

APPENDICE 5

Coloration de Giemsa, hématologie

Coloration de Giemsa

Réactifs

Solution de Giemsa (par ex. BDH/Merck Ltd, Hunter Boulevard, Magna Park, Lutterworth, Leicestershire, R66 ; produit 35086). La qualité des lots de colorant de Giemsa pouvant varier, chaque nouveau lot doit être essayé sur un organisme connu avant d'être utilisé pour le travail quotidien.

Eau distillée tamponnée au phosphate à pH 7,2.

KH_2PO_4	0,7 g
Na_2HPO_4	1 g
Eau distillée	1 litre

Méthanol absolu (Analar). Le méthanol pur doit être conservé dans un flacon bouché hermétiquement pour éviter l'absorption d'humidité.

Mode opératoire

1. **Préparer** un frottis en suivant la procédure habituelle en hématologie. S'assurer que la "queue" du frottis est de bonne qualité et que celui-ci n'atteint pas les bords latéraux de la lame.
2. **Laisser** le frottis sécher à l'air puis le fixer au méthanol pendant une minute.
3. **Éliminer** le méthanol en excès et mettre le frottis, tourné vers le bas, sur un plateau de coloration.
4. **En** utilisant une seringue de 20 ml et une aiguille à bout émoussé, diluer la solution-mère de Giemsa au 1/10 avec l'eau distillée tamponnée. Bien mélanger et éliminer l'air.
5. A l'aide de l'aiguille et de la seringue, introduire la solution sous la lame, en prenant soin **d'éviter** de coincer de larges bulles d'air. Laisser agir 25 à 30 minutes.
6. A la fin du temps de coloration, rincer brièvement les lames à l'eau courante et les laisser sécher en position verticale. Les parasites éventuels seront observés à l'objectif à

immersion pour pouvoir détailler davantage leur morphologie. Des objectifs à immersion 50x ou 63x sont particulièrement utiles lors de l'examen préliminaire : il faut qu'une personne entraînée examine au moins 1 000 champs du microscope.

Remarques

Nous recommandons fortement la dilution de la solution de Giemsa par la méthode de la seringue (voir le point 4 ci-dessus) : une fois qu'elle est diluée avec de l'eau, elle **commence** à précipiter et l'exposition à l'air accélère le phénomène. Il faut donc utiliser des préparations extemporanées et ne pas garder de solution diluée en réserve. La **coloration** des lames retournées réduit les effets d'une précipitation éventuelle car, si elle se produit, elle tombe hors du frottis. Il est très important d'obtenir des frottis colorés proprement lorsqu'on recherche de petits parasites intracellulaires.

Il *faut* utiliser de l'eau tamponnée à pH 7,2 pour la dilution du colorant lorsqu'on **recherche** des parasites sanguins. Ce n'est qu'à ce pH alcalin que l'on observe une **différenciation** nette du noyau et du cytoplasme parasitaires.

Détermination de l'hématocrite

L'**hématocrite** (ou fraction de volume érythrocytaire) est le pourcentage du volume sanguin occupé par les hématies (ou érythrocytes). Lorsque ce pourcentage est bas, il indique l'anémie. Pour déterminer sa valeur, on remplit directement un tube capillaire hépariné à microhématocrite avec du sang capillaire (obtenu par exemple en piquant le doigt ou l'oreille avec un vaccinostyle) ou avec du sang veineux recueilli sur anticoagulant. Les tubes sont scellés à l'une des extrémités avec de la **pâte** à modeler ou à la flamme. Utiliser le phénomène de capillarité pour remplir les tubes en laissant 10 à 15 mm vides à l'extrémité qui sera scellée. Passer ensuite le tube dans une centrifugeuse à hématocrite (à 12 000 g), l'extrémité scellée en contact avec le bord externe en caoutchouc du plateau de la centrifugeuse. Centrifuger 5 mn puis lire la valeur de l'hématocrite en plaçant le tube sur une table de lecture, le fond de la colonne d'hématies sur la ligne du zéro et le sommet de la colonne de plasma sur la ligne 100. Régler la ligne argentée de façon à ce qu'elle **pass**e au niveau de l'interface entre les hématies et les leucocytes et plaquettes, puis lire sur l'échelle la fraction de volume érythrocytaire.

L'**hématocrite** est la fraction du volume sanguin occupée par les globules rouges.

Numération des leucocytes

Liquide de dilution des leucocytes :

Acide acétique glacial	2 ml
Bleu de méthylène à 1 %	1 à 2 gouttes
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Les globules rouges sont **lysés** et on utilise un colorant pour les leucocytes. Pour lyser les hématies additionner 20 μ l de sang à 0,38 ml de liquide de dilution des leucocytes (dilution au 1/20), puis mélanger soigneusement. Remplir la cellule d'un appareil de numération et la laisser reposer 2 mn dans une chambre humide. Tous les leucocytes présents sur une surface de 4 mm^2 sont comptés.

Le nombre de leucocytes

$$= \frac{\text{nb. de cellules comptées}}{\text{volume examiné (0,4)}} \times \text{dilution} \times 10^6 = \text{nb compté} \times 50 \times 10^6/l$$

Numération leucocytaire normale selon le groupe d'âge

Groupe d'âge	Num. leuc. normale
Nourrissons à 1 an	6 - 18 x 10 ⁹ /l
Enfants de 1 à 10 ans	5 - 14 x 10 ⁹ /l
Adultes	4 - 11 x 10 ⁹ /l

Détermination de la concentration en hémoglobine (méthode à la cyanmethémoglobine)

Solution pour la dilution du sang (diluant de Drabkin, pH 7,0 - 7,4)

F'errocyanure de potassium	200 mg
Cyanure de potassium	50 mg
F'osphate monopotassique	140 mg
Nonidet P 40	1 ml
Eau distillée	q.s.p. 1 l

Conserver à température ambiante à l'obscurité (le diluant ne doit pas geler). *Cette solution est extrêmement toxique*

Il est possible de préparer cette solution en dissolvant des comprimés renfermant les composants à un dosage standard ou en diluant une ampoule de concentré disponible dans le commerce

Ajouter 20 μ l de sang prélevé sur anticoagulant à 4 ml de réactif, bien mélanger et laisser reposer 3 mn à température ambiante. Lire la densité optique au colorimètre à 540 nm par rapport à du réactif de Drabkin pur. Lire également la densité optique pour une solution étalon de **cyanméthémoglobine** toujours par rapport au réactif de Drabkin pur.

Calcul de la concentration en hémoglobine (en g/l)

$$\frac{\text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de l'étalon}} \times \frac{\text{Concentration de l'étalon} \times \text{facteur de dilution}}{100}$$

Valeurs normales :

Groupe d'âge	Valeurs normales
Enfants de 1 à 6 ans	110 - 140 g/l
Hommes	130 - 180 g/l
Femmes	115 - 165 g/l

Protéines sériques totales

Réactif de Biuret

Sulfate de cuivre (5 H ₂ O)	3 g
Tartrate de potassium-sodium	9 g
Iodure de potassium	5 g
NaOH	24 g
Eau distillée	q.s.p. 1 l

Solution de **tartrate** alcalin

Tartrate de potassium-sodium	9 g
Iodure de potassium	5 g
NaOH	24 g
Eau distillée	q.s.p. 1 l

Ajouter 0,1 ml de sérum à 5 ml de réactif de Biuret.

Ajouter 0,1 ml de sérum à 5 ml de solution de **tartrate** alcalin.

Laisser les deux tubes reposer 30 mn à température ambiante.

Etablir le 0 du spectrophotomètre à 540 nm au moyen d'une solution composée de 5 ml de réactif de Biuret et 0,1 ml d'eau distillée.

Lire la densité optique pour le sérum du patient dans le réactif de Biuret et en retrancher la densité optique lue pour la solution de **tartrate** alcalin.

Lire la concentration totale en protéines sériques du patient à partir d'une courbe d'étalonnage établie à partir de 5 dilutions d'une solution étalon de protéines ou d'un sérum témoin avec une concentration connue en protéines. Il existe dans le commerce des étalons lyophilisés contenant une quantité donnée de protéines totales.