



SEED Hématologie

Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex
No 4 | 2012

Indices érythrocytaires

Ce bulletin d'information a pour objectif de proposer une vision d'ensemble des indices érythrocytaires, de leur utilité clinique, de la façon dont ils sont mesurés sur les analyseurs Sysmex et des différences susceptibles d'être observées entre les résultats obtenus en fonction de la technique utilisée.

Mots clés :

Sysmex, Hb, NGR, Ht, CCMH, TCMH, VGM, IDR, NFS, focalisation hydrodynamique, impédance.

La numération formule sanguine

La numération formule sanguine (NFS), élément central dans la prise de décision clinique, est en conséquence l'un des examens de laboratoire les plus courants dans le monde. Le nombre et le type de paramètres mesurés par les différents analyseurs d'hématologie influent certes sur la définition de la composition d'une NFS, toutefois, les indices érythrocytaires traditionnels amplement utilisés pour classifier les anémies sont communs à tous.

L'anémie, l'approche par l'analyse biologique

L'anémie est un problème de santé extrêmement courant dans le monde, même s'il ne s'agit en fait que d'un simple symptôme aux multiples causes. Elle ne peut être traitée efficacement que si la cause sous-jacente est identifiée correctement. C'est dans ce sens que plusieurs systèmes de classification ont été élaborés, dont le plus utile et le plus largement utilisé, fondé sur les indices érythrocytaires.

Le diagnostic de l'anémie

L'anémie se définit généralement comme une diminution du taux d'hémoglobine (Hg) en dessous de la limite inférieure normale. Les valeurs déterminant la présence ou l'absence d'anémie dépendent à la fois de l'âge et du sexe. L'hématocrite (Ht), considéré comme un paramètre connexe est susceptible d'être faible en cas d'anémie.

Les indices érythrocytaires

Les paramètres cellulaires des globules rouges, générés par l'ensemble des systèmes automatisés d'hématologie, incluent l'Hb, l'hématocrite, la numération des globules rouges (NGR), le volume globulaire moyen (VGM), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). Le VGM, la TCMH et la CCMH sont communément appelés : indices érythrocytaires. Conjointement aux indices érythrocytaires traditionnels, on exploite depuis peu l'indice de répartition des globules rouges (IDR), paramètre calculé automatiquement, renseignant sur la variabilité de taille des globules rouges, afin d'affiner les causes potentielles d'anémie chez un patient donné.

Technique d'impédance

Tous issus des informations obtenues par le passage des cellules dans l'ouverture du tube d'impédance d'un analyseur automatique d'hématologie, la NGR, l'Ht et le VGM sont étroitement liés. La technique d'impédance repose sur la possibilité d'utiliser un champ électrique, créé entre deux électrodes de charge opposée, pour compter des cellules et déterminer leur taille. Les cellules sanguines sont de piètres conducteurs d'électricité. Le diluant dans lequel les cellules se trouvent en suspension lors de leur passage

devant l'ouverture pendant la numération est une solution isotonique, agissant comme un bon conducteur d'électricité. En conséquence, lors de son passage entre les électrodes, chaque cellule en suspension dans le diluant augmente momentanément l'impédance (la résistance) électrique entre ces électrodes et génère une impulsion électrique, proportionnelle à sa taille.

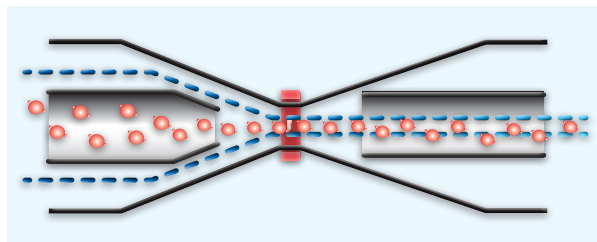


Fig. 1 Principe de l'impédance avec focalisation hydrodynamique

Numération des globules rouges

Pour des analyseurs du type Sysmex s'appuyant sur le principe de numération absolue, la NGR est déterminée par le nombre d'impulsions générées dans un volume de sang précis. Cette approche présente l'avantage de ne pas nécessiter d'étalonnage pour chaque utilisateur final. Les analyseurs reposant sur les principes de numérations relatives déterminent la NGR à partir du nombre d'impulsions générées au cours d'une période donnée. Ces systèmes, sujets aux erreurs du fait de l'encrassement de l'ouverture, impliquent donc un étalonnage régulier.

Hématocrite

L'Ht est un paramètre, consistant à mesurer le volume total ou cumulé de globules rouges pour un volume global de sang total, exprimé sous la forme d'un pourcentage ou d'une fraction (unité l/l).

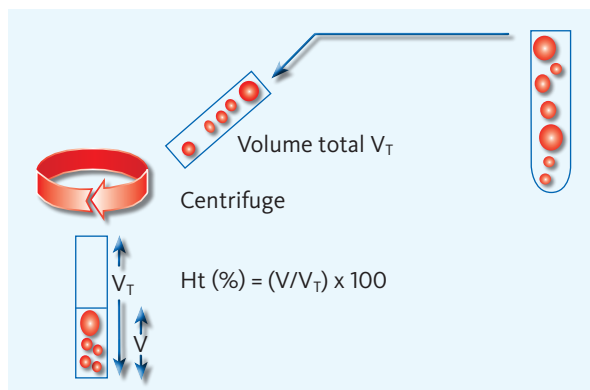


Fig. 2 Représentation schématique de la méthode de centrifugation destinée à déterminer l'Ht.

La mesure de l'Ht par un analyseur automatique d'hématologie a peu de rapport avec la concentration en globules rouges à proprement parler. Elle est, en effet, obtenue grâce à la technique de l'impédance : le passage de chaque cellule à travers l'ouverture génère une impulsion électrique, présumée proportionnelle au volume de la cellule. Dans un analyseur Sysmex, l'Ht est obtenu grâce au cumul des hauteurs d'impulsions.

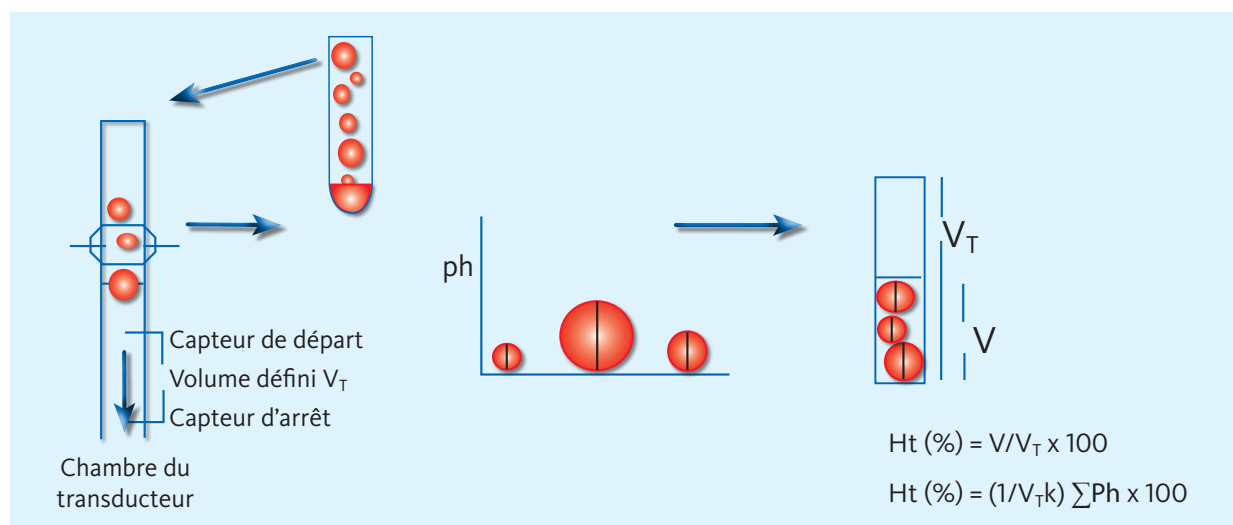


Fig. 3 Représentation schématique de la mesure automatique de l'Ht par le procédé de détection du cumul des hauteurs d'impulsions.

L'Ht est obtenu à partir du cumul des hauteurs d'impulsions générées par chaque cellule selon la formule indiquée dans la figure 4.

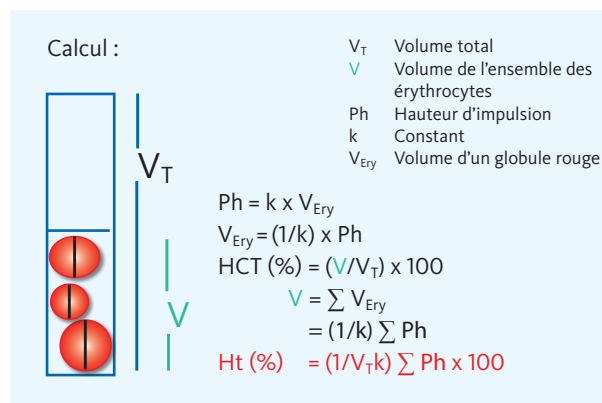


Fig. 4 Formule de la mesure automatique de l'Ht

Volume globulaire moyen

Le volume moyen des globules rouges est calculé à partir de la NGR et de l'Ht selon la formule ci-dessous :

$$VGM (fl) = \frac{Ht (l/l)}{NGR (x 10^{12}/l)}$$

La plage de référence normale pour le VGM dépend de l'âge. Les termes normocytaire, microcytaire ou macrocytaire servent à décrire les populations de globules rouges présentant respectivement des VGM normaux, faibles et élevés.

Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine est déterminée à partir de la NGR et de l'Hb à l'aide de la formule ci-dessous :

$$TCMH (pg) = \frac{Hb (g/dl)}{NGR (x 10^{12}/l)}$$

Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

La CCMH est calculée à partir de l'Ht et de l'Hb à l'aide de la formule ci-dessous :

$$CCMH (g/dL) = \frac{Hb (g/dL)}{Ht (L/L)}$$

La plage de référence normale pour la CCMH est remarquablement constante durant toute la vie, et est en général assez étroite, avec des variations minimales. La CCMH, en particulier dans les anciennes références, sert également à définir des populations de globules rouges normochromiques et hypochromiques. La CCMH est rarement élevée. Le cas échéant, cela signifie que les cellules sont sphérocytaires ou très déshydratées (voir ultérieurement).

Indice de répartition des globules rouges

Les analyseurs automatiques produisent des histogrammes, représentant la taille de chaque cellule, déterminée par la hauteur de l'impulsion générée lors de son passage par l'ouverture d'impédance. Plusieurs populations de cellules peuvent être évaluées, les plaquettes et les globules rouges étant en général représentés ensemble. Ces deux populations de cellules sont différenciées l'une de l'autre par les fameux discriminateurs qui s'appuient sur la taille des cellules. L'IDR est une mesure quantitative de la variabilité de la taille des globules rouges, indiqués sous la forme IDR-SD et IDR-CV.

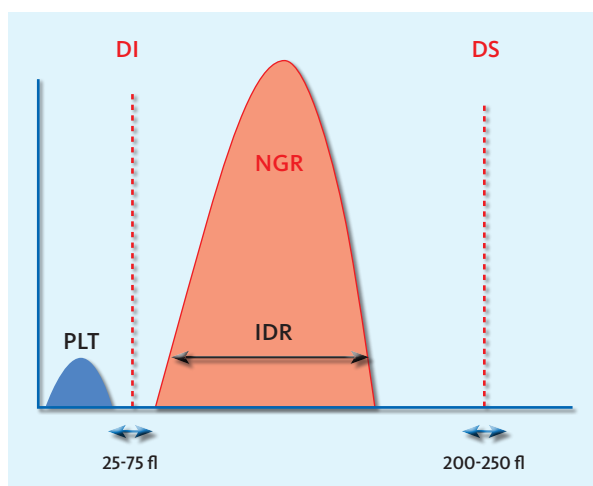


Fig. 5 Histogramme des globules rouges illustrant le concept d'IDR.

Classification des anémies fondée sur les indices érythrocytaires

Les indices érythrocytaires, altérés de façon prévisible par les mécanismes à l'origine de l'anémie, permettent au clinicien d'affiner les causes possibles de l'anémie. La taille d'un globule rouge dépendant de sa teneur en hémoglobine, un trouble de la production de cette dernière se traduira inévitablement par des érythrocytes plus petits que la normale. La microcytose est généralement constatée en cas d'anémie ferriprive, de thalassémie (une maladie héréditaire induisant une déficience dans la production des chaînes de globine), et d'anémie associée à une infection ou à une maladie chronique. Les globules macrocytaires apparaissent quant à eux en cas d'altération de la division des cellules précurseurs des érythrocytes dans la moelle osseuse. Le plus souvent, les anémies macrocytaires, également appelées anémies mégalo-blastiques, sont dues à des carences en vitamine B12 et en folate. Une baisse de la production (provoquée par une tumeur maligne ou toute autre cause de défaillance de la moelle épinière), une augmentation de la destruction (hémolyse) ou une perte de sang peuvent induire une anémie normocytaire. La NGR est certes basse, mais la taille et la teneur en hémoglobine des cellules sont normales.

Une TCMH basse indique une teneur trop faible des cellules en hémoglobine due à une production inadaptée. Ces cellules sont appelées hypochromiques. L'anémie hypochromique est le plus souvent le résultat d'une carence en fer. Sous l'objectif du microscope, les cellules présentant une TCMH particulièrement faible auront un aspect pâle.

La CCMH correspond à la proportion d'hémoglobine contenue dans un globule rouge rapportée à son volume. Les cellules présentant une trop faible teneur en hémoglobine sont de couleur plus claire et ont une CCMH faible. La CCMH est faible lors des anémies

hypochromiques, microcytaires ainsi qu'en cas de carence en fer, mais elle est en général normale en cas d'anémie macrocytaire. Les érythrocytes contenant essentiellement de l'hémoglobine, la CCMH reflète également la viscosité interne du globule rouge. Si la CCMH est trop élevée, les globules perdront leur capacité à se déformer et à reprendre leur forme d'origine, une nécessité intrinsèque des globules rouges leur permettant de passer dans la microcirculation à plusieurs reprises sans être détruits prématurément. En conséquence, les globules rouges ont une « limite supérieure » maximale naturelle pour la CCMH. Elle est donc rarement élevée, pour des raisons cliniques ; la transformation en sphérocytes des globules rouges induite par la perte de leur membrane constitue donc l'unique exception à cette règle. On observe le plus souvent une CCMH élevée en cas de sphérocytose héréditaire, une maladie caractérisée par une moindre survie des globules rouges due à une anomalie des protéines structurales dans la membrane cellulaire, mais cette élévation peut également survenir dans des maladies acquises, lors d'anémies hémolytiques à médiation immune ou en cas de brûlures sévères par exemple.

L'IDR est une mesure quantitative de la variation en taille des globules rouges. Un IDR élevé indique une variation anormale de la taille de chaque globule rouge, appelée anisocytose et observée au microscope. L'IDR contribue à différencier les anémies présentant des indices érythrocytaires similaires. Il est, en général, utilisé pour distinguer les anémies ferriprives des thalassémies mineures, qui présentent l'une et l'autre une microcytose et une hypochromie avec un chevauchement des valeurs du VGM et de la TCMH. Cependant, en cas d'anémie ferriprive, l'IDR est anormalement élevé, contrairement à la thalassémie mineure.

Le tableau ci-dessous résume la classification des anémies à l'aide des indices érythrocytaires :

Tableau 1 Classification des anémies à l'aide des indices érythrocytaires

Type morphologique d'anémies	Exemples	VGM	TCMH	CCMH
Normochromique normocytaire	Perte de sang Maladie chronique	N	N	N
Hypochromique microcytaire	Ferriprive Thalassémie Maladie chronique (stade avancé)	↓	↓	N ou ↓
Normochromique macrocytaire	Anémie mégaloblastique	↑	↑	N

Les valeurs obtenues grâce à des analyseurs différents sont-elles toujours identiques ?

La réponse est non. Il est universellement reconnu qu'en raison des différences technologiques, les informations quantitatives et qualitatives (par ex. sensibilité du marquage) ne seront pas concordantes à 100% sur des analyseurs de marques différentes, voire sur différents modèles de la même marque. En l'occurrence, il est essentiel d'interpréter les résultats du patient en tenant compte de la plage de référence établie pour cette marque et ce modèle précis d'analyseur. Les plages de références provenant de manuels ou d'autres analyseurs ne peuvent pas être utilisées de manière interchangeable sans validation de la pertinence des données. Cependant, cette validation est rarement effectuée, et en conséquence, les questions sur les divergences des données obtenues d'une marque d'analyseurs à l'autre, en particulier pour la CCMH, sont fréquentes.

FAQ N° 1 : Pourquoi les valeurs de la CCMH obtenues sur un analyseur Sysmex ne sont-elles pas identiques à celles d'autres analyseurs ?

La CCMH obtenue grâce aux analyseurs d'hématologie Sysmex est déduite des valeurs de l'Hb et de l'Ht conformément à la formule décrite précédemment dans ce texte.

L'Hb et l'Ht sont tout deux des paramètres mesurés sur les analyseurs Sysmex X-class. La validité de la valeur de la

CCMH dépend donc de la précision des valeurs de l'Hb et de l'Ht, paramètres interdépendants mesurés avec un degré de précision élevé. En conséquence, la CCMH a une plage normale relativement étroite. Une CCMH basse traduit la présence de globules rouges hypochromiques et est un marqueur sensible et précoce d'une carence en fer. La TCMH et la CCMH plongeront avant que les globules ne deviennent microcytaires. Une CCMH élevée est habituellement due à une erreur d'analyse, elle sert donc en général à contrôler les performances techniques de l'analyseur. Il existe, cependant, trois exceptions cliniques :

1. la sphérocytose marquée (par ex., sphérocytose héréditaire, brûlures sévère, infection sévère à *Clostridium difficile*) - concentration intracellulaire d'hémoglobine exceptionnellement élevée pour chaque globule rouge induite par une perte de volume de ces cellules ;
2. la maladie des agglutinines froides - dans ce cas, les globules rouges s'agglutinent les uns aux autres, avec pour résultat un Ht faussement élevé ;
3. l'hyperlipidémie ou autre, causant une augmentation inhabituelle de la turbidité du plasma - Hb faussement élevée.

Il convient de noter que les analyseurs d'hématologie provenant de fabricants différents répondent à des principes de mesure différents pour l'Hb et l'Ht. Par ailleurs, si la CCMH est calculée à partir des valeurs de l'Hb et de l'Ht, cette dernière n'est pas mesurée par tous les

fabricants, contrairement à Sysmex. Les analyseurs de Beckman Coulter mesurent le VGM, servant à calculer l'Ht.

Il existe plusieurs facteurs influant sur la mesure finale du VGM. Il s'agit de la forme et de la taille de l'ouverture du tube d'impédance, de la présence ou de l'absence de focalisation hydrodynamique et de l'osmolalité du flux de gainage. Ces facteurs influent collectivement sur le degré de déformation de chaque cellule lors de son passage dans l'ouverture. On sait que les érythrocytes, en suspension dans le liquide, changent de forme, passant d'un discoïde biconcave à une forme allongée, ressemblant à un cigare, en cas d'exposition à une accélération rapide. Grâce à la focalisation hydrodynamique, utilisée dans les analyseurs Sysmex X-class (et PochH-100i), le degré d'accélération est fortement diminué. La hauteur de l'impulsion électrique générée dépend à son tour de la coupe transversale de la cellule plutôt que de son volume à proprement parler. Elle est utilisée pour calculer le volume de chaque cellule en s'appuyant sur une formule comprenant un facteur constant (voir figure 3). La détermination de ce facteur constant repose sur l'hypothèse suivante : toutes les cellules subissent une déformation prévisible lors de leur passage par l'ouverture.

Toutefois, tel n'est pas le cas. En effet, cette capacité à se déformer, au-delà des facteurs déjà cités, est influencée par la viscosité interne du globule, en d'autres termes, par sa concentration en hémoglobine.

Il convient également de noter que les cellules présentant

une viscosité interne élevée (donc les cellules avec une « CCMH élevée ») se déforment moins et que leur taille est donc surestimée et a contrario, celle des cellules présentant une viscosité interne basse (les cellules avec une « CCMH basse ») est sous-estimée. Seule la taille des cellules présentant une « CCMH élevée » étant surestimée et seule celle des cellules présentant une « CCMH basse » étant sous-estimée, le mélange des deux « normalise » les extrêmes et donc resserre ou réduit la véritable plage de CCMH. Par conséquent, la CCMH a généralement été considérée par le passé, comme étant moins utile qu'un véritable paramètre clinique, mais plus utile qu'un paramètre de contrôle technique. La CCMH de Sysmex, cependant, souffre bien moins de cet effet de resserrage, les cellules se déformant moins que dans des analyseurs d'hématologie ne recourant pas à la focalisation hydrodynamique et reflète donc plus précisément la véritable CCMH des cellules. On peut par conséquent s'attendre à disposer d'une plage de référence normale beaucoup plus large.

Selon la démonstration de Bull et al (1996), l'« exactitude » de la CCMH obtenue grâce à différents analyseurs se servant de l'Ht mesuré (ou VGM x NGR), par rapport à l'Ht obtenu à l'aide de la méthode de référence du microhématocrite, dépend de la technologie employée. Ils affirment que le carré du coefficient de corrélation (R^2) pour chacune des méthodes testées reflète approximativement le taux de correspondance des valeurs de la CCMH générées par l'analyseur par rapport à la valeur véritable de la CCMH (méthode manuelle). Voir tableau 2.

Tableau 2 R^2 des indices érythrocytaires, méthode automatique par rapport à la méthode de référence

Méthode	CCMH	VGM	TCMH
Impédance sans FHD(par ex CellDyn 3000)	0,178	0,709	0,905
Impédance sans FHD (par ex.Coulter)	0,278	0,602	0,812
Mesure optique avec FHD et système de sphérisation des cellules (par ex. Bayer Technicon)	0,556	0,738	0,866
Impédance avec FHD (par ex. Sysmex)	0,729	0,860	0,904

FHD = focalisation hydrodynamique

En s'appuyant sur ces informations et sur d'autres études², il est évident que les valeurs de la CCMH obtenues grâce à des analyseurs sans focalisation hydrodynamique, peu conformes à la CCMH réelle de la population de globules rouges de l'échantillon, ne peuvent donc pas être utilisées comme paramètre clinique. Au contraire, les valeurs de la CCMH obtenues grâce à des analyseurs avec focalisation hydrodynamique (tels que ceux de Sysmex) reflètent beaucoup mieux les méthodes manuelles et sont donc utiles pour la classification des anémies.

Il faut donc s'attendre à des divergences entre les valeurs de la CCMH obtenues avec un analyseur Beckman Coulter et celles obtenues avec un analyseur Sysmex. Il convient également de noter que les indices érythrocytaires d'un analyseur ne sont pas interchangeables avec ceux d'un autre, pour le calcul de la CCMH. En d'autres termes, l'Hb et l'Ht doivent provenir du même analyseur si l'on souhaite effectuer un calcul manuel.

Compte-tenu de ces différences mineures, le Guide de l'utilisateur (GdU) de l'analyseur d'hématologie Sysmex indique très clairement que chaque laboratoire doit définir sa propre plage de référence conformément aux directives du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute - anciennement NCCLS).

En général, les analyseurs qui n'utilisent pas la focalisation hydrodynamique (par ex., ceux de Beckman Coulter et les anciens modèles Cell Dyn) et présentent un « effet de resserrage » présenteront des plages de CCMH normales plus étroites et la CCMH servira donc plutôt de « paramètre de contrôle qualité » pour évaluer les performances techniques de l'analyseur.

A contrario, pour les analyseurs Sysmex (impédance avec focalisation hydrodynamique) et les analyseurs Advia (mesures optiques avec focalisation hydrodynamique et système sphérisation des cellules), « l'effet de resserrage » sera moins visible et la CCMH présentera une plage de référence plus large et pourra être utilisée comme valeur clinique pour l'évaluation des anémies.

Il est utile de noter qu'à l'origine, la description du classement des anémies comme normochromiques ou hypochromiques dans les manuels était fondée sur la CCMH ; à cette époque ce paramètre était calculé à l'aide du microhématocrite, et non pas d'une valeur automatique. Des descriptions plus récentes se réfèrent cependant à la TCMH, les valeurs automatisées de la CCMH n'étant en effet plus considérées comme le reflet universellement fiable de l'état de la NGR du patient, mais indiquant plutôt une bonne performance de l'analyseur.

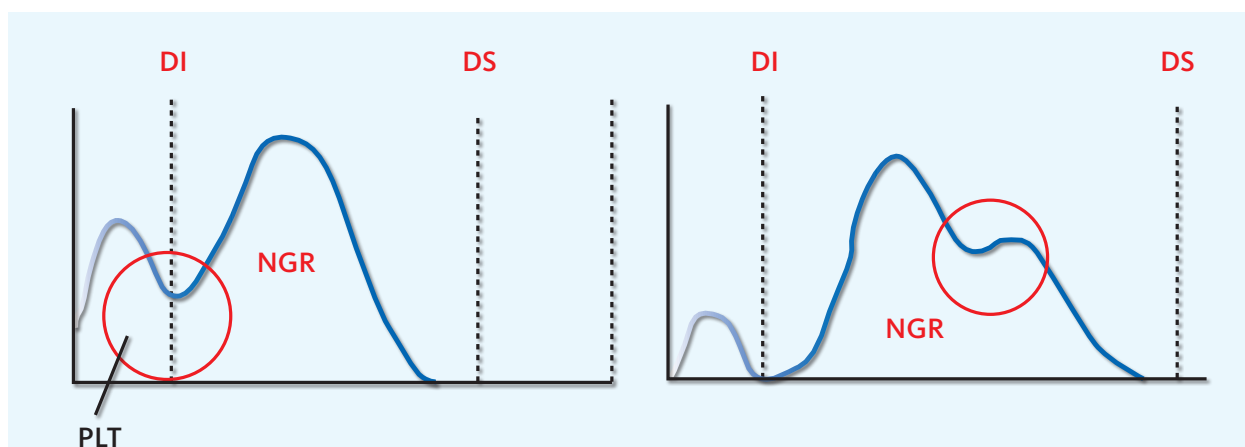


Fig. 6 Histogramme de globules rouges montrant des exemples justifiant la mise à l'écart des valeurs d'IDR.

FAQ N° 2 : Pourquoi la valeur de l'IDR est-elle parfois écartée ?

Certains critères doivent être satisfaits pour permettre à l'analyseur de calculer une valeur de l'IDR à partir de la courbe de distribution du volume des globules rouges. La mesure de l'IDR-SD est effectuée à une hauteur relative de 20 % au-dessus de la ligne de référence. Si l'une des extrémités de la courbe de l'histogramme est en dessous de ces 20 %, il est impossible de calculer la valeur de l'IDR qui ne sera donc pas indiquée. Ce faisant, l'analyseur alerte l'opérateur qu'un facteur autre que les globules rouges intacts, par exemple des plaquettes géantes ou un agglomérat de globules rouges, peut être présent et fausser les informations sur les érythrocytes. Pour supprimer cette donnée, l'opérateur est contraint d'examiner l'échantillon afin d'identifier la cause de l'interférence. De même, si l'histogramme présente un double pic, ce qui est susceptible de se produire en cas de population dimorphe de globules rouges, l'IDR sera ignoré. Dans ce cas, l'IDR n'est pas indiqué, l'analyseur pensant, en fait, être en présence de deux populations. Dans ce cas, l'inspection physique de la courbe et l'enregistrement du double pic fourniront des informations beaucoup plus significatives que la valeur de l'IDR. Identifier la présence d'un dimorphisme donne beaucoup plus d'informations sur les problèmes du patient qu'une valeur quantitative de l'IDR, qui pourrait être élevée dans ce cas. La liste des causes éventuelles d'un histogramme à double pic est beaucoup plus courte que celle des causes possibles d'un IDR élevé.

Informations à se rappeler

Les indices érythrocytaires, guides précieux pour la classification des anémies, aideront le clinicien à sélectionner de façon pertinente les examens complémentaires afin d'identifier la cause sous-jacente de l'anémie et de faciliter le choix d'un traitement pertinent. L'utilisation complémentaire de la numération des réticulocytes, et le paramètre Ret-he associé (disponible sur les analyseurs Sysmex équipés d'un canal à réticulocytes) y contribueront encore davantage (voir SEED n° 1 2012). Les laboratoires devraient toujours se conformer aux principes des bonnes pratiques de laboratoire et établir des plages de référence spécifiques à chaque analyseur, pour garantir une interprétation adaptée des résultats du patient, des différences entre les analyseurs reposant sur diverses technologies étant à prévoir. De plus, il convient de ne jamais perdre de vue lors de la comparaison des résultats obtenus grâce à différents analyseurs, que tout délai entre des mesures peut avoir un impact significatif sur les résultats, les cellules ayant tendance à gonfler avec le temps.

Références :

1. Bull BS, Aller R, Howen B. Red cell index or quality control parameter? In: McArthur JR, Lee SH, Wong JEL, Ong YW, eds. Haematology 1996, Educational programme of the 26th Congress of the International Society of Haematology. 1996:40.
2. Van Hove L, Schisano T, Brace L. Anemia diagnosis, classification, and monitoring using Cell-Dyn technology reviewed for the new millennium. Laboratory Hematology, 2000; 6:93 – 108.

Compilé par

Dr Marion Münster

