

SEED Hématologie



Reconnaître les profils particuliers et les résultats erronés dans la numération automatisée des cellules sanguines

Comprendre la cause originelle des interférences en fonction des différents principes de mesure

L'utilisation de la numération automatisée des cellules sanguines dans les laboratoires constitue la base essentielle de la prise en charge et du diagnostic des patients. Avec l'adoption de technologies de pointe, la qualité et la précision des résultats fournis par les analyseurs d'hématologie se sont améliorées, contribuant ainsi à une plus grande fiabilité et utilité clinique. Le développement de divers principes de mesure a permis la détection et la classification optimales des différents types de cellules sanguines, en exploitant leurs caractéristiques morphologiques uniques. Cependant, malgré ces avancées technologiques considérables, il existe encore quelques rares cas où des résultats erronés peuvent apparaître en raison de certains facteurs d'interférence. La plupart de ces interférences peuvent être attribuées aux conditions spécifiques du patient ou pré-analytiques, tandis que certaines sont déterminées par la technologie utilisée [1, 2].

L'objectif de cet article est de présenter les potentielles causes originelles de certains profils bien caractéristiques qui entraînent des résultats erronés sur les analyseurs d'hématologie à 5 populations de Sysmex, d'expliquer

quels paramètres mesurables pourraient être affectés et de mettre en évidence les aspects des scattergrammes et des alarmes qui peuvent aider à l'identification rapide de ces profils.

Cet article pose les bases de la compréhension des technologies de mesure et des canaux utilisés dans les analyseurs d'hématologie Sysmex et décrit les raisons potentielles pour lesquelles des profils particuliers pourraient survenir.

Technologies de mesure dans la numération automatisée des cellules sanguines

Les analyseurs automatisés à 5 populations Sysmex utilisent des principes de mesure avancés, qui exploitent différentes propriétés cellulaires pour réaliser une identification optimale des cellules. Plus précisément, la méthode d'impédance par focalisation hydrodynamique est utilisée pour la différenciation volumétrique et la quantification absolue des globules rouges (RBC) et des plaquettes (PLT). Le principe de dosage de l'hémoglobine au laurylsulfate de

sodium (SLS) repose sur une méthode photométrique qui permet la quantification précise de la concentration en hémoglobine lors de la génération d'un complexe coloré (hémoglobine-SLS). Enfin, la technologie de fluorocytométrie en flux est utilisée pour l'identification et la quantification des globules blancs (WBC), des érythroblastes (NRBC), des réticulocytes et des plaquettes, sur la base d'une analyse tridimensionnelle, par l'obtention d'informations sur les propriétés physiologiques et struc-

turelles des cellules (en terme de taille, de structure intracellulaire et de nombre d'acides nucléiques et d'organites cellulaires) sous forme de lumière émise.

Chacun de ces principes dépend fortement de réactifs uniques et dont Sysmex a la propriété, qui, par leur interaction avec les cellules sanguines, contribuent à leur détection et à leur numération précises en exerçant leurs caractéristiques et propriétés morphologiques.

Le canal WNR

Le canal WNR fait partie de la numération sanguine complète (CBC), le profil d'analyse standard pour chaque échantillon sanguin. L'objectif de ce canal est de déterminer le nombre total de globules blancs (WBC) et de différencier les érythroblastes (NRBC) et les basophiles. Pour obtenir une séparation optimale des cellules, les cellules sanguines sont traitées avec des réactifs bien spécifiques.

Les cellules avec un pH basique ($\text{pH} > 7$), comme les basophiles, ne sont pas affectées par le Lysercell WNR et conservent leur taille d'origine. En revanche, les cellules avec un pH acide ou neutre ($\text{pH} \leq 7$), telles que les NRBC et autres WBC, rétrécissent sous l'effet de ce réactif. Cette modification de la taille des cellules permet une meilleure différenciation des cellules détectées dans le canal WNR.

Pour l'analyse des globules blancs (WBC), il est important de lyser les globules rouges (RBC) car ils ont la concentration la plus élevée dans le sang. Cette étape est réalisée par le réactif Lysercell WNR qui lyse également les plaquettes et perméabilise les membranes cellulaires des globules blancs (WBC) et des érythroblastes (NRBC). En raison des différences de pH intracellulaire, ce réactif entraîne également des modifications dans la taille cellulaire.

Le Fluorocell WNR marque les acides nucléiques, ainsi que plusieurs organites cellulaires, avec un marqueur de fluorescence spécifique. L'intensité du signal fluorescent que les cellules émettent lors de l'excitation fournit des informations précieuses sur l'activité métabolique et l'état de maturation des cellules marquées, contribuant ainsi à une différenciation et à une quantification précises.

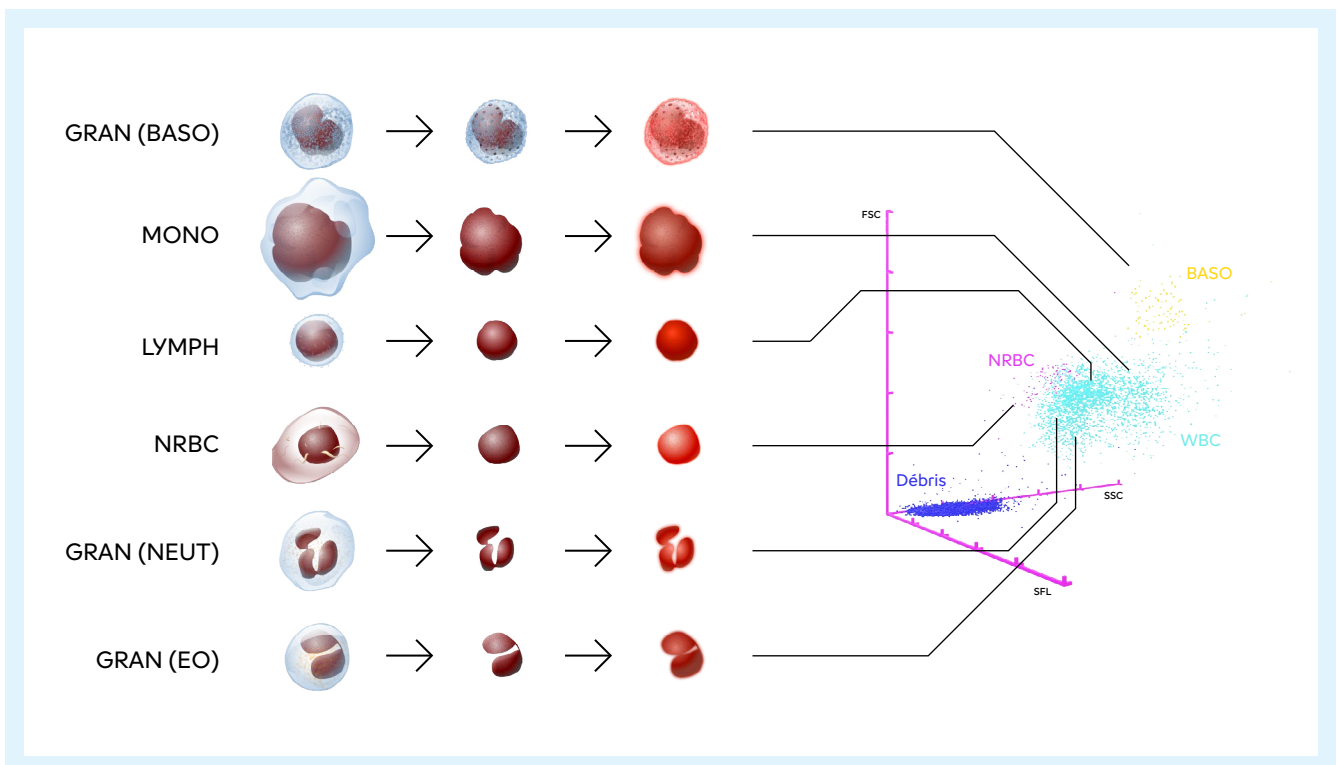


Fig. 1 Les réactifs du canal WNR exercent différents effets sur les leucocytes (WBC) et les érythroblastes (NRBC), qui sont liés à leurs propriétés individuelles (c'est-à-dire la taille des cellules (FSC) et le contenu en acides nucléiques (SFL)). La combinaison des informations obtenues par fluorocytométrie en flux reflète ces propriétés et permet une classification et une quantification optimales des cellules détectées.

Le canal WDF

Des informations supplémentaires sur les différentes populations de leucocytes (WBC) présentes dans un échantillon sanguin sont fournies par le canal de mesure WDF. Bien que la numération leucocytaire totale soit obtenue par le canal WNR, lorsque des informations détaillées sur les sous-populations leucocytaires sont nécessaires, le canal WDF est utilisé pour rendre le nombre absolu et le pourcentage de lymphocytes, monocytes, neutrophiles et éosinophiles. De plus, si des granulocytes immatures (IG) sont présents dans le prélèvement, ils seront automatiquement quantifiés.

Sur le canal WDF, la classification précise des cellules est attribuée aux réactifs spécifiques utilisés. Les réactifs, Lysercell WDF (applicable sur XN-Series et XN-L Series) et Lysercell WDF II (applicable sur XR-Series), lysent également les globules rouges (RBC) et les plaquettes et perméabilisent les membranes cellulaires des leucocytes. Cependant, en raison d'une composition chimique différente par rapport au Lysercell WNR, ces réactifs

n'ont pas d'impact direct sur la taille des leucocytes, dont les caractéristiques principales restent largement conservées après la réaction avec le réactif. La seule exception concerne les éosinophiles. L'interaction des réactifs de lyse du canal WDF avec les granules acides des éosinophiles entraîne la formation de cristaux dans ces granules, ce qui augmente la complexité intracellulaire de cette sous-population spécifique. Comme le canal WDF tire parti des différences de complexité intracellulaire pour parvenir à une classification correcte des sous-populations leucocytaires, cette caractéristique des réactifs de lyse améliore la performance du canal.

Le Fluorocell WDF marque les acides nucléiques (principalement l'ARN) et les organites cellulaires (par exemple, les ribosomes et le réticulum endoplasmique rugueux) avec un marqueur de fluorescence spécifique, contribuant ainsi à une différenciation optimale des leucocytes en utilisant des informations reflétant l'activité métabolique et l'état de maturation des cellules marquées.

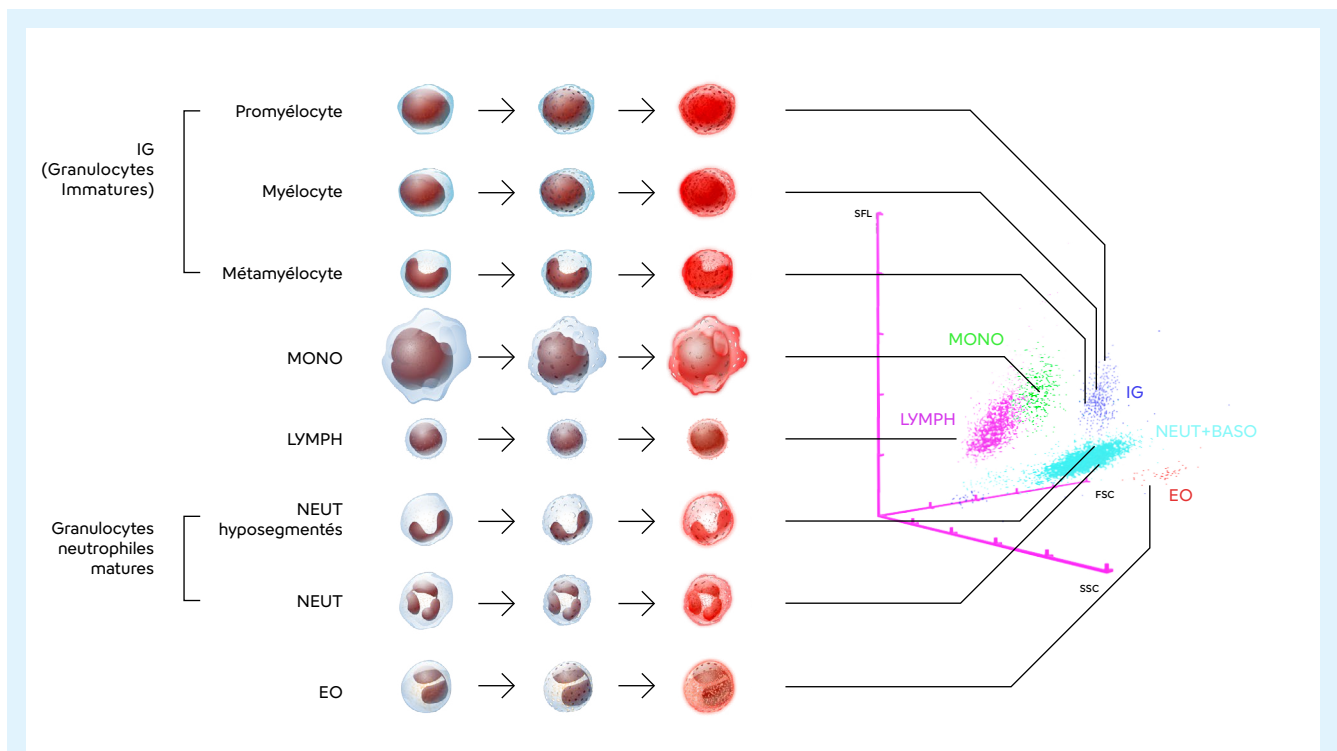


Fig. 2 Les réactifs du canal WDF exercent différents effets sur les sous-types de leucocytes (WBC), qui sont liés à leurs propriétés individuelles (c'est-à-dire la complexité intracellulaire (SSC) et le contenu en acides nucléiques (SFL)). La combinaison des informations obtenues par fluorocytométrie en flux reflète ces propriétés et permet une classification et une quantification optimales des cellules détectées.

Le canal WPC

Dans le cas où la présence de leucocytes anormaux ou potentiellement réactionnels est suspectée, des informations supplémentaires pertinentes peuvent être fournies par le canal WPC. Bien qu'un premier signal d'alerte puisse être déclenché par une alarme générique sur le canal WDF, le canal WPC peut fournir plus de détails sur l'origine hématopoïétique des cellules anormales et déclencher des alarmes explicites avec une spécificité plus élevée.

Comme pour les deux autres canaux, des réactifs spécifiques sont utilisés pour différencier les leucocytes immatures ou anormaux des leucocytes matures. En général, les membranes cellulaires des cellules immatures contiennent moins de lipides que celles des cellules matures. Par conséquent, le réactif Lysercell WPC, qui, en plus de lyser les globules rouges (RBC) et les plaquettes,

perméabilise également les membranes des leucocytes, exerce un effet plus stringent sur les cellules matures, qui sont plus efficacement perméables que les cellules immatures. En raison du degré différent de perméabilisation des membranes cellulaires, la quantité de Fluorocell WPC qui marque les acides nucléiques (principalement l'ADN) des cellules matures et immatures varie, contribuant ainsi à une meilleure séparation.

De même, les cellules réactionnelles activées peuvent être facilement perméabilisées par le Lysercell WPC et présenter une intensité de fluorescence élevée, ce qui reflète l'augmentation de leur activité métabolique.

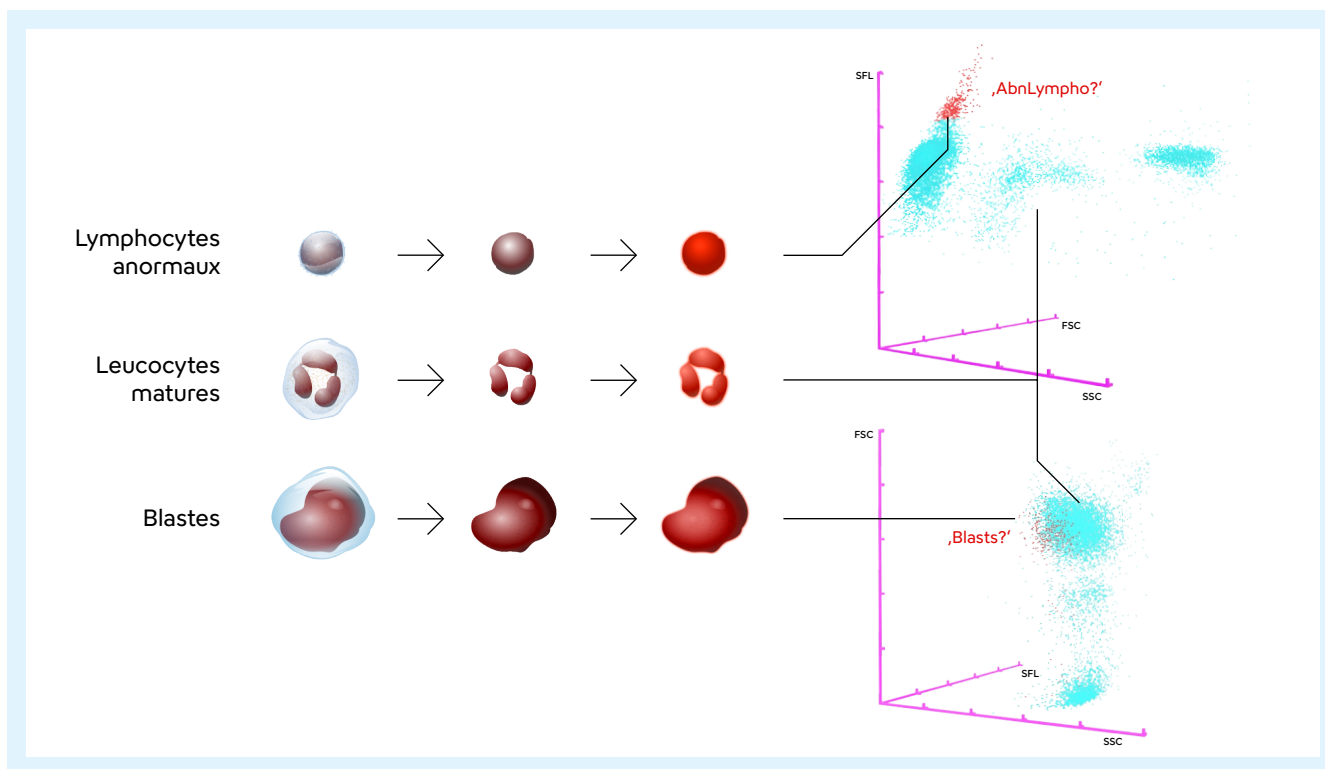


Fig. 3 Les réactifs du canal WPC exercent différents effets sur les leucocytes immatures, matures et activés, qui sont liés à leurs propriétés individuelles (c'est-à-dire la complexité intracellulaire (SSC), le contenu en acides nucléiques (SFL) et/ou la taille des cellules (FSC)). La combinaison des informations obtenues par fluorocytométrie en flux reflète ces propriétés et permet une différenciation optimale des cellules détectées. Les images ci-dessus sont des exemples représentatifs montrant où ces cellules peuvent se projeter sur les scattergrammes WPC. Cependant, la position exacte des cellules immatures dépend de la pathologie sous-jacente, et des variations de ces profils peuvent survenir.

Le canal RET

Bien que les globules rouges (RBC) soient principalement mesurés par la méthode d'impédance par focalisation hydrodynamique, qui repose sur la différenciation volumétrique des cellules, le canal RET peut être utilisé pour fournir des informations supplémentaires sur les réticulocytes et leurs différents niveaux de maturation.

Ce canal utilise la fluorocytométrie en flux pour quantifier avec précision les réticulocytes. Le réactif Cellpack DFL n'a pas de propriétés lysantes, mais perméabilise les membranes cellulaires des érythrocytes et des réticulocytes. Le réactif Fluorocell RET marque l'ARN restant dans le cytoplasme des réticulocytes avec un marqueur de fluorescence spécifique. Étant donné qu'au cours de l'érythropoïèse, les réticulocytes présentent différents niveaux de maturation, corre-

spondant à la perte progressive du contenu en acides nucléiques, l'intensité de fluorescence des cellules détectées est utilisée pour les classer en réticulocytes à haute, moyenne ou faible fluorescence (HFR, MFR, LFR) et en globules rouges matures.

Comme aucune lyse n'est appliquée à aucun type de cellule sanguine, le canal RET peut également être utilisé pour la quantification des plaquettes (PLT-O) dans l'échantillon. Cette analyse est particulièrement utile dans le cas où les plaquettes ne peuvent pas être facilement différenciées des globules rouges par des méthodes volumétriques, comme pour les prélèvements présentant des microcytes, des globules rouges fragmentés ou des plaquettes géantes.

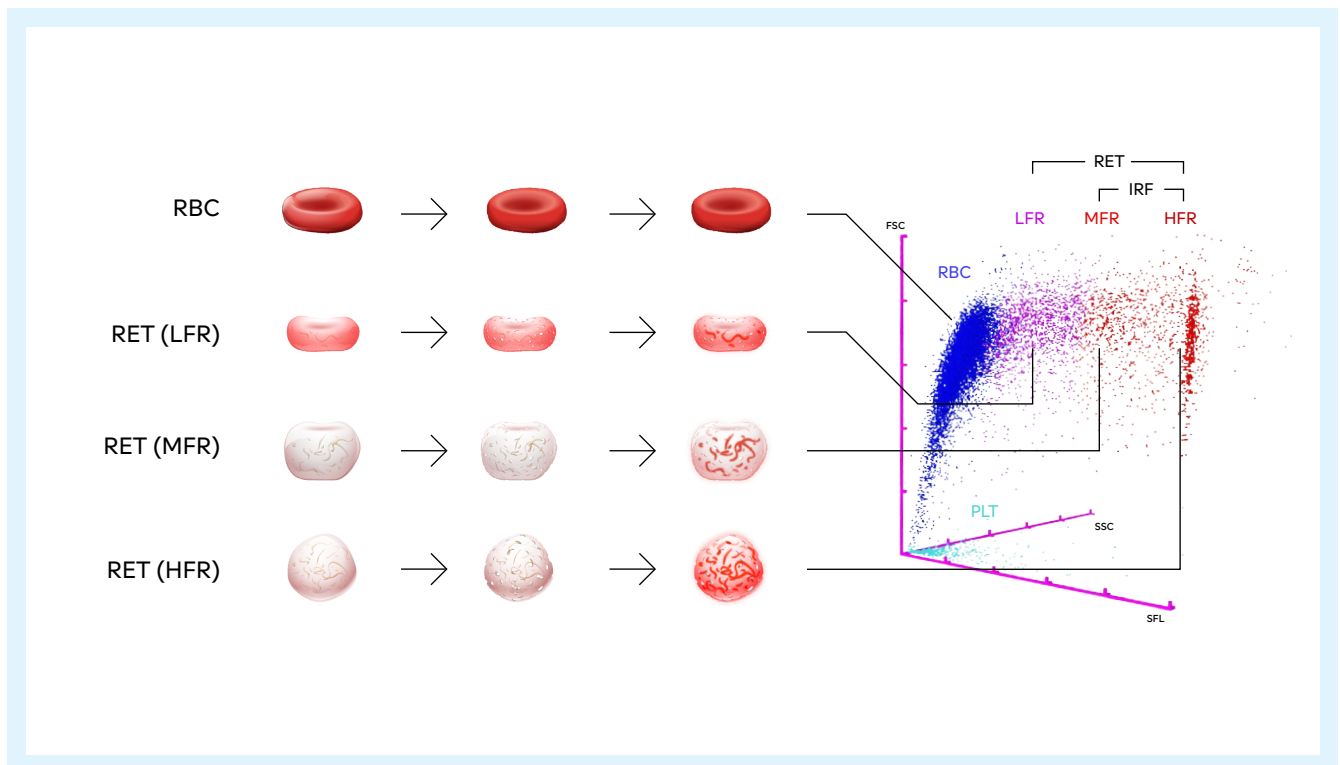


Fig. 4 Le canal RET est utilisé pour la quantification des réticulocytes de différents niveaux de maturation. La combinaison des informations obtenues par fluorocytométrie en flux (c'est-à-dire le contenu en acides nucléiques (SFL) et la taille des cellules (FSC)) reflète les différentes propriétés de chaque population cellulaire et permet leur classification optimale. De plus, les globules rouges matures (RBC) et les plaquettes peuvent être détectés et quantifiés.

Le canal PLT-F

Le canal de mesure PLT-F a été développé pour obtenir une numération plaquettaire à la fois précise et fiable. En raison de son volume de comptage plus important et de l'utilisation de la fluorescence par rapport à la mesure par impédance, ce canal peut quantifier plus précisément le nombre de plaquettes dans des échantillons présentant une thrombopénie sévère [3] et surmonter les interférences qui affectent la classification correcte des plaquettes en fonction de leur taille [4, 5, 6].

De manière similaire au canal RET, le réactif Cellpack DFL perméabilise les membranes cellulaires des plaquettes, et le réactif Fluorocell PLT marque l'ARN présent dans le cytoplasme avec un marqueur de fluorescence plus spécifique. Comme les plaquettes immatures ou réticulées contiennent une plus grande quantité d'ARN et émettent ainsi un signal de fluorescence plus élevé, cette méthode permet une séparation optimale entre les plaquettes immatures et matures, ainsi qu'une quantification précise de chaque population par rapport à la méthode de référence [3, 4, 5].

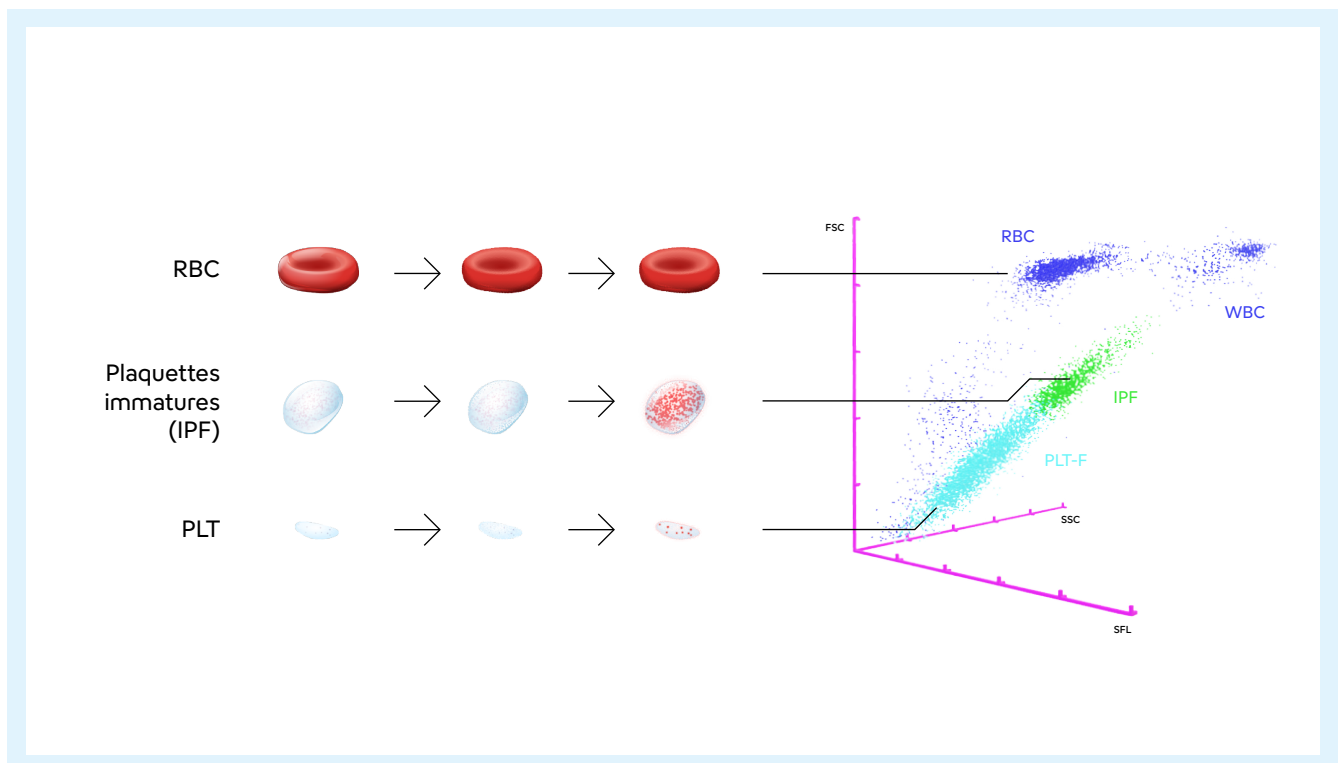


Fig. 5 Le canal PLT-F peut déterminer précisément le nombre de plaquettes en utilisant la méthode de fluorocytométrie en flux. Les informations obtenues (c'est-à-dire le contenu en acides nucléiques (SFL) et la taille des cellules (FSC)) reflètent les différents stades de maturation des plaquettes, permettant ainsi une classification optimale et une quantification précise des plaquettes immatures et matures.

Résultats erronés dus à des facteurs interférents

Comme illustré précédemment, malgré les améliorations technologiques relatives au matériel et aux logiciels des analyseurs d'hématologie, des résultats erronés peuvent être générés dans de rares cas en raison de facteurs interférents. Ces interférences résultent généralement de caractéristiques anormales des prélèvements, et les causes les plus courantes peuvent être classées en deux groupes :

- Pathologies sous-jacentes
- Facteurs pré-analytiques [1, 2].

Il est reconnu que les propriétés cellulaires peuvent être altérées en raison de causes cliniques. Diverses conditions pathologiques ou lignes thérapeutiques peuvent affecter la taille, la structure, le niveau de maturation ou l'activité métabolique d'une cellule, ou peuvent influencer l'interaction correcte avec les réactifs utilisés sur les analyseurs automatisés d'hématologie. De même, les facteurs pré-analytiques, tels qu'un volume d'échantillon non conforme, un mélange excessif, une prise de sang mal réalisée, la présence d'anticoagulants ou de facteurs nutritionnels, peuvent également affecter les propriétés cellulaires ainsi que les réactions des réactifs. Certaines des observations les plus courantes faites lorsque de telles interférences se produisent sont l'agrégation cellulaire, la fragmentation cellulaire, les inclusions cellulaires, la résistance à la lyse ou la présence d'éléments non-cellulaires qui peuvent être perçues à tort par les analyseurs comme des cellules [1, 2].

Selon le type d'interférence, divers paramètres hématologiques peuvent être affectés, et des profils anormaux distincts peuvent apparaître sur les histogrammes et/ou scattergrammes. Au cours des dernières années, Sysmex a apporté des améliorations continues pour identifier et caractériser les profils atypiques courants, ainsi que leur impact sur les résultats d'analyse. Grâce à cet effort, ces interférences sont désormais listées dans les Instructions d'utilisation (IFU) de chaque analyseur d'hématologie et des alarmes spécifiques peuvent être générées pour avertir les opérateurs en cas de suspicion de résultats anormaux.

Des exemples de ces profils spéciaux et résultats erronés affectant divers canaux sont décrits dans d'autres de nos articles SEED.

Causes connues de résultats erronés dans la numération automatisée des cellules sanguines [1, 2]

Facteurs pré-analytiques

- Agrégation cellulaire
- Cellules fragmentées
- Lipémie

Pathologies sous-jacentes

- Agrégation cellulaire
- Cellules fragmentées
- Agglutinines froides
- Cryoglobulines
- Inclusions cellulaires
- Microorganismes
- Cellules résistantes à la lyse

Remarques de conclusion

L'utilisation généralisée de la numération automatisée des cellules sanguines a accéléré l'amélioration continue de la précision des résultats obtenus par les analyseurs d'hématologie. Malgré les efforts considérables pour améliorer les performances analytiques, divers facteurs interférents pré-analytiques ou analytiques peuvent contribuer à la génération de résultats erronés. L'amélioration de l'analyse des cellules sanguines, combinée à la prise de conscience des limites des principes de mesure actuels, a permis de mettre l'accent sur l'examen attentif des histogrammes et des scattergrammes associés pour identifier les anomalies potentielles. Des profils atypiques bien caractérisés et des alarmes associées peuvent alerter l'utilisateur de résultats suspects et, dans de nombreux cas, suggérer la cause de ce profil. Cela peut être d'une grande aide pour les utilisateurs, qui peuvent plus facilement décider des prochaines étapes à suivre pour garantir des résultats précis et un diagnostic fiable.

Références

- [1] **Zandecki M et al. (2007):** Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. Int J Lab Hematol; 29(1): 4–20.
- [2] **Zandecki M et al. (2007):** 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 J Lab Hematol; 29(1): 21–41.
- [3] **Schoorl M et al. (2013):** New fluorescent method (PLT-F) on Sysmex XN2000 hematology analyzer achieved higher accuracy in low platelet counting. Am J Clin Pathol;140:495.
- [4] **Tanaka Y et al. (2014):** Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining in the XN-Series automated hematology analyzers. J Clin Lab Anal; 28(5):341-8.
- [5] **Wada A et al. (2015):** Accuracy of the New Platelet Count System (PLT-F) Depends on the Staining Property of Its Reagents. PLOS ONE; 10(10).
- [6] **Tantanate C (2015):** Spuriously high platelet counts by various automated hematology analysers in a patient with disseminated intravascular coagulation. Clin Chem Lab Med; 53(10):e257-9.