

CYTOLOGIE

Guide de préparation des échantillons

Ce livret contient les techniques recommandées pour la préparation et la coloration des échantillons destinés à une analyse cytologique de routine. Ces méthodes sont appropriées à la visualisation des lames au microscope ou à l'envoi de lames numérisées par un scanner.

La préparation des échantillons de cytologie numérique est similaire à bien des égards à la préparation des échantillons de cytologie traditionnelle. En utilisant les colorants courants de votre clinique (par exemple Diff Quik), vous obtiendrez des frottis colorés similaires à ceux que vous auriez envoyés à un laboratoire de référence externe.



Contenu

Réalisation d'un frottis sanguin	1
Problèmes courants lors de la préparation du frottis sanguin	2
Technique d'aspiration à l'aiguille fine	3
Réalisation d'un frottis à partir de cellules aspirées à l'aiguille fine	4
Réalisation d'un frottis à partir d'un fluide biologique	6
Réalisation d'un calque par impression	6
Réalisation d'un frottis via un écouvillon	7
Techniques de coloration d'un frottis	8
Problèmes courants de la coloration d'un frottis	8

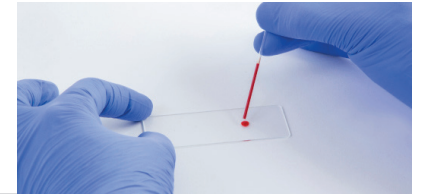


RÉALISATION D'UN FROTTIS SANGUIN

1. Placer une lame sur une surface plane. Une deuxième lame servira à l'étalement. Utiliser un tube capillaire ou un applicateur en bois pour prélever une petite quantité de sang total EDTA.



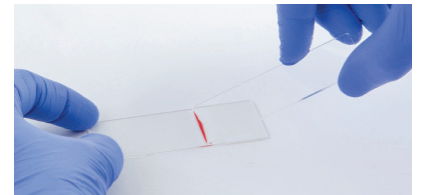
2. Déposer une goutte de sang sur la lame. La goutte doit être de cette taille ●.



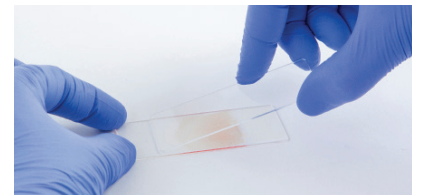
3. Incliner le bord d'une seconde lame devant la goutte de sang pour obtenir un angle d'environ 30 degrés. Maintenir la lame en place pendant que le frottis est réalisé.



4. Reculer la lame dans la goutte de sang et laisser le sang se répandre le long du bord de celle-ci.



5. Pousser immédiatement la lame vers l'avant en exerçant une légère pression d'un geste rapide.



Le frottis doit couvrir 1/2 à 3/4 de la surface de la lame. L'extrémité doit être arrondie et avoir un bord en forme de plume, créant une fine zone qui a l'apparence d'un arc-en-ciel lorsqu'elle est réfléchi par la lumière. L'espace situé en aval du bord contient la monocouche de cellules nécessaire pour les différencier et évaluer leur morphologie.

6. Si la qualité du frottis est satisfaisante, procéder à la coloration.



PROBLÈMES COURANT LORS DE LA PRÉPARATION DU FROTTIS SANGUIN

1. FROTTIS TROP FIN

- > **Problème** : distribution anormale des globules blancs ou artéfacts érythrocytaires en queue de frottis.
- > **Cause** : mouvement trop lent lors de l'étalement.
- > **Solution** : étaler avec un geste plus rapide.

2. FROTTIS TROP COURT

- > **Problème** : frottis difficile à colorer et à examiner.
- > **Causes** : goutte de sang trop petite ; angle inadéquat (trop élevé) de la lame servant à étaler.
- > **Solutions** : déposer une goutte de cette taille : ● ; corriger l'angle de la lame servant à étaler.

3. FROTTIS TROP LONG

- > **Problème** : aucune monocouche cellulaire, le frottis est trop épais pour être examiné.
- > **Causes** : goutte de sang trop grosse ; angle inadéquat (trop faible) de la lame servant à étaler.
- > **Solutions** : déposer une goutte de sang plus petite ; corriger l'angle de la lame servant à étaler.

4. FROTTIS STRIÉ, IRRÉGULIER

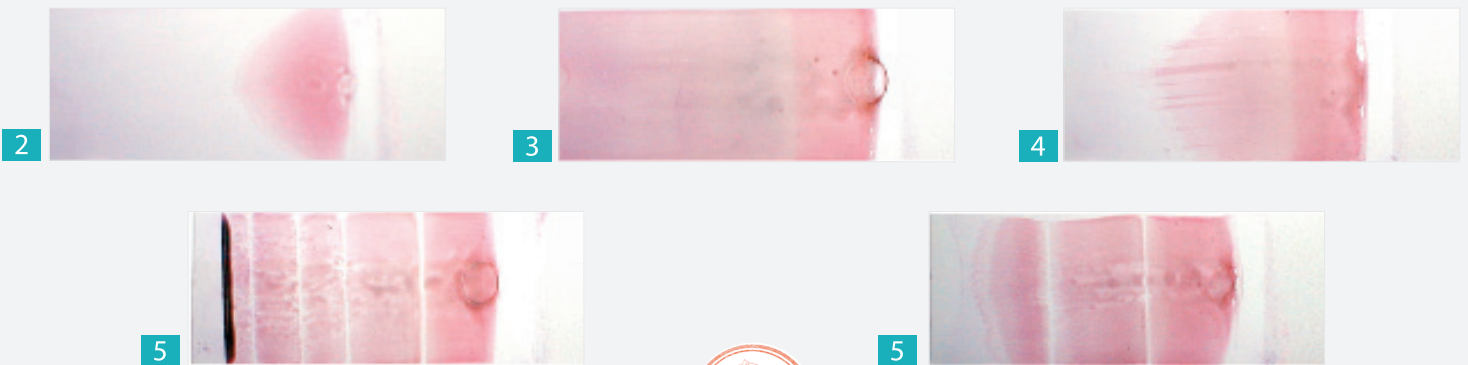
- > **Problème** : monocouche cellulaire irrégulière et difficile à examiner.
- > **Causes** : lame servant à étaler au bord irrégulier ou piqué ; lame support sale ; amas de plaquettes dans l'échantillon (particulièrement problématique chez le chat) ; goutte de sang partiellement sèche avant étalement.
- > **Solutions** : utiliser une nouvelle lame ; vérifier la présence d'amas plaquettaires ; réaliser le frottis immédiatement après avoir placé la goutte de sang sur la lame.

5. HACHURES ET VARIATION DE L'ÉPAISSEUR

- > **Problème** : frottis hachuré, monocouche cellulaire irrégulière et difficile à examiner.
- > **Causes** : pression trop forte sur la lame servant à étaler ; geste trop lent (lame servant à étaler « saute » le long de la lame support).
- > **Solutions** : appliquer une légère pression sur la lame tout en poussant vers l'avant ; adopter un geste plus rapide.

6. PROBLÈMES ADDITIONNELS LORS DE LA PRÉPARATION DU FROTTIS SANGUIN

- > **Problème** : impossibilité d'appliquer la coloration sur la lame.
- > **Cause** : exposition de la lame aux vapeurs de formol.
- > **Problème** : origine de la lame inconnue.
- > **Cause** : absence d'identification de la lame avec le nom du patient et la date.



TECHNIQUE D'ASPIRATION À L'AIGUILLE FINE

Technique particulièrement adaptée pour :

- Les masses.
- Les nœuds lymphatiques.

TECHNIQUE À AIGUILLE DÉMONTÉE

1. Retirer de manière aseptique l'aiguille de 22G de son emballage (*manipuler avec des gants*).
2. Insérer l'aiguille dans la lésion et la réorienter plusieurs fois pour prélever au travers d'environ 2/3 de la lésion.
3. Retirer l'aiguille de la lésion.
4. Remplir d'air une seringue de 3 à 5 mL.
5. Fixer la seringue à l'aiguille.
6. Tenez la seringue et l'aiguille près d'une lame de verre, le biseau dirigé vers le bas.
7. Expulser rapidement l'air dans la seringue de manière à déposer le contenu de l'aiguille sur la lame.
8. Étaler si nécessaire.
9. Si la qualité du frottis est satisfaisante, procéder à la coloration.

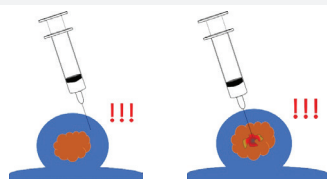


TECHNIQUE À AIGUILLE MONTÉE

1. Fixer une aiguille stérile de calibre 22 à 25G à une seringue de 3 à 5 mL.
2. Insérer l'aiguille dans la lésion et tirer sur le piston de la seringue.
3. Rediriger l'aiguille plusieurs fois pour prélever au travers d'environ 2/3 de la lésion.
4. Relâcher la pression sur le piston tout en retirant l'aiguille de la lésion.
5. Retirer l'aiguille et aspirer de l'air dans la seringue.
6. Fixer à nouveau la seringue à l'aiguille et suivre les étapes 6 à 9 comme indiqué ci-dessus.



REMARQUE : il convient d'être prudent pour garantir un échantillonnage correct des masses sous-cutanées.



> Veiller à ne pas ponctionner trop loin sur le bord des masses fermes.

> En outre, si du liquide est obtenu lors de l'aspiration de ce qui semble être une masse solide, le centre nécrotique peut avoir été prélevé tandis que les bords solides et plus viables de la masse peuvent ne pas avoir été ponctionnés. Un prélèvement de l'ensemble de la masse est recommandé.

> Faire un frottis du matériel prélevé en utilisant la technique décrite à la page 5.

> Si le matériel est fluide, il est recommandé de préparer l'échantillon à l'aide de la technique du frottis de la page 4 en veillant à séparer toute matière solide ou floconneuse.

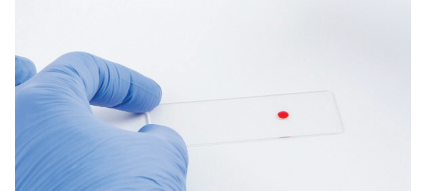


RÉALISATION D'UN FROTTIS À PARTIR DE CELLULES ASPIRÉES À L'AIGUILLE FINE

TECHNIQUE DU FROTTIS AVEC LAME INCLINÉE

- Technique à privilégier pour les épanchements thoraciques, abdominaux et péricardiques.
Peut également être utilisée avec du matériel fluide recueilli par aspiration à l'aiguille fine.
- Le liquide synovial est souvent trop visqueux pour cette technique et est plus facile à étaler avec la technique "lame sur lame".
- Si l'on peut voir une matière solide flotter dans l'échantillon, utiliser la technique de glissement sur lame décrite ci-dessous.

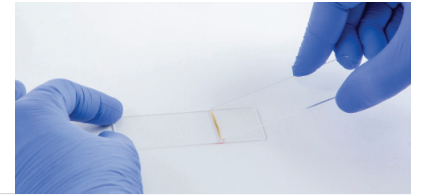
1. Placer l'échantillon près du bord dépoli de la lame de verre. ▶



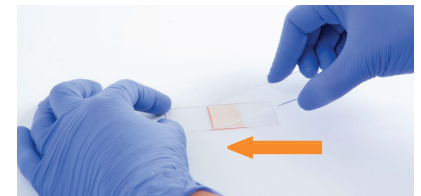
2. Utiliser une deuxième lame pour former un angle de 30 degrés par rapport à la lame de l'échantillon. Tirer progressivement la deuxième lame de verre vers l'échantillon. ▶



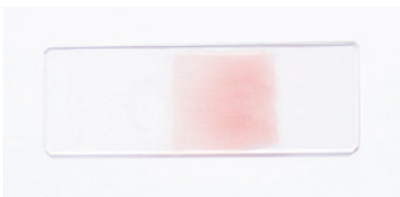
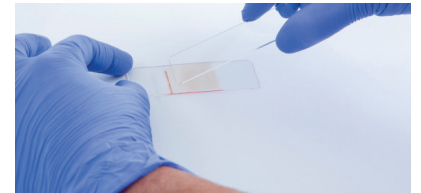
3. Une "ligne" d'échantillon doit se former au bord de la deuxième lame une fois qu'elle est dans la bonne position. ▶



4. Au fur et à mesure que cette ligne se forme, faire avancer la lame du dessus en exerçant une pression douce mais régulière. ▶



5. Soulever rapidement la lame ayant servi à étaler une fois que le frottis couvre environ 1/2 à 2/3 de la lame. ▶



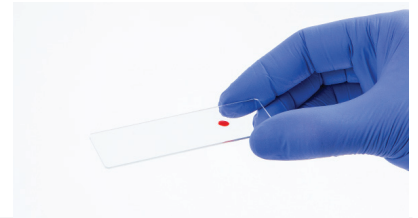
▶▶ Si la qualité du frottis est satisfaisante, procéder à la coloration.



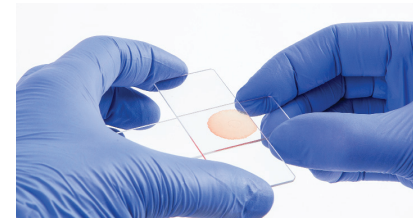
TECHNIQUE DU FROTTIS « LAME SUR LAME »

- Technique à privilégier pour les prélèvements à l'aiguille fine et le liquide synovial.
- En cas de présence de matériel solide ou floconneux dans un échantillon, étaler la partie liquide séparée de la matière plus solide.

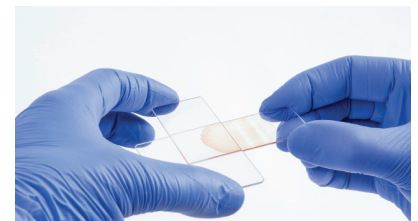
1. Placer l'échantillon près du bord dépoli de la lame de verre. ▶



2. Avec une deuxième lame maintenue à plat et perpendiculairement à la lame de l'échantillon, recouvrir l'échantillon comme le montre l'image de droite. Ne pas exercer de force supplémentaire sur la lame. ▶



3. Déplacer la lame supérieure vers le bord opposé pour étaler l'échantillon de manière à recouvrir environ 2/3 de la surface de la lame inférieure. Soulever délicatement la lame supérieure tout en terminant le mouvement. ▶



4. Si la qualité du frottis est satisfaisante, procéder à la coloration. ▶



RÉALISATION D'UN FROTTIS À PARTIR D'UN FLUIDE BIOLOGIQUE

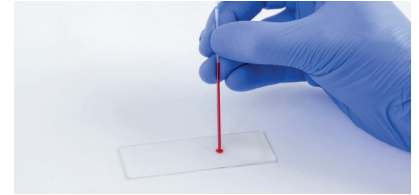
Technique particulièrement adaptée pour :

- Les épanchements thoraciques et abdominaux.
- Le liquide synovial.
- Les liquides de lavage broncho-alvéolaire.

FROTTIS DIRECT DU MATÉRIEL

Si le volume de l'échantillon obtenu est suffisant, préparer un frottis du liquide bien homogénéisé avant toute centrifugation.

Déposer une goutte d'échantillon provenant d'un tube EDTA sur une lame et suivre les instructions de la technique du frottis de la page 4. ▶



FROTTIS DU MATÉRIEL APRÈS CENTRIFUGATION

Après la préparation du frottis direct à partir de l'échantillon de liquide bien homogénéisé, sédimenter le liquide par centrifugation pendant 5 à 10 minutes à environ 450-500 G. Il s'agit d'un réglage à faible vitesse, similaire à la vitesse utilisée pour la centrifugation des sédiments d'urine.

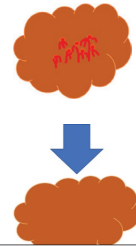
Une fois la centrifugation terminée, retirer le surnageant, à l'exception de quelques gouttes et remettre l'échantillon en suspension dans le liquide restant. Suivre les instructions de la page 4 pour la technique du frottis.

RÉALISATION D'UN CALQUE PAR IMPRESSION

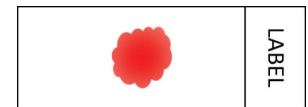
Technique particulièrement adaptée pour :

- Les lésions exsudatives.
- Les biopsies excisionnelles/incisionnelles.

1. Appuyer doucement la lame directement sur la lésion. ▶



2. En fonction de la localisation et du type de lésion, nettoyer la surface de la lésion avec une compresse humidifiée au sérum physiologique et répéter l'opération sur une deuxième lame. ▶



Si la qualité du calque est satisfaisante, procéder à la coloration.

REMARQUE : De nombreuses masses cutanées présentent une surface ulcérée et enflammée. Les calques par impression de ces lésions ne permettent souvent pas de diagnostiquer la masse sous-jacente car seule la lésion inflammatoire superficielle est prélevée. Dans ce cas, l'aspiration à l'aiguille fine de la masse sous-jacente est nécessaire pour obtenir un échantillon diagnostic.



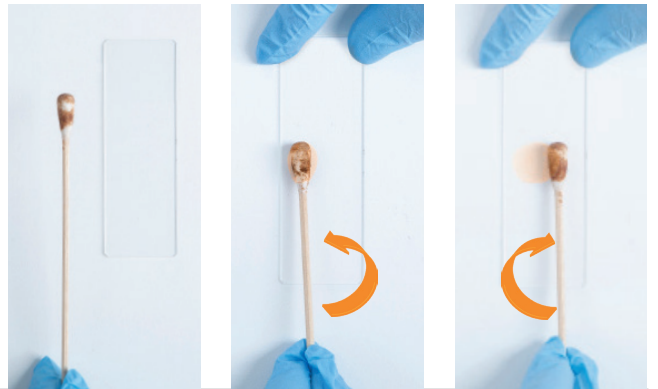
RÉALISATION D'UN FROTTIS VIA UN ÉCOUVILLON

Les écouvillons ne sont pas couramment utilisés sauf dans le cas de l'évaluation des exsudats auriculaires ou des frottis vaginaux.

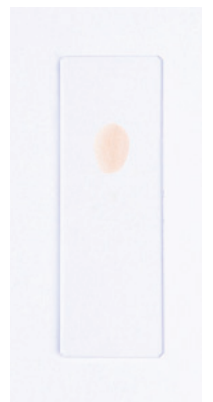
1. Pré-humidifier l'écouvillon avec une solution saline stérile. Cela peut atténuer la déformation des cellules des échantillons trop secs. ▶



2. Une fois l'échantillon obtenu, faire doucement rouler l'écouvillon sur la lame. ▶



3. Si la qualité du frottis est satisfaisante, procéder à la coloration. ▶



TECHNIQUES DE COLORATION D'UN FROTTIS

Diff Quik et d'autres colorants rapides Romanowsky sont les colorants les plus couramment utilisés en pratique vétérinaire. La procédure de coloration est similaire pour tous ces colorants bien que les recommandations du fabricant doivent être suivies.

Dans le cas des colorations en 3 étapes, le premier liquide est un fixateur à l'alcool, le second est un colorant rouge et le troisième un colorant violet.

Il faut garder à l'esprit que le temps nécessaire pour colorer des frottis épais peut parfois être plus long que le temps nécessaire pour colorer des frottis plus fins.

Ne pas oublier ou ne pas laisser les lames dans les colorants trop longtemps car cela peut entraîner une sur-coloration des échantillons.



1. Plonger la lame dans le fixateur bleu 20 fois.



2. Plonger la lame dans le colorant rouge 10 fois.



3. Plonger la lame dans le colorant violet 10 fois.



4. > Rincer la lame sous un filet d'eau.

> Laisser sécher la lame.

CONSEILS POUR LA COLORATION D'UN FROTTIS

1. Utiliser des lames neuves et propres.
2. Pour éviter la contamination du colorant, utiliser du colorant frais ou nouvellement filtré et changer de colorant aussi souvent que nécessaire (généralement une fois par semaine).
3. S'assurer que les lames sont complètement sèches afin d'éviter toute perte d'échantillon.
4. Un temps de coloration insuffisant et/ou un vieux colorant peuvent entraîner une faible coloration.

