (A) ; sur l'histogramme « formule leucocytaire » un amas de particules de taille réduite apparaît (C, flèche), alors que l'histogramme « numération des leucocytes » montre un nuage de points dont la silhouette particulière évoque la présence d'un excès de lipides (D, flèche)). La quantité d'hémoglobine de chaque GR déterminée par méthode optique en utilisant le canal « réticulocytes » permet d'obtenir l'hémoglobine réelle et de recalculer les indices érythrocytaires (B) (Sysmex XE 2100).

erreurs ultérieures sur la mesure des autres paramètres de l'héogramme. La numération des GR peut également être perturbée au cours des grandes hyperleucocytoses (voir plus loin), rendant les indices érythrocytaires calculés suspects : la mesure de l'Ht par centrifugation puis une approximation constitue l'alternative dans les cas extrêmes.

Les immunoglobulines

L'excès d'immunoglobulines (Ig) interfère dans la détermination de divers examens biologiques [10, 11]. Une fausse augmentation de l'Hb a été décrite chez des patients présentant une macroglobulinémie de Waldenström avec IgM et dans le myélome multiple avec IgA ou IgG [10-12]. Les Ig en quantité élevée interagissent avec les réactifs de la solution de lyse : pour les IgM ce phénomène est clairement relié à une quantité élevée de forme monomère dans le sang circulant [13]. Les AHC utilisant la technique à la cyanmethémoglobine semblent être plus fréquemment affectés, sans doute parce que les méthodes sans cyanure surajoutent divers surfactants.

Ici, la CCMH est habituellement supérieure à 36 g/dL par une surestimation de l'Hb, alors que l'Ht de l'AHC n'est

pas perturbé. Afin d'obtenir des résultats plus exacts, il a été proposé de déterminer "l'Hb plasmatique" après centrifugation de l'échantillon, qui donne la turbidité liée à la paraprotéine, puis de retirer ce résultat de l'Hb mesurée à partir du sang total [10]. Pour certains AHC (Sysmex), il semble que ce phénomène ne survienne plus si l'échantillon est dilué de moitié par le technicien avant analyse. Pour les AHC proposant une CHCM mesurée (technique de diffraction optique), la discordance avec la CCMH calculée génère une alarme : la valeur vraie de l'Hb peut être obtenue à partir de la CHCM (Siemens, Sysmex).

Les cryoglobulines

Une fausse augmentation de l'Hb a été rapportée dans quelques cas, correspondant soit à un mécanisme similaire à celui de la présence de grandes quantités d'Ig (décrit ci-dessus) [1] soit à la perturbation de la transmission lumineuse [14]. Dans d'autres cas ce sont des anomalies de flux liées à l'hyperviscosité au sein de l'AHC (gélification partielle de l'échantillon produisant un aspect proche de celui d'un sang coagulé) qui provoquent une diminution à la fois

de l'Hb et de la numération des GR [14]. Cependant la perturbation de la mesure de l'Hb liée à la présence d'une cryoglobulinémie reste une situation rare.

Hémolyse

L'Hb libre plasmatique est mesurée en même temps que celle contenue dans les GR, mais en conditions normales cette quantité est négligeable et ne provoque aucune interférence de dosage. Cependant, dans les hémolyses intravasculaires majeures liées à des toxiques, en rapport avec des valves cardiaques ou post-transfusionnelles, l'Hb libre plasmatique peut être suffisamment élevée pour perturber la mesure de l'Hb totale, entraînant parfois une CCMH > 36 g/dL. Les AHC qui déterminent la CHCM (diffraction optique) permettent d'obtenir la vraie valeur de l'Hb (Siemens, Sysmex). Dans les grandes hémolyses il faut en outre réaliser l'analyse rapidement après le prélèvement, car celle-ci peut se poursuivre *in vitro*, entraînant une appréciation faussée de l'Hb libre plasmatique mais aussi une fausse diminution du nombre des GR et de l'Hb.

La structure chimique de l'hémoglobine, et la bilirubine

En situation normale, l'Hb est soit couplée à l'oxygène, soit au dioxyde de carbone, et les pics optimaux d'absorption lumineuse de l'Hb diffèrent légèrement : l'utilisation de divers réactifs (ferricyanure, laurylsulfate), qui transforment toutes les formes de couplage de l'Hb en une molécule unique de pic d'absorption lumineuse étroit, permet d'obtenir une valeur très exacte de l'Hb sanguine. Cependant, quand il existe une forte quantité de monoxyde de carbone, le complexe Hb-monoxyde de carbone se transforme plus lentement sous l'influence des réactifs, ce qui peut induire une fausse augmentation de la valeur de l'Hb [1, 15]. À l'opposé, la sulfhémoglobine en grande quantité a été rapportée comme diminuant la valeur de l'Hb [1]. En pratique, de telles anomalies ne s'observent qu'au cours de situations extrêmes d'intoxication au monoxyde de carbone ou d'anémies hémolytiques toxiques. Concernant la bilirubine, bien qu'il faille par principe être prudent quand il en existe de grandes quantités dans le plasma, on n'observe pas d'interférence sur la plupart des AHC, au moins pour des concentrations allant jusqu'à 400 $\mu\text{mol/L}$.

Perturbation de la numération des GR et des paramètres érythrocytaires

De telles anomalies sont observées de manière variable selon la technologie utilisée par les AHC (voir pour chaque AHC son « guide d'utilisation »). Avec la technique par impédance, un aliquot de sang est dilué par un réactif iso-

osmotique, et les impulsions électriques générées par les GR traversant l'orifice de comptage permettent de déterminer à la fois le nombre et le volume des GR. Par les techniques de diffraction optique à au moins deux angles on détermine également le nombre de GR et leur volume moyen (VGM). Afin d'améliorer la précision de mesure, certains AHC effectuent un prétraitement des GR par un réactif spécifique qui les transforme de manière isovolumétrique en une sphère (Siemens, Abbott). Les PLT et les GR sont énumérés sur un même canal : la discrimination entre GR de taille réduite et PLT de grande taille, basée sur le volume et/ou l'indice de diffraction, est parfois délicate et a été discutée préalablement (*voir partie 1 de ce travail*). À l'inverse, même dans les situations extrêmes de la pathologie humaine le VGM ne dépasse pas 150-160 fL, et selon les AHC le seuil supérieur d'analyse des particules dans le canal érythrocytaire est limité (à 250-360 fL selon les AHC). Les principales situations perturbant la numération des GR sont reprises dans le *tableau 1*.

Numération des GR faussement augmentée

Les grandes hyperleucocytoses

Quand les AHC énumèrent les GR par impédancemétrie, le décompte réalisé dans le canal « GR et PLT » inclut en réalité les GR et une partie des leucocytes. En situation physiologique la surestimation de la numération des GR ne dépasse pas 0,1 % (en considérant un nombre de leucocytes de 5 G/L et un nombre de GR de 5 T/L). Cependant, de grandes hyperleucocytoses (> 100 G/L) peuvent induire une modification significative de la numération érythrocytaire, particulièrement si le patient est anémique [16]. Selon les AHC, la plage de mesure des GR varie (40 à 250 fL ou 36 à 360 fL), et les leucocytes seront inclus ou non dans le nombre des GR en fonction de leur volume. Ceci est particulièrement vrai dans la leucémie lymphoïde chronique ou dans la phase de dissémination des lymphomes à petites cellules, car les cellules anormales ont un volume faible (150-200 fL). L'histogramme des volumes des GR montre la présence d'une seconde population cellulaire, de plus grand volume (*figure 2*). Le VGM rendu est plus ou moins faussé car il correspond à la moyenne des volumes des GR et des leucocytes (voir plus loin). Cette erreur de numération des GR est observée également avec la technique par diffraction optique, mais plus ou moins nettement selon les AHC.

Quand l'hyperleucocytose dépasse 100 G/L, l'alarme ou l'aspect particulier de l'histogramme des GR (évocateur d'une « double population de GR ») aident à repérer l'anomalie. La CCMH est parfois anormale, mais soit augmentée soit diminuée selon l'importance des perturbations respectives du nombre des GR et de la mesure du VGM. Il faut prendre en compte que la valeur de l'Hb est aussi

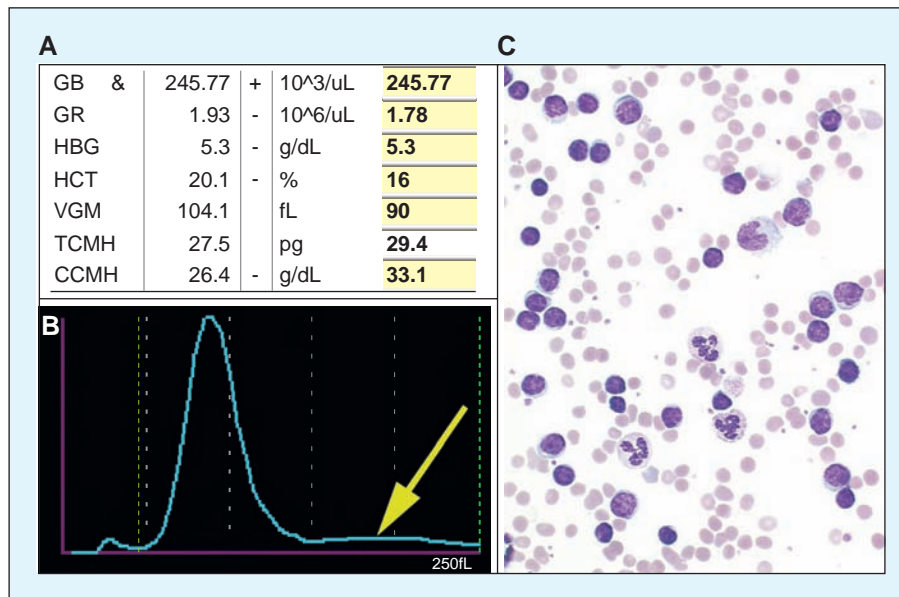


Figure 2. Image de double population cellulaire sur l'histogramme volumétrique des GR. La numération globale (A, à gauche) montre une hyperleucocytose franche avec anémie sévère, macrocytaire et hypochrome. L'histogramme des volumes des GR montre de gauche à droite le petit pic lié aux plaquettes, le pic majoritaire correspondant aux GR et un pic anormal (B, flèche). L'hyperleucocytose correspond à une leucémie lymphoïde chronique (C). L'automate utilisé ici (Sysmex XE 2100) fournit une valeur de l'hémoglobine non perturbée par l'hyperleucocytose et donne la valeur du mode du pic de GR majoritaire (=90 fL). Avec l'aide de l'hématocrite centrifugé (= 16 %) il a été possible de rectifier les résultats de la numération des GR et les indices érythrocytaires (A, à droite). On remarque qu'une bonne partie des leucocytes a été initialement incluse dans le décompte des GR.

parfois faussée par l'hyperleucocytose. En pratique, quand la CCMH et le VGM se situent encore dans les zones de normalité et que l'histogramme des GR est normal, il n'est pas utile de réaliser de calculs correctifs. Si une deuxième population cellulaire est présente sur l'histogramme des volumes des GR, et que la CCMH est < 31-32 g/dL, on peut alors calculer le nombre réel de GR en lui retirant celui du nombre des leucocytes. Il faudra ensuite recalculer l'Ht et vérifier que la CCMH retrouve des valeurs proches de la normale pour valider les nouveaux résultats. Mais le VGM peut être également faussé, ce qui limite la portée des calculs correctifs. Utiliser le résultat de l'Ht obtenu après centrifugation permet de déterminer au moins approximativement quelles corrections apporter. Le VGM peut être apprécié à la valeur modale du pic majoritaire de l'histogramme des volumes érythrocytaires. Certains AHC proposent le volume moyen de chaque pic cellulaire en cas de « double population » clairement identifiée sur l'histogramme des GR, ce qui permet de corriger le VGM (Sysmex). Enfin, quand cela est possible, il ne faut pas oublier de vérifier l'Hb à partir de la mesure directe dans les GR, comme le proposent les AHC utilisant la diffraction optique (voir ci-dessus).

Les plaquettes géantes

Des PLT géantes peuvent présenter un volume supérieur à celui du seuil discriminant PLT-GR, ne pas être incluses

dans la numération des PLT et être alors énumérées parmi les GR. Dans cette situation, la perturbation de la numération des GR reste très modérée et en pratique elle est négligée [1, 16].

Numération des GR faussement diminuée

Les agglutinines froides

Les agglutinines froides agrègent les GR entre eux quand la température est inférieure à 37 °C : de ce fait, des anomalies de détermination des paramètres érythrocytaires sont presque constantes avec les AHC fonctionnant à température du laboratoire [17]. Les GR isolés et les petits agglutinats de deux ou trois GR sont analysés dans le canal « érythrocytes » et énumérés chaque fois comme une seule particule. Les agglutinats érythrocytaires plus volumineux sont négligés par les AHC, au-delà du seuil maximum de mesure (250 à 360 fL selon les AHC). La numération des GR est ainsi sous-estimée et le VGM sur-estimé. L'Ht, qu'il soit calculé (nombre de GR x VGM) ou mesuré, est également sous-estimé. En revanche l'Hb, mesurée après lyse des GR, n'est pas affectée par la présence d'agglutinines : la CCMH calculée est élevée, dépassant parfois 150 g/dL quand l'Ht est très effondré. L'association particulière d'une numération des GR basse, avec un VGM élevé et une CCMH > 36 g/dL est quasi pathognomonique de l'interférence liée à une agglutinine

froide, et il n'est pas rare que ce type de perturbation soit à l'origine de la découverte de cette agglutinine [18]. Les AHC qui utilisent des réactifs à température proche de 37 °C sont moins sensibles à ce phénomène, mais quand le titre de l'agglutinine est élevé des modifications de la numération globulaire apparaissent cependant, provoquant une augmentation discrète du VGM, difficile à détecter car la CCMH demeure à la limite supérieure des valeurs normales [19]. En revanche, même en cas de titre très élevé d'agglutinine, la CHCM mesurée par diffraction optique est le plus souvent proche de la réalité et l'Hb ainsi obtenue n'est pas perturbée. Les anomalies observées disparaissent quand l'échantillon est réchauffé au bain-marie à 37 °C pendant une à deux heures puis réanalysé rapidement. L'amplification des anomalies sur un aliquot préalablement placé pendant une heure à 4 °C renforce le diagnostic (*figure 3*). Une alternative consiste en la centrifugation de l'échantillon et le remplacement iso-volumétrique du plasma par du diluant isoosmotique, puis l'homogénéisation et l'incubation à 37 °C préalables à l'analyse. Dans de rares cas le titre de l'agglutinine est si élevé que la normalisation de l'hémogramme ne peut pas être obtenue après réchauffage à 37 °C, nécessitant alors un nouveau prélèvement réalisé et maintenu à 37 °C jusqu'à l'analyse. La viscosité de l'échantillon peut être très élevée et conduire à une aspiration insuffisante, générant une alarme liée à ce type d'anomalie (« échantillon insuffisant », « aspiration insuffisante », ou un message apparenté). La

coexistence d'une agglutination des GR avec une thrombopénie induite par l'EDTA a été rapportée, mais les anticorps dirigés contre les GR et ceux dirigés contre les PLT étaient différents [20].

Anémies hémolytiques à anticorps chauds

Quelques cas d'agglutination des GR en présence d'autoanticorps chauds ont également été rapportés, conduisant à de faux résultats de la numération érythrocytaire et du VGM, comme dans le cas des agglutinines froides, mais avec une absence de correction de l'anomalie après réchauffage à 37 °C [21].

Les microcytes et schizocytes et leur séparation d'avec les plaquettes

La numération des PLT peut être perturbée par les GR microcytaires, notamment si leur taille est < 36-40 fL, induisant une possible surestimation de leur nombre (*voir partie 1 consacrée aux plaquettes*). Cependant certains AHC ne comptent pas les particules érythrocytaires en deçà du seuil discriminant parmi les GR et PLT : une sous-estimation de la numération des GR peut alors être observée, bien qu'elle reste limitée, ne dépassant pas 5 à 6 % [22].

Les cryoglobulines

Comme déjà mentionné, une petite diminution portant à la fois sur l'Hb et sur la numération des GR a été rapportée dans quelques cas, liée à une anomalie de flux, avec un

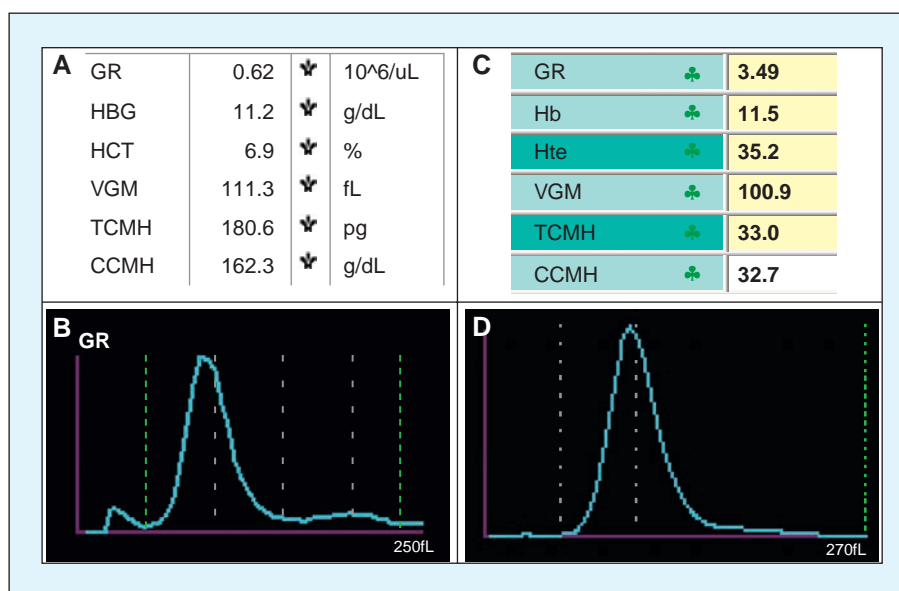


Figure 3. Perturbation de la numération globulaire en présence d'agglutinines froides. L'analyse réalisée à 22 °C (**A** et **B**) montre une CCMH très augmentée et un contraste flagrant entre un nombre d'hématies (GR) très faible, un hémocrite très bas (HCT) et une valeur d'hémoglobine (HGB) subnormale ; l'histogramme des volumes des GR (**B**) montre un pic dans la partie droite. Après incubation une heure à 37 °C et réanalyse rapide (**C** et **D**) la CCMH se normalise (appréciation correcte de la numération des GR, du VGM et de l'hémocrite par l'automate) ; le pic anormal sur l'histogramme des GR a disparu (Sysmex XE 2100).

message correspondant à une aspiration insuffisante ou à un prélèvement coagulé [1, 14].

Problèmes liés à la qualité de l'échantillon

La coagulation ou une homogénéisation insuffisante par remplissage excessif du tube sanguin [23] peuvent conduire à l'aspiration d'un aliquot non représentatif de l'échantillon. Les agglutinines froides (comme parfois les cryoglobulines) peuvent rendre l'échantillon sanguin très visqueux, et induire une aspiration insuffisante (message d'alarme signalé par divers AHC). Quand il n'a été possible d'obtenir que très peu de sang capillaire ou veineux, et que le recueil a été réalisé dans un tube de volume normal contenant de l'EDTA-K3 sous forme liquide, une petite dilution peut s'observer (nourrisson prélevé avec un tube pour adulte).

Hémolyse *in vitro*

Dans certaines situations, notamment dans les hémolyses post-transfusionnelles ou toxiques, les GR peuvent continuer à se lyser dans le tube de sang et conduisent à une

numération anormalement diminuée. Il en est de même pour la mesure de l'Hb et des indices érythrocytaires (voir « mesure de l'Hb »).

Volume globulaire moyen et hématocrite

Une erreur d'appréciation du volume globulaire moyen (VGM) et/ou de la numération des GR peu(ven)t induire secondairement une erreur de l'hématocrite (Ht) (habituellement calculé par les AHC). De manière systématique, quand on suspecte une anomalie de mesure du VGM, de la numération des GR et/ou de l'Ht, il faut vérifier la validité des deux autres paramètres considérés. Les principales situations perturbant la mesure du VGM sont reprises dans le *tableau 2*.

VGM et agglutinines froides (et anticorps chauds)

Comme signalé au chapitre précédent, on observe une augmentation du VGM (plus nette quand les AHC utilisent des réactifs à température du laboratoire) et de la CCMH et une baisse de la numération des GR, alors que la mesure de

Tableau 2. Principales situations conduisant à une erreur de détermination du volume globulaire moyen ou de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

Volume globulaire moyen (VGM)	Anomalies d'autres paramètres de l'hémogramme
<i>Fausse augmentation</i>	
Agglutinines froides, agglutinines chaudes	Diminution de la N° des GR et parfois de la N° des PLT, augmentation de la CCMH
Grandes hyperleucocytoses	Augmentation de la N° des GR, augmentation ou diminution de la CCMH
Grandes hyperglycémies (ou ponction proche d'une perfusion glucosée)	Diminution de la CCMH (en plus si perfusion = dilution de l'échantillon)
Excès d'EDTA K2	Diminution de la CCMH
Hypernatrémie	Diminution de la CCMH
Sang vieilli (> 3 jours)	Diminution de la CCMH
<i>Fausse diminution</i>	
Hyponatrémie	Augmentation de la CCMH
Technique de mesure : impédance sans focalisation hydrodynamique et anémies hypochromes	CCMH subnormale au lieu d'être diminuée
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)	
<i>Supérieure à 36 g/dL</i>	
(hyperchromie « vraie » : voir texte)	
Agglutinines froides, agglutinines chaudes	Augmentation du VGM, diminution de la N° des GR
Lipides	Augmentation de la N° des leucocytes et de l'Hb
Grandes hyperleucocytoses	Augmentation de l'Hb (parfois)
Immunoglobulines (et cryoglobulines)	Augmentation de l'Hb
Hémolyse <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	Modifications de l'Ht
Carboxyhémoglobine (> 20 %)	
Bilirubine (> 250-300 mg/L)	
Médicaments immunosuppresseurs	Augmentation du VGM
<i>Inférieure à 32 g/dL</i>	
Hyperglycémie (ou ponction proche d'une perfusion glucosée)	Augmentation du VGM (et dilution si ponction à proximité d'une perfusion)
Grandes hyperleucocytoses	Augmentation de la N° des GR (variable selon les automates) et de l'Hb (variable selon les automates)
Sang vieilli	Augmentation du VGM

l'Hb n'est pas perturbée. Certains AHC « mesurent » l'Ht en faisant la somme des volumes des particules analysées dans le canal GR en un temps et un volume donnés : ce résultat est également faussé en présence d'agglutinines froides car les agglutinats de gros volume sont négligés (Sysmex).

VGM et grandes hyperleucocytoses

Comme mentionné ci-dessus, le décompte réalisé dans le canal « GR et PLT » inclut en réalité les GR, mais également une partie des leucocytes (variable selon l'AHC), et le VGM affiché devient alors la moyenne du volume des GR et de celui des leucocytes. Au cours des grandes hyperleucocytoses, surtout associées à une anémie sévère et donc peu de GR, la mesure du VGM est plus nettement faussée : une augmentation pouvant atteindre 15-20 fL peut être observée dans certaines circonstances [16]. Les AHC qui calculent le VGM à partir de l'Ht et de la numération des GR sont eux aussi sensibles aux hyperleucocytoses > 100 G/L. Une perturbation de l'Hb et de la numération des GR est également à envisager : les approches correctives sont discutées dans le chapitre précédent.

Variation du VGM en fonction de la technologie de mesure

Lors de la mesure par impédance, les GR discoïdes s'étirent (ellipses) lorsqu'ils sont aspirés au travers de l'orifice de mesure : cette élongation est en outre plus prononcée pour les particules qui passent en périphérie de l'orifice que pour celles qui passent à la partie centrale. Ce phénomène s'accroît particulièrement au cours des anémies hypochromes, lorsque la concentration en Hb des GR est faible : le VGM peut ainsi être exagérément diminué de 5 à 7 fL [24, 25]. Ceci conduit à une diminution de l'Ht, et par voie de conséquence à une erreur de la CCMH : cette dernière demeure faussement « normale » ou est à peine diminuée, sous-estimant l'hypochromie dans de telles situations [24, 25]. Des modifications techniques de la mesure par impédance, comme une chambre de mesure mieux adaptée (Beckman Horiba) ou la focalisation hydrodynamique qui dirige le flux des GR au centre de l'orifice (Sysmex), améliorent la précision de mesure. Avec la diffraction optique, la nécessité d'une sphérisation isovolumétrique préalable à l'analyse évite cet écueil. Pour les AHC qui utilisent la technique de mesure par impédance et « mesurent » l'Ht en additionnant les volumes individuels des GR analysés dans un volume et un temps donnés (le VGM est alors le paramètre calculé), la valeur de l'Ht est également faussée.

Hyperglycémie sévère

Le VGM peut être artificiellement augmenté lorsque l'échantillon sanguin contient des taux élevés de glucose (hyperglycémie sévère) [26-28], ou lorsque le prélèvement a été réalisé à proximité d'une perfusion de soluté glu-

cosé. Dans ce dernier cas le prélèvement est en plus dilué, conduisant à une pseudo-anémie macrocytaire ou à une accentuation de l'anémie préexistante [28, 29]. Dans les deux cas, l'« augmentation » du VGM est directement liée à la quantité de glucose intra-érythrocytaire, en équilibre avec le glucose plasmatique. Dans les AHC, dès les premières secondes suivant la dilution du sang, de l'eau pénètre dans les GR riches en glucose, ce qui provoque leur gonflement. Le retour à la taille normale se réalise ensuite progressivement, et est complet après deux à cinq minutes [29]. Le VGM augmente de manière variable selon les AHC : une petite augmentation peut apparaître avec des concentrations en glucose supérieures à 20 mmol/L, et tous les AHC sont perturbés avec des concentrations dépassant 35 mmol/L. Le VGM peut être faussement augmenté de 30-50 fL [29]. Les AHC utilisant la sphérisation isovolumétrique sont particulièrement sensibles à l'hyperglycémie, car la stabilisation du volume des GR survient dans les secondes qui suivent la dilution, au moment où le gonflement est à son maximum [28, 29]. L'augmentation du VGM augmente artificiellement l'Ht, et la CCMH est faussement diminuée. La découverte d'une macrocytose hypochrome doit faire évoquer en premier lieu un échantillon hyperglycémique (*figure 4*). Des messages d'alerte aspécifiques (« macrocytose », « hypochromie », « anémie ») sont visualisés. Chez le patient diabétique, la numération des GR et la valeur de l'Hb ne sont pas affectées : comme l'Ht centrifugé n'est pas modifié, il permet le calcul du VGM réel. La CHCM (mesure de l'Hb au sein de chaque GR), a parfois été rapportée comme également faussée.

Influence de l'anticoagulant

L'utilisation des anticoagulants EDTA-K2 ou K3 n'interfère pas avec la numération des GR lorsque les tubes sont remplis de manière optimale. Cependant, quand la quantité de sang est insuffisante dans le tube (ponction difficile, nouveau-nés), la concentration en anticoagulant est proportionnellement augmentée, et des modifications peuvent être observées. Une concentration excessive en EDTA-K2 conduit à une petite augmentation du VGM sur divers types d'AHC [30]. L'excès d'EDTA-K3 n'influence ni le VGM ni l'Ht des AHC, à l'opposé de ce que l'on observe avec l'Ht centrifugé qui diminue artificiellement par contraction des GR [30, 31].

Hyper- et hyponatrémie

En cas d'hyponatrémie on observe une tendance à la macrocytose et à l'hypochromie des GR, tandis que l'hyponatrémie entraîne une tendance microcytaire et hyperchrome [1, 32]. De telles situations ont également été rapportées chez les animaux [32]. L'hyper- et l'hyponatrémie sont également des situations qui peuvent induire des erreurs de l'Ht centrifugé [1].

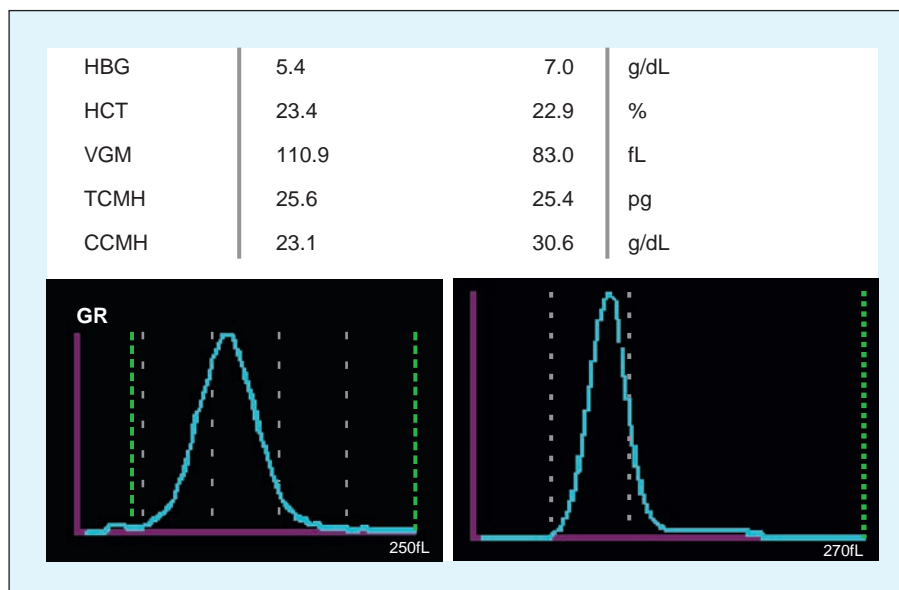


Figure 4. Découverte d'une macrocytose hypochrome (en haut à gauche) chez un patient hospitalisé en unité de réanimation médicale. L'histogramme des volumes érythrocytaires présente une base très élargie (en bas à gauche). Un prélèvement de contrôle va permettre d'obtenir les indices érythrocytaires réels (en haut à droite) et un histogramme des volumes érythrocytaires normalisé (en bas à droite). La ponction veineuse a été primitivement réalisée à proximité d'une voie de perfusion de soluté glucosé isotonique et le contrôle réalisé par ponction au bras opposé : la différence entre les deux valeurs d'hémoglobine chiffre l'importance de la dilution liée à l'erreur de prélèvement.

Conservation des échantillons et son influence sur le VGM

L'EDTA utilisé comme anticoagulant permet une détermination exacte des divers paramètres de la numération globulaire jusqu'à 24 heures après le prélèvement. Après cette date, le VGM peut augmenter, notamment si l'échantillon est stocké à température du laboratoire. Les modifications sont signalées comme étant discrètes, de l'ordre de 1,5 % après 24 heures et 4 % après 48 heures, le stockage prolongé au-delà de 3 jours pouvant parfois masquer une microcytose modérée [33, 34]. La numération érythrocytaire et l'Hb étant relativement stables dans la même période, la CCMH diminue avec le temps [33, 34]. Cependant certains auteurs signalent des variations plus importantes du VGM, pouvant atteindre 9 % après 24 heures et 16 % après 48 heures, et ce sur plusieurs types d'AHC [35].

Concentration corpusculaire moyenne en Hb (CCMH)

Elle correspond au rapport entre la quantité d'Hb et l'Ht, et reflète la concentration en Hb au sein des GR, définissant la normo-, l'hypo- ou l'hyperchromie. Avec la mesure par diffraction optique, certains AHC déterminent directement la concentration en Hb au sein de chaque GR (CHCM) : cet indice est comparé à la CCMH calculée, et un message d'alerte est généré lorsque la différence dépasse un seuil (habituellement 1,9 g/dL) (Siemens, Abbott). Cette discor-

dance correspond habituellement à une anomalie dans la détermination de l'un des paramètres mesurés que sont l'Hb, la numération des GR et/ou le VGM, ou l'Ht. Les principales situations perturbant la valeur de la CCMH sont reprises dans le *tableau 2*.

L'hyperchromie vraie (CCMH > 36 g/dL)

Observée dans certaines situations pathologiques, elle est rarement révélée avec la technique de mesure par impédance, mais plus souvent par diffraction optique : la CCMH peut atteindre ou dépasser 41 g/dL. De telles valeurs caractérisent des pathologies constitutionnelles au cours desquelles les GR sont déshydratés, comme la sphérocytose héréditaire, diverses hémoglobinoses (CC, SC, C β thalassémie), et la xérocytose. Certaines anémies hémolytiques auto-immunes à anticorps chauds peuvent également présenter une CCMH augmentée après analyse par diffraction optique.

CCMH artificiellement augmentée

Une telle situation s'observe dans trois circonstances. Le plus souvent il s'agit d'une fausse diminution de la numération des GR liée à la présence d'agglutinines froides. Parfois il s'agit d'une fausse augmentation de l'Hb mesurée : excès de lipides plasmatiques ou d'immunoglobulines (et cryoglobulines), grandes hyperleucocytoses (mais provoquant parfois aussi une CCMH diminuée : voir plus loin), hémolyse *in vivo* et *in vitro*, excès de carboxyhémoglobine (> 20 %) ou de bilirubine (> 400 μ mol/L). Enfin,

bien que le mécanisme en soit mal connu, certains médicaments immunosuppresseurs peuvent légèrement augmenter la CCMH, mais habituellement pas au-delà de 37,5 g/dL [1]. Les diverses situations qui modifient la CCMH sont reprises dans le *tableau 2*.

CCMH artificiellement diminuée

En pathologie, l'hypochromie s'observe surtout au cours des anémies microcytaires, et plus rarement en association avec un VGM normal. À l'opposé, une hypochromie associée à une macrocytose est très inhabituelle en hématologie, et doit faire évoquer une erreur de mesure suite à une hyperglycémie, vraie ou induite (ponction veineuse proche d'une perfusion glucosée). Les grandes hyperleucocytoses peuvent générer un ensemble d'anomalies secondaires à l'inclusion de leucocytes dans l'analyse des GR, en provoquant les anomalies de la numération érythrocytaire, du VGM et de l'hématocrite, et en influant de manière variable sur la mesure de l'hémoglobine. Ceci peut aboutir *in fine* à une baisse de la CCMH. La conservation des échantillons sanguins influence la mesure du VGM, qui a tendance à augmenter avec le temps, ce qui augmente l'Ht et diminue la CCMH [33, 34].

Les réticulocytes

La numération des réticulocytes sanguins est une partie essentielle du diagnostic et de la surveillance des patients anémiques, et doit être considérée à l'heure actuelle comme faisant partie de l'hémogramme. Si le décompte manuel par microscopie optique reste une méthode classique, les méthodes automatisées développées pendant les deux dernières décennies ont montré leur exactitude et leur précision, à un coût inférieur du fait du faible temps technique nécessaire. De plus, divers paramètres dérivés de l'analyse des réticulocytes (volume, concentration individuelle en hémoglobine, niveau de maturité), impossibles à obtenir par microscopie optique, sont maintenant proposés par tous les AHC récents à forte cadence d'analyse [36-42]. Initialement réalisée à l'aide de cytofluoromètres en flux généralistes puis de cytomètres en flux dédiés, la numération automatisée des réticulocytes est maintenant incluse sous forme de technique soit semi-automatique (dilution manuelle puis analyse par l'AHC) soit totalement automatisée au sein de l'hémogramme [37-42]. L'ARN des réticulocytes est coloré par le bleu de méthylène nouveau (certains automates Abbott et Beckman) ou l'oxazine (Siemens), ou par un colorant fluorescent qui peut être le thiazole orange (Horiba), l'auramine O (Sysmex), le CD4K530 (Abbott) ou la coriphosphine (Beckman). L'analyse est ensuite réalisée par cytométrie en flux [41, 42]. Chaque étape de l'analyse est potentiellement sujette à perturbations.

Le fenêtrage des réticulocytes

Il constitue une étape primordiale pour la détermination de décomptes exacts, car les colorants utilisés réagissent également avec l'ARN des PLT, et peuvent se combiner à l'ARN et l'ADN des cellules nucléées. Les GR et les réticulocytes étant d'une part, plus grands que les PLT et, d'autre part, plus petits que les leucocytes, une séparation utilisant le critère de taille est appliquée. Ce fenêtrage peut être rendu difficile si des composants du sang ont une taille inhabituelle, et/ou contiennent de l'ARN ou de l'ADN : PLT géantes ou amas plaquettaires, leucocytes anormaux ou en nombre anormalement élevé, et grands fragments leucocytaires sont les principales sources d'interférence potentielle [40, 43]. Les érythroblastes ne sont pas inclus en tant que tels parmi les réticulocytes mais peuvent cependant perturber la numération, vraisemblablement par le nombre élevé de très jeunes réticulocytes présents en même temps que les érythroblastes [40, 43, 44].

Le seuil de discrimination entre GR et réticulocytes

Un seuil plus ou moins fixe sépare ces deux populations, déterminé par exemple à partir de la mesure de l'autofluorescence des GR matures (Abbott). Des GR contenant du matériel coloré ou fluorescent mais ne correspondant pas à des réticulocytes peuvent perturber le positionnement de ce seuil : ce sont notamment les GR contenant des corps de Howell-Jolly, des corps de Pappenheimer ou des ponctuations basophiles. Cependant les AHC sont plus ou moins sensibles à ce type d'interférence [40, 43-46]. Beaucoup plus rarement une interférence comparable aux précédentes a été signalée en présence de corps de Heinz [40], d'inclusions d'Hb H [40], d'un nombre élevé de sphérocytes [45] ou de drépanocytes [45]. Les parasites intra-érythrocytaires (paludisme, babésiose), bien qu'habituellement faiblement colorés par les réactifs fluorescents, peuvent interférer avec la numération automatisée, et des valeurs augmentées jusqu'à six fois par rapport à valeur réelle ont été rapportées chez un patient dont 71 % des GR étaient infectés par *Plasmodium falciparum* [47].

L'intensité de coloration ou de fluorescence des réticulocytes

Elle peut être quantifiée au sein de chaque réticulocyte par la plupart des AHC. Les réticulocytes les plus colorés (ou les plus brillants) sont les plus riches en ARN et donc considérés comme les plus jeunes : ceci a permis de définir de nouveaux indices, et notamment la fraction immature des réticulocytes (Immature Reticulocyte Fraction ou IRF) [39]. La présence d'un nombre élevé de leucocytes (intensément colorés) peut induire une estimation erronée des indices réticulocytaires, avec un parallélisme entre l'importance de l'erreur et celle de l'hyperleucocytose

[48]. À l'opposé, les réticulocytes les plus matures ne contiennent que quelques ponctuations colorées et peuvent être détectés de manière insuffisante chez les nouveaux-nés, peut-être du fait d'une concentration trop faible en matière colorante dans certains automates (Advia 120) [49]. Si la numération des réticulocytes est stable 24 à 48 heures à température du laboratoire et 72 heures à + 4 °C, la fraction immature des réticulocytes ne l'est que pendant 8 heures à 4 °C et 6 heures à température du laboratoire [16, 50].

Diverses autres situations ont été rapportées comme ayant provoqué de manière occasionnelle une erreur dans la numération des réticulocytes : présence d'agglutinats de GR en présence d'agglutinines froides à titre élevé, autofluorescence des GR (porphyries, prise de médicaments), présence de substances fluorescentes intraveineuses à visée diagnostique, de fortes quantités d'immunoglobulines, ou hémolyse intense [40, 43]. Les messages d'alerte de la numération des réticulocytes sont habituellement générés lorsque l'une des anomalies mentionnées ci-dessus est présente, incitant le technicien à porter une attention particulière au résultat ou à réaliser une numération microscopique. Cependant des exceptions et une absence de message ont été rapportées avec les agglutinines froides ou la β thalassémie majeure [43, 45].

Conclusion

L'utilisation des AHC a conduit à une amélioration majeure de la qualité en hématologie cellulaire, avec des résultats rapides et exacts dans une vaste majorité des cas. Les variables préanalytiques liées aux conditions du prélèvement sanguin sont sans doute à considérer aujourd'hui en premier lieu en cas d'erreur de l'hémogramme. Les variables préanalytiques liées au patient ou à sa maladie sont plus difficiles à maîtriser, et resteront l'un des objets d'intérêt de l'hématologie automatisée. Les anomalies analytiques intrinsèques à la technologie utilisée ont initialement limité la qualité de certaines mesures : elles ont progressivement conduit les fabricants à développer des améliorations techniques, comme l'utilisation de la focalisation hydrodynamique pour la mesure du VGM par impédance, ou la sphérisation des GR avant analyse par diffraction optique, voire à abandonner certains protocoles (numération des PLT après lyse des GR). L'optimisation du traitement informatique des données a permis (i) de proposer des messages d'alerte d'abord généralistes, (ii) puis de trouver les critères discriminant les divers leucocytes des amas plaquettaires, des érythroblastes, et d'autres cellules anormales, aboutissant à proposer une formule leucocytaire complète, (iii) mais aussi de quantifier certains

éléments (érythroblastes), (iv) et enfin de générer des messages d'orientation plus informatifs en cas d'anomalie. La CCMH demeure l'indice érythrocytaire qui reflète le plus fréquemment une anomalie de mesure du nombre des GR, de leur VGM ou de l'Hb. L'étude des histogrammes biparamétriques de la formule leucocytaire est le second point crucial du contrôle de validité de l'hémogramme automatisé, car elle visualise de nombreux artefacts et permet dans bon nombre de cas d'orienter la démarche complémentaire. Certaines situations entraînent quasi constamment une anomalie de mesure d'un paramètre, bien que l'amplitude de l'anomalie varie d'un cas à l'autre et d'un AHC à l'autre. Dans d'autres cas on observe des anomalies sur deux ou plusieurs autres paramètres de l'hémogramme automatisé, qu'il convient de gérer en parallèle. Finalement, si de nombreux comptes erronés ont été observés de façon suffisamment récurrente pour les identifier clairement, voire pour proposer des améliorations techniques, il existe encore trop souvent des erreurs de mesure qui soit ne génèrent pas de message d'alarme spécifique d'une anomalie soit ne génèrent pas du tout de message. Les AHC les plus élaborés sont capables de générer divers messages en rapport avec au moins une partie des erreurs de mesure décrites ici tandis que les AHC les plus simples, notamment ceux qui ne disposent pas de l'analyse précise de la formule leucocytaire, seront souvent pris en défaut. Si l'acquisition d'un AHC est un choix personnel, chaque hématologiste doit connaître comment son AHC va réagir avec (au moins) les diverses situations présentées ici.

Remerciements. Les auteurs remercient Madame le Docteur Souni (Abbott diagnostics), et Messieurs Kerivel (Beckman-Coulter), Manceau (Horiba Médical), Maldonado (Siemens), et Pérol (Sysmex) pour leurs propos constructifs et les explications précises concernant les automates d'hématologie cellulaire fabriqués par leurs sociétés

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

1. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers : a review. Part II : white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int Jnl Lab Hem* 2007 ; 29 : 21-41.
2. Cornbleet J. Spurious results from automated hematology cell counters. *Lab Med* 1983 ; 14 : 501-14.
3. Sandberg S, Sonstabo K, Christensen NG. Influence of lipid and leucocytes on the haemoglobin determination by Coulter Counter S Plus III, Technicon H6000, Technicon H1, LK540, Reflotron, and Hemocap. *Scand J Clin Lab Invest* 1989 ; 49 : 145-8.

4. Mayan H, Gurevitz O, Mouallem M, Farfel Z. Multiple spurious laboratory results in a patient with hyperlipemic pancreatitis treated by plasmapheresis. *Isr J Med Sci* 1996; 32 : 762-6.
5. Creer MH, Ladenson J. Analytical error due to lipemia. *Lab Med* 1983; 14 : 351-5.
6. Cantero M, Conejo JR, Jimenez A. Interference from lipemia in cell count by hematology analyzers. *Clin Chem* 1996; 42 : 987-8.
7. Gagne C, Auger PL, Moorjani S, Brun D, Lupien PJ. Effect of hyperchylomicronemia on the measurement of hemoglobin. *Am J Clin Pathol* 1977; 68 : 584-6.
8. Savage RA. Analytic inaccuracy resulting from hematology specimen characteristics. Three cases of clinically misleading artifacts affecting white blood cell and platelet counts. *Am J Clin Pathol* 1989; 92 : 295-9.
9. McVeigh DJ, Faim LS, van der Weyden MB. Correction of spurious haematological results using Technicon H 1-derived data. *Clin Lab Haematol* 1989; 11 : 369-73.
10. Roberts WL, Fontenot JD, Lehman CM. Overestimation of hemoglobin in a patient with an IgA-kappa monoclonal gammopathy. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124 : 616-8.
11. Dalal BI, Brigden ML. Factitious biochemical measurements resulting from hematologic conditions. *Am J Clin Pathol* 2008; 131 : 195-204.
12. McMullin MF, Wilkin HJ, Elder E. Inaccurate haemoglobin estimation in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Pathol* 1995; 48 : 787.
13. Goodrick MJ, Boon RJ, Bishop RJD, Copplestone JA, Prentice AG. Inaccurate haemoglobin estimation in Waldenström's macroglobulinemia : unusual reaction with monomeric IgM paraprotein. *J Clin Pathol* 1993; 46 : 1138-9.
14. 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.
15. Vinatier I, Flandrin G. Avantages et limites de l'hémogramme automatisé. *Rev Prat* 1993; 7 : 69-73.
16. Bain BJ, Bates I. Basic haematological techniques. In : Lewis SM, Bain BJ, Bates I, eds. *Dacie and Lewis practical haematology*. Londres : Churchill Livingstone, 2001 : 19-46.
17. Bessman JD, Banks D. Spurious macrocytosis, a common clue to erythrocyte cold agglutinins. *Am J Clin Pathol* 1980; 74 : 797-800.
18. Petrucci JV, Duanne PA, Chapman CC. Spurious erythrocyte indices as measured by the model S Coulter counter due to cold agglutinins. *Am J Clin Pathol* 1971; 56 : 500-2.
19. Solanki DL, Blackburn BC. Spurious red cell parameters due to serum cold agglutinins : observations on Ortho ELT-8 cell counter. *Am J Clin Pathol* 1983; 83 : 218-22.
20. Bizzaro N, Piazza I. Lymphocytic clusters in peripheral blood : an atypical morphologic pattern of chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1991; 86 : 209-11.
21. Weiss GB, Bessman JD. Spurious automated red cell values in warm autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 1984; 17 : 433-5.
22. Savage RA, Hoffman GC. Spuriously high platelet counts. *Am J Clin Pathol* 1985; 84 : 406-7.
23. Pewarchuk W, VanderBoom J, Blajchman MA. Pseudopolycythemia, pseudothrombocytopenia, and pseudoleukopenia due to overfilling of blood collection vacuum tubes. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116 : 90-2.
24. Mohandas N, Clark MR, Kissinger S, Bayer C, Shohet SB. Inaccuracies associated with the automated measurement of mean cell hemoglobin concentration in dehydrated cells. *Blood* 1980; 56 : 125-8.
25. Paterakis GS, Laoutaris NP, Alexia SV, Siourounis PV, Stamoulakatou AK, Terzoglou GN, et al. The effect of red cell shape on the measurement of red cell volume. A proposed method for the comparative assessment of this effect among various haematology analysers. *Clin Lab Haematol* 1994; 16 : 235-45.
26. Morse EE, Kalache G, Germino W, Stockwell R. Increased electronic mean corpuscular volume induced by marked hyperglycemia. *Ann Clin Lab Sci* 1981; 11 : 184-7.
27. Strauchen JA, Alston W, Anderson J, Gustafson Z, Fajardo LF. Inaccuracy in automated measurement of hematocrit and corpuscular indices in the presence of severe hyperglycemia. *Blood* 1981; 57 : 1065-7.
28. Holt JT, DeWandler MJ, Arvan DA. Spurious elevation of the electronically determined mean corpuscular volume and hematocrit caused by hyperglycemia. *Am J Clin Pathol* 1982; 77 : 561-7.
29. Van Duijnhoven HLP, Treskes M. Marked interference of hyperglycemia in measurements of mean (red) cell volume by Technicon H analyzers. *Clin Chem* 1996; 42 : 76-80.
30. Goossens W, Van Duppen V, Verwilghen RL. K2- or K3- EDTA : the anticoagulant of choice in routine haematology ? *Clin Lab Haematol* 1991; 13 : 291-5.
31. Hinchliffe RF, Bellamy GJ, Lilleyman JS. Use of the technicon H1 hypochromia flag in detecting spurious macrocytosis induced by excessive K2-EDTA concentration. *Clin Lab Haematol* 1992; 14 : 268-9.
32. Boisvert AM, Tvedten HW, Scott MA. Artifactual effects of hypernatremia and hyponatremia on red cell analytes measured by the Bayer H*1 analyser. *Vet Clin Pathol* 1999; 28 : 91-6.
33. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete cell blood count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126 : 336-42.
34. Hedberg P, Lehto T. Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyzer. *Int Jnl Lab Hem* 2009; 31 : 87-96.
35. Imeri F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M, Risch GM, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used : a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica Chimica Acta* 2008; 397 : 68-71.
36. Cavill I. The rejected reticulocyte. *Br J Haematol* 1993; 84 : 563-5.
37. Davis BH, Bigelow NC, Koepke JA, Borowitz MJ, Houwen B, Jacobberger JW, et al. Flow cytometric reticulocyte analysis. Multiinstitutional interlaboratory correlation study. *Am J Clin Pathol* 1994; 102 : 468-77.
38. Koepke JA. Update on reticulocyte counting. *Lab Med* 1999; 30 : 339-43.
39. Brugnara C. Reticulocyte cellular indices : a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. *Lab Sci* 2000; 37 : 93-130.

40. Riley RS, Ben-Ezra JM, Goel R, Tidwell A. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J Clin Lab Anal* 2001 ; 15 : 267-94.
41. Riley RS, Ben-Ezra JM, Tidwell A, Romagnoli G. Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. *Hematol/Oncol Clin North Am* 2002 ; 16 : 373-420.
42. Pierre RV. Reticulocytes. Their usefulness and measurement in peripheral blood. *Clin Lab Med* 2002 ; 22 : 63-79.
43. Oyamatsu T, Shimizu N, Takeuchi K, Yamamoto M, Kawai Y, Watanabe K, *et al.* Automated measurement of reticulocyte count by flow cytometry. II : analysis of the blood containing abnormal erythrocytes or giant platelets. *Rinsho Byori. Jap J Clin Pathol* 1989 ; 37 : 807-12.
44. Pappas AA, Owens RB, Flick JT. Reticulocyte counting by flow cytometry. A comparison with manual methods. *Ann Clin Lab Sci* 1992 ; 22 : 125-32.
45. Ghevaert C, Fournier M, Reade V, Mehiaoui L, Goudemand J. Laboratory evaluation of the Coulter STKS reticulocyte method in a children's hospital. *Lab Hematol* 1997 ; 3 : 92-7.
46. Lofsness KG, Kohnke ML, Geier NA. Evaluation of automated reticulocyte counts and their reliability in the presence of Howell-Jolly bodies. *Am J Clin Pathol* 1994 ; 101 : 85-90.
47. Laurencet FM, Martinez T, Beris P. Spurious extreme reticulocytosis with an automated reticulocyte analyzer. *N Engl J Med* 1997 ; 337 : 1922-3.
48. Villamor N, Kirsch A, Huhn D, Vives-Corrons JL, Serke S. Interference of blood leukocytes in the measurements of immature red cells (reticulocytes) by two different (semi-) automated flow-cytometry technologies. *Clin Lab Haemat* 1996 ; 18 : 89-94.
49. Wiegand G, Effenberger-Klein A, Weber R, Kosanke W, Niethammer D, Bruchelt G. Potential pitfalls of comparative measurements of reticulocytes using flow cytometry and microscopy in premature and infants. *Clin Chem Lab Med* 2004 ; 42 : 1150-4.
50. Lacombe F, Lacoste L, Vial JP, Briais A, Reiffers J, Boisseau MR, *et al.* Automated reticulocyte counting and immature reticulocyte fraction measurement. Comparison of ABX PENTRA 120 retic, Sysmex R-2000, flow cytometry, and manual counts. *Am J Clin Pathol* 1999 ; 112 : 677-86.