

Sysmex Educational Enhancement & Development

Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex

Bulletin d'information SEED-Afrique | No 10 | 2011

L'analyse automatisée des liquides corporels dans les laboratoires d'hématologie

Analyse automatisée des liquides corporels

Ce bulletin d'information vise à vous présenter le concept de changement d'analyse de liquides corporels, pour abandonner la méthode manuelle actuelle, qui ressort habituellement du domaine des laboratoires de microbiologie, et être incorporée dans le flux de travail quotidien des analyseurs d'hématologie automatisés.

Mots-clés:

Liquides corporels, LCR, automatisation, XT-4000i, XE-5000

Qu'appelle-t-on « liquides corporels » ?

Les liquides corporels peuvent être définis comme toute substance liquide produite par le corps humain. Les liquides corporels peuvent être répartis en trois grandes catégories : normaux, pathologiques et iatrogènes (tableau 1). Les liquides corporels normaux sont toujours présents et jouent un rôle intégral dans la fonction biologique normale du corps humain. Les liquides corporels pathologiques sont produits en réponse à un processus pathologique sous-jacent tel une infection, une inflammation, un traumatisme ou un cancer. Ils s'accumulent généralement dans les cavités corporelles normalement « sèches » ou contenant une quantité minimale de liquide non censé s'accumuler. On les trouve encore dans les tissus anormaux comme les kystes ou les abcès. Les liquides corporels iatrogènes sont provoqués par l'insertion délibérée par le médecin de liquide dans une cavité corporelle, à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Le liquide iatrogène le plus courant est le liquide de dialyse

péritonéale. Les patients présentant une insuffisance rénale ont besoin d'un « rein de substitution » pour éliminer les déchets habituellement évacués par les reins. Si l'hémodialyse est impossible, la cavité abdominale est remplie de liquide de dialyse qu'on laisse en place pendant plusieurs heures avant de l'évacuer. Cette technique s'appelle la dialyse péritonéale ambulatoire continue (DPAC).

Un autre exemple : au cours du lavage broncho-alvéolaire (BAL), un liquide est introduit dans les poumons par bronchoscope et ensuite aspiré. Le BAL est généralement utilisé pour rechercher des cellules tumorales.

En ce qui concerne le diagnostic médical, le concept de « liquides corporels » se limite généralement aux liquides susceptibles d'être envoyés à un laboratoire d'analyses pour faciliter le diagnostic médical.

Tableau 1 Exemples de liquides corporels humains

Normal	Pathologique	Iatrogène
Sang	Liquide pleural (cage thoracique)	Liquide de dialyse péritonéale
Urine	Liquide d'ascite (cavité abdominale)	Lavage broncho-alvéolaire
Sperme	Liquide péricardique (autour du cœur)	
Liquide céphalo-rachidien		
Liquide synovial (espace articulaire)		

a) Sang

Le sang est très simple à prélever, c'est pourquoi il est très souvent utilisé pour refléter le fonctionnement du corps, notamment pour confirmer son bon fonctionnement ou identifier une pathologie. Le sang est le « liquide corporel » le plus important et le plus souvent testé, utilisé pour confirmer un diagnostic et surveiller la réponse à un traitement. En raison de la fréquence des examens, il existe de nombreux analyseurs spécifiques. Le sang n'est donc pas considéré comme faisant partie de l'analyse traditionnelle de liquides corporels.

b) Urine

L'urine est le deuxième « liquide corporel » le plus couramment testé et est généralement utilisée pour confirmer une infection et identifier une pathologie rénale. Des analyseurs automatiques spécifiques ont été mis au point pour l'urine, en raison de la fréquence des examens urinaires et de la demande unique d'identification des cylindres urinaires. L'urine n'est donc pas considérée comme faisant partie de l'analyse traditionnelle de liquides corporels.

c) Sperme

La principale raison amenant à évaluer le sperme est l'évaluation de la fertilité. On se concentre ici sur la mobilité des spermatozoïdes, leur morphologie et leur composition chimique. Cela nécessite une évaluation hautement qualifiée et une étude fonctionnelle qui dépasse l'analyse classique de liquides corporels.

L'analyse des liquides corporels, dans le contexte des diagnostics laboratoires, se limite donc aux liquides indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 Liquides corporels regroupés sous le terme générique d'analyse des liquides corporels

Liquide céphalo-rachidien
Liquide synovial
Liquide pleural
Liquide d'ascite
Liquide péricardique
Liquide DPAC

Comment les liquides corporels sont-ils prélevés ?

Le recueil est une procédure invasive, quel que soit le liquide corporel. Il subsiste toujours un risque de ponction traumatique, susceptible de provoquer une hémorragie et de nécessiter un acte chirurgical pour l'endiguer. Le prélèvement doit toujours s'effectuer dans des conditions stériles car

il existe un risque d'introduction d'une infection dans ce qui est habituellement une cavité stérile. Le prélèvement de liquide corporel peut être apparenté à une intervention chirurgicale mineure. Tous les échantillons doivent donc être traités avec précaution, afin d'éviter des prélèvements répétés dus à une manipulation peu soignée.

Pourquoi les liquides corporels sont-ils analysés ?

Les examens laboratoires servent à répondre à l'une des questions élémentaires suivantes :

- Quel est le problème du patient ? - pour poser un diagnostic
- Va-t-il mieux ? – par ex. pour contrôler la réponse à un traitement

L'objectif primaire de l'analyse des liquides corporels est de faire la distinction entre infection, inflammation (réaction) et malignité. Les premiers examens pratiqués sur tous les liquides corporels sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 Premiers examens sur les liquides corporels

Numération cellulaire	Numération des globules blancs plus différentielle
Morphologie	Numération des globules rouges
Microbiologie	Microscopie
Biochimie	Coloration de Gram
	Culture
	Glucose
	Protéines

L'analyse automatisée des liquides corporels, le sujet de ce bulletin d'information, concerne la numération des cellules et la morphologie, les deux éléments les plus longs du travail d'analyse classique.

Les questions auxquelles les médecins cherchent les réponses sont assez prévisibles pour chaque type de liquide corporel.

a) Liquide céphalo-rachidien (LCR)

Le LCR est un liquide dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière, qui absorbe les chocs, leur apporte des nutriments et élimine les déchets. Les membranes couvrant le cerveau et la moelle épinière sont appelées méninges.

L'infection des méninges engendre une affection très grave, appelée méningite, mettant en jeu le pronostic vital. La présence d'une infection peut être détectée grâce à la modification de la composition du LCR. Une méningite sera suspectée chez un patient présentant des maux de tête soudains, de la fièvre, un état mental altéré et une photophobie alors qu'il allait bien récemment. La réponse à la question « Ce patient a-t-il une méningite ? » se trouve dans l'augmentation des leucocytes (adultes $>5-10$ cellules/ μL ; enfants $>10-30$ cellules/ μL). Une numération cellulaire précise à très faibles concentrations est donc capitale, notamment si l'on considère qu'un patient présentant une leucopénie sévère (leucocytes $\sim 0,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ dans le sang total) a une numération des leucocytes 50 fois plus élevée que la valeur limite dans le LCR utilisée pour diagnostiquer la méningite. Les autres causes d'élévation de la numération leucocytaire peuvent être une leucémie/un lymphome avec atteinte du SNC et autres troubles neurologiques. Ce dernier groupe de maladies se différencie généralement par une durée plus longue des signes et symptômes. La méningite peut être bactérienne, virale, fongique ou tuberculeuse. Une méningite bactérienne aiguë est une urgence médicale car elle peut rapidement entraîner la mort. Pour répondre à la question « Est-ce une méningite bactérienne aiguë ? », il convient d'effectuer une numération différentielle des leucocytes et de dégager une prédominance de neutrophiles (cellules polymorphonucléaires). Toutes les autres affections avec une numération leucocytaire élevée présentent une prédominance de lymphocytes (cellules mononucléaires).

La numération des globules rouges est principalement utilisée pour déterminer si l'élévation de la numération leucocytaire est due à une contamination par sang périphérique. Une ponction lombaire difficile peut provoquer une ponction hémorragique. Cela se voit facilement car le LCR devient limpide dans les tubes pour séquentiels lors du prélèvement. Dans le cas d'un saignement intracrânien (hémorragie arachnoïde), le LCR ne devient pas limpide. L'analyse de la morphologie est généralement requise pour les cas suspectés de leucémies et de lymphomes, pour confirmer une atteinte du système nerveux central. Le cas échéant, l'analyse du LCR est utilisée pour surveiller la réponse au traitement. La coloration à Gram est utilisée pour confirmer la présence et la nature de la bactérie.

b) Liquide pleural et liquide d'ascite

L'accumulation de liquides dans les cavités thoracique et abdominale n'est jamais normale. Le liquide dans la poitrine s'appelle le liquide pleural car les membranes tapissant la cavité thoracique constituent la « plèvre ». Le liquide dans l'abdomen est généralement appelé liquide d'ascite ou encore parfois liquide péritonéal (du nom « péritoine

» désignant la membrane tapissant la cavité abdominale). Les causes fréquentes d'épanchement pleural et d'ascite sont l'insuffisance cardiaque congestive et l'insuffisance hépatique avec hypertension portale (ascite généralement). Généralement, aucune analyse n'est effectuée car les raisons en sont évidentes, tout comme pour les hémothorax (sang dans la poitrine) provoqués par un traumatisme et les hémopéritonées (sang dans l'abdomen). Il peut s'agir également d'ascite maligne ou d'infection, notamment la tuberculose (TB). Dans le cas d'une suspicion de malignité, les échantillons de liquide pleural ou d'ascite ne sont pas transmis pour des analyses classiques de liquides corporels (décompte des cellules et microscopie) mais sont généralement directement envoyés dans le service de cytologie pour rechercher les cellules malignes. En cas de soupçon de tuberculose, les échantillons sont habituellement envoyés directement en culture TB ou en coloration de Ziehl-Nielsen. C'est seulement si une infection sévère est suspectée, ce qui est généralement parallèle à une autre cause d'ascite chronique ou d'épanchement pleural, que les échantillons sont envoyés pour des analyses classiques. Les principales questions auxquelles les médecins cherchent des réponses lorsqu'ils envoient le liquide pleural et le liquide d'ascite à un laboratoire sont les suivantes : « Ce liquide est-il d'origine maligne ? » ou encore « Ce patient a-t-il la tuberculose ? ».

c) Liquide synovial

Le liquide synovial désigne du liquide entre les articulations. Son rôle primaire est la lubrification et il n'est habituellement présent qu'en quantités infimes, inaccessibles à l'aspiration. Le liquide synovial s'accumule toutefois en cas de septicémie, d'inflammation et de traumatisme. Le gonflement post-traumatique des articulations est habituellement provoqué par une accumulation de sang qui devient visible à l'aspiration et ne nécessite généralement pas d'autres interventions de laboratoires. La première question que les médecins ont en tête lorsqu'ils envoient le liquide synovial pour analyse est « Quelle est la cause de l'arthrite ? » et leur diagnostic différentiel comprend une septicémie aiguë (augmentation du nombre de cellules polymorphonucléaires) ou inflammation (augmentation des cellules mononucléaires).

d) Liquide de dialyse péritonéale ambulatoire continue

Les patients sous dialyse péritonéale présentent un risque élevé d'infection parce que la barrière naturelle de la cavité abdominale est constamment violée. Le dialysat péritonéal est régulièrement contrôlé à la recherche de signes d'infection en effectuant une numération leucocytaire ou des numérations différentielles. Le développement d'une

péritonite aiguë chez un patient atteint d'insuffisance rénale chronique est très grave car la survie de ce type de patients dépend de la dialyse. Dans la plupart des cas, ils sont sous dialyse péritonéale car pour une quelconque raison, l'hémodialyse n'est pas une option thérapeutique possible en premier lieu. La première question ici est donc « Y a-t-il un signe d'infection bactérienne évolutive ? »

e) Liquide péricardique

Le cœur est englobé dans un sac constitué d'une membrane très solide appelée péricarde. Comme pour presque toutes les autres cavités corporelles, une accumulation de liquide dans le péricarde est anormale. Le liquide péricardique est très rarement recueilli parce que la cause est souvent évidente et c'est une procédure dangereuse. Le liquide péricardique n'est donc pas souvent envoyé au laboratoire pour analyse.

Comment les liquides corporels sont-ils mesurés ?

Cette section se limite à la numération et la morphologie car la culture et la biochimie sont des examens spécialisés à part entière.

a) Méthode manuelle

La numération des cellules des liquides corporels a traditionnellement toujours été effectuée à l'aide d'un microscope. Cela nécessite un traitement préanalytique dépendant du type d'échantillon. La préparation préanalytique est encombrante, laborieuse et source d'erreurs, notamment parce qu'elle est influencée par la précision des pipettes. La procédure de numération en elle-même nécessite une chambre de comptage spéciale et un microscopiste qualifié qui sait compter les cellules à l'aide de la grille de comptage. L'approche dépend de la numération cellulaire estimée et de l'étendue de la présence des hématies. Le décompte cellulaire rapporté est une valeur calculée qui dépend du nombre et du type de carrés comptés, ainsi que du facteur de dilution le cas échéant. La procédure nécessite des microscopistes hautement qualifiés disponibles jour et nuit, notamment pour les examens urgents du LCR. La numération différentielle manuelle doit être effectuée sur une lame colorée par Cytospin car cette technique concentre les cellules. Le frottis classique utilisé pour les analyses de sang périphérique ne convient pas aux analyses de liquide corporel. Dans la pratique, la plupart des laboratoires essaie d'effectuer une numération différentielle sur l'échantillon non coloré, en même temps que la numération cellulaire. Ceux qui pratiquent cette numération et colorent les frottis ne font généralement qu'un différentiel en 2 parties : cellules mononucléaires et cellules

polymorphonucléaires. Très peu de laboratoires effectuent véritablement une numération différentielle complète et des rapports sur la morphologie générale à l'aide de l'approche par Cytospin recommandée, car la plupart n'ont ni la centrifugeuse Cytospin ni le personnel qualifié requis pour le faire efficacement.

Les limites à la numération manuelle des cellules de liquides corporels sont nombreuses mais peuvent se résumer ainsi :

- Laborieux
- La précision des résultats dépend de la qualification des opérateurs
- Large variabilité des résultats donnant un faible % de CV
- Nécessite une préparation préanalytique, est longue et source d'erreurs
- Nécessite un dosage par pipettes très précis pour les étapes de dilution
- Exige de bonnes connaissances du travail en chambre de comptage
 - Les utilisateurs doivent savoir laquelle ils utilisent pour procéder à des réglages de la profondeur de chambre et obtenir des comptes précis
 - Doit être remplie correctement
 - Tout retard d'évaluation augmentera l'imprécision
 - Doit comprendre les zones de comptage et les calculs nécessaires

Les limites à la numération différentielle manuelle des liquides corporels et à l'examen morphologique dans la pratique peuvent se résumer ainsi :

- Les numérations par Cytospin sont rares
- Les frottis sont rarement représentatifs
- Les cellules apparaissent différemment dans les liquides corporels et dans le sang. Seul un technicien qualifié peut faire la différence.
- Les techniciens inexpérimentés ratent souvent les cellules malignes
- N'aboutit généralement qu'à une numération différentielle en 2 parties
- En pratique, cela ne donne pas une analyse morphologique appropriée

Tableau 4 Avantages de l'analyse automatisée des liquides corporels par rapport à la méthode manuelle

Analyse automatisée	Méthode manuelle
Aucune préparation préanalytique d'échantillon requise	Pas de normes
Possibilité de contrôle qualité	Pas de contrôle qualité possible
Ne dépend pas du technicien	Dépend beaucoup du technicien et est donc source d'erreurs
Bien plus précis pour les numérations très faibles et très élevées	Encombrante
Rapide	Relativement long

b) Analyse automatisée des liquides corporels

La numération cellulaire automatisée dans le sang périphérique est une pratique courante en médecine de laboratoire depuis maintenant plusieurs décennies. Non seulement, la numération cellulaire automatisée est beaucoup plus rapide mais elle est également nettement plus précise car elle permet de dénombrer bien plus de cellules qu'à l'aide d'une chambre de comptage et d'un microscope. La vitesse et la précision de l'analyse font de l'analyse automatisée des liquides corporels un choix plus judicieux, notamment pour les laboratoires ayant peu de moyens. Le tableau 4 souligne les avantages de l'analyse automatisée des liquides corporels par rapport à la méthode manuelle qui est encore considérée comme la méthode de référence. La seule limite possible à l'analyse automatique est l'impossibilité de pratiquer une analyse morphologique directe en présence d'indices ou signes évoquant des cellules anormales.

Directives du CLSI sur l'analyse des liquides corporels

Le Clinical Laboratory Standards Institute a publié un guide sur l'« Analyse des liquides corporels pour la composition cellulaire » (H56-A (2006)). Le document n'est pas un règlement à caractère obligatoire mais plutôt une déclaration de consensus issue des témoignages de la communauté médicale dans son ensemble offrant des directives pour effectuer au mieux les tests laboratoires. Il ne fait aucune référence à la préférence pour la méthode manuelle ni à la méthode de référence. Il souligne plutôt comment les liquides corporels devraient être analysés et rapportés en fonction de la méthode choisie, qu'elle soit manuelle ou automatisée. Il est intéressant de noter que très peu de laboratoires, voire aucun, respectent vraiment la procédure de méthode manuelle décrite dans le document de directives CLSI. À l'inverse, la numération automatisée des liquides corporels disponible sur les



Figure 1 L'analyseur d'hématologie Sysmex XT-4000i avec son mode spécial pour liquides corporels.

analyseurs d'hématologie Sysmex est en adéquation avec ce guide.

Analyse automatisée des liquides corporels Sysmex

Basé sur l'avantage clinique majeur obtenu par un décompte précis des cellules dans le même temps que la numération-formule sanguine (NFS), les analyseurs d'hématologie Sysmex XE-5000 et XT-4000i. Les principes de mesure se fondent sur la même technologie dernière utilisée pour les tests du LCR, dont la cytométrie en flux pour la numération différentielle. L'avantage principal que présentent les analyseurs Sysmex sur leurs concurrents est que l'analyse des liquides corporels possède un mode spécifique qui permet de régler la fourchette d'analyses pour l'adapter avec précision à ces numérations cellulaires très basses, si importantes pour diagnostiquer avec précision une méningite. Le seuil inférieur de détection des leucocytes sur l'analyseur Sysmex est zéro, tandis que sur d'autres analyseurs il peut atteindre 50 cellules/ μ L ce qui n'a aucun intérêt puisque la limite chez les adultes est de 10 cellules/ μ L. La faible quantité de volume d'échantillon nécessaire

est également un autre avantage par rapport aux produits de la concurrence (ex : 85 μ L sur le XT-4000i contre 300 μ L sur les machines concurrentielles). L'analyse de liquides corporels Sysmex est approuvée pour une large gamme de liquides corporels (LCR, liquide pleural, liquide d'ascite, liquide synovial, liquide CAPD), tandis que les analyseurs de la concurrence traitent uniquement des échantillons de LCR.

Voici les avantages de l'analyse automatisée des liquides corporels Sysmex :

- Inclusion de numération cellulaire hautement fluorescente représentant des cellules tumorales non hématopoïétiques et des macrophages. Leur présence doit entraîner un examen microscopique manuel.
- Ne dépend pas du technicien, aucune formation ou compétence spécifique requise
- Rapide et entièrement automatisée (pas d'étapes de préparation manuelle)
- Très rapide – 38 échantillons par heure
- Disponible 24h/24
- Le matériel de contrôle qualité spécifique aux liquides corporels est disponible.
- Précision excellente à faibles concentrations ~ numération leucocytaire 10 cellules/ μ L, essentiel pour l'analyse du LCR

Quels sont les défis à relever pour passer d'une analyse des liquides corporels manuelle à une analyse automatisée ?

La plus grosse difficulté dans l'intégration de l'analyse automatisée des liquides corporels est que l'analyse de liquides corporels classique s'effectue en laboratoire de microbiologie, tandis que la numération cellulaire automatisée pour les liquides corporels est une fonction disponible sur les analyseurs qui seront principalement utilisés pour l'analyse du LCR prise en charge par les laboratoires d'hématologie. Il est toujours préférable d'envisager ces situations en gardant l'intérêt du patient à l'esprit. Le plus gros avantage est pour le laboratoire : il pourra fournir une numération leucocytaire précise et une

numération différentielle en quelques minutes à partir d'échantillons de LCR et ainsi identifier rapidement les patients atteints de méningite bactérienne aiguë afin que leurs soins soient prioritaires et qu'un traitement salvateur soit initié. L'approche devra toujours être une approche de coopération entre deux disciplines traditionnelles distinctes de médecine laboratoire. L'analyse automatisée des liquides corporels présente de nombreux avantages par rapport au comptage manuel mais ne le remplacera jamais totalement. Des cas spéciaux nécessiteront toujours une étude au microscope, soit par microbiologie pour rechercher des cristaux, soit par cytologie pour rechercher des cellules malignes. Il est préférable de considérer la solution automatisée pour liquides corporels comme une méthode de premier tri pour une numération rapide, suivie d'une analyse manuelle pour certains cas précis. Toutefois, il n'y a pas de différences pour les échantillons d'hématologie. Il y en aura toujours quelques uns qui nécessiteront une analyse manuelle au microscope. L'analyse automatique prendra en charge la plus grande partie des besoins de travail manuel et libèrera ainsi du personnel qui pourra concentrer son attention sur les cas ayant besoin d'un examen approfondi.

À retenir

L'analyse automatisée de liquides corporels Sysmex offrira aux laboratoires surmenés, tout comme à ceux de plus petite taille où le personnel qualifié n'est pas toujours disponible 24h/24 une excellente solution pour pallier la charge de travail et la lenteur de la numération cellulaire manuelle par microscope actuelle, largement utilisée pour les liquides corporels. Il est clairement admis que la méthode manuelle présente un taux d'imprécision nettement plus élevée que la numération cellulaire automatisée, fait tiré de nombreuses études médicales où les méthodes manuelles étaient appliquées dans le strict respect des recommandations. Il est donc hautement probable que la précision de la méthode manuelle dans la pratique quotidienne soit bien pire et remette en cause la valeur clinique des résultats. À l'inverse, la méthode automatisée présente une excellente précision, ne dépend pas d'un technicien et est très rapide, ce qui peut avoir des répercussions cruciales sur la prise en charge du patient.

Compilé par
Dr Marion Münster

