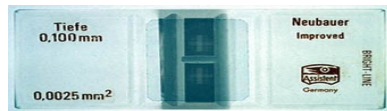




FICHE TECHNIQUE

Numération des cellules sanguines sur l'hématimètre de Neubauer



A la fin de la lecture de ce document vous devez être capable de :

- comprendre et entretenir un hématimètre
- savoir l'utiliser avec la dilution adéquate pour chaque type de cellules
- identifier et corriger les principales sources d'erreurs
- rendre un résultat en tenant compte du volume et du facteur de dilution

ATTENTION : pour des raisons de sécurité, les pipettes en verre, telles que les pipettes Thoma ne sont plus utilisées dans le laboratoire.

1. Hématimètre

Un hématimètre permet les numérations globulaires de liquides biologiques sans automate. Il s'agit d'une lame de verre épais, creusée de 2 rainures et gravée de 2 quadrillages sur la plate-forme centrale, les grilles de numération. Il existe différents types d'hématimètres (ex. Lemaure, Malassez, Nageotte, Neubauer, Rosenthal) qui diffèrent par leur quadrillage, adapté aux différents liquides biologiques que l'on veut analyser. Ce document aborde plus particulièrement le comptage, dans un volume précis et connu, des globules blancs (leucocytes), des thrombocytes et des globules rouges (érythrocytes) à l'aide de l'hématimètre de Neubauer.

2. Matériel

- Solution pour dilution : on trouve dans le commerce des solutions de dilution toutes prêtes ou des systèmes bien adaptés selon les cellules que l'on veut compter. Exemple : pour les leucocytes et les thrombocytes la solution de Türk ou Plaxan, pour les érythrocytes le réactif selon Dacie et Lewis (le réactif Hayem n'est plus utilisé en raison de sa toxicité).
- Hématimètre de Neubauer (ou modèle plus récent Neubauer improved) / lamelle en verre épais pour recouvrir l'hématimètre.
- Pipettes réglables / tube pour dilution du sang.
- Mélangeur pour les échantillons de sang.
- Microscope avec oculaire 10x et objectif 50x ou **60x** sans immersion.

3. Préparation de l'échantillon

- Mélanger le sang EDTA sur un mélangeur pendant 5-10 minutes au minimum.
- Diluer le sang complet ou le sang capillaire de la manière suivante :

	Leucocytes	Thrombocytes	Erythrocytes
Tube pour dilution appropriée	<u>Dilution 1:20</u> 950 µL Türk ou Plaxan + 50 µL sang EDTA ou sang capillaire	<u>Dilution 1:20</u> 950 µL Türk ou Plaxan + 50 µL sang EDTA ou sang capillaire (la 1 ^{ère} goutte!)	<u>Dilution 1:200</u> 1990 µL réactif Dacie-Lewis + 10 µL sang EDTA ou sang capillaire

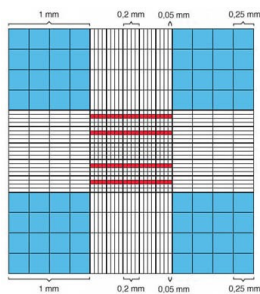
Si le nombre de cellules est très augmenté ou au contraire diminué, il faudra adapter la dilution.

4. Préparation de la chambre de comptage

On pose une lamelle sur les plates-formes latérales élevées de l'hématimètre où un volume précis et connu de liquide biologique va permettre de compter les cellules.

- Humecter avec de l'eau distillée et une ouate pour faire adhérer la lamelle sur les plates-formes latérales, en appuyant légèrement : il doit apparaître un anneau de Newton (franges de couleur arc-en-ciel) qui montre la bonne adhésion. Vérifier la propreté de la cellule sous le microscope.
- Remplir les quadrillages par capillarité en déposant une goutte de l'échantillon dilué à l'aide d'une pipette inclinée sur la plate-forme centrale entre la lamelle et le fond. Le remplissage doit être réalisé en 1 seule fois, sans débordement dans les rainures et sans bulles d'air.
- Laisser reposer l'hématimètre à plat, en "chambre" humide (une boîte de Pétri avec une ouate humide), pendant 5 minutes (10 minutes pour les thrombocytes) afin de laisser les éléments sédimenter. Lors du comptage, s'assurer que l'échantillon ne dessèche pas.
- Observer au microscope, objectif 10x si la répartition est homogène, sinon recommencer la mise en cellule.

5. Comptage des cellules



- Les leucocytes sont comptés dans les 4 grands carrés bleus composés de 16 petits carrés (= 64).
- Les érythrocytes et les thrombocytes sont comptés dans les 4 lignes rouges dans le quadrillage central composé de 20 très petits carrés (= 80).
- La hauteur entre la chambre et la lamelle est de 0,1mm. Le volume est donc de :
 - grand carré $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 0,1\ \mu\text{L}$
 - très petit carré $0,05\text{mm} \times 0,05\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,00025\text{mm}^3 = 0,00025\ \mu\text{L}$

Compter dans le quadrillage les éléments selon un procédé bien établi. Quelle que soit la surface à compter, on compte tous les éléments situés à l'intérieur de la surface délimitée, en appliquant la règle de la limite des lignes : compter les cellules touchant la ligne du haut et celle de droite. Ne pas compter les cellules touchant la ligne du bas, ni celle de gauche afin d'éviter de compter les éléments 2 fois.

	<p>compter toutes les cellules internes au carré</p> <p>+</p> <p>toutes les cellules touchant la ligne du haut et la ligne de droite.</p>	<p>Dans cet exemple, les cellules à compter sont : 13 + 8 = 21 cellules.</p>
--	---	---

Lors du comptage des cellules à l'aide d'un hématimètre, les variations peuvent être très importantes. Chaque étape doit être effectuée avec minutie, notamment celle de la dilution qui doit être appropriée aux cellules comptées.

6. Exemple de calcul des cellules

Rendre le résultat en prenant le nombre de cellules comptées sans oublier le facteur de dilution utilisé.

Formule du calcul : <u>nombre de cellules X facteur de dilution X facteur de conversion</u> <u>nombre de carrés x volume d'un carré</u>		
LEUCOCYTES	THROMBOCYTES	ERYTHROCYTES
Leucocytes comptés par carré : 28 ; 25 ; 27 ; 26 = 106 Lc	Thrombocytes comptés par carré : 35 ; 45 ; 50 ; 50 = 180 Tc	Erythrocytes comptés par carré : 85 ; 95 ; 80 ; 100 = 360 Ec
Leucocytes comptés : 106 Surface comptée : 4 grands carrés Volume d'un carré bleu : 0,1 μL Dilution : 1/20 Conversion μL en L : 1L = 1 $\times 10^6$ μL	Thrombocytes comptés : 180 Surface comptés : 80 très petits carrés Volume d'un carré rouge : 0,00025 μL Dilution : 1/20 Conversion μL en L : 1L = 1 $\times 10^6$ μL	Erythrocytes comptés : 360 Surface comptée : 80 très petits carrés Volume d'un carré rouge : 0,00025 μL Dilution : 1/200 Conversion μL en L : 1L = 1 $\times 10^6$ μL
$\frac{106 \times 20 \times 10^6}{4 \times 0,1}$ → 5 300 $\times 10^6$ Lc / L = 5,3 10^9 / L (E⁹/L) ou 5,3 G / L (Giga / L)	$\frac{180 \times 20 \times 10^6}{80 \times 0,00025}$ → 180 000 $\times 10^6$ Tc / L = 180 10^9 / L (E⁹/L) ou 180 G / L (Giga / L)	$\frac{360 \times 200 \times 10^6}{80 \times 0,00025}$ → 3 600 000 $\times 10^6$ Ec / L = 3,6 10^{12} / L (E¹² / L) ou 3,6 T / L (Tera / L)

7. Entretien d'un hématimètre

- Rincer la cellule et la lamelle à l'eau courante puis à l'alcool à 70 % (volume / volume).
- Sécher la cellule et la lamelle avec un torchon sec, doux et non pelucheux (éviter de la rayer).

8. Principales sources d'erreurs

De la bonne utilisation des cellules de comptage dépend la qualité des résultats des numérations cellulaires en hématologie. Les sources d'erreurs peuvent être :

Cellule à numération mal nettoyée et / ou mal dégraissée / empreinte de doigt sur la lamelle / mauvaise homogénéisation du sang / erreur de pipetage / temps non respectés, comptage dans une chambre de comptage desséchée / présence de bulles d'air dans la cellule / absorption du liquide en cas de débordement / mauvais réglage du microscope / erreurs de dilutions / erreurs de calculs / erreurs d'unités lors du calcul.