

Évaluation de la morphologie érythrocytaire avec le RBC Advanced : Quels seuils pour quelles anomalies ?

Evaluation of blood cell morphology with the RBC Advanced Application: Which cut-offs are most needed for which specific abnormalities?

Rhita Bennis¹
Francois Mullier²
Pascale Saussoy¹

¹ Laboratory of Haematology,
Université Catholique de Louvain,
10 avenue de Hippocrate,
Bruxelles 1200, Belgique

² Laboratoire d'hématologie, CHU
UCL Namur, Université Catholique
de Louvain, Belgique

Résumé. La reconnaissance des anomalies morphologiques érythrocytaires est un élément clé et parfois méconnu, pouvant orienter le diagnostic étiologique des anémies. Le but de cet article est d'évaluer la performance clinique des différents seuils de détection étudiés par notre laboratoire à l'aide du module CellaVision® RBC Advanced, après reclassification manuelle par des opérateurs expérimentés, en les comparant aux recommandations émises par l'ICSH (International Council for Standardization in Haematology). Nous avons établi arbitrairement des seuils à 1 % pour les anomalies « critiques » (dacryocytes, cellules cibles, schizocytes et sphérocytes) sauf pour les drépanocytes (seuil fixé à 0,01 %). Nos données montrent une excellente sensibilité de 100 % pour les cut-offs définis par l'étude pour les dacryocytes et les drépanocytes, mais une faible spécificité pour la détection des pathologies cliniques associées en comparaison avec les seuils de l'ICSH, allant de 4 % pour les dacryocytes (détection de myélofibrose), 26 % pour les cellules cibles (détection de carence martiale), jusqu'à 55 % pour les schizocytes (présence d'anémie hémolytique). Nos résultats montrent une meilleure spécificité des seuils établis par l'ICSH comparativement aux seuils étudiés pour la détection des pathologies d'intérêt, suggérant une meilleure pertinence clinique des résultats rendus.

Mots-clés : anomalies morphologiques érythrocytaires, module RBC Advanced, Biologie clinique, Cellavision DM9600, gradation, morphologie des globules rouges, hématologie, standardisation

Abstract. The detection of erythrocyte morphological abnormalities is a valuable and sometimes overlooked element in the diagnostic management of anemias. The aim of this article is to evaluate the clinical performance of the different detection thresholds tested by our laboratory using the Cellavision RBC Advanced module, after manual reclassification by an experienced operator, and comparing them to the guidelines by the ICSH (International Council for Standardization in Haematology). We arbitrarily set thresholds at 1% for "critical" abnormalities (tear drop cells, target cells, schizocytes and spherocytes) except for sickle cells (threshold set at 0.01%). Our data show excellent sensitivity of 100% for the cut-offs defined by the investigation for tear drop cells and sickle cells, but low specificity for detection of associated clinical pathology compared with ICSH cut-offs, varying from 4% for teardrop cells (detection of myelofibrosis), 26% for target cells (detection of martial deficiency) to 55% for schizocytes

Article reçu le 31 juillet 2023,
accepté le 28 août 2023

Correspondence : R. Bennis
<rhita.bennis@student.uclouvain.be>

(presence of hemolytic anemia). Our results show a better specificity of the thresholds established by ICSH than our studied thresholds for the detection of the pathologies of concern, suggesting a better clinical relevance.

Key words: erythrocyte morphological abnormalities, Advanced RBC Application, clinical Biology, Cellavision DM9600, grading system, red blood cell morphology, haematology, standardization

Introduction et objectifs

Les méthodes de description et de gradation des anomalies de la morphologie érythrocytaire (RBC-M) ont longtemps été peu standardisées entre les différents laboratoires. Selon les différentes sources, les seuils retenus pour classer les différentes fractions comme normales, modérées ou sévères peuvent varier. Nous pouvons relever l'exemple des ovalocytes comme légers (2-5 %), modérés (6-15 %) and marqués (> 16 %) alors que d'autres références indiquent un seuil d'anomalie (+) > 5 %, (++) > 10 %, (+++) > 25 %, (+++++) > 50 % [2]. C'est pourquoi le comité international de standardisation en hématologie, l'ICSH, a fourni un effort de consensus ayant permis la rédaction de recommandations internationales [3] : « *ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphology* ».

Le manque de standardisation inter- ou intra-laboratoires peut entraîner des confusions chez le clinicien mais aussi pour le suivi des différentes anomalies, ayant potentiellement un impact clinique. Certaines des anomalies des globules rouges (*tableau 1*) sont en effet spécifiques à des désordres pathologiques (dacryocytes ou « *tear drop cells* » associés à la myélofibrose, corps de Jolly en présence de splénectomie ou asplénie fonctionnelle, drépanocytes en cas de drépanocytose...). Peu d'articles se sont intéressés à l'évaluation interne au sein des laboratoires des seuils de détection

et de classification des différentes anomalies des globules rouges, sauf pour les schizocytes. Parmi eux, nous pouvons citer l'article de M. Criel *et al.* où les auteurs ont comparé les performances du RBC Advanced software® sur le CellaVision® DM96 pour la détection des anomalies des globules rouges.

Notre article s'intéresse à l'évaluation clinique de différents seuils testés en routine pour la détection des anomalies morphologiques critiques suivantes (les dacryocytes, les cellules cibles, les schizocytes, les sphérocytes, et les drépanocytes) pour détecter respectivement les pathologies hématologiques suivantes (la myélofibrose, la thalassémie ou les carences martiales sévères, les anémies hémolytiques, la sphérocytose héréditaire, et la drépanocytose). Grâce à l'automatisation de l'analyse morphologique érythrocytaire proposée par l'outil RBC Advanced Sysmex®, notre but est de standardiser les résultats inter-utilisateurs de la classification des globules rouges et d'évaluer la pertinence clinique des différents seuils testés. Comme le rappelle les recommandations du groupe francophone d'hématologie cellulaire (GHFC), l'examen du frottis sanguin reste indispensable lorsque les données fournies par les analyseurs automatisés réalisant les hémogrammes présentent des données qualitativement ou quantitativement anormales, et ce, malgré leur perfectionnement au fil des dernières années [4]. Par exemple, pour le comptage des schizocytes, pendant de nombreuses années, les résultats variaient fortement selon les laboratoires, avec

Tableau 1. Définitions des principales anomalies des globules rouges.

Dacryocytes (<i>tear drop cells</i>)	Globules rouges en forme de larmes. On les retrouve de manière pathologique en cas de myélofibrose, de thalassémie ou d'hématopoïèse extra-médullaire.
Cellules cibles (<i>target cells</i>)	Érythrocyte rond avec coloration rouge centrale, dense en hémoglobine, associé à une augmentation de la surface membranaire (post-splénectomie, affections hépatiques...) ou à une diminution de l'hémoglobine (hémoglobinopathies, thalassémie, carence martiale).
Schizocytes	Fragments érythrocytaires causés par des dommages extrinsèques, ce sont des éléments diagnostiques des anémies liées aux microangiopathies thrombotiques. Les schizocytes sont toujours plus petits que les GR intacts. Cf. Recommandations liées à la gradation et comptage schizocytes.
Drépanocytes (<i>sickle cells</i>)	GR déformé en faucilles suite à une polymérisation de l'hémoglobine HbS chez les patients drépanocytaires. Une électrophorèse de l'hémoglobine peut être recommandée en cas de dépistage.
Sphérocytes	GR de petit diamètre, de forme sphéroïdale en l'absence de pâleur centrale. Ils peuvent être le produit d'un défaut du cytosquelette, de la membrane globulaire ou d'une hémolyse immunologique ou associée à une microangiopathie. Ils peuvent également être retrouvé en cas de lésion directe des membranes cellulaires.

un résultat sous forme d'évaluation générale ou sous forme de comptage précis. Par ailleurs, ce comptage peut varier selon de nombreux facteurs (zone de la lame lue, le nombre de globules rouges étudiés et l'utilisation d'aides techniques à la lecture). Ce travail découle de efforts de standardisation des pratiques en hématologie, et a pour but d'étudier nos données de routine au sein d'un centre d'hématologie universitaire pour faciliter la mise en évidence des anomalies morphologiques érythrocytaires importantes à l'aide de l'outil de microscopie digitale RBC Advanced proposé par Sysmex®, tout en rationalisant l'activité technique et biologique, afin de mieux prendre en charge les patients tout en répondant aux contraintes médico-économiques et en orientant correctement les prescripteurs.

Méthode

Nous avons étudié l'ensemble des prélèvements sanguins analysés pour les paramètres de l'hémogramme sur notre automate EPU Sysmex® sur une durée de trois mois (42 665 échantillons). Parmi eux, 5 110 frottis sanguins ont été réalisés avec analyse automatisée des globules blancs et passage en revue des anomalies rouges ainsi que 406 lames uniquement pour étudier les globules rouges à l'aide du CellaVision® et du module RBC Advanced Sysmex®.

Voici les critères distincts définis de l'EPU Sysmex® paramétrés dans notre centre entraînant la réalisation d'un frottis pour vérifier la morphologie des globules rouges, lors de l'analyse de la formule sanguine :

- présence de fragments d'érythrocytes > 1 % ;
- double population ou anisocytose : RDW-CV > 22 % en alarme ;
- hémoglobine basse : < 8 g/dL chez les adultes ou < 9 g/dL chez les enfants en situation initiale ou suivi ;
- présence de globules rouges nucléés : NRBC ≥ à 1 % en situation initiale ou suivi.
- macrocytose : > 105 fl chez les adultes, > 85 entre 6mois et 2 ans, > 95 entre 2 ans et 15 ans ;
- réticulocytose : réticulocytes > 120 000/μL sans alarme RET abnormal scattergram (figure 1).

Nous avons relevé le pourcentage des différentes alarmes sur les lames RBC réalisées selon ces critères : dans 60 % des cas l'alarme fragments érythrocytaires > 1 % avait été déclenchée, dans 24 % cela était dû à la réticulocytose, dans 14 % à la présence de populations dimorphiques ou anisocytose, dans 5 % des cas à la présence de globules rouges nucléés, et dans 2 % des cas à une hémoglobine basse selon les critères mentionnés (figure 1) Ces recommandations ont été

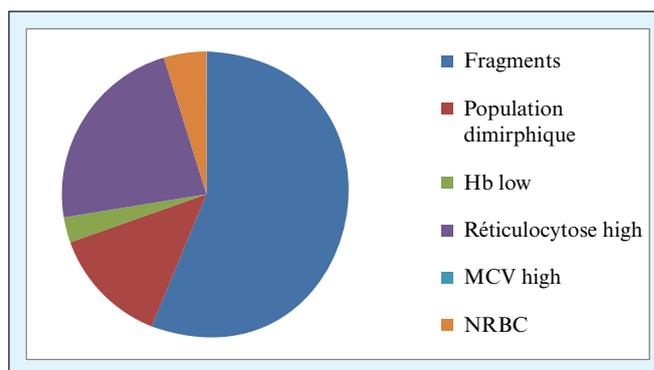


Figure 1. Pourcentage des alarmes déclenchées sur les lames RBC selon les critères définis de l'EPU Sysmex® durant la période de l'étude.

établies en intégrant les recommandations de Sysmex® et du GFHC, qui permettent de réduire efficacement le taux de révision des lames et d'améliorer les délais d'attente pour les cliniciens, tout en restant vigilants afin de ne pas rater des anomalies qualitatives ou quantitatives de l'hémogramme, grâce aux critères automatisés établis et aux recommandations d'experts [17-19]. Par la suite, nous avons étudié les anomalies morphologiques observées dans les catégories critiques sélectionnées caractéristiques de certaines pathologies (dacryocytes, cellules cibles, schizocytes, sphérocytes, drépanocytes) (figure 2) en étudiant la sensibilité et la spécificité clinique des seuils utilisés pour ces anomalies morphologiques des globules rouges afin de détecter les pathologies caractéristiques associées, à partir des hémogrammes de routine ayant engendré une analyse morphologique des globules rouges. La morphologie érythrocytaire a été étudiée à l'aide du module RBC Advanced Sysmex®, outil de microscopie digitale. Les lames ont été lues quotidiennement par un technologue cytologiste expert au sein d'une équipe de quatre technologues cytologistes expérimentés, Le pré-classement proposé par le module a toujours été adapté après vérification visuelle, en se basant sur des seuils bas arbitrairement fixés pour les cinq catégories critiques. La sensibilité et la spécificité ont été évaluées de manière rétrospective en comparant les anomalies des globules reportées pour les cinq catégories et le nombre de personnes présentant les pathologies associées, en retraçant l'histoire clinique et les autres analyses des patients. Nous avons recherché le nombre de patients présentant une myélofibrose en cas de présence de dacryocytes, l'association d'une thalassémie ou d'une carence martiale avec la détection de cellules cibles, la présence d'anémie hémolytique en cas de schizocytes ou encore de drépanocytose en cas de drépanocytes rapportés, ou encore

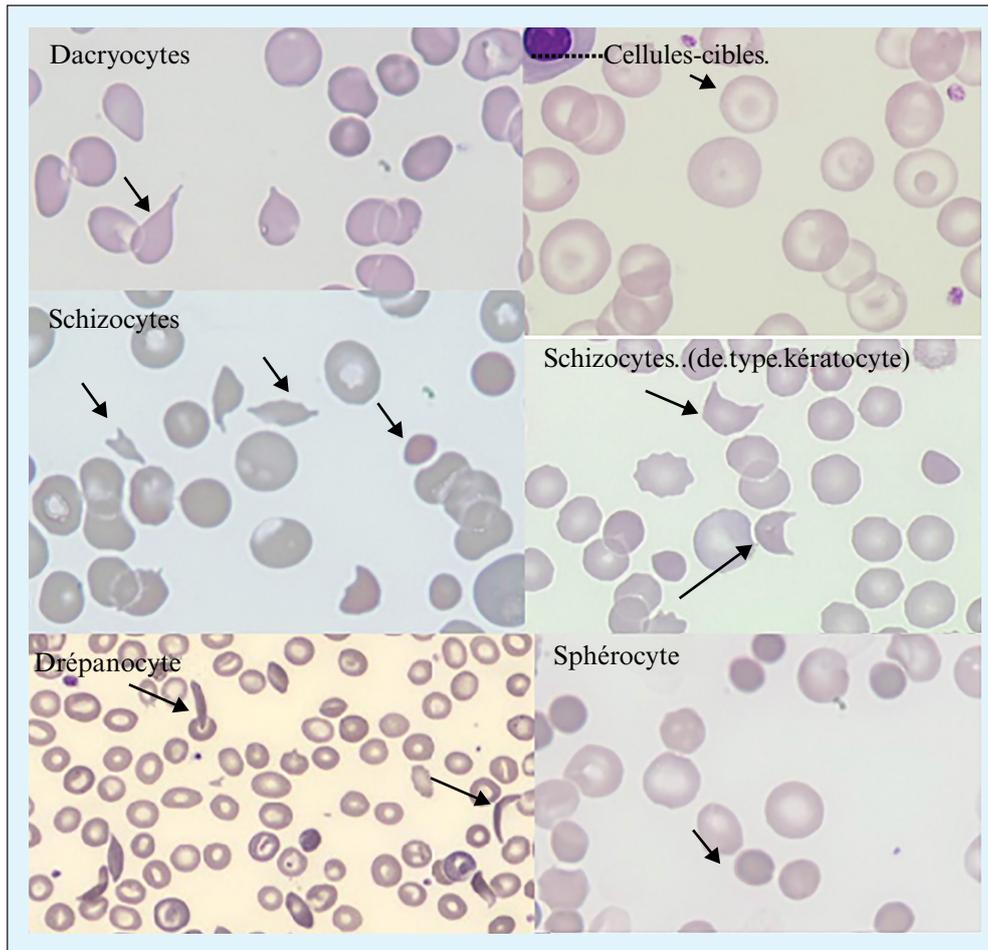


Figure 2. Anomalies morphologiques « critiques » des érythrocytes.

le nombre de patients pour lesquels des sphérocytes ont été détectés avec analyse de leur contexte clinique. Les cut-off définis ont été définis à 1 % pour les anomalies « critiques » (dacryocytes, cellules cibles, schizocytes, sphérocytes) sauf pour les drépanocytes où le seuil a été fixé à 0,1 %. Les schizocytes évalués par microscopie digitale sur l'outil du Cellavision® ont été identifiés conformément aux recommandations de l'ICSH [3]. Le nombre de globules rouges analysés sur le frottis sanguin par microscopie digitale est d'environ 2 000. Les seuils choisis pour l'étude sont volontairement bas, et sont proches de seuils cliniques établis par M. Criel *et al.* dans leur analyse des performances du module RBC Advanced®, calculés comme les plus petits seuils de détection présentant une sensibilité ≥ 80 % pour les anomalies « critiques » [1]. Nous avons ensuite comparé les cut-off arbitraires étudiés aux seuils établis dans la littérature scientifique, en particulier aux recommandations émises par l'ICSH (International Council for

Standardization in Haematology) [1-3]. Pour ces anomalies critiques, il est important de maintenir une bonne sensibilité pour détecter les pathologies associées, contrairement aux autres anomalies érythrocytaires moins spécifiques, moins significatives si elles sont retrouvées à de faibles pourcentages. C'est pourquoi notre étude s'est basée sur des seuils bas (1 %) pour les anomalies considérées comme critiques, afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité de ce seuil pour détecter les principales pathologies associées à ces anomalies morphologiques (la myélofibrose, la thalassémie, les carences martiales, les anémies hémolytiques, la drépanocytose et la sphérocytose).

De manière globale, il est important d'inclure des commentaires en cas d'anomalie significative, et de ne reporter que les anomalies pertinentes. Certains articles montrent la difficulté pour de nombreux cliniciens pour l'interprétation et l'intérêt des anomalies des globules rouges rapportées [10].

L'avantage fourni par DM96 Cellavision® est le passage en revue rapide et standardisé des frottis sanguins, pour analyser la morphologie cellulaire des cellules sanguines grâce aux outils de microscopie digitale. Le CellaVision® Advanced RBC Software est un module intégré permettant l'analyse de la morphologie érythrocytaire, grâce à une reconnaissance et un pré-classement des globules rouges selon leurs caractéristiques principales, prenant en compte les paramètres de taille (anisocytose, microcytose, macrocytose), de contenu (hypochromie, polychromie), de forme (21 catégories morphologiques dont poikilocytose, cellules cibles, schizocytes, drépanocytes, sphérocytes, elliptocytes, ovalocytes ou dacryocytes...) ainsi que les inclusions cytoplasmiques (Ponctuations basophiles, Corps de Jolly, parasites et corps de Pappenheimer). L'automate permet également une reclassification manuelle des anomalies des globules rouges par l'opérateur. Cet outil peut être utilisé pour favoriser la standardisation des résultats inter-opérateurs.

Pour obtenir les données analysées dans cet article, nous avons étudié l'ensemble des analyses morphologiques des globules rouges réalisées sur le Cellavision®, pour lesquels des anomalies érythrocytaires critiques, ont été mises en évidence selon les seuils établis et confirmées par lecture technique par un opérateur expérimenté, dans les conditions de l'étude. Pour chaque frottis sanguin pathologique où une des cinq anomalies avait été répondue au-dessus des seuils de détection définis, nous avons recherché les contextes cliniques des patients à l'aide des dossiers médicaux informatiques. Pour tous les frottis sanguins où > 1 % de dacryocytes ont été détectés, nous avons identifié les patients avec une myélofibrose connue, confirmées par la clinique, l'examen médullaire et la biologie moléculaire. Pour les frottis sanguins où un taux > 1 % de cellules cibles ont été répondus, nous avons identifié les patients pour lesquels une carence en fer ou une thalassémie étaient connus. Les patients carencés en fer ont été identifiés sur base d'une ferritine < 13 µg/L ou un coefficient de saturation de la transferrine < 20 %. Les patients atteints d'une thalassémie ou d'une autre hémoglobinopathie ont été identifiés sur base d'une électrophorèse de l'hémoglobine et d'une confirmation par génétique moléculaire. De même, sur l'ensemble des frottis sanguins analysés à l'aide du module RBC Advanced du Cellavision®, pour lesquels plus d'1 % de schizocytes avait été répondu, nous avons identifié les patients atteints d'anémie hémolytique, sur base de plusieurs critères (contexte clinique, présence d'une anémie, un effondrement de l'haptoglobine

< 0,10 g/L et une augmentation des LDH > 250 UI/L). Concernant l'évaluation des frottis sanguins pour lesquels des sphérocytes avaient été détectés au-delà du même seuil pathologique utilisé (1 %), nous avons analysé le contexte clinique de chacun des patients et recherché la présence d'une sphérocytose héréditaire (confirmée biologiquement par le test à l'éosine 5'maléimide-EMA, l'ektacytométrie et la biologie moléculaire). Enfin, pour tous les patients où des drépanocytes étaient présents sur les frottis sanguins analysés (au-delà du seuil pathologique de 0.01 %), nous avons identifié les patients drépanocytaires connus sur base de leur dossier médical (diagnostic confirmé par biologie moléculaire chez des patients homozygotes SS pour le gène de l'hémoglobine).

Résultats et discussion (tableaux 2, 3)

Résultats

Dacryocytes

Les résultats montrent une sensibilité de 100 % pour (+), 43 % pour ≥ (++) et 29 % pour ≥ (+++). Pour la détermination de la spécificité : 488 des frottis sanguins ont été analysés avec le module RBC Advanced confirmant la présence de dacryocytes après révision par l'opérateur. Parmi ces frottis, 396 présentait (+) de dacryocytes, 80 (++) et 11 (+++) de dacryocytes. Pour la détection d'une myélofibrose, les résultats montrent une spécificité de 4 % pour (+) de dacryocytes, 13 % pour (++) et 64 % pour (+++) de dacryocytes. Nous avons également recherché la présence de dacryocytes dans d'autres maladies hématologiques, afin d'évaluer si de faibles taux de dacryocytes étaient retrouvés de manière non aspécifique dans d'autres pathologies hématologiques perturbant l'érythropoïèse. Chez les patients atteints de pathologies hématologiques, 79 % montraient (+) de dacryocytes, 60 % (++) de dacryocytes et 82 % (+++) de dacryocytes.

Cellules cibles

La sensibilité n'a pas pu être évaluée en raison du faible nombre d'échantillons issus de patients atteints hémoglobinopathies lors de la période analysée. Nous nous sommes donc référés à la littérature pour l'analyse des seuils. Criel *et al.* ont établi un cut-off clinique de 1,6 % correspondant à une sensibilité de 80 % et une spécificité de 100 % quant à la présence de l'anomalie érythrocytaire confirmée par la technique gold standard (microscopie manuelle avec expertise) [3]. Pour rappel, la présence de cellules cibles est classiquement associé à

Tableau 2. Nombres d'échantillons positifs par anomalie morphologique critique et pathologies associées.

Nombre d'échantillons positifs par catégorie par microscopie digitale	Maladies hématologiques*		Myélofibrose	Drépanocytose	Thalassémies	Pédiatrie**	Dialyse	Cardiologie
Dacryocytes(+)	396	315	17	16	5	63	9	21
(++)	80	48	10	1	2	11	3	1
(+++)	11	9	7	0	0	0	2	0
Cellules cibles (+)	84	38	5	6	9	18	1	4
(++)	18	4	0	4	7	6	1	4
(+++)	2	2	0	0	2	0	0	1
Schizocytes (+)	160	88	10	6	3	19	2	8
(++)	53	27	5	7	4	14	1	3
(+++)	16	10	0	0	4	2	0	3
Sphérocytes (+)	21	4	0	0	1	13	1	3
(++)	2	0	0	0	0	2	0	0

*Inclut des patients atteints de syndromes myéloprolifératifs, syndromes myélodysplasiques, Lymphomes B, Myélomes et leucémies aiguës.

**Inclut la néonatalogie, les soins intensifs pédiatriques, le centre d'hématologie pédiatrique et la pédiatrie générale.

Tableau 3. Seuils testés en routine pour la détection des anomalies morphologiques « critiques » des globules rouges.

	(+)	(++)	(+++)
Dacryocytes	1	2	5
Cellules cibles	1	2	5
Schizocytes	1	2	5
Sphérocytes	1	5	20
Drépanocytes	0,01	3	10

une carence en fer sévère, un trait thalassémique ainsi qu'à certaines hémoglobinopathies telles que l'hémoglobinoses C et l'hémoglobinoses E, d'où leur intérêt comme catégorie érythrocytaire « critique ».

Pour étudier la spécificité des cellules cibles, 104 frottis sanguins ont été analysés à l'aide du module RBC Advanced pour rechercher la présence de cellules cibles. 84 montraient (+) de cellules cibles ; 18 (++) et 2 (+++) de cellules cibles. Pour la détection d'une anémie microcytaire, la spécificité est de 88 % pour (+), 94% pour (++) et 100 % pour (+++) de cellules cibles. Plus précisément, la spécificité de la détection d'une carence martiale est de 26 % pour (+), 33% pour (++) et 0 % pour (+++) de cellules cibles (sous réserve du faible nombre d'échantillons analysés). Quant à la détection d'une thalassémie, la spécificité était de 10 % pour (+), 39 % pour (++) et 100 % pour (+++) de cellules cibles.

Parmi les patients avec (+) de cellules cibles, 6 sont atteints de drépanocytose et 8 de thalassémie. Parmi les patients avec (++) de cellules cibles, 1 patient présente une drépanocytose avec un syndrome thalassémique. Sur l'ensemble des échantillons analysés où des cellules cibles ont été identifiés, nous retrouvons peu de prélèvements pédiatriques : 6 sur 104 frottis sont ceux d'enfants

dont l'âge est compris entre 1 et 6 ans, et ils présentent quasi tous une anémie microcytaire. Les résultats obtenus montrent également que plus les seuils de cellules cibles sont élevés, plus la spécificité augmente pour la détection d'une anémie microcytaire ou d'une thalassémie. Cette corrélation n'est pas retrouvée pour les carences martiales.

Schizocytes

Sur la période de trois mois étudiée, 229 frottis sanguins montraient la présence de schizocytes, dont 53 (++) soit un seuil supérieur à 2 %, et 16 frottis sanguins (+++) soit un seuil ici supérieur à 5 %.

La sensibilité n'a pas été évaluée directement, nous nous sommes référés aux seuils présents dans la littérature, rapportés dans la discussion [15].

Pour la détection d'une anémie hémolytique, l'évaluation des résultats montre une spécificité de 55 % (29/53) chez les patients présentant (++) soit > 2 % de schizocytes, et une spécificité de 38 % (6/16) chez les patients présentant (+++) soit > 5 % de schizocytes. À noter que pour les 16 patients présentant plus de 5 % de schizocytes, 10 étaient atteints par une pathologie hématologique (thalassémie, anémie ou myélodysplasie), et 2 étaient sous traitement oncologique.

Sphérocytes

Nous n'avons pas pu étudier la sensibilité ni la spécificité de la détection des sphérocytes dans le cadre de cette étude. Sur les 457 lames de frottis sanguins analysées par le module RBC advanced, 21 frottis présentaient (+) de sphérocytes soit un seuil de 1 %, et 2 frottis montraient (++) de sphérocytes soit > 5 %. Aucun

de ces patients n'était connu pour une sphérocytose héréditaire. À noter que 12 des 23 patients étaient des enfants de moins d'un an d'âge.

Drépanocytes

Les patients drépanocytaires étudiés ont été identifiés sur base de leur dossier médical, avec une confirmation du diagnostic par biologie moléculaire (patients homozygotes SS). Parmi les 41 patients drépanocytaires dont les frottis sanguins ont été évalués par microscopie digitale durant la période analysée, 100 % (41/41) présentaient au moins 0,01 % de drépanocytes (+), 46% (19/41) > 3 % de drépanocytes (++), et seulement 13 % (5/41) > 10 % de drépanocytes. La spécificité n'a pas été évaluée. Pour comparaison, parmi l'ensemble des frottis sanguins où des dacryocytes avaient été répondus, 10/457 présentaient des drépanocytes (> 0,01 %), dont 9/10 étaient des patients drépanocytaires connus, et 1 seul patient seulement était hospitalisé au centre d'hématologie pédiatrique pour une leucémie lymphoïde aigüe, et pour lequel (+) de drépanocytes avait été répondu.

Discussion

Pour les dacryocytes, le seuil fixé à 1 % a montré une excellente sensibilité (100 %) mais une faible spécificité pour la détection de myélofibrose (4 %), contrairement au seuil de 5 % montrant une moins bonne sensibilité (29 %), mais une bien meilleure spécificité pathologique (64 %). Cette limite inférieure à 5 % utilisé comme seuil de détection (++) à reporter selon l'ICSH semble donc pertinent pour mieux cibler les patients suspects de myélofibrose. La présence de dacryocytes est communément associée à une fibrose médullaire, la spécificité augmente avec l'élévation du taux de dacryocytes. Toutefois, les résultats obtenus sur ces petits échantillons montrent également qu'il ne s'agit pas d'une analyse sensible pour la détection de la myélofibrose chez les adultes. De plus, on retrouve des dacryocytes dans plusieurs autres situations telles que des carences en fer sévères ou des thalassémies, ou encore lors de processus inflammatoires ou métastatiques médullaires, en association avec d'autres anomalies morphologiques érythrocytaires. Il faut aussi rester vigilant face aux artefacts d'étalements, suggérés lorsque les cellules d'allure piriforme sont toutes orientées vers la même direction.

La présence de cellules cibles est associée à différentes situations cliniques telles que la drépanocytose ou les thalassémies avec drépanocytose. La présence de cellules cibles macrocytaire est rare, mais peut être rencontrée chez des patients avec une pathologie hépatique, post-splénectomie ou chez les enfants prématurés [3].

La présence artéfactuelle de cellules cibles peut également survenir lors de la préparation des frottis sanguins : au temps de séchage ou à l'hypercoagulation de l'échantillon sanguin. Nos échantillons confirment ces éléments. Nous sommes intéressés à la spécificité de la présence des cellules cibles pour détecter une anémie microcytaire et une thalassémie : le seuil à 1 % utilisé montre une spécificité de 88 % pour la détection d'une anémie microcytaire et de 10 % pour la détection de thalassémie. Avec un seuil de 5 %, cette spécificité passe à 100 % pour la détection d'anémie microcytaire et à 100 % pour les patients thalassémiques, sous réserve du faible nombre d'échantillons étudiés.

Pour la détection des schizocytes et le diagnostic d'anémie hémolytique, nos résultats montrent une spécificité de 55 % (29/53) chez les patients présentant > 2 % de schizocytes. La spécificité n'augmente pas avec des seuils plus haut de schizocytes après analyse des résultats obtenus. À noter que pour les 16 patients présentant plus de 5 % de schizocytes, 10 étaient atteints par une pathologie hématologique (thalassémie, anémie ou myélodysplasie), et 2 étaient sous traitement oncologique. Par ailleurs, outre les anémies liées à des microangiopathies thrombotiques, à des CIVD ou à des syndromes liés aux vascularites, une présence rare à modérée de schizocytes peut être retrouvée dans divers contextes, associés à d'autres anomalies érythrocytaires et biologiques, tels que des néoplasies, d'autres pathologies hématologiques (dont la myélofibrose), des sepsis ou d'autres anémies hémolytiques mécaniques. La préclassification du Cellavision[®] DM950 classification montre des faiblesses pour l'identification des schizocytes selon d'autres données publiées, c'est pourquoi les critères de reconnaissance morphologique publiés par l'ICSH et la lecture par un cytologiste expérimenté sont importants lors d'une recherche de schizocytes [13]. Pour les schizocytes, les valeurs de référence établies par de nombreuses études confirment l'importance d'avoir des seuils de détection bas pour les schizocytes. Celle de Lesesve *et al.* montre une valeur maximale de 0,19 % schizocytes chez 119 patients sains [12]. Les résultats obtenus sont en faveur de la robustesse de taux supérieurs à 1 % de schizocytes pour la détection d'anémie hémolytique, en l'absence d'autres éléments évoquant un diagnostic différentiel, en accord avec les recommandations de l'ICSH [15, 16]. En l'absence de schizocytes et cas de forte suspicion de MAT, la recherche de schizocytes dans le frottis sanguin doit être répétée quotidiennement [15].

Tous les patients analysés durant la période de l'étude avaient un taux de sphérocytes < 5 %. De faibles pourcentages de sphérocytes peuvent être retrouvés dans de

nombreux contextes cliniques, sans qu'ils soient associés à une sphérocytose, qui reste une maladie héréditaire rare. Ces contextes associés à la présence rare ou modérée de sphérocytes incluent les patients splénectomisés, de vieux globules rouges transfusés, la présence de pathologies hépatiques, d'anémie liées à des microangiopathies, des patients prématurés ou encore des grands brûlés [2]. La présence de sphérocytes n'est donc, en réalité, pas spécifique de sphérocytose héréditaire. Les examens de seconde intention comprennent l'examen à l'éosine 5'maléimide (EMA), l'électrophorèse des protéines de la membrane du globule rouge, l'ektacytométrie (test spécialisé), et la biologie moléculaire pour rechercher les mutations responsables de sphérocytose héréditaire. Le test à l'EMA en cytométrie en flux est utilisé en cas de suspicion diagnostique ou en cas de confirmation. L'électrophorèse des protéines de la membrane érythrocytaire permet de différencier sphérocytose héréditaire et dysérythropoïèse congénitale de type II. Des algorithmes basés sur des indices automatisés érythrocytaires et réticulocytaires fournis par les automates d'hématologie permettent également d'orienter plus facilement vers le diagnostic de sphérocytose héréditaire, et ont été testés dans plusieurs articles publiés [9, 20]. Les sphérocytes peuvent être la conséquence d'une anomalie du cytosquelette ou de la membrane érythrocytaire, d'une hémolyse immunologique, d'une micro-angiopathie thrombotique ou d'une lésion directe de la membrane cellulaire [3]. Si les sphérocytes sont présents en grand nombre en cas de sphérocytose héréditaire, ils peuvent également être absents en cas de sphérocytose héréditaire confirmée. Par ailleurs, l'aspect morphologique du frottis sanguin de patients présentant une anémie hémolytique auto-immune ou une incompatibilité fœto-maternelle peut mimer celui d'une sphérocytose héréditaire [6]. Il est recommandé de grader les sphérocytes et de se référer au contexte clinique. La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine est généralement normale en cas de sphérocytose acquise alors qu'il peut être augmenté en cas de sphérocytose héréditaire [2]. De même, en cas de sphérocytose acquise, nous retrouvons un nombre variable de sphérocytes accompagnés d'autres anomalies morphologiques érythrocytaire, notamment en cas de pyropoïkylocytose, d'anémie hémolytique auto-immune ou d'hémoglobinopathie. Quant aux drépanocytes, toutes les patients drépanocytaires dont les frottis sanguins avaient été évalués par microscopie digitale pendant la période étudiée présentaient $\geq 0,01$ % de drépanocytes, confirmant l'importance d'un seuil très bas pour assurer une détection maximale de ces patients.

Comparaison des seuils de sensibilité et de spécificité des anomalies érythrocytaires critiques

Des nombreuses études ont évalué la sensibilité et les spécificités des anomalies morphologiques érythrocytaires en comparant les résultats pré- et post-classification à l'aide du Module RBC Advanced aux résultats obtenus par microscopie optique. Certains auteurs ont utilisé des outils statistiques tels que l'analyse de personnes en bonne santé et de frottis sanguins pathologiques pour définir des courbes ROC (courbe sensibilité/spécificité),

Pour améliorer la pertinence de ces seuils, l'équipe de M. Criel ont choisi de définir des seuils cliniques ayant pour but d'augmenter la sensibilité de détection des anomalies érythrocytaires pathognomoniques de pathologies hématologiques, et d'augmenter la spécificité de l'analyse pour détecter les autres anomalies érythrocytaires. Ainsi ils ont défini des seuils cliniques en choisissant les plus petits cut-off ayant une sensibilité supérieure à 80 % pour les anomalies considérées critiques, et les plus petits cut-off ayant une spécificité supérieure à 80 % pour les anomalies non-critiques [1]. Ils définissent ainsi un cut-off à 0,5 % pour les dacryocytes (*tear drop cell*), et 1,6 % pour cellules cibles (*target cells*), avec une sensibilité respective de 89 % et de 80 %, en comparaison au gold standard (lecture sur frottis par opérateurs experts). Pour les drépanocytes, le seuil clinique était défini à 0 %, puisque toute anomalie observée et confirmée visuellement par un cytologiste expert est considérée pathologique. Ces seuils sont proches des cut-off évalués dans cette étude, et arbitrairement fixés à 1 % pour les anomalies considérées comme critiques (schizocytes, dacryocytes, cellules cibles, sphérocytes et drépanocytes). Ces seuils sont inférieurs à ceux fixés par l'ICSH sauf pour les schizocytes et les drépanocytes. Pour les sphérocytes, l'étude de M. Criel et son équipe rapporte une moins bonne détection de ces anomalies par le module RBC advanced avec l'impossibilité de fixer un seuil > 0 % pour obtenir une sensibilité ≥ 80 %. Pour un seuil de détection à 5 % des sphérocytes, d'autres études rapportent une sensibilité pré-classification de 11 % et de 33 % post-classification par le RBC advanced, en comparaison avec la microscopie manuelle [14]. Selon la même étude, le module RBC advanced montre par contre une très bonne spécificité pour la détection des sphérocytes (99,5 % en pré- et post-classification) [14]. Comme le montre notre étude, les seuils pathologiques de 5 % pour la réponse et la gradation des dacryocytes et des cellules cibles montrent une meilleure spécificité pour la détection respective de myélofibrose et des anémies microcytaires ou thalassémies, en comparaison

aux seuils à 1 %. Nos résultats concordent avec les recommandations internationales de l'ICSH préconisant de répondre toute présence de drépanocytes, même inférieure à 1 % (gradation 1+) [3]. Dans notre étude, tous les patients analysés avaient un taux de sphérocytes < 5 %, et aucun des patients n'était atteint de sphérocytose héréditaire. Ces arguments sont en faveur d'un seuil de détection rapporté de 5 % pour les sphérocytes, en accord avec les recommandations de l'ICSH (tableau 4).

Concernant le diagnostic de microangiopathie post-grève, le groupe de travail de l'ICSH recommande un seuil pathologique de schizocytes $\geq 4\%$, en combinaison avec un contexte clinique suggestif d'anémie hémolytique (thrombopénie, effondrement de l'haptoglobine, diminution de l'hémoglobine), contrairement au seuil standard de 1 % pour la détection de microangiopathie [15]. Ces seuils de détection doivent être adaptés au contexte et l'âge des patients. Chez des enfants prématurés, un seuil normal de schizocytes $\leq 5\%$ est recommandé. Les érythrocytes des nouveau-nés et nourrissons sont plus larges que les adultes, tandis que les globules rouges des enfants en bonne santé sont plus physiologiquement plus petits que ceux des adultes. Pour la population des nouveau-nés normaux, le pourcentage des fragments peut atteindre 3 % (*versus* 1 % chez les enfants et adultes), d'autres déformations des globules peuvent être décrites (polychromie, dacryocytes, sphérocytes, acanthocytes, globules rouges nucléés...). Chez les prématurés, ces anomalies sont majorées. La présence d'une poikilocytose (variation de forme des hématies) est normale chez le nouveau-né, pouvant présenter jusqu'à 2 % de pyknocytes disparaissant normalement vers l'âge de 6 mois [6], toutefois leur présence en très grand nombre est évocatrice d'une pyknocytose infantile [11].

Tableau 4. Recommandations internationales de l'ICSH pour la standardisation et la gradation de la morphologie des GR (adaptation en français).

Anomalie des globules rouges	Système de gradation		
	1+, %	++, %	+++, %
Dacryocytes (tear drop cells)	n/a	5-20	> 20
Cellules cibles (target cells)	n/a	5-20	> 20
Schizocytes	< 1 %	1-2	>2
Drépanocytes (sickle cells)	< 1 %	1-2	>2
Sphérocytes	n/a	5-20	> 20

Limites de l'étude

De par le faible nombre de patients atteints de pathologies héréditaires érythrocytaires parmi les patients inclus dans l'étude, nous n'avons pas pu analyser la sensibilité de détection des cellules cibles chez des patients atteints de thalassémie ou d'autres hémoglobinopathies, ni sensibilité et la spécificité des sphérocytes pour la détection de la sphérocytose héréditaire. Pour la détermination de la sensibilité des drépanocytes chez des patients drépanocytaires, nous pouvons mentionner le biais relatif à la lecture technique du frottis sanguin, où l'opérateur se base sur le contexte connu du patient pour confirmer la drépanocytose. Une autre limitation fréquemment rencontrée en routine au sein des laboratoires est l'intérêt plus grand porté aux anomalies morphologiques des globules blancs qu'aux anomalies érythrocytaires, pouvant entraîner une sous-estimation des anomalies érythrocytaires lorsqu'elles sont peu représentées (faible pourcentage), lorsque la morphologie érythrocytaire globale est considérée comme normale sans utiliser les outils de pré-classification des anomalies érythrocytaires proposés par le module RBC Advanced du CellaVision®. Toutefois, la lecture par des cytologistes expérimentés permet d'éviter des biais de détection en cas d'anomalie significative.

Enfin, notre étude se base sur une approche pratique et clinique des seuils pathologiques définis pour la détection des pathologies érythrocytaires. Cette méthode n'est pas comparable aux autres approches retrouvées dans la littérature, pour la validation de la microscopie digitale grâce au module RBC Advanced, qui étudie la sensibilité et la spécificité de détection de ces anomalies par microscopie automatisée en comparaison avec la microscopie optique comme référence. Il est bien sûr à noter que pour les anomalies morphologiques érythrocytaires décrites ne sont qu'un des éléments évoquant le diagnostic, qui repose sur un faisceau d'arguments cliniques et de tests biologiques de confirmation. Il s'agit toutefois d'outils précieux qui peuvent guider et orienter les cliniciens s'ils sont utilisés de manière réfléchie et standardisée.

Utilisation des paramètres des globules rouges et des réticulocytes sur le XN-10 pour la détection des pathologies érythrocytaires

De nouveaux indices mathématiques ont été développés pour discriminer les pathologies érythrocytaires, notamment dans le contexte d'anémie microcytaire. Nivagigioni *et al.* [8] ont évalué un arbre de décision en deux étapes prenant en compte des indices automatisés érythrocytaires et des réticulocytes pour calculer un score érythrocytaire, pour mettre en évidence quatre

principaux groupes de pathologies des globules rouges suspectés (carence martiale, hémoglobinopathie héréditaire, drépanocytose, sphérocytose) et une catégorie autre en cas d'absence de suspicion de pathologie érythrocytaire ou de carence martiale majeure (procédure normale). L'analyse des paramètres érythrocytaires montre que dans le groupe carence martiale et hémoglobinopathie hétérozygote le pourcentage de microcytes (%micro) était significativement plus haut que les autres groupes, avec une concentration corpusculaire en hémoglobine (MCHC) plus basse. L'indice de distribution des globules rouges en écart type (RDW-SD) était significativement plus bas chez les patients au sein du groupe hémoglobinopathie hétérozygote. La présence d'érythroblastes nucléés était nettement significative parmi le groupe des patients avec drépanocytose. L'arbre de décision en deux étapes distingue dans un premier temps les patients présentant un MCHC > 365 g/L et ceux avec un MCHC ≤ 365 g/L pour lesquels sont ensuite étudiés le pourcentage de microcytes, le taux de globules rouges nucléés et l'indice de distribution érythrocytaire en écart type. Dans un second temps, la fraction de réticulocytes permet de discriminer entre drépanocytose et sphérocytose chez les patients ayant un score RBC positif et une des associations suivantes (MCHC > 365 g/L, un MCHC > 338 g/L associé à un NRBC % > 0,9 % et un micro % < 12,9 %, ou un LCHC > 330 g/L avec un RDW-SD > 38,5 fl et un taux de microcytes > 12,9 %). La fraction de réticulocytes immatures est > 20 % en cas de drépanocytose dans ce contexte [8]. Mullier *et al.* avaient également déjà démontré la très bonne valeur prédictive de l'association des paramètres érythrocytaires et réticulocytaires pour le dépistage de la sphérocytose héréditaire [9, 20]. Globalement, L'utilisation de ce nouvel arbre de décision sur une large cohorte montre d'excellents résultats, avec une identification correcte des patients atteints de pathologies érythrocytaires atteignant 99,4 %. La sensibilité et la spécificité pour la détection de ces pathologies ont été respectivement évaluées à 95,2 % et 99,9 %. En conclusion, l'élaboration d'un arbre de décision basé sur les paramètres des érythrocytes et des réticulocytes sur le Sysmex® XN-10 démontre une excellente prédiction et classification des pathologies héréditaires des globules rouges, en complément des analyses microscopiques [12], et permet d'orienter les investigations complémentaires en optimisant les ressources.

Développement des méthodes de détection des schizocytes

Si la variabilité inter-laboratoire a été réduite depuis l'établissement par le groupe de morphologistes français

de consensus pour l'identification et le comptage des schizocytes [16], il reste important d'améliorer l'exactitude et la reproductibilité du comptage de schizocytes pour le diagnostic de microangiopathies thrombotiques, y compris dans le contexte de MAT post-allogreffe de cellules souches où le pourcentage de schizocytes a été inclus dans des scores pronostiques. Le groupe de travail de l'ICSH propose d'utiliser le comptage automatisé des globules rouges fragmentés (FRC), proposés par les appareils de numération sanguine automatisés récents à l'instar du Sysmex® XN, pour exclure la présence de schizocytes [15].-Certaines conditions peuvent artificiellement augmenter le pourcentage de FRC, notamment la présence importante de globules rouges hypochromes, ayant une teneur en hémoglobine inférieure à 17 picogrammes (hypo-he).

L'article publié par Y. Abe *et al.* en 2009 confirme la bonne sensibilité du comptage automatisé des schizocytes, quoique de faible spécificité pour la détection des microangiopathies thrombotiques [5]. C'est pour cette raison que les recommandations internationales de l'ICSH préconisent de recourir à un comptage microscopique manuel en cas de suspicion de micro-angiopathie thrombotique ou après transplantation. Cela est d'autant plus important si les schizocytes sont l'anomalie prédominante au sein des globules rouges, ce qui augmente la probabilité d'une micro-angiopathie thrombotique. Par ailleurs, des faux négatifs peuvent également survenir en cas de macrocytose (VGM > 105 fl) [16], d'où l'intérêt de lecture microscopique dans ce contexte. En résumé, le comptage automatisé des schizocytes est un bon outil de dépistage avec une excellente valeur prédictive négative [6], mais reste un complément à la microscopie [16].

Conclusion

Le RBC Advanced® est un outil facilitant la détection, la gradation et la standardisation des anomalies morphologiques des globules rouges, sur base des critères définis entraînant la réalisation d'un frottis sanguin suite à des anomalies qualitatives ou quantitatives détectées par les automates spécialisés d'hématologie lors de la réalisation de l'hémogramme. L'analyse par microscopie digitale du frottis sanguin par un opérateur expérimenté permet de vérifier la présence ou non d'anomalies morphologiques érythrocytaires et de les grader le cas échéant. Les cytologistes doivent rester vigilants à correctement évaluer les anomalies érythrocytaires, d'autant plus pour les anomalies critiques pouvant orienter rapidement vers certaines pathologies hématologiques, alors que celles-ci sont souvent méconnues.

L'enjeu est de ne pas rater des anomalies morphologiques érythrocytaires associées à des pathologies importantes, tout en évitant d'augmenter inutilement la charge de travail des opérateurs et d'inquiéter inutilement les cliniciens pour des anomalies non pertinentes. Pour le report des dacryocytes et des cellules cibles, nos données montrent une excellente sensibilité pour les cut-off définis par l'étude, mais une faible spécificité clinique pour la détection des pathologies cliniques associées avec un seuil pathologique fixé à 1 % (4 % de spécificité pour la détection de la myélofibrose, 10 % pour la détection de thalassémie). Pour la détection de la myélofibrose et de la thalassémie, les seuils fixés à 5 % permettent d'améliorer respectivement la spécificité à 64 % et à 100 %, sur base des échantillons testés. Nos résultats montrent également la faible spécificité d'un taux de sphérocytes inférieur à 5 %. Les seuils recommandés par l'ICSH semblent plus adaptés cliniquement pour la détection et le report des dacryocytes, des cellules cibles et des sphérocytes. Concernant le report des schizocytes et des drépanocytes, nos données et l'analyse de la littérature confirment l'importance de maintenir des seuils de détection bas pour correctement détecter les anémies hémolytiques et la drépanocytose, conformément aux recommandations de l'ICSH suggérant de rapporter la présence de schizocytes et de drépanocytes, même à des taux inférieurs à 1 %.

Liens d'intérêts : [[en rapport avec l'article. A déclarer par tous les auteurs]]

Références

- Criel M, Godefroid M, Deckers B, Devos H, Cauwelier B, Emmerichts J. Evaluation of the Red Blood Cell Advanced Software Application on the CellaVision DM96. *Int J Lab Hematol* 2016 ; 38 : 366-74.
- Constantino BT. Reporting and grading of abnormal red blood cell morphology. *Int J Laboratory Hematol* 2015 ; 37 : 1-7.
- Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Laboratory Hematol* 2015 ; 37 : 287-303.
- Genevieve FGA, Mercier-Bataille D, Wagner-Ballon O. Revue microscopique du frottis sanguin : propositions du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC). *Feuill Biol* 2014 ; 317 : 7-16.
- Abe Y, Wada H, Yamada E, Noda M, Ikejiri M, Nishioka J, et al. The effectiveness of measuring for fragmented red cells using an automated hematology analyzer in patients with thrombotic microangiopathy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009 ; 15 : 257-262.
- Fenneteau O. Anomalies morphologiques érythrocytaires. *Horizons Hemato* 2014 ; 04 : 31-34.
- Salvagno GL, Sanchis-Gomar F, Picanza A, Lippi G. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015 ; 52 : 86-105.
- Nivaggioni V, Bouriche L, Coito S, Le Floch AS, Ibrahim-Kosta M, Leonnet C, et al. Use of XN-10 red blood cell parameters for screening of hereditary red blood cell diseases and iron deficiency anaemia. *Int J Lab Hematol* 2020 ; 42 : 697-704.
- Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, Da Costa L, Schillinger F, Bailly N, et al. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicenter study. *Ann Hematol* 2020 ; 90 : 750-68.
- Ford JC, Milner R, Dix DB. Red Blood Cell Morphology Reporting: How much is a waste of time? *J Pediatr Hematol Oncol* 2011 ; 33 : 10-4.
- El Nabouch M, Rakotoharinandrasana I, Ndayikeza A, Picard V, Kayemba-Kay's S. Infantile pyknocytosis, a rare cause of hemolytic anemia in new borns: a report of two cases in twin girls and literature overview. *Clin Case Rep* 2015 ; 3 : 535-538.
- Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Laboratory measurement of schizocytes. *Int J Lab Hematol* 2007 ; 29 : 149-51.
- Moulis M. Evaluation de l'application Red Blood Cell Advanced Software de Cellavision® et des apports de l'automatisation pour la recherche et la quantification des schizocytes. Sciences pharmaceutiques 2018. Disponible à l'adresse suivante : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02016003>
- Park SJ, Yoon J, Kwon JA, Yoon SY. Evaluation of the CellaVision Advanced RBC Application for Detecting Red Blood Cell Morphological Abnormalities. *Ann Lab Med* 2021 ; 41 : 44-50.
- Zini G, d'Onofrio G, Erber WN, Lee SH, Nagai Y, Basak GW, Lesesve JF; International Council for Standardization in Hematology (ICSH). 2021 update of the 2012 ICSH Recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes: Impact and revisions. *Int J Lab Hematol* 2021 ; 43 : 1264-1271.
- Zini G, d'Onofrio G, Briggs C, Erber W, Jou JM, Lee SH, et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol* 2012 ; 34 : 107-16.
- Tamigniau A, Bailly N, Chatelain B, Mullier F. From XE-2100 to XN-9000, from SIS standard to GFHC recommendations for slide review: potential impact on review rate and turnaround time. *Annales de Biologie Clinique (Paris)* 2017 ; 75 : 285-292.
- Cornet E, Mullier F, Despas N, Jacqmin H, Geara C, Boubaya M, et al. Evaluation and optimization of the extended information process unit (E-IPU) validation module integrating the sysmex flag systems and the recommendations of the French-speaking cellular hematology group (GFHC). *Scand J Clin Lab Invest* 2016 ; 76 : 465-71.
- Trimoreau F, Galois AC, Geneviève F, Bardet V, Cornet E, Hurst JP, et al. Harmonisation of full blood count reports, recommendations of the French-speaking cellular haematology group (GFHC). *J Clin Pathol* 2017 ; 70 : 395-402.
- Sottiaux JY, Favresse J, Chevalier C, Chatelain B, Jacqmin H, Mullier F. Evaluation of a hereditary spherocytosis screening algorithm by automated blood count using reticulocytes and erythrocytic parameters on the Sysmex XN-series. *Int J Laboratory Hematol* 2020 ; 42 : e88.