

SEED Hématologie

Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex
Juillet 2014

Rôle du frottis sanguin périphérique en laboratoire d'hématologie moderne

Ce bulletin d'information a pour objectif de proposer une vision d'ensemble du rôle du frottis sanguin périphérique, de l'importance de réaliser un frottis ainsi qu'un prélèvement de bonne qualité et de la comparaison entre formule sanguine manuelle et automatisée.

Mots clés :

Sysmex, NFS, frottis sanguin périphérique, formule sanguine manuelle, monocyte, paludisme, RAL Stainer, Sysmex Hemoslider, formule sanguine automatisée

Numération cellulaire automatisée en hématologie

La pratique en laboratoire d'hématologie a beaucoup évolué au cours des dernières décennies, la numération formule sanguine (NFS) par analyseur automatisé ayant totalement remplacé les méthodes manuelles, portant sur un paramètre à la fois. Les laboratoires ont pour la plupart abandonné la revue systématique des lames au microscope, notamment pour la formule leucocytaire. Ceci s'explique par une précision et une justesse améliorées de la numération cellulaire automatisée par rapport aux méthodes manuelles traditionnelles. En outre, on admet que la supériorité de la formule sanguine automatisée se limite aux leucocytes matures bien caractérisés, tandis que la microscopie manuelle s'avère mieux adaptée pour différencier les cellules plus immatures et anormales. Ainsi, en plus des données quantitatives, les analyseurs fournissent des informations qualitatives sous formes de « flags », qui alertent l'opérateur de possibles résultats erronés en raison d'interférences ou de la présence de cellules anormales. Au vu de cela, seule une revue manuelle sélective du frottis sanguin est nécessaire, sur la base de données quantitatives anormales et de flags. Tandis que la NFS est acceptée sans être remise en question, la confirmation automatique de la formule sanguine par examen au microscope tient lieu de réflexe dans de nombreux établissements.

Le frottis sanguin périphérique manuel

Alors que la formule sanguine manuelle est généralement considérée plus fiable que celle générée par un analyseur sur des échantillons pathologiques, cette assertion se confirme uniquement dans des conditions très strictes.

La formule sanguine manuelle est réalisée par examen visuel d'un frottis sanguin coloré, en utilisant un microscope optique. Un frottis frais et bien préparé est crucial pour l'évaluation précise de la morphologie cellulaire. Les éléments contribuant au résultat final sont multiples : la qualité du frottis, la qualité de la coloration, la qualité du microscope, ainsi que l'expérience et les compétences de l'opérateur.

a) La préparation du frottis sanguin

Le frottis périphérique doit être correctement préparé. Les frottis sont généralement réalisés par étalement en couche mince. On produit un frottis manuellement en plaçant une goutte de sang sur la face d'une lame de verre, puis en l'étalant rapidement en faisant glisser une seconde lame ou un étaleur sur la première lame, selon un angle défini. Un frottis périphérique bien préparé est épais (les érythrocytes se chevauchent) sur son extrémité dépolie et devient progressivement plus fin avec une

bonne séparation des cellules vers l'extrémité opposée. La « zone d'observation », où l'épaisseur est optimale pour un examen au microscope optique, doit s'étendre sur au moins 2 cm de long. Le frottis doit se trouver au centre de la lame, sans espace aux bords.

La réalisation d'un frottis de qualité impose de la pratique. Le frottis sanguin ne doit pas être trop fin ni trop épais et sa queue doit être lisse. La qualité d'un frottis est affectée par trois facteurs ; la vitesse d'exécution, l'angle de réalisation et la taille de la gouttelette.

- Plus la lame étaleuse est glissée rapidement, plus le frottis sera long et fin. Plus la lame étaleuse est glissée lentement, plus le frottis sera court et épais.
- Un angle supérieur à 30° produit un frottis plus épais ; un angle inférieur à 30° permet d'obtenir un frottis plus fin.
- Une petite goutte de sang peut se révéler insuffisante pour obtenir une longueur adéquate; une goutte trop volumineuse peut former un frottis de taille supérieure à celle de la lame.

La viscosité du sang (hématocrite), qui peut fortement varier d'un patient à l'autre, affectera également les propriétés du frottis. Le sang d'un patient anémique présentera une viscosité inférieure et le frottis sera trop fin si on n'augmente pas l'angle. L'inverse est également vrai dans le cas de patients atteints de polycythémie.

Les frottis sanguins trop fins ou trop épais posent problème. Dans le cas de frottis extrêmement fins (en raison d'une goutte trop petite, d'un étalement trop lent ou d'un angle d'étaleur trop faible), les érythrocytes peuvent ressembler à des sphérocytes, avec un nombre accru de leucocytes dans la queue, tels que des monocytes et des neutrophiles. Il en résultera une formule incorrecte. Dans le cas de frottis extrêmement épais, la zone de numération sera trop réduite. Au moins dix champs faibles, dans lesquels cinquante pourcent des érythrocytes ne se chevauchent pas, sont nécessaires pour obtenir une formule précise. Les frottis sanguins présentant une queue de taille excessive ou des extrémités granuleuses indiquent un bord d'étaleur sale ou rugueux ou une accumulation de leucocytes due à un étalement lent ou à un nombre élevé de leucocytes.

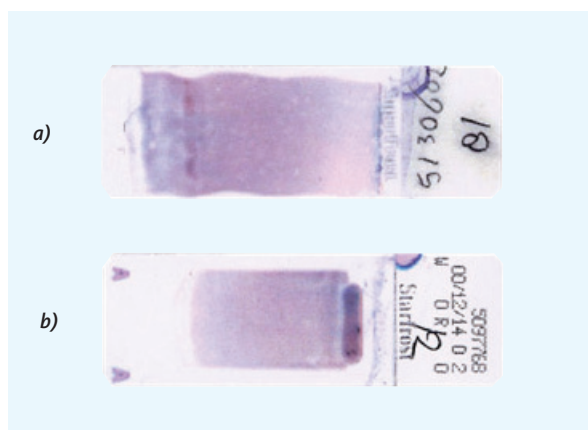


Fig. 1 a) Frottis sanguin périphérique manuel de mauvaise qualité et b) Frottis automatisé de bonne qualité

b) La coloration du frottis sanguin

Le frottis sanguin périphérique doit être coloré de sorte à accentuer les détails cytoplasmiques et nucléaires des différents types de cellules. Les colorations selon la méthode de Romanowsky et ses dérivés tels que Wright, Wright-Giemsa et May-Grünwald Giemsa sont universellement adoptées en hématologie. Une coloration selon la méthode de Romanowsky est une combinaison de colorations se composant d'éosine avec du bleu de méthylène et / ou un de ses produits d'oxydation. Au microscope, ces colorations font apparaître les cellules dans une palette de bleu, magenta et rose typique. Voir tableau 1.

Tableau 1: Coloration des éléments cellulaires en réaction à la méthode de Romanowsky

	Élément cellulaire	Couleur
Noyau	Chromatine	Magenta
	Nucléoles	Bleu clair
Cytoplasme	Érythrocyte	Rose foncé
	Réticulocyte	Gris-bleu
	Lymphocyte	Bleu
	Monocyte	Gris-bleu
	Neutrophile	Rose
	Éosinophile	Rose
	Basophile	Bleu
Granulations	Neutrophile (granulation toxique)	Magenta (bleu foncé)
	Éosinophile	Rouge orangé
	Basophile	Noir-magenta
	Plaquette	Magenta
Inclusions	Parasite du paludisme	Magenta

D'après Dacie and Lewis, Practical Haematology¹

i. D'après Dacie and Lewis, Practical Haematology¹

Le mécanisme par lequel certains éléments structurels d'une cellule se teintent avec un colorant défini tandis que d'autres structures similaires n'y répondent pas, mais se teintent avec d'autres colorants, dépend de différences complexes entre les colorants, de leurs interactions ainsi que de leur pH et du micro-environnement cellulaire. Les structures acides absorbent le colorant de base, le bleu de méthylène, qui, comme son nom l'indique, est de couleur bleue. À l'inverse, les structures basiques ou alcalines se lient aux colorants acides, dans ce cas l'éosine qui est rose. Un moyen technique simple consiste à considérer la couleur rose intense des granules d'éosinophile et la couleur magenta intense des granules de basophiles. Le terme « éosinophile » se rapporte à une ressemblance ou à une attraction à l'éosine (le colorant rose) et « basophile » désigne l'attraction au colorant de base ou bleu.

L'alcool méthylique est utilisé à la fois en tant que solvant et agent de fixation, et constitue un élément de la méthode de coloration de Romanowsky.

ii. Facteurs induisant des erreurs de coloration

De nombreux facteurs peuvent causer des défauts de coloration des lames. Ceci peut se manifester par une lame trop foncée ou trop claire, trop bleue ou trop rose, des granulations peuvent sembler trop foncées ou sont manquantes, le fond peut apparaître bleu ou des dépôts de colorants peuvent être présents. Différentes structures cellulaires présentent différentes affinités à des colorants variés – l'ADN se lie rapidement, l'ARN reste en retrait et l'hémoglobine est l'élément le plus lent. Une synchronisation correcte est donc cruciale pour un résultat de bonne qualité. Disposer des différents éléments de coloration selon les bonnes proportions est également crucial, en raison de des interactions présentées. Cet aspect variable disparaît avec les colorations disponibles dans le commerce, mais est une source d'erreur courante avec les colorants « faits maison ». Comme nous l'avons déjà mentionné, le pH de la solution de coloration joue un rôle

déterminant. Un pH compris entre 6,8 et 7,2 est généralement recommandé. Une autre cause fréquente d'erreurs repose sur l'usage excessif de colorants, sur une température ambiante élevée provoquant une évaporation et des contaminations par des bactéries et autres débris.

Préparation et coloration automatisées de lames

Même si le personnel de laboratoire suit des directives strictes pour la préparation et la coloration, il est possible de produire des frottis de mauvaise qualité, probablement susceptible de générer des interprétations erronées des observations au microscope, avec des conséquences potentiellement graves pour la prise en charge des patients.

Conformément aux principes définis par les bonnes pratiques de laboratoire, des procédures de préparation et de coloration des lames normalisées garantiront des frottis de sang périphérique de bonne qualité. La meilleure forme de normalisation consiste en l'automatisation. Dans la plupart des cas, les laboratoires équipés d'une forme d'automatisation limitent cette dernière à l'étape de coloration. Les systèmes de coloration automatisés sont généralement des systèmes dits « ouverts », permettant l'emploi de tous types de colorants, notamment des préparations « maison » ainsi, seule la durée de coloration est contrôlée et la probabilité d'obtenir une coloration de mauvaise qualité du fait d'une surconsommation de colorant ou d'erreur dans les ingrédients n'est pas exclue. En outre, dans le cas où l'automate de coloration est alimenté en frottis préparés manuellement, la qualité du résultat n'est pas garantie.

Par ailleurs le système entièrement automatique de préparation et de coloration de lames, Sysmex SP-1000i, ne se révèle rentable que pour les laboratoires réalisant un grand nombre d'analyses. Pour cela,

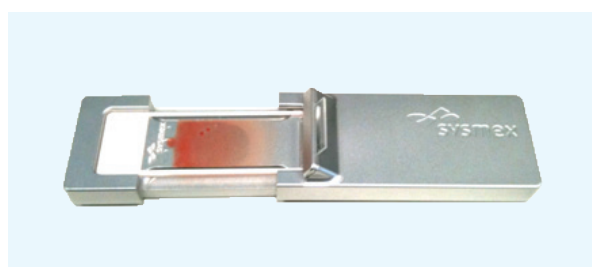


Fig. 2 Le Sysmex Hemoslider®

Sysmex, en partenariat avec RAL Diagnostics, propose à présent une solution plus adaptée destinée aux laboratoires de taille plus réduite.

a) Le Sysmex Hemoslider

Il s'agit d'un petit système portable, de structure solide, permettant un étalement normalisé des frottis. Il est simple d'utilisation, se nettoie aisément et est équipé de lames d'étalement remplaçables. Une petite goutte de sang est placée sur une extrémité de la lame avant que l'étaleur ne soit glissé d'un bout à l'autre. On obtient alors un frottis bien préparé, de qualité constante avec une répartition homogène des cellules. (Fig. 2)



Fig. 3 Le RAL stainer

b) Le RAL Stainer

Le RAL Stainer est un automate de coloration simple d'utilisation (Fig. 3). Les réactifs sont conditionnés dans des bacs scellés, munis d'une puce RFID pour éviter toute utilisation du réactif au-delà de la date limite d'utilisation et tout excès, problème récurrent avec les procédés « ouverts ». Les protocoles de coloration ont été optimisés pour les frottis sanguins périphériques préparés avec l'Hemoslider. Les sources d'erreurs déjà

mentionnées ici peuvent toutes être éliminées en combinant Hemoslider et RAL Stainer. L'analyseur permet un chargement et un déchargement en continu, en laissant la possibilité d'insérer une lame urgente à tout moment. Avantages non négligeables, l'ensemble ne nécessite aucune maintenance et, du point de vue de la sécurité et des questions environnementales, les colorants sont dépourvus de méthanol.

L'automate de coloration dispose d'un protocole de coloration des lames de moelle osseuse et de dépistage du paludisme. Une version semi-automatique de ce système sera bientôt disponible : elle impliquera un déplacement manuel du panier à lames d'une station de coloration à la suivante à chaque avertissement émis par le minuteur de l'analyseur. Ce minuteur est ajusté automatiquement au protocole de coloration choisi.

Examen au microscope du frottis sanguin périphérique

Outre la qualité du frottis et du colorant, un résultat optimal impose un microscope bien entretenu et un utilisateur qualifié.

Comme pour tous les équipements de laboratoire, le microscope requiert un entretien régulier. Les climats chauds et humides constituent des défis particuliers : si aucune précaution n'est prise dans ce sens, des moisissures se développeront et endommageront les optiques, ce qui rendra par conséquent le microscope inutilisable. Dans les climats chauds et secs par contre, le problème vient de la poussière.

Le microscope doit être paramétré correctement pour obtenir une illumination ajustée et éliminer tout artefact de réfraction qui pourrait être interprété par erreur comme une inclusion cellulaire.

Formule sanguine automatisée ou manuelle

Nous vous invitons à vous reporter au SEED N° 5

2011 pour une description technique détaillée des procédés de numération et de différenciation des sous-populations de leucocytes.

Lorsque l'opérateur obtient une formule sanguine automatisée, qu'il compare ensuite à une formule sanguine manuelle, il sera en mesure de relever des différences. Dans ce cas, le personnel de laboratoire a généralement tendance à remettre en question la précision de la formule automatisée.

Il est important de noter que l'attribution de la méthode de référence à la formule sanguine manuelle se fait d'après les directives du CLSI, stipulant une numération de 800 corps cellulaires (2 opérateurs comptent 200 corps cellulaires chacun sur deux frottis différents), et non l'habituelle numération de 100 corps cellulaires par un seul opérateur sur un seul frottis.

Par ailleurs les automates d'analyse comptabilisent bien plus d'événements. Par exemple, un analyseur Sysmex générera une formule sanguine leucocytaire d'environ 10 000 cellules, contre à peine 100 avec la méthode manuelle standard. Les différences peuvent se révéler substantielles, et ce pour différentes raisons.

a) Répartition inégale des cellules dans un frottis

Malheureusement, la répartition des cellules n'est pas le fruit du hasard, même dans un frottis parfaitement préparé. En règle générale, les neutrophiles et les monocytes ont tendance à s'accumuler sur les bords du frottis, et les lymphocytes au centre. Ce problème se trouve accentué si le frottis est trop fin ou si le bord de l'étaleur est rugueux.

Avec la numération cellulaire automatisée, les cellules sont en suspension et chaque cellule dans l'aliquot d'échantillon est comptabilisée.

b) Sélection et exclusion cellulaires anormales

C'est humain : lorsque nous étudions la lame en quête d'une « bonne zone de numération », nous nous arrêtons sur toute cellule inhabituelle et utilisons cette zone comme point de départ. Conséquence à cela, le pourcentage de cellules anormales peut être surestimé. De même, il n'est pas rare de simplement exclure des cellules dont la morphologie est difficile à catégoriser. L'analyseur identifie et catégorise à son tour chaque cellule.

En général, les monocytes semblent être les éléments présentant le plus souvent des résultats de numération divergents, selon la méthode utilisée. Les raisons en sont multiples. Tout d'abord, les monocytes ont tendance à s'accumuler dans la queue du frottis, qui par définition n'est pas une zone de numération. Ensuite, la morphologie des monocytes peut être difficile à distinguer de celle des lymphocytes activés, c'est pourquoi ils sont souvent « exclus » des 100 corps cellulaires intégrés à la numération. En troisième lieu, plus le sang est ancien avant la préparation du frottis, plus la désintégration cellulaire est importante et plus il sera difficile d'identifier notamment les monocytes. Les éosinophiles et les basophiles, bien que relativement peu courants, sont plus caractéristiques et restent ainsi plus facilement identifiables. Enfin, les monocytes constituent une population cellulaire minoritaire : toute différence même minime dans les caractéristiques ci-dessus sera accentuée. Ainsi, la numération automatisée des monocytes est en règle générale supérieure à la numération manuelle. Ces différences s'en trouveraient réduites si les laboratoires se conformaient aux recommandations du CLSI stipulant une numération de 800 corps cellulaires, mais ceci n'est évidemment pas pratique, même dans le plus pointilleux des laboratoires.

En admettant la nature peu fiable de la numération manuelle des monocytes, la numération par cytométrie de flux s'appuyant sur des anticorps monoclonaux CD45 et CD14 marqués par fluorescence a été suggérée en tant que nouvelle méthode de référence pour la numération des monocytes. Cette méthode a montré une bonne corrélation avec la numération automatisée.²

Plages de référence pour les formules sanguines automatisées et manuelles

Pour surmonter les différences apparentes entre les formules sanguines automatisées et manuelles en général et les numérations automatisées et manuelles des monocytes en particulier, il convient de se conformer aux principes généraux des bonnes pratiques de laboratoire et de définir des plages de référence spécifiques à chaque méthode. Ainsi, les valeurs obtenues seront interprétées en fonction de la référence adaptée et le jugement clinique ne s'en trouvera pas impacté.

Populations cellulaires normales ou pathologiques

Conformément à la description qui en est donnée dans SEED N° 5 2011, les automates d'analyse alertent l'opérateur de la présence possible de leucocytes anormaux à l'aide de flags. Dans ce cas, il convient de préparer un frottis de sang périphérique et de l'étudier au microscope.

Cependant, pour des échantillons totalement normaux, pour lesquels aucun flag n'est généré, la formule sanguine automatisée sera plus précise, rendant la numération manuelle obsolète.

Informations à se rappeler

1. Dans une époque moderne laissant la place aux technologies automatisées, il n'est plus nécessaire de déterminer manuellement la formule sanguine et d'étudier le frottis sanguin périphérique dans tous les cas : ceci doit se limiter aux échantillons identifiés par l'analyseur comme présentant d'éventuelles anomalies morphologiques ou de numération cellulaire. Une telle mesure permettrait aux laboratoires d'optimiser les compétences et les disponibilités de leurs équipes en se concentrant uniquement sur les frottis qui requièrent vraiment leur attention.
2. Pour garantir un rapport d'examen au microscope fiable, le frottis et la coloration doivent être de qualité optimale. Pour y parvenir, l'automatisation de la préparation des lames et de la coloration est la méthode la mieux adaptée. Avec le Sysmex Hemoslider et le RAL Stainer, Sysmex propose une solution.
3. Des différences surviendront dans les formules sanguines manuelles et automatisées, notamment pour les monocytes. Le recours à des plages de référence spécifiques à chaque méthode est recommandé.

Références :

1. Dacie and Lewis, Practical Haematology, 9th edition, Eds SM Lewis, BJ Bain, I Bates, Chapter 4 Preparation and staining methods for blood and bone marrow films, page 50.
2. Hübl W, Andert S, Erath A, Lapin A, Bayer PM. Peripheral blood monocyte counting: towards a new reference method. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33: 839-845.

Compilé par

Dr Marion Münster