

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

Partie 2. Numération et formule leucocytaires*

Automated hematology analysers and spurious counts Part 2. Leukocyte count and differential

Franck Geneviève

Alban Godon

Anne Marteau-Tessier

Marc Zandecki

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

Résumé. Sur les automates d'hématologie cellulaire, le nombre des leucocytes est obtenu après lyse des hématies puis analyse par diffraction optique ou variation d'impédance. L'examen des histogrammes leucocytaires, soit avec trois paramètres soit générant une formule complète, permet de repérer plusieurs de ces particules perturbatrices sous la forme de nuages de points, et leur localisation sur le graphe oriente parfois aussi sur leur nature. Une numération leucocytaire est parfois réalisée également sur le canal d'analyse de la formule complète, et une discordance de résultats entre canaux sera signalée. Une fausse diminution du nombre de leucocytes est essentiellement liée à l'agglutination des leucocytes entre eux ou avec des plaquettes en présence d'EDTA. Une fausse augmentation évoquera la présence de particules anormales (agrégats plaquet-taires, érythroblastes, cryoglobulines) ou d'hématies non lysées. Certains des automates localisent très précisément les érythroblastes, ce qui permet leur quantification. La formule leucocytaire automatisée se révèle exacte et précise quand les hémogrammes sont normaux ou montrent des variations quantitatives modérées, mais diverses imprécisions de mesure persistent, notamment pour le décompte des polynucléaires basophiles et des monocytes, ou par l'absence de détection de cellules anormales quand leur nombre est faible (blastes, cellules de lymphome, lymphocytes atypiques). Enfin, la conservation prolongée des échantillons avant analyse altère les paramètres de la formule leucocytaire plus nettement et plus vite que ceux de la numération globulaire.

Mots clés : *automates d'hématologie, numération globulaire, hémogramme automatisé, erreur de décompte, leucocytes, formule leucocytaire*

Abstract. Using hematology analysers, white blood cell (WBC) counts and differentials (either three or five parameters) may be ascertained after Red Blood Cell (RBC) lysis and analysis using either impedance and/or optical (laser) technology. Cells or particles not destroyed by lytic agents are enumerated as WBC: abnormal particles may be observed on WBC differential scattergrams, if performed, appearing as a variable number of dots, which location may help

* La première partie de ce travail de synthèse a été publiée sous la référence : Marteau-Tessier A, Geneviève 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 troisième partie est publiée dans ce numéro.

Tirés à part : M. Zandecki

to ascertain the nature of the abnormality. Spuriously low WBC counts are rare, mainly related to agglutination in the presence of ethylenediamine tetra-acetic acid. Cryoglobulins, lipids, insufficiently lysed RBC, erythroblasts and platelet aggregates are common situations increasing WBC counts. So far, many current high performance analysers clearly identify and enumerate erythroblasts now. In normal patients and in reactive disorders automated differential provides true and accurate results. However, failure to enumerate accurately basophilic granulocytes and monocytes is not uncommon. Using myeloperoxidase cytochemistry to ascertain differential may lead to slide review if the enzyme expression is low or absent. Low number of abnormal cells (blasts, lymphoma cells, dysplastic granulocytes) may be missed, more frequently if leukopenia is present. In many but not all instances flagging and/or an abnormal WBC differential scattergram will alert the operator. Although these flags are sensitive enough to allow the identification of several spurious counts, only the most sophisticated analysers have optimal flagging, whereas more simple ones, especially those without a WBC differential scattergram, do not demonstrate the same sensitivity for the detection of abnormal results.

Key words: *haematology analysers, automated count, cell blood count, full blood count, spurious counts, white blood cells, leukocyte differential*

Les automates d'hématologie cellulaire (AHC) actuels produisent des résultats rapides, exacts et précis pour des échantillons de sang de sujets sains, et quand il existe des variations quantitatives des paramètres de la numération globulaire celles-ci sont également bien analysées [1]. Au-delà de certaines limites, larges mais variables selon l'AHC, les résultats deviennent moins précis ou ne peuvent être obtenus (voir le guide d'utilisation de son AHC). À côté de ces limites quantitatives et/ou qualitatives des résultats erronés peuvent être observés, variables selon la nature de l'agent responsable et de l'AHC, d'origine pré-analytique, analytique, ou liés à une particularité de la pathologie du patient. Concernant la numération des leucocytes les causes d'erreur sont diverses : certaines sont liées à des anomalies liées aux plaquettes sanguines (PLT) et ont été abordées dans la partie 1 de ce travail, alors que d'autres sont plus spécifiques aux leucocytes. Les AHC analysent aujourd'hui très précisément ces leucocytes et peuvent les identifier et les énumérer pour en réaliser une formule automatisée à cinq paramètres. Jusqu'à une certaine limite les variations quantitatives, voire qualitatives, de la formule leucocytaire sont convenablement appréhendées par les AHC, mais il convient d'être plus prudent à mesure que l'on s'éloigne des résultats normaux, les résultats indiqués par les AHC n'étant qu'une indication de résultat plutôt que la réalité [1]. Les diverses populations leucocytaires apparaissent sous forme de nuages de points au sein d'histogrammes bi- ou multiparamétriques, et des anomalies dans la position de ces nuages, ou l'apparition de nuages anormaux, doivent alerter l'opérateur. Ces histogrammes visualisent

des anomalies de la formule leucocytaire mais également diverses particules à l'origine d'erreurs de comptage d'un ou plusieurs paramètres de la numération globulaire. Des messages d'alerte sont souvent proposés, aujourd'hui plus fréquents avec les capacités croissantes d'analyse et la puissance informatique de traitement des données. Ces messages demeurent des éléments d'orientation pour mieux cerner l'anomalie ou interpréter la formule microscopique, et ne doivent en aucun cas être transcrits tels quels sur le résultat [1].

Principes généraux de la numération des leucocytes et de détermination de la formule leucocytaire

Chaque particule de taille supérieure à celle d'une PLT et qui n'est pas détruite par les agents hémolytiques est identifiée *a priori* comme un leucocyte et énumérée comme telle par les AHC, avec la technique de mesure par impédance tout comme avec la méthode de diffraction optique. Certains AHC proposent une numération des leucocytes après addition d'agents de lyse drastiques qui détruisent les GR et les membranes leucocytaires tout en respectant les noyaux leucocytaires, à l'exception des granulocytes basophiles qui restent intacts. Ce canal de numération des leucocytes est encore appelé « canal basophiles », car il fournit le nombre de noyaux leucocytaires et le nombre des polynucléaires basophiles (l'ensemble correspondant à la numération

leucocytaire totale). Sur certains AHC les réactifs lysent les GR et contractent les leucocytes (déshydratation partielle), permettant d'obtenir le nombre de leucocytes ainsi qu'une formule leucocytaire approchée à trois paramètres appelée LMG (pourcentages de lymphocytes, monocytes et granulocytes). L'histogramme volumétrique LMG est perturbé en cas d'anomalies de la formule leucocytaire mais visualise aussi d'éventuelles particules interférant dans la zone de discrimination PLT – leucocytes autour de 35-40 fL, correspondant essentiellement à des amas plaquettaires, des PLT géantes ou des érythroblastes (Beckman LH, Horiba).

Pour obtenir une formule leucocytaire automatisée à cinq paramètres les leucocytes sont analysés sur un autre canal, selon diverses technologies (voir *tableau 1 de la partie 1 de ce travail*) : un (ou plusieurs) histogramme bi- ou multiparamétrique (souvent la taille et un ou plusieurs autres critères) visualise les cinq populations leucocytaires sous forme de nuages de points [1]. Ces histogrammes « formule leucocytaire » localisent également, voire identifient approximativement, d'éventuelles autres cellules (myélémie, blastes, érythroblastes, plasmocytes, lymphocytes atypiques). Des messages d'alerte signalant ces populations anormales sont générés, et l'examen attentif des histogrammes avec vérification par microscopie optique sera nécessaire le cas échéant, en fonction des anomalies signalées. Quelques automates proposent une semi-quantification (Beckman, Horiba, Abbott, Siemens) ou une quantification précise de la myélémie (Sysmex) ou des érythroblastes (Siemens, Abbott, Sysmex, Beckman). Une numération leucocytaire est réalisée en parallèle de la formule sur ce canal « formule leucocytaire », mais ici les réactifs de lyse n'altèrent que les GR et diverses autres particules, comme les amas de PLT, PLT géantes, ou autres ne sont pas altérées et sont alors visualisées sur les histogrammes, perturbant ou non la numération leucocytaire sur ce canal et l'établissement de la formule leucocytaire. Une différence numérique avec le résultat provenant du canal « numération leucocytaire » et génère un message d'alerte, indiquant la présence possible d'éléments perturbateurs. De plus ces histogrammes bi- ou multiparamétrique(s) de formule leucocytaire ont une place majeure dans la gestion globale de l'hémogramme, car ils visualisent souvent les particules anormales perturbant la mesure d'un ou plusieurs des paramètres de la numération globulaire, et leur localisation particulière permet parfois d'orienter la démarche d'identification de l'anomalie. L'absence d'histogramme « formule leucocytaire » sur les AHC les plus simples nécessite d'associer des procédures complémentaires de contrôle ou de réanalyse plus attentives pour valider l'hémogramme automatisé qu'avec des AHC plus élaborés.

Numération leucocytaire faussement diminuée (*tableau 1*)

Les agrégats de polynucléaires neutrophiles en présence d'EDTA

Leur incidence est faible mais certainement sous-estimée, variant de 0,003 % à 0,013 % des hémogrammes selon les pays [2]. L'anomalie est observée aussi bien chez l'homme que chez la femme, et bien qu'aucune pathologie ou aucune maladie spécifique ne soit clairement associée à l'agrégation des polynucléaires neutrophiles (PNN), un contexte inflammatoire aigu ou chronique, une maladie hépatique, ou la présence d'agglutinines froides ont été rapportés dans plusieurs circonstances [2, 3]. Ce phénomène peut être transitoire ou permanent [4]. L'importance de la fausse diminution de la numération des leucocytes varie de modérée à majeure, et une suspicion d'agranulocytose a même pu être évoquée, entraînant la réalisation d'explorations et de démarches complémentaires non nécessaires (myélogramme, mise en place d'une antibiothérapie) [4].

Le mécanisme qui conduit à l'agglutination des PNN n'est pas totalement élucidé [2, 5]. C'est un artefact obtenu *in vitro* et principalement en présence d'EDTA, bien qu'une agglutination avec d'autres anticoagulants (citrate trisodique ou héparine) ait été rapportée dans quelques cas [2, 6, 7]. Après incubation du plasma avec un anticorps anti-Ig ou avec le dithiothreitol, certains auteurs ont montré que ce phénomène était lié à un composant plasmatique de nature IgM et ont rapporté que la taille des agrégats était plus importante à basse température et qu'ils disparaissaient à 37 °C [5]. D'autres auteurs ont remarqué que l'agglutination n'était qu'inconstamment corrigée par le réchauffage à 37 °C, en défaveur de l'implication constante d'une agglutinine froide dans la genèse des amas [6, 8]. Un taux élevé d'expression d'intégrine CD11b (CD18) sur la membrane des PNN a été rapporté dans une étude [9]. Selon le type d'AHC, un message d'alerte est présent ou non : il s'agit alors d'une alarme quantitative (« leucopénie » ou « neutropénie »), secondaire à la déplétion en neutrophiles) ou d'une alarme qualitative concernant les leucocytes non agrégés (« immatures granulocytes », « lymphocytes atypiques »), mais il n'y a pas de message spécifique pour l'agrégation des PNN [10]. Quand le nombre de leucocytes est déterminé sur le canal de numération des leucocytes après lyse des membranes et décompte des noyaux (« canal basophiles ») le résultat est correct car les agrégats sont détruits (lyse des membranes) [9], alors que le nombre obtenu sur le canal « formule leucocytaire » est sous-estimé, la lyse ménagée préservant les amas, qui ne sont ni identifiés ni comptés. Les histogrammes

Tableau 1. Principales situations associées à une anomalie de la numération leucocytaire automatisée.

| Fausse diminution | Autres paramètres parfois ou constamment altérés |
|---|---|
| Agglutination des neutrophiles (liée à l'EDTA) Agglutination de divers autres types de leucocytes entre eux (lymphocytes, cellules de leucémies ou de lymphome) Agrégats mixtes neutrophiles – plaquettes Excès d'anticoagulant EDTA-K3 (rapport quantité de sang/quantité d'anticoagulant non respectée) Coagulation partielle de l'échantillon | Formule leucocytaire erronée : neutropénie, fausse lymphocytose Formule leucocytaire erronée Formule leucocytaire erronée, N° plaquettaire diminuée Rétraction des GR (VGM et Hte faussés) Numération plaquettaire diminuée (parfois augmentée : filaments de fibrine) ; tous les paramètres sont faussés |
| Fausse augmentation | Autres paramètres parfois ou constamment altérés |
| Agrégats plaquettaires Plaquettes géantes Érythroblastes Globules rouges résistant à la lyse (nouveau-nés, hémoglobines anormales, chimiothérapie, insuffisance rénale ou hépatique, hyperosmolarité plasmatique...) Cryoglobulines, cryofibrinogène, immunoglobulines monoclonales Lipides Micro-organismes (agrégats de bactéries) Tube de sang trop rempli Anecdotique : présence de cellules adipeuses dans l'échantillon de sang | Numération plaquettaire diminuée Numération plaquettaire diminuée Augmentation de la N° plaquettaire, plus rarement de celle des GR Hémoglobine et CCMH augmentées (variable selon les automates) ; image anormale sur le graphe de la formule leucocytaire, <u>formule leucocytaire automatisée perturbée</u> ; N° plaquettaire parfois augmentée Numération des plaquettes parfois augmentée Tous paramètres erronés |

biparamétriques de la formule leucocytaire (taille/contenu, ou taille/activité myéloperoxydase) peuvent visualiser les petits amas sous la forme de quelques points correspondant à des particules de grande taille (au-dessus du nuage des PNN) et/ou avec forte activité peroxydase et/ou perturbant la séparation des nuages leucocytaires normaux. Les messages les plus fréquemment générés sont : « granulocytes immatures » ou « band cells », ou « forte activité peroxydase », ou « neutropénie », ou « HPX » (présence de particules à forte activité peroxydase ; Siemens), mais se rapportent surtout aux particularités des leucocytes résiduels [4]. Sur les frottis sanguins les amas leucocytaires ont une taille variant de quelques-uns à plusieurs centaines de PNN par amas : l'examen au faible grossissement doit être attentif car plus les amas sont volumineux plus ils sont rares et donc difficiles à détecter (localisés dans les franges des frottis) (*figure 1*). Des granulocytes immatures (myélocytes ou métamyélocytes) ou des neutrophiles non segmentés sont observables dans ces amas, et parfois quelques lymphocytes ou monocytes semblent y avoir été piégés [7]. Divers anticoagulants préparés spécialement ont été proposés pour pallier l'agglutination [4]. Le chauffage de l'échantillon à 37 °C diminue inconstamment la taille et le nombre des agrégats et ne doit pas être proposé comme moyen d'obtenir une numération leucocytaire exacte. Un

prélèvement de sang sur citrate trisodique est à conseiller en première intention [2]. La dilution immédiate de sang capillaire dans un milieu sans EDTA prévient l'agglutination [2].

Deux remarques. Les agrégats de PNN sont dépourvus de PLT, par opposition aux agrégats mixtes PNN - PLT décrits dans la partie 1 de ce travail. En outre il n'y a pas de relation entre le phénomène lié à EDTA présenté ici et l'anomalie qui peut survenir *in vivo* dans diverses maladies dont les syndromes de détresse respiratoire de l'adulte ou la leucostase, au cours desquels les PNN ont tendance à s'agréger comme conséquence d'interactions de leur membrane avec le complément [11].

Agrégation de cellules lymphoïdes en présence d'EDTA

Des amas de lymphocytes normaux ont été observés chez un patient présentant une infection urinaire, chez un patient présentant un lymphome à cellules B sans dissémination sanguine, chez un patient présentant des escarres, et chez un autre présentant une leucémie myélomonocytaire chronique [7, 12-15]. Des amas de lymphocytes de survenue spontanée sont décrits dans les leucémies lymphoïdes chroniques, surtout si elles sont très hyperleucocytaires

(> 400 G/L) [14]. Des agrégats de trois à 50 cellules lymphomateuses ont été observés dans deux cas de lymphomes spléniques à lymphocytes villeux et dans un cas de lymphome non hodgkinien évoquant un lymphome à lymphocytes villeux [15-17]. Dans ces circonstances les gros agrégats n'étaient pas mis en évidence par les AHC et le compte leucocytaire était sous-estimé : cependant les AHC en cause ne disposaient pas d'une technique de comptage des noyaux leucocytaires. Les petits agrégats perturbaient de manière variable la formule leucocytaire automatisée en induisant ou non un message d'alerte (« histogramme anormal »). Dans tous les cas rapportés jusqu'à présent l'EDTA était impliqué, bien que de petits amas de cellules aient également été observés sur des prélèvements héparinés utilisés comme contrôles [18], et l'emploi de sang prélevé sur citrate de sodium ne modifiait pas réellement la tendance à l'agglutination des cellules lymphoïdes dans un cas [17]. Un prélèvement de sang capillaire avec dilution immédiate dans un liquide sans EDTA semble la meilleure manière d'éviter la formation des agrégats [13]. Le réchauffage à 37 °C a été mentionné comme peu efficace pour faire disparaître les agrégats [13, 17]. Comme le nombre de cas rapporté est faible, seules des hypothèses concernant le mécanisme ou les mécanismes conduisant à l'agglutination des lymphocytes ont été proposées, impliquant diverses molécules comme l'adrénaline, l'acide arachidonique, ou le leucotriène D4 [17]. Enfin, des agrégats impliquant toutes les classes de leucocytes normaux ont été observés chez un patient présentant une cirrhose éthylique [19].

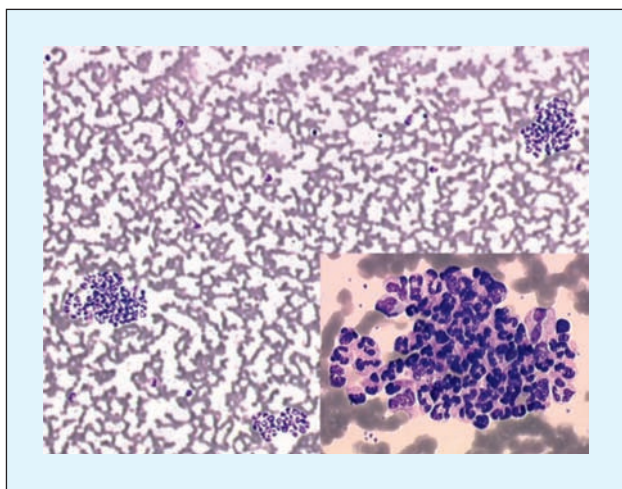


Figure 1. Agrégats de granulocytes neutrophiles, observés au faible grossissement, avec l'un d'entre eux agrandi (frottis sanguin MGG). Ils sont suffisamment volumineux pour être négligés par l'automate, comme dans le cas présent où l'examen de la lame était justifié par une leucopénie avec neutropénie signalée par l'automate (patient VIH+).

Nature et quantité d'anticoagulant

Une diminution du nombre des leucocytes sans relation avec une agglutination leucocytaire a été rapportée pour des échantillons sanguins contenant une quantité de sang insuffisante (après ponction veineuse difficile) : l'excès d'EDTA K3 a été mis en avant comme pouvant altérer les leucocytes. Les histogrammes de la formule leucocytaire montrent alors des aspects anormaux, peu superposables d'un cas à l'autre. Ce phénomène doit être évoqué également pour les prélèvements capillaires chez le nouveau-né et le nourrisson ; il semble cependant ne pas survenir en cas d'excès d'EDTA K2 [20].

Numération leucocytaire faussement augmentée (tableau 1)

Agrégats plaquettaires et plaquettes géantes

Les agrégats de PLT ont une taille variable et parfois proche de celle des leucocytes et peuvent être énumérés comme tels, induisant une fausse hyperleucocytose [21-24]. Lors de la numération des leucocytes avec la technique d'impédance et la détermination de la formule approchée LMG, l'histogramme correspondant peut, outre montrer les 3 pics correspondant respectivement aux lymphocytes, monocytes et granulocytes, signaler une interférence liée à la présence de particules de petite taille, signalée par un message : « agrégats de PLT », « PLT géantes », mais aussi parfois « érythroblastes » (Beckman, série LH). Dans le canal énumérant les noyaux leucocytaires (« canal basophiles ») l'agent de lyse détruit les agrégats de PLT et la numération leucocytaire proposée est exacte. Par contre si un décompte est réalisé dans le canal « formule » les agrégats de PLT ne sont pas détruits : ils sont inclus parmi les leucocytes et induisent un résultat faussement augmenté (les différences sont affichées ou un message de résultats discordants est proposé). Les amas de PLT ont des tailles différentes chez un patient donné et forment sur les histogrammes biparamétriques de la formule leucocytaire un nuage de points assez allongé (en fusée) partant souvent de l'origine du graphe. Outre un message d'alerte signalant ce phénomène, certains AHC peuvent quantifier ces agrégats et proposer une numération et une formule leucocytaires corrigées (Siemens). Par contre, quand l'AHC ne réalise pas la formule leucocytaire (ou que le programme formule a été débrayé) les messages d'erreur venant des histogrammes leucocytaires sont absents et il est nécessaire d'être plus attentif aux résultats de la numération des leucocytes et des PLT [22, 23].

Dans certaines circonstances, comme les syndromes myéloprolifératifs ou les syndromes myélodysplasiques il existe des PLT géantes, dont les plus grandes peuvent être

comptées parmi les leucocytes. Des messages sont habituellement produits, issus de l'histogramme des volumes des PLT ou des histogrammes biparamétriques de la formule leucocytaire (*voir aussi la partie 1 de ce travail*) : les AHC discriminent peu PLT géantes et petits agrégats plaquettaires, et les messages d'alerte peuvent proposer les deux options, la conduite pratique étant superposable dans les deux cas. Tout comme pour les amas de PLT, ces PLT géantes sont détruites dans le canal de numération leucocytaire « basophiles » et la numération proposée dans ce canal est donc exacte. Quand on ne dispose pas de la technologie de double décompte dans deux canaux différents, il faut être prudent avec le nombre des leucocytes fourni par l'AHC, faire un compte avec un hématimètre, ou éventuellement essayer d'estimer les nombres respectifs de leucocytes et de PLT géantes sur le frottis en situation d'urgence (faible grossissement ; très subjectif).

Les érythroblastes

Présents de manière physiologique dans le sang périphérique des nouveau-nés ou découverts dans diverses circonstances pathologiques, leur nombre peut être ou devenir parfois très supérieur à celui des leucocytes. Lors de la dilution dans le canal « formule leucocytaire » les agents de lyse des GR agissent également sur les érythroblastes en détruisant leur membrane mais respectent leur noyau : les anomalies du décompte leucocytaire sont liées à la présence de ces noyaux d'érythroblastes. Leur taille (30 - 50 fL) superposable à celle des amas de PLT ou des PLT géantes explique (i) qu'ils perturbent la numération des leucocytes de manière assez similaire à celles des amas de PLT et (ii)

qu'ils génèrent souvent des messages signalant indifféremment l'existence de l'un ou/et l'autre de ces artefacts. Sur les histogrammes biparamétriques de formule leucocytaire les noyaux des érythroblastes sont visualisés dans une région assez proche de celle des amas de PLT (*figure 2*). Les AHC les plus élaborés signalent la présence d'érythroblastes et en proposent parfois un décompte, soit après réanalyse soit directement, le résultat étant soustrait de celui de la numération leucocytaire brute [25, 26]. Quand un AHC ne réalise pas de formule leucocytaire cinq paramètres, il faut bien comprendre si, quand et comment apparaît l'alarme « érythroblastes », créer un protocole de décompte sur frottis sanguin et réaliser manuellement la soustraction des érythroblastes du nombre brut des leucocytes.

Les globules rouges résistant à la lyse

Certains GR peuvent ne pas être détruits par les agents de lyse chez les nouveau-nés, ou en pathologie au cours de maladies hépatiques, dans l'insuffisance rénale, au cours des chimiothérapies ou de certaines hémoglobinoses (homozygotes CC, ou hétérozygotes composées CS ou C β thalassémie) (*figure 3*) [6, 27-30]. Ces GR résistants à la lyse peuvent provoquer sur certains AHC une fausse augmentation de la numération leucocytaire. Dans le canal « numération leucocytaire » l'agent de lyse détruit habituellement (mais pas toujours) les GR, et le décompte des leucocytes n'est que très inconstamment perturbé. Certains automates proposent un mode de lyse étendue qu'il suffit d'activer pour éliminer ce problème (Abbott). Par contre les GR ne sont pas détruits avec la lyse ménagée proposée dans le canal « formule », et ils apparaissent dans

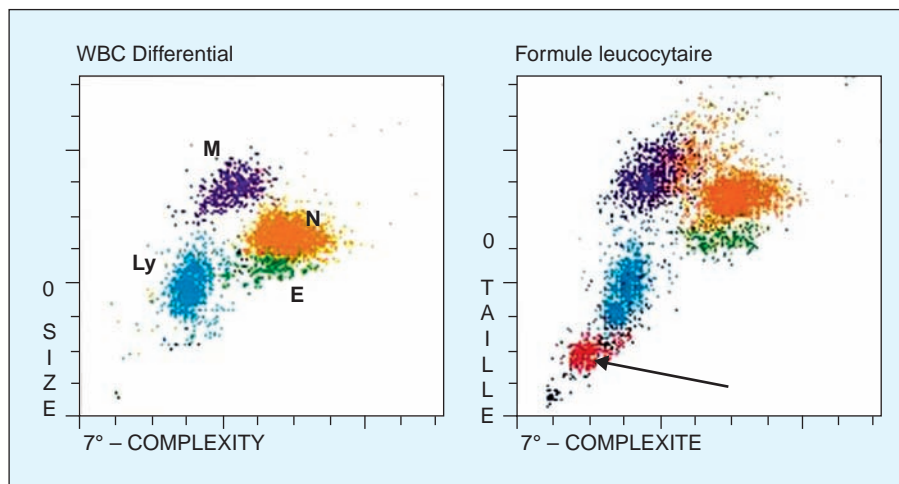


Figure 2. Présence d'érythroblastes sanguins. Les automates qui réalisent la formule leucocytaire à cinq paramètres localisent les érythroblastes sous la forme d'un nuage de particules de petite taille et de structure interne faible. Ici, l'histogramme biparamétrique de droite présente un petit nuage supplémentaire de points (en rouge : flèche) par rapport à l'histogramme témoin de gauche [N = neutrophiles ; E = éosinophiles ; Ly = lymphocytes ; M = monocytes] : il s'agit d'érythroblastes, et l'analyse à d'autres angles de diffraction et en présence d'iodure de propidium permettent de les dénombrer et de les soustraire du décompte des leucocytes totaux (Cell-Dyn Sapphire, Abbott).

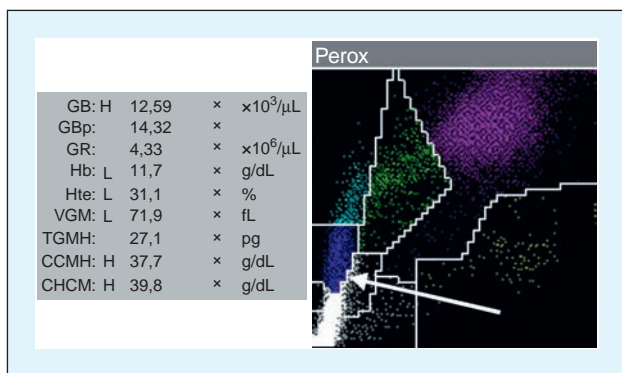


Figure 3. Présence de globules rouges (GR) résistants à la lyse au cours d'une hémoglobinose C homozygote. On observe une différence entre le nombre de leucocytes du canal peroxydase « formule leucocytaire » (GBp) et sur le canal de numération leucocytaire « basophiles » (GB). L'histogramme Perox « formule leucocytaire » (à droite) visualise un nuage de particules de petite taille, partant de l'origine de l'histogramme (points blancs, en bas) chevauchant la partie basse de la fenêtre des lymphocytes (en bleu), ce qui surestime la numération leucocytaire de ce canal. On note par ailleurs une CCMH > 36 g/dL, habituelle de cette hémoglobinose (Siemens Advia 120).

les histogrammes biparamétriques « formule leucocytaire » sous la forme d'un nuage de points, dans des régions qui varient selon les AHC (figure 3). L'aspect se rapproche parfois de celui observé en présence d'un grand nombre d'érythroblastes. L'incapacité ou la difficulté à réaliser une formule leucocytaire automatisée induit la génération d'un message d'alerte.

L'anomalie se traduit par une hyperleucocytose plus ou moins notable (jusqu'à plusieurs dizaines de G/L), difficile à appréhender en l'absence d'histogramme des leucocytes. La discordance entre les numérations leucocytaires obtenues sur le canal de « numération leucocytaire » (avec lyse forte) et sur le canal « formule », associée à une image particulière (amas de particules, de localisation variable selon les AHC) permet de préciser l'anomalie. Une appréciation sur lame de la richesse en leucocytes est possible (mais très subjective), et un décompte avec un hématimètre après dilution et lyse manuelle peut être envisagé. Une attention particulière doit être portée aux patients sous chimiothérapie car quelques GR résistants à l'hémolyse peuvent induire une fausse normalisation voire une augmentation de la numération leucocytaire alors qu'il existe en réalité une leucopénie : la comparaison avec les résultats antérieurs (Delta Check) et l'examen du frottis sanguin sont nécessaires dans de tels cas. Particulièrement quand on dispose d'un AHC qui ne réalise pas de formule leucocytaire automatisée, l'anomalie peut ne pas être détectée.

Les cryoglobulines

La présence de cryoglobulines induit une fausse augmentation de la numération des leucocytes mais également de

la numération des PLT, et plus rarement à une altération du nombre des GR ou de la mesure de l'hémoglobine [31, 32]. L'aspiration de l'échantillon de sang est insuffisante ou nulle quand la cryoglobuline a une action gélifiante, et les messages d'alerte sont en rapport (« aspiration insuffisante » ou message apparenté) : il convient de ne pas confondre l'aspect du tube avec celui d'un prélèvement coagulé. La cryoglobuline peut précipiter en cristaux : ceux de taille réduite faussent la numération des PLT (voir partie 1 de ce travail), et ceux de taille plus élevée peuvent faussement augmenter la numération des leucocytes. Dans ce cas un nuage de particules est parfois visible sur l'histogramme de la formule leucocytaire, soit près de la région des lymphocytes ou au-dessus du seuil discriminant avec les PLT, soit au-dessus du nuage des neutrophiles, selon l'AHC utilisé. Les anomalies disparaissent habituellement après incubation à 37 °C, sauf quand la quantité de cryoglobuline est très élevée. Les AHC qui utilisent des réactifs chauffés à 37 °C, même avec des réactifs à pH bas mentionnés comme évitant la précipitation des cryoglobulines, ne sont pas exempts d'anomalie quand la cryoglobuline est présente en grande quantité, et de faux décomptes peuvent alors être également observés (Siemens). Les cryopécipités sont parfois visibles sur des frottis colorés et dans presque tous les cas après examen du sang frais avec un microscope à contraste de phase (l'anomalie est plus évidente si l'analyse est réalisée à basse température). Divers aspects morphologiques des précipités ont été rapportés : amas de particules denses et amorphes ou en flaque, aspect de cristaux, ou de globules plus ou moins rosés, et souvent une déformation particulière des GR est visible (aspect « mangé aux mites » ; voir figure 7 de la partie 1 de ce travail) [33].

La conduite pratique est l'incubation du tube de sang au bain-marie à 37 °C pendant une heure puis une réanalyse rapide [33]. L'anomalie s'amplifie sur un aliquot de sang incubé à 4 °C et conforte l'hypothèse diagnostique [33]. Parfois la disparition de l'anomalie est incomplète à 37 °C : un nouvel échantillon sanguin, prélevé et maintenu à 37 °C jusqu'à analyse, devient nécessaire pour obtenir des résultats exacts [32]. La détermination de l'hémoglobine et de la numération des GR ont été parfois signalées comme anormales en présence de cryoglobuline (voir partie 3 de ce travail).

Filaments de fibrine, cryofibrinogène et apparentés

Des particules correspondant à du cryofibrinogène ou de la fibrine ont été rapportées comme pouvant augmenter la numération des PLT, parfois jusqu'à 2 fois la valeur réelle, et jusqu'à 16 fois la numération des leucocytes [29, 34]. Les messages d'alerte sont proches de ceux générés par la présence d'amas de PLT, et les perturbations de l'histogramme

« formule » sont du même type. L'examen attentif des frottis sanguins montre de fines fibrilles, qui ont l'aspect de fibrine après étude en microscopie électronique (*voir partie 1 de ce travail*). Ces fibrilles peuvent correspondre soit à du cryofibrinogène, bien que la recherche biochimique soit négative dans certains cas, soit à un mélange de cryoglobuline et de cryofibrinogène. Cependant l'analyse d'un nouvel échantillon sanguin EDTA de ces patients ne reproduit que rarement le phénomène, et fait penser qu'il s'agirait plutôt d'une polymérisation de fibrine, peut-être suite à une ponction veineuse un peu difficile, initiant la coagulation *in vitro*, avant contact du sang avec l'EDTA [34]. Après chauffage des échantillons à 37 °C, l'anomalie de décompte est soit moins prononcée, soit disparaît totalement : un contrôle sur un nouveau prélèvement est cependant souhaitable.

Les lipides

Comme discuté dans la partie 1 de ce travail, les lipides peuvent former des gouttelettes de taille suffisamment grande pour perturber la numération des PLT et/ou celle des leucocytes. La discordance des résultats produits par les deux canaux de mesure des leucocytes (canal « basophiles » et canal « formule ») est souvent signalée, mais les deux résultats peuvent se situer encore au sein des valeurs normales : déterminer le résultat correct nécessite l'interprétation des histogrammes générés avec les canaux d'analyse correspondants (choisir le résultat du canal ne visualisant pas de nuage anormal). La présence d'un excès de lipides est en effet souvent bien visible sur les histogrammes leucocytaires, sous forme d'un nuage de points : ces nuages ont une forme variable selon les AHC, mais leur aspect est suffisamment particulier avec chaque type d'AHC pour évoquer d'emblée cette interférence. Les commentaires sur la perturbation de la mesure de l'hémoglobine en présence de lipides seront apportés dans la partie 3 de ce travail.

Les micro-organismes

Des bactéries ou des champignons peuvent être observés sur les frottis sanguins et, comme mentionné dans la partie 1 de ce travail, ils peuvent provoquer une fausse augmentation de la numération des PLT [35-37]. Des études *in vitro* au cours desquelles de grandes quantités de micro-organismes ont été rajoutées aux échantillons sanguins ont montré qu'ils peuvent s'auto-agglutiner et provoquer alors une augmentation de la numération leucocytaire et des modifications de la formule leucocytaire automatisée [35].

Concernant spécifiquement le paludisme, les GR, les PNN et les monocytes peuvent contenir de l'hémozoïne [38], et ce pigment dépolarise les faisceaux laser entraînant des

anomalies de la formule leucocytaire (voir plus loin) ; la numération leucocytaire n'est pas perturbée.

Tissus adipeux

Une numération leucocytaire faussement augmentée par contamination avec du tissu adipeux sous-cutané a été rapportée dans le cas d'un prélèvement sanguin obtenu par une ponction à la veine fémorale : l'histogramme de la formule leucocytaire présentait également une image anormale [39].

Remplissage excessif des tubes sous vide

Comme déjà mentionné avec la numération des PLT, un remplissage excessif des tubes de sang peut induire une difficulté à homogénéiser l'échantillon, du fait de l'absence de bulle d'air, et provoquer des numérations anormales et non reproductibles [40].

Anomalies de la formule leucocytaire automatisée (tableau 2)

Certains AHC, lorsqu'ils réalisent la numération des leucocytes par impédance, analysent les leucocytes sur ce canal et produisent une formule leucocytaire approchée, à trois paramètres, appelée LMG (Beckman, Horiba). Il s'agit d'une formule simplifiée, utile dans des cas précis (hyperleucocytose post-chirurgicale par exemple), mais qui présente diverses limites : absence de quantification des éosinophiles, identification imparfaite des variations du nombre des monocytes, et faible nombre de messages d'alerte quand le profil de l'histogramme est anormal. De plus l'analyse doit être réalisée dans des conditions bien définies : un minimum de 30 minutes après le prélèvement est nécessaire, qui correspond à une période de « maturation » ou « d'adaptation » des leucocytes au sein de l'échantillon sanguin, et des résultats reproductibles ne sont ensuite obtenus que dans les 6 heures suivantes [1]. Cette formule approchée ne remplace pas la formule à cinq paramètres mais complète l'analyse leucocytaire cinq paramètres de certains AHC, notamment en précisant l'existence de particules de faible taille comme les PLT géantes, les amas de PLT et les érythroblastes (Beckman LH 750, Horiba Pentra 120) [41, 42]. Les AHC actuels fournissent des formules leucocytaires automatisées précises pour des hémogrammes normaux ou qui ne montrent que des variations quantitatives modérées. Quand les modifications de l'hémogramme ne sont que réactionnelles il est parfois possible d'obtenir une semi-quantification ou une quantification de certaines cellules anormales : myélemie, lymphocytes activés, érythroblastes (appelée formule leucocytaire étendue). Par contre les AHC ne sont pas programmés pour identifier précisément tous

Tableau 2. Principales anomalies de la formule leucocytaire automatisée.

| |
|---|
| <p>Situations inhabituelles ou anormales perturbant la numération leucocytaire</p> <p>Amas de plaquettes Plaquettes géantes (si nombre élevé) Agrégats de leucocytes (entre eux ou avec les plaquettes) Globules rouges mal lysés Présence de lipides</p> <p>Présence de cellules anormales en faible nombre</p> <p>Incluses parmi les leucocytes habituels (cellules de lymphome), ou non détectées car en nombre inférieur au seuil de détection de l'automate (leucopénies)</p> <p>Érythroblastes</p> <p>Influence variable selon les automates : les plus performants identifient, énumèrent et retirent les érythroblastes du décompte des leucocytes</p> <p>Déficit en myéloperoxydase des leucocytes (Siemens)</p> <p>Total ou partiel, constitutionnel ou acquis, il perturbe les capacités des automates Siemens Advia à identifier les divers leucocytes : augmentation du nombre des lymphocytes, grandes cellules non colorées, ou des monocytes, selon les cas</p> <p>Monocytes</p> <p>Faible reproductibilité du décompte d'un automate à l'autre Difficulté d'identification au cours des états infectieux sévères Présence de cellules anormales de taille comparable (neutrophiles des chimiothérapies, leucémies aiguës, lymphomes, grands lymphocytes activés)</p> <p>Granulocytes basophiles</p> <p>Fausse augmentation possible en présence de cellules de lymphome, blastes, lymphocytes activés, plasmocytes, neutrophiles ou monocytes géants de myélodysplasies, sang conservé plus de 24 heures Fausse diminution : basophiles inclus parmi les lymphocytes au cours de la leucémie myéloïde chronique</p> <p>Éosinophiles</p> <p>Difficultés d'identification : leucémies myéloïdes et myélodysplasies Paludisme avec présence d'hémozoïne dans les neutrophiles, les monocytes ou les globules rouges (schizontes matures)</p> <p>Conservation des échantillons sanguins avant analyse</p> <p>Modifications variables selon les automates et le type de cellule concerné :</p> <p>Neutrophiles : stabilité bonne jusqu'à 2-3 J à +4 °C Lymphocytes : diminution de 2 à 7 % après 2 J à +4 °C Monocytes : variations fortes à la baisse ou à la hausse (-12 – 25 % pour Sysmex XE et Beckman LH, +30 % pour Siemens Advia après 1 J à +4 °C)</p> |
|---|

les types de cellules, et peuvent négliger des cellules anormales quand leur nombre est faible (< 1-2 %) ou/et que leurs caractéristiques s'approchent de celles de cellules normales [1]. Selon les AHC une formule est soit toujours proposée soit seulement quand elle est techniquement réalisable : l'affichage systématique de résultats peut influencer l'utilisateur. Dans les situations pathologiques les valeurs proposées par un AHC ne doivent être considérées qu'à titre indicatif, et chaque utilisateur doit connaître précisément les limites de son AHC en la matière [1].

Diverses situations qui perturbent les paramètres de la numération globulaire altèrent secondairement la détermination et/ou la qualité de la formule leucocytaire. Ces situations anormales, abordées dans les trois parties de ce travail, correspondent notamment aux amas de PLT, PLT géantes, érythroblastes, GR non lysés, ou particules diverses qui apparaissent sur les histogrammes leucocytaires sous la forme de nuages de points, pouvant se juxtaposer ou chevaucher les nuages leucocytaires habi-

tuels. Enfin la formule automatisée peut être perturbée par un problème d'identification des cellules normales (modifications de nature réactionnelle) ou par la présence de cellules anormales. Un histogramme leucocytaire anormal impose de toute manière une démarche de l'opérateur et dans la majorité des cas l'examen microscopique du frottis sanguin.

Le problème particulier des érythroblastes

Il constituait un écueil de la numération leucocytaire sur les premières générations d'AHC, et interfère encore maintenant sur les AHC d'entrée de gamme en provoquant une surestimation du nombre des leucocytes (voir chapitre précédent). La formule leucocytaire est alors perturbée, et la localisation habituelle des noyaux d'érythroblastes près ou au niveau du nuage des lymphocytes (cf supra) entraîne une surestimation du nombre de ces derniers. Les AHC les plus élaborés signalent l'existence des érythroblastes et peuvent

les compter, soit dès le premier passage de l'échantillon (Siemens, Abbott, Beckman) soit secondairement (Horiba, Sysmex), le résultat de la numération leucocytaire étant ensuite directement corrigé [25, 26].

Le déficit en peroxydase des leucocytes

Il perturbe la formule automatisée déterminée par méthode cytochimique (Siemens) et sous-estime soit le nombre des neutrophiles (déficit en myéloperoxydase), soit des éosinophiles (déficit en éosinoperoxydase), soit des monocytes (déficit en peroxydase monocyttaire) [43, 44]. Dans ces situations les populations concernées sont délocalisées par rapport à la situation normale : outre leur nombre sous estimé elles perturbent l'analyse et la quantification des autres leucocytes. Des messages d'alerte adaptés sont proposés et l'aspect particulier de l'histogramme « formule leucocytaire » permet d'évoquer le déficit (*figure 4*) [43, 44].

Le nombre absolu de monocytes

Les performances des AHC concernant la numération des monocytes sont loin d'être parfaites et acceptables : la reproductibilité d'un AHC à l'autre est faible, avec des écarts de résultats variant de 13 à 59 % selon les séries de la littérature [45-47]. Outre le déficit en peroxydase

monocytaire et la présence de cellules anormales localisées près du nuage monocyttaire (blastes, granulocytes dysplasiques, lymphocytes activés, plasmocytes de myélome), l'activation des monocytes au cours des états infectieux sévères peut rendre leur identification plus malaisée par l'AHC ; cette modification a été mise à profit par certains pour aider à la détection du paludisme (Beckman) [48]. De plus le décompte des monocytes s'altère rapidement dans le temps, avec une augmentation ou une diminution dès 6-10 heures après le prélèvement, indépendamment de la température de conservation (voir plus loin).

Le nombre des polynucléaires basophiles

Comme pour les monocytes la numération des polynucléaires basophiles est globalement imparfaite : les AHC sous-estiment leur nombre quand il est augmenté, et de plus un nombre élevé de basophiles doit être interprété avec prudence [47, 49]. Les granulocytes basophiles sont souvent identifiés et comptés séparément des quatre autres leucocytes de la formule sur un canal dédié : toute cellule ou tout élément qui, comme les basophiles, résiste aux modifications chimiques induites par les réactifs est susceptible d'en perturber le décompte. Selon les AHC, diverses cellules ont été rapportées comme pouvant entraîner une « pseudobasophilie » : lymphocytes de patients positifs pour

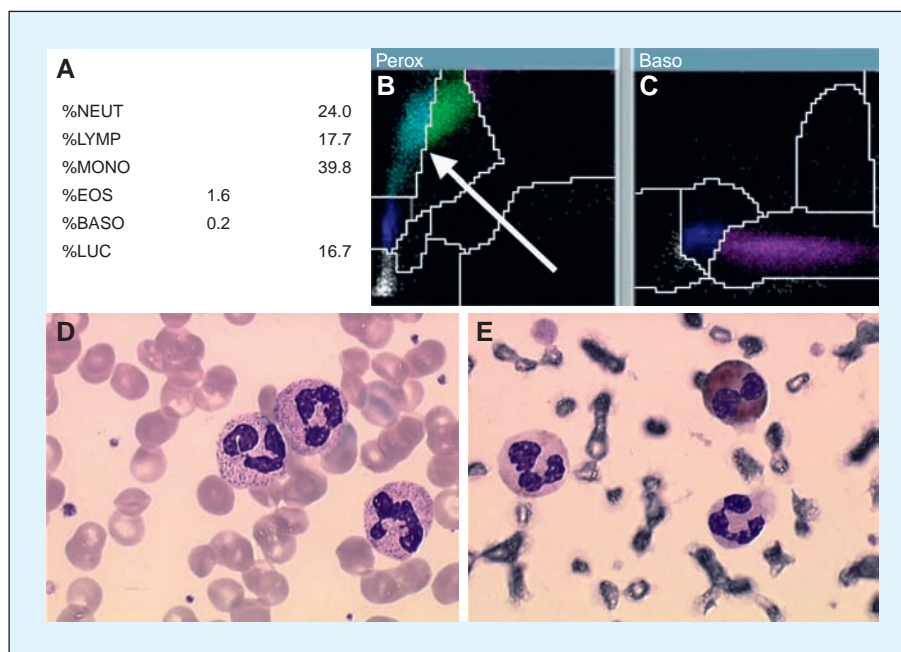


Figure 4. Déficit partiel en myéloperoxydase (découvert de manière fortuite chez une femme jeune en consultation de fin de grossesse). La formule leucocytaire (A) montre un % faible de neutrophiles et élevé de monocytes et de grandes cellules non classées (LUC) ($N < 2\%$). L'histogramme biparamétrique Perox (B) montre un nuage des neutrophiles dévié vers la gauche, positionné sur la fenêtre des monocytes (vert) et des LUC (bleu turquoise), alors que l'histogramme du canal « basophiles (Baso, C) montre un nombre normal de cellules polylobées. Ceci génère une alarme. L'étude du frottis sanguin coloré au MGG montre une formule de répartition normale (71 % de neutrophiles et 7 % de monocytes), sans anomalie morphologique des neutrophiles (D), alors que la cytochimie de la myéloperoxydase (E) confirme le déficit en peroxydase dans une partie des neutrophiles (Siemens Advia 120).

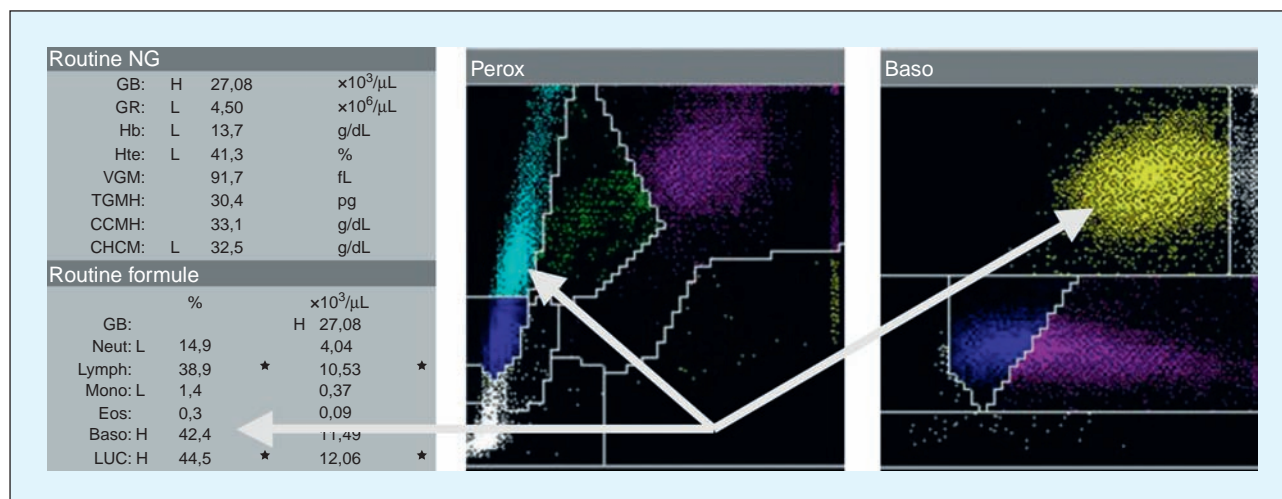


Figure 5. Excès erroné de granulocytes basophiles au cours d'un lymphome de la zone manteau en dissémination sanguine. L'hémogramme chiffré (à gauche) signale une hyperleucocytose (GB = 27.08 G/L) avec excès de lymphocytes (Lymph), de grandes cellules non colorées (LUC) et de granulocytes basophiles (Baso). L'histogramme « formule leucocytaire » au centre (Perox) montre un nuage continu de points qui chevauche les zones « lymphocytes » en bleu et « LUC » en bleu turquoise. L'histogramme du « canal basophiles » (à droite) montre un nuage de points jaunes très important (basophiles ?). De tels histogrammes imposent la réalisation d'un frottis sanguin, montrant 94 % de cellules de lymphome, sans excès de granulocytes basophiles (Siemens Advia 120).

le virus de l'immunodéficience humaine, blastes de divers types de leucémies aiguës (myéloblastes, promyélocytes), granulocytes ou monocytes anormaux au cours des syndromes myélodysplasiques, cellules de lymphomes (figure 5) ou de myélome, parfois érythroblastos ou amas de PLT [49-51]. Même s'ils ne perturbent pas toujours le décompte des basophiles, les érythroblastos et les amas de PLT peuvent se localiser sur les histogrammes « formule » à proximité du nuage des basophiles (Sysmex) et conduisent à s'interroger sur la dissociation entre un faible nombre de basophiles lors du décompte et un nuage apparemment important sur l'histogramme leucocytaire. Par ailleurs l'analyse sur échantillons conservés au-delà de 24 heures s'associe à une petite augmentation du nombre de basophiles.

Anomalies de la numération les éosinophiles

Outre le déficit en éosinoperoxydase qui sous-estime leur nombre (ci-dessus), des difficultés à identifier précisément les éosinophiles dans des syndromes myélodysplasiques et certaines leucémies aiguës myéloïdes ont été rapportées. Au cours du paludisme les granulocytes neutrophiles et les monocytes peuvent phagocyter du pigment malarrien (hémozoïne), dont les propriétés dépolarisantes de la lumière et des faisceaux laser sont comparables à celles des granulations éosinophiles [38]. Les leucocytes qui en contiennent sont délocalisés de leur région normale et redistribués dans une région proche de celle des éosinophiles (Abbott) [52]. Cette particularité permet de prédire avec une forte sensibilité et une forte spécificité l'existence d'une

infestation paludéenne : des alarmes particulières sont générées sur certains automates récents (Abbott) [38, 52]. Les GR parasités peuvent résister à la lyse sur le canal formule et former un nuage de points proche de celui des éosinophiles, pouvant ressembler à un dédoublement de la population éosinophile ou neutrophile (Abbott, Sysmex) (figure 6) [38, 52, 53]. Cette anomalie ne perturbe pas le décompte dans le canal de numération leucocytaire. Une conservation au-delà de 24 heures peut diminuer le nombre des éosinophiles (Horiba Argos 5 diff).

Conservation des échantillons sanguins

Elle influe de manière variable sur les résultats de la formule automatisée. Les effets du retard à l'analyse sur les résultats de la formule automatisée débutent en pratique après 24 heures sur échantillons conservés à température ordinaire ou à 4 °C, mais sont variables d'un AHC à l'autre et d'une firme à l'autre [54-56]. Par exemple les améliorations technologiques permettent que des modifications quantitatives des lymphocytes, des monocytes et des éosinophiles observés après 6-8 heures de stockage en utilisant les AHC Beckman STKS ne s'observent qu'après 1-2 jours sur les AHC Beckman GenS. Une diminution du nombre de neutrophiles avec augmentation correspondante du nombre de monocytes a été rapportée pour divers AHC quand l'analyse est réalisée au-delà de 24 heures (Sysmex NE 1500 et NE 8000, Beckman-Coulter STKS). De même, après 24 heures de conservation, une augmentation du nombre des lymphocytes est observable sur certains AHC, isolée ou associée à une petite diminution du nombre des neutrophiles et

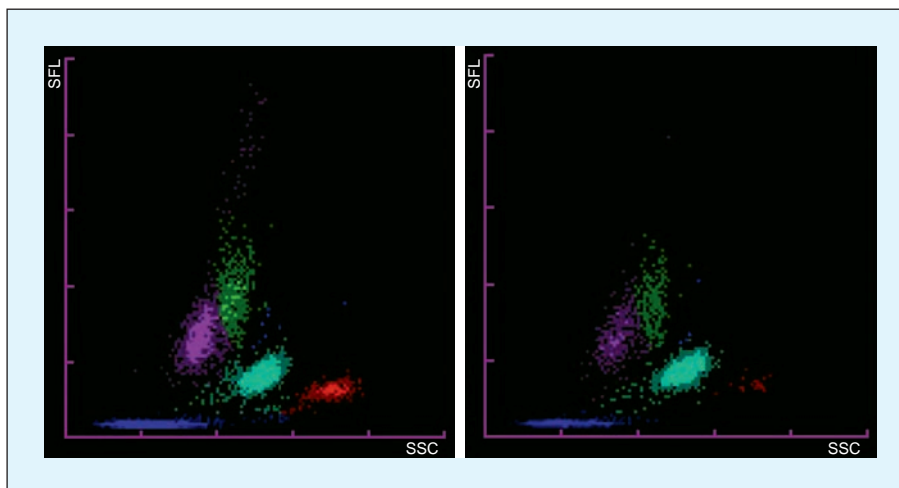


Figure 6. Altération de la formule leucocytaire au cours du paludisme (*P. vivax*). La présence de granulocytes, ou de monocytes, ou d'hématies contenant de l'hémozoïne provoque une anomalie de polarisation de la lumière, superposable à celle des granulations des éosinophiles : les éléments riches en hémozoïne se localisent donc dans la même région que les éosinophiles et sont comptés comme tels par l'automate (nuage en rouge sur l'image de gauche). L'examen du frottis sanguin ne montre aucun éosinophile. L'image de droite est celle du patient après deux jours de traitement : la pseudo éosinophilie a disparu (Sysmex XE 2100).

monocytes (Abbott CD3500, Horiba Argos 5 diff [1]. Cependant il a été rapporté récemment que le nombre des monocytes pouvait diminuer de 25 % après 1 à 2 j à température ordinaire comme à +4 °C (Sysmex XE2100 ; Beckman LH 750), alors que les mêmes échantillons voyaient leur nombre de monocytes augmenter de 30 % après 12 heures dans les mêmes conditions de conservation avec d'autres AHC (Siemens Advia 120) [56]

Conclusion

Diverses conditions préanalytiques liées aux leucocytes mais aussi à d'autres particules viennent perturber la numération des leucocytes (*tableau 1*). L'examen systématique des histogrammes biparamétriques de la formule leucocytaire est nécessaire devant toute anomalie quantitative de l'un des paramètres de la numération globale, car bon nombre de messages d'alerte sont issus de ces histogrammes. La précision des messages d'alerte vis-à-vis d'une anomalie spécifique présente une bonne sensibilité mais une spécificité modeste [47]. Le développement d'AHC réalisant simultanément la numération leucocytaire sur deux canaux différents avec des réactifs de lyse différents permet, par comparaison des résultats obtenus, de contrôler la validité des résultats obtenus et d'orienter vers le résultat convenable. La formule leucocytaire approchée à trois paramètres (LMG), proposée par divers AHC ne doit être considérée que comme un appoint : l'éventualité que la formule complète soit normale apparaît cependant comme raisonnable quand (i) la numération globale est

strictement normale et (ii) que le profil de l'histogramme LMG est normal sans aucun message d'alerte. La formule automatisée à cinq paramètres est exacte, précise et reproductible quand l'hémogramme est normal ou qu'il n'existe que des variations quantitatives d'importance moyenne. De très nombreuses situations réactionnelles et surtout de l'hématologie maligne génèrent des anomalies qualitatives des leucocytes et/ou font apparaître des cellules anormales dans le sang. Les capacités des AHC à repérer ou à énumérer les éléments inhabituels sont extrêmement variables d'un AHC à l'autre : une formation spécifique et adaptée est indispensable en la matière (stages de formation). Certaines situations (nombre absolu d'érythroblastes, quantification de la myélémie) sont relativement bien codifiées et les résultats peuvent être utilisés aujourd'hui en pratique quotidienne, si l'on a connaissance de la pathologie probable du patient concerné. Sauf cas très précis, quand un histogramme de formule leucocytaire est anormal une démarche est nécessaire de la part du technicien (démarche technique, sans ou avec examen du frottis sanguin) et/ou du biologiste responsable (démarche biologique). Il serait imprudent de considérer que l'AHC fournit par principe et systématiquement le bon résultat d'analyse [57] (*tableau 2*).

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. Bain BJ. *Blood cells : a practical guide*. Oxford : Blackwell Pub, 2006.
2. Lesesve JF, Haristoy Y, Thouvenin M, Latger-Cannard V, Buisine J, Lecompte T. Pseudoleucopénie par leuco-agglutination *in vitro* des polynucléaires neutrophiles : expérience d'un laboratoire, revue de la littérature et conduite proposée. *Ann Biol Clin* 2000 ; 58 : 417-24.
3. Imbing FD Jr, Adegboyega PA, McLucas E, Elghetany T. EDTA-associated leukoagglutination. *Am J Clin Pathol* 1996 ; 105 : 133-4.
4. Schinella M, Kojikara P, Curci V. Prevention of polymorphonuclear leukocyte agglutination *in vitro*. *Haematologica* 1995 ; 80 : 196-7.
5. Carr ME, Whitehead J, Carlson P, Todd W, Orcutt J, Wallace H. Case report : immunoglobulin M-mediated, temperature-dependent neutrophil agglutination as a cause of pseudoneutropenia. *Am J Med Sci* 1996 ; 311 : 92-5.
6. Vinatier I, Capiod JC, Sassier P, Roussel B, Delobel J. Four cases of spuriously low WBC count due to *in vitro* leukocyte agglutination : contribution of the hematology analyzer Coulter STKS in detecting this clinically misleading artefact. *Pathol Biol* 1994 ; 42 : 775-80.
7. Deol I, Hernandez A, Pierre RV. Ethylenediamine tetraacetic acid-associated leukoagglutination. *Am J Clin Pathol* 1995 ; 103 : 338-40.
8. Bizzaro N. Granulocyte aggregation is edetic acid and temperature dependent. *Arch Pathol Lab Med* 1993 ; 117 : 528-30.
9. Galifi M, Schinella M, Nicoli M, Lippi G. Instrumental reports and effect of anticoagulants in a case of neutrophil agglutination *in vitro*. *Haematologica* 1993 ; 78 : 364-70.
10. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M, Lippi G. Assessment of neutrophil aggregation by Coulter STKR and STKS haematological analysers. *Clin Lab Haematol* 1994 ; 16 : 43-55.
11. Jacob HS, Craddock PR, Hammerschmidt DE, Moldow CF. Complement-induced granulocyte aggregation. An unsuspected mechanism of disease. *N Engl J Med* 1980 ; 302 : 789-94.
12. Lesesve JF, Haristoy X, Fisher B, Goupil JJ, Lecompte T. Agglutination *in vitro* EDTA-dépendante des lymphocytes. *Ann Biol Clin* 2001 ; 59 : 497-501.
13. Lesesve JF, Fediuk T, Merseille JM, Braun F. EDTA-dependent lymphoagglutination in a patient with non-Hodgkin lymphoma. *Int J Lab Hematol* 2007 ; 29 : 221-4.
14. Bizzaro N, Piazza I. Lymphocytic clusters in peripheral blood : an atypical morphologic pattern of chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1991 ; 86 : 209-11.
15. Juneja S, Wolf M, McLennan R. Clumping of lymphoma cells in peripheral blood induced by EDTA. *J Clin Pathol* 1992 ; 45 : 538-40.
16. Imbing F Jr, Kumar D, Kumar S, Yuoh G, Gardner F. Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes. *J Clin Pathol* 1995 ; 48 : 584-7.
17. Shelton JB Jr, Frank IN. Splenic B cell lymphoma with lymphocyte clusters in peripheral blood smears. *J Clin Pathol* 2000 ; 53 : 228-30.
18. Deol I, Hernandez A, Pierre RV. Ethylenediamine tetraacetic acid-associated leukoagglutination (comments). *Am J Clin Pathol* 1996 ; 105 : 133-4.
19. Savage RA. Analytic inaccuracy resulting from hematology specimen characteristics. Three cases of misleading artefacts affecting white blood cell and platelet counts. *Am J Clin Pathol* 1989 ; 92 : 295-9.
20. 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.
21. Savage RA. Pseudoleukocytosis due to EDTA-induced platelet clumping. *Am J Clin Pathol* 1984 ; 81 : 317-22.
22. Payne BA, Pierre RV. Pseudothrombocytopenia : a laboratory artifact with potentially serious consequences. *Mayo Clin Proc* 1984 ; 59 : 123-5.
23. Lombarts AJPF, de Kieviet W. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleucocytosis. *Am J Clin Pathol* 1988 ; 89 : 634-9.
24. Schrezenmeier H, Muller H, Gunsilius E, Heimpel H, Seifried E. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb Haemost* 1995 ; 73 : 506-13.
25. Kim YR, Yee M, Metha S, Chupp V, Kendall R, Scott CS. Simultaneous differentiation and quantification of erythroblasts and white blood cells on a high throughput clinical haematology analyser. *Clin Lab Haematol* 1998 ; 20 : 21-9.
26. Wang FS, Itose Y, Tsuji T, Hamagushi Y, Hirai K, Sakata T. Development and clinical application of nucleated red blood cell counting and staging on the automated haematology analyser XE-2100. *Clin Lab Haematol* 2003 ; 25 : 17-23.
27. Cornbleet J. Spurious results from automated hematology cell counters. *Lab Med* 1983 ; 14 : 501-14.
28. Booth F, Mead SV. Resistance to lysis of erythrocytes containing haemoglobin C detected in a differential white cell counting system. *J Clin Pathol* 1983 ; 36 : 816-8.
29. Griswold DJ, Champagne VD. Evaluation of the Coulter S plus IV three part differential in an acute care hospital. *Am J Clin Pathol* 1985 ; 84 : 49-57.
30. Elghetany MT, Hudnall SD. Spurious automated white cell count with Coulter STKS in the myelodysplastic syndromes suggests the presence of a red cell membrane defect. *Am J Hematol* 1996 ; 52 : 69.
31. Emori HW, Bluestone R, Goldsberg LS. Pseudo-leukocytosis associated with cryoglobulinemia. *Am J Clin Pathol* 1973 ; 59 : 202-4.
32. 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.
33. Zandecki M, Dupriez B, Fenaux P, Jude B, Watel A, Dracon M, et al. Cytological and ultrastructural assessment of free crystals or precipitates associated with pseudoleukocytosis and pseudothrombocytosis in cryoglobulinemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1989 ; 31 : 397-402.
34. Corberand JX, Laharrague PF, Fillola G, Charlet JP, Cambus JP. Discovery of unsuspected pathological states using a new haematology analyser. *Med Lab Sci* 1991 ; 48 : 80-3.
35. Lesesve JF, Khalifa MA, Denoyes R, Braun F. Peripheral blood candidosis infection leading to spurious platelet and white blood cell counts. *Int Jnl Lab Hem* 2008 ; May 21 [Epub ahead of print].
36. Marshall Ban Theil KS, Brandt JT. Abnormalities of leukocyte histograms resulting from microorganisms. *Am J Clin Pathol* 1990 ; 93 : 526-32.

37. Kim HR, Park BR, LeeMK. Effects of bacteria and yeast on WBC counting in three automated hematology counters. *Ann Hematol* 2008 ; 87 : 557-62.
38. Hänscheid T, Egan T, Grobusch M. Haemozoin : from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infect Dis* 2007 ; 7 : 675-85.
39. Whiteway AJ, Bain BJ. Artefactual elevation of an automated white cell count following femoral vein puncture. *Clin Lab Haematol* 1999 ; 21 : 65-8.
40. 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.
41. Richardson-Jones A, Hellman R, Twedt D. The Coulter Counter leukocyte differential. *Blood Cells* 1985 ; 11 : 203-40.
42. Cornbleet J, Kessinger S. Evaluation of Coulter S-Plus three-part differential in population with a high prevalence of abnormalities. *Am J Clin Pathol* 1985 ; 84 : 620-6.
43. Nauseef WM. Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *J Mol Med* 1998 ; 76 : 661-8.
44. Kutter D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency : population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *J Mol Med* 1998 ; 76 : 669-75.
45. Grimaldi E, Carandente P, Scopacasa F, Romano MF, Pellegrino M, Bisogni R, et al. Evaluation of the monocyte counting by two automated haematology analysers compared with flow cytometry. *Clin Lab Haematol* 2005 ; 27 : 91-7.
46. Kang SH, Kim HK, HamCK, Lee Ds, Cho HI. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int Jnl Lab Hem* 2008 ; 30 : 480-6
47. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts. State of the art. *Am J Clin Pathol* 2008 ; 130 : 104-16.
48. Briggs C, daCosta A, Freeman L, Aucamp I, Ngubeni B, Machin SJ. Development of an automated malaria discriminant factor using VCS technology. *Am J Clin Pathol* 2006 ; 126 : 691-8.
49. Ducrest S, Meier F, Tschopp C, Pavlovic R, Dahinden CA. Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers. *Allergy* 2005 ; 60 : 1446-50.
50. Hur M, Lee YK, Lee KM, Kim HJ, Cho HI. Pseudobasophilia as an erroneous white blood cell differential count with a discrepancy between automated cell counters : report of two cases. *Clin Lab Haematol* 2004 ; 26 : 287-90.
51. Lesesve JF, Benbih M, Lecompte T. Accurate basophils counting : not an easy goal ! *Clin Lab Haematol* 2005 ; 27 : 143-4.
52. Scott CS, Van Zyl D, Ho E, Meyersfeld D, Ruivo L, Mendelow BV, et al. Automated detection of malaria-associated intraleukocytic haemozoin by Cell Dyn 4000 depolarization analysis. *Clin Lab Haematol* 2003 ; 25 : 77-86.
53. HuH HJ, Oh GY, Huh JW, Cahe SL. Malaria detection with the Sysmex XE-2100 hematology analyzer using pseudo eosinophilia and abnormal WBC scattergram. *Ann Hematol* 2008 ; 87 : 755-9.
54. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med* 2002 ; 126 : 336-42.
55. Lippi G, Salvagno GL, Solero GP, Franchini M, Guidi GS. Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia 120 hematologic analyzer. *J Lab Clin Med* 2005 ; 146 : 333-40.
56. Imeri F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M, Risch GM, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyzer used : a stability study with bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica Chimica Acta* 2008 ; 397 : 68-71.
57. 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.