



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 19328

To cite this version :

Thibault, Marion. *Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine obtenus par le SYSMEX XT-2000iV et des méthodes manuelles*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 67 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ETABLISSEMENT DES INTERVALLES DE REFERENCE DES VARIABLES HEMATOLOGIQUES CHEZ L'ESPECE BOVINE OBTENUS PAR LE SYSMEX XT-2000IV ET DES METHODES MANUELLES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

THIBAULT, Marion
Née, le 15 novembre 1991 à Talence (33)

Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENT :

Mme Emmanuelle URO-COSTE

Professeure à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

Mme Catherine TRUMEL

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Nicolas HERMAN

Résident à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : Madame Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. MILON Alain, *Microbiologie moléculaire*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. DUCOS Alain, *Zootchnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mme TRUMEL Catherine, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme CADIARGUES Marie-Christine, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

REMERCIEMENTS

A notre Président du Jury,

Madame la Professeure Emmanuelle URO-COSTE,

Professeure des Universités,

Praticien hospitalier,

Service d'Anatomie Pathologie et Histologie-Cytologie,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Madame la Professeure Catherine TRUMEL,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Biologie Médicale Animale et Comparée,

Qui nous a fait l'honneur et le plaisir d'accepter la direction de cette thèse. Pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse dans la réalisation de cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect et gratitude pour ce que vous nous avez apporté.

Madame le Docteur Nathalie BOURGES-ABELLA,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Histologie, Anatomie pathologique,

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse. Sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Nicolas HERMAN,

Résident à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des Ruminants,

Pour ton soutien et ta disponibilité qui m'ont été très précieux durant l'élaboration de ce travail.

Aux personnes impliquées dans la réalisation de cette thèse,

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRAUN,

Professeur honoraire à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Physique et chimie biologiques et médicales,

Pour votre collaboration dans la réalisation et l'interprétation des statistiques de cette étude.

Remerciements chaleureux.

Mademoiselle le Docteur Camille ANCEL,

Interne à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des Ruminants,

Pour ton aide et la réalisation des prélèvements dans les élevages.

| |
|--------------------|
| TABLE DES MATIERES |
|--------------------|

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 7 |
| 1. Matériels et méthodes | 11 |
| 1.1. Sélection des sujets de la population de référence | 11 |
| 1.1.1. Répartition géographique..... | 11 |
| 1.1.2. Age et sexe..... | 11 |
| 1.1.3. Stade Physiologique..... | 12 |
| 1.1.4. Type de production et races..... | 12 |
| 1.1.5. Etat sanitaire des élevages | 12 |
| 1.1.6. Alimentation | 12 |
| 1.2. Critères d'inclusion d'un animal | 13 |
| 1.3. Critères d'exclusion d'un animal | 13 |
| 1.4. Caractéristiques pré-analytiques et prélèvements des spécimens | 14 |
| 1.4.1. Prélèvements sanguins | 14 |
| 1.4.2. Conditions de conservation et d'acheminement des prélèvements | 14 |
| 1.5. Technique d'analyse des prélèvements sanguins | 15 |
| 1.5.1. Contrôle de qualité | 15 |
| 1.5.2. Critères d'exclusion du laboratoire | 15 |
| 1.5.3. Procédures effectuées pour chaque prélèvement | 15 |
| 1.6. Frottis sanguins | 16 |
| 1.7. Analytes sanguins | 17 |
| 1.8. Analyses statistiques des données | 18 |
| 2. Résultats | 20 |
| 2.1. Caractéristiques de la population de référence | 20 |
| 2.2. Contrôle de Qualité | 22 |
| 2.3. Intervalles de référence | 23 |
| 2.3.1. Intervalles de référence de la lignée rouge..... | 24 |
| 2.3.2. Intervalles de référence de la lignée blanche | 27 |
| 2.3.3. Intervalles de référence de la lignée plaquettaire | 28 |
| 2.3.4. Intervalles de référence d'après le comptage manuel | 29 |
| 2.4. Influence des critères de partition sur les intervalles de référence | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.1. | <i>Influence du type de production</i> | 30 |
| 2.4.2. | <i>Influence du stade physiologique</i> | 30 |
| 2.4.3. | <i>Influence de l'âge</i> | 31 |
| 2.4.4. | <i>Influence de l'élevage</i> | 33 |
| 3. | Discussion | 34 |
| 3.1. | Sélection de la population de référence | 34 |
| 3.2. | Facteurs pré-analytiques | 35 |
| 3.3. | Performances analytiques de l'analyseur | 36 |
| 3.4. | Méthode de détermination des intervalles de référence | 37 |
| 3.5. | Comparaison des intervalles de référence de la lignée rouge obtenus dans cette étude avec ceux de la littérature | 37 |
| 3.5.1. | <i>Influence du stade de lactation</i> | 39 |
| 3.5.2. | <i>Influence du type de production</i> | 39 |
| 3.6. | Comparaison des intervalles de référence de la lignée blanche obtenus dans cette étude avec ceux de la littérature | 40 |
| 3.7. | Comparaison des résultats du Sysmex XT-2000iV et du comptage manuel | 41 |
| 3.8. | Comparaison des intervalles de référence selon l'âge des bovins | 43 |
| 3.9. | Influence de l'élevage sur les variables sanguines | 43 |
| | CONCLUSION | 45 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 46 |
| | ANNEXES | 50 |

TABLE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Comparaison d'intervalles de variables hématologiques établies chez des bovins de plus de 2 ans considérés comme étant en « bonne santé » | 9 |
| Tableau 2 : Caractéristiques de la population étudiée : races | 20 |
| Tableau 3 : Caractéristiques de la population étudiée : stade physiologique..... | 21 |
| Tableau 4 : Caractéristiques de la population étudiée : alimentation | 22 |
| Tableau 5 : Résultats des contrôles de qualité durant l'étude | 23 |
| Tableau 6 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV pour les analytes sanguins de la lignée rouge et leurs index calculés | 24 |
| Tableau 7 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV pour les analytes sanguins de la lignée blanche et leurs index calculés..... | 27 |
| Tableau 8 : Intervalles de référence établis par comptage manuel pour les analytes sanguins de la lignée blanche..... | 29 |
| Tableau 9 : Intervalles de référence hématologiques suivant le stade de lactation (L1 : 1-90 jours ; L2 : 91-180 jours, L3 : tarissement) | 31 |
| Tableau 10 : Comparaison des intervalles de référence avec ceux de la littérature pour les analytes sanguins de la lignée rouge | 38 |
| Tableau 11 : Comparaison des intervalles de référence avec ceux de la littérature pour les analytes sanguins de la lignée blanche | 40 |
| Tableau 12 : Comparaison des intervalles de référence entre le Sysmex XT-2000iV et le comptage manuel des analytes sanguins de la lignée blanche | 41 |

TABLE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Caractéristiques de la population étudiée : âges..... | 21 |
| Figure 2 : Représentation graphique de la répartition, des limites des intervalles de référence et des intervalles de confiance pour les variables sanguines de la lignée rouge. | 26 |
| Figure 3 : Représentation graphique de la répartition, des limites des intervalles de référence et des intervalles de confiance pour les variables sanguines de la lignée blanche. | 28 |
| Figure 4 : Variables hématologiques significativement influencées par l'âge..... | 32 |

| |
|-------------------|
| TABLE DES ANNEXES |
|-------------------|

| | |
|---|----|
| Annexe 1 : Questionnaire troupeau | 50 |
| Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement..... | 51 |
| Annexe 3 : Consentement éclairé de l'éleveur | 53 |
| Annexe 4 : Fiche de résultats des lectures des frottis sanguins | 54 |
| Annexe 5 : Protocole..... | 55 |
| Annexe 6 : Fiche de lecture des frottis sanguins | 64 |
| Annexe 7 : Aspect microscopique des différents lymphocytes de l'espèce bovine..... | 66 |
| Annexe 8 : Différents cyogrammes issus du Sysmex XT-2000iV | 67 |

INTRODUCTION

Les analyses hématologiques sont réalisées quotidiennement en médecine vétérinaire. En effet, l'hémogramme peut-être une aide précieuse pour le vétérinaire clinicien dans l'établissement d'un diagnostic, dans la surveillance d'un patient ou bien dans la formulation d'un pronostic sur l'évolution d'un animal malade ¹.

La mise en évidence d'anomalies hématologiques repose sur la comparaison des valeurs obtenues de l'hémogramme d'un animal donné aux l'intervalles de référence. Chez les bovins, les premiers intervalles de référence en hématologie ont été établis par Schalm en 1965 ². Cette étude reposait sur les prélèvements de sang de 62 vaches adultes de race Holstein, aucune information sur la population de référence ni sur la méthode statistique employée pour la réalisation de ces intervalles n'était donnée.

De nos jours la notion d'intervalle de référence fait l'objet de nombreuses mises à jour pour aboutir aux dernières recommandations internationales faites par l'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) et le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ³. Ces recommandations imposent une sélection stricte des individus de référence selon des critères d'inclusion et d'exclusion précis. De plus, il est recommandé d'avoir une population d'au moins 120 sujets et d'utiliser une méthode statistique non paramétrique.

Nous avons référencé l'ensemble des données des variables hématologiques publiées chez les bovins adultes de plus de 2 ans considérés comme « en bonne santé » **[Tableau 1]**. A notre connaissance, seulement une étude en Corée du Sud ⁴ a établi des intervalles de référence sur une population de plus de 120 bovins. Néanmoins peu d'informations sont disponibles sur la population des vaches utilisées pour cette étude.

En 2010 une étude américaine ⁵ a comparé les intervalles de référence des variables hématologiques bovines entre 1957 et 2006 et a prouvé que ces derniers avaient évolué. Plusieurs études faites après l'an 2000 ont montré une augmentation significative de la concentration en neutrophiles alors que la concentration en lymphocytes, en monocytes, en éosinophiles et la concentration en hémoglobine avaient diminué chez les bovins « sains » depuis 1957 ⁵.

Malheureusement de nombreux praticiens continuent à se référer aux valeurs usuelles de Schalm ⁵. Cela peut avoir comme conséquence de mauvaises interprétations des hémogrammes.

Cette étude a donc pour objectif d'établir des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine avec l'automate Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Villepinte, France) dans les conditions de prélèvement inhérentes aux pratiques courantes des vétérinaires en milieu rural et selon les recommandations internationales mises à jour en 2008.

En complément, un comptage manuel sur frottis sanguin sera réalisé afin de contrôler les comptages leucocytaires faits par l'automate mais aussi pour différencier les différents types de lymphocytes présents dans le sang des bovins ce que le Sysmex XT-2000iV n'est pas en capacité d'établir aujourd'hui.

Tableau 1 : Comparaison d'intervalles de variables hématologiques établies chez des bovins de plus de 2 ans considérés comme étant en « bonne santé »

| Année | 1965 | 1980 | 2000 | 2001 | 2001 | 2003 | 2005 | 2006 | 2009 | 2009 | 2010 | 2010 | 2010 | 2012 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2015 | 2016 | NR |
|--|------------------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------------|--|------------------------------------|--|---|--|--|--|--|-----------------------------|--|--|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|--|---------------------------|
| Caractéristiques | 2 | 6 | 7 | 5 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 4 | 23 |
| Echantillon Mode de prélèvement Automate | n= 62 ♀ NR manuel e | n = 41 ♀ NR Coulter S | n = 80 ♀ v.jugulaire NR | n = 58 ♀ NR ADVIA 120 | n = 10 ♀ v.jugulaire CELL-DYN 3500 | n = 43 ♀ v.coccygienne NR | n = 240 ♀ v.coccygienne NR | n = 75 ♀ v.coccygienne ADVIA 120 | n = 90 ♂ v.jugulaire Neubauer's hemocytometer | n = 1072 ♀ v.coccygienne Technicon H1 Bayer | n = 25 ♀ v.jugulaire NR | n = 20 ♀ v.jugulaire Neubauer hemocytometer | n = 99 ♀ NR ADVIA 120 | n = 10 ♀ v.coccygienne ADVIA 120 | n = 17 ♀ v.jugulaire Arcus Diatron | n = 24 ♀ v.jugulaire NR | n = 8 ♀ v.jugulaire NR | n = 12 ♀ v.jugulaire NR | n = 8 ♀ NR Caltac-α | n = 350 ♀ ^T n = 334 ♀ ^U v. jugulaire et coccygienne | NR NR ADVIA 2120 |
| Hémoglobine g/L | 80-1,0 | 85-132 | 70,9-79,3 ^{NG} 82,7-93,7 Ges 80,0-89,7 PLM 73,9-84,4 PLE | 85-122 | NR | NR | 90-98 ^D 95-99 ^E 97-104 ^F | 88-125 | 88,22-126,08 ^G 84,38-122,82 ^H 88,31-125,29 ^I | NR | 111,0 ^L 78,8 ^M 104,7 ^N | 99,3-112,5 | 84-120 | 98-118 | NR | 100,62-106,58 | 129 | NR | NR | 118-121 ^T 88-92 ^U | 87-124 |
| HCT % | 24-46 | 24-36 | NR | 22 - 33 | NR | 27,3-31,1 | 26,8-27,9 ^D 27,2-28,8 ^E 28,6-30,6 ^F | 23-31 | NR | NR | 30,5 ^L 21,31 ^M 28,55 ^N | 31,11-39,63 | 21-30 | 26-32 | NR | 33,921-36,419 | 36,7 | NR | 29,8% | 43.2-43.8 ^T 28.1-29.9 ^U | 25-33 |
| RBC x10 ⁶ /μL | 5,0-10,0 | 5,0-7,7 | 5,25-6,17 ^{NG} 7,07-8,35 Ges 6,82-7,94 PLM 6,22-7,18 PLE | 5,1-7,6 | NR | NR | 6,6-6,9 ^D 6,5-6,8 ^E 6,7-7,1 ^F | 4,6-6,9 | 4,756-7,938 ^G 4,942-8,238 ^H 4,908-7,962 ^I | NR | 6,64 ^L 5,02 ^M 7,92 ^N | 7,2-7,82 | 4,9-7,5 | 5,8-7,0 | NR | 6,49-7,81 | NR | NR | NR | 9.7-10.2 ^T 7.4-8.0 ^U | 5,0-7,2 |
| MCV fl | 40-60 | 37,8-56,0 | 55,3-64,8 ^{NG} 45,9-52,8 Ges 43,9-49,8 PLM 50,8-56,1 PLE | 38-50 | NR | NR | NR | 40-53 | 46,25-74,506 ^G 39,67-73,334 ^H 44,462-72,076 ^I | NR | 43,8 ^L 41,66 ^M 36,50 ^N | 45,68-61,02 | 36-50 | 43-47 | NR | 47,92-50,44 | 51 | NR | NR | NR | 38-51 |
| MCH pg | 11,0-19,0 | 14,2-20,1 | 12,3-14,5 ^{NG} 10,4-13,3 Ges 11,3-12,2 PLM 10,9-12,8 PLE | 14 - 18 | NR | NR | NR | NR | 12,871-22,521 ^G 10,577-23,493 ^H 11,972-23,168 ^I | NR | 16,02 ^L 15,46 ^M 13,37 ^N | 16,51-18,41 | 14-19 | 16-18 | NR | 13,7-15,28 | 18,0 | NR | NR | NR | 14-19 |
| MCHC % | 30-36 | 317-404g/L | 21,4-23,8 ^{NG} 22,5-25,2 Ges 23,9-26,2 PLM 21,1-23,9 PLE | 36 - 39 | NR | NR | NR | 360-400g/L | 26,025-32,547 ^G 21,816-38,994 ^H 23,476-36,822 ^I | NR | 36,42 ^L 37,16 ^M 36,75 ^N | 29,58-36,78 | 38-43 | 36-38 | NR | 28,5-30,42 | NR | NR | NR | NR | 34-38 |
| RDW % | NR | NR | NR | 15,5-19,7 | NR | NR | NR | 16-21 | NR | NR | NR | NR | 16-20 | 16,6-18,2 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | 15,0-19,4 |
| Plaquettes x 10 ³ /μL | 100-800 | 220-640 | NR | 193 - 637 | NR | NR | NR | 200-590 | NR | NR | NR | NR | 160-650 | 258-446 | NR | NR | 181 | NR | NR | NR | 252-724 |
| MPV fl | NR | NR | NR | 4,5-7,5 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | 4,6-7,4 | 6,1-8,5 | NR | NR | 7,8 | NR | NR | NR | 5,7-8,0 |
| PDW % | NR | NR | NR | 53,1-79,6 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| WBC x 10 ³ /μL | 4,0-12,0 | 3,8-11,0 | NR | 4,9 - 12 | 6,3 ^A 8,7 ^B 7,2 ^C | 6,6-9,46 | 8,9-11,3 ^D 8,7-9,7 ^E 8,8-9,5 ^F | 4,7-11,4 | 1,081-1,661 ^G 1,035-1,553 ^H | 4,8-14,6 ^J 3,9-17,0 ^K | 13,80 ^L 11,68 ^M 14,9 ^N | 6,038-6,102 | 5,1-13,3 | 7,0-11,6 | 5,29-9,03 ^O 6,22-12,3 ^P 6,59-10,6 ^Q | 2,37-14,81 | NR | 6,61-7,71 | 5,2 | 8,9-9,4 ^T 8,5-9,2 ^U | 5,9-14,0 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------|---------|----|----------|--|----|--|---------|--|---|---|-------------|---------|-----------|--|-------------|-------|-----------|-------|--|---------|---|
| | | | | | | | | | 1,054-1,568 ^I | | | | | | 6,0-9,04 ^R 4,89-9,39 ^S | | | | | | | |
| Bands x 10 ³ /μL | 0-0,12 | 0-0,2 | NR | rare | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | 0 |
| Neutrophiles x 10 ³ /μL | 0,6-4,0 | 0,7-4,9 | NR | 1,8-6,3 | 2,3 ^A 4,7 ^B 3,1 ^C | NR | 3,3-5,1 ^D 3,3-3,8 ^E 3,4-4,1 ^F | 1,3-5,3 | 12,605-35,395 ^G 19,846-36,286 ^H 13,011-37,189 ^I | 1,7-6,2 ^J 0,7-9,0 ^K | 7,30 ^L 5,02 ^M 4,62 ^N | 22,54-29,56 | 1,7-6,0 | 2,8-4,8 | 1,89-3,29 ^O 3,45-6,23 ^P 2,64-5,44 ^Q 2,20-4,62 ^R 2,02-4,04 ^S | 47,48-55,0% | 40% | 2,27-2,85 | 30,9% | 3,4-3,7 ^T 3,4-3,7 ^U | 1,8-7,2 | |
| Lymphocytes x 10 ³ /μL | 2,5-7,5 | 1,0-5,8 | NR | 1,6-5,6 | 2,8 ^A 2,2 ^B 2,6 ^C | NR | 4,5-4,8 ^D 4,0-4,5 ^E 3,6-4,1 ^F | 1,9-5,9 | 50,401-76,665 ^G 49,403-70,729 ^H 48,5-76,032 ^I | 1,9-9,0 ^J 2,1-10,0 ^K | 5,30 ^L 5,84 ^M 9,59 ^N | 62,56-69,94 | 1,8-8,1 | 2,7-6,1 | 2,44-3,40 ^O 1,82-3,00 ^P 2,08-3,60 ^Q 1,83-3,39 ^R 2,08-3,70 | 31,18-35,1% | 58% | 4,21-7,65 | 55,4% | 4,5-4,8 ^T 4,5-4,9 ^U | 1,7-7,5 | |
| Monocytes x 10 ³ /μL | 0,025-0,84 | 0,0-0,9 | NR | 0-0,8 | 0,5 ^A 1,3 ^B 0,7 ^C | NR | 0,31-0,43 ^D 0,3-0,4 ^E 0,3-0,4 ^F | 0,2-0,8 | 0-5,558 ^G 0-7,891 ^H 0-7,409 ^I | 0,0-0,3 ^J 0,0-0,3 ^K | 0,14 ^L 0,06 ^M 0,28 ^N | 1,06-3,84 | 0,1-0,7 | 0,3-0,7 | 0,55-1,23 ^O 1,05-1,71 ^P 0,72-1,36 ^Q 0,65-1,05 ^R 0,55-1,05 ^S | 7,38-8,54% | 0,75% | 0,53-0,83 | 3,4% | 0,6-0,7 ^T 0,6-0,7 ^U | 0-0,9 | |
| Eosinophiles x 10 ³ /μL | 0-2,4 | 0-1,9 | NR | 0-0,9 | NR | NR | 0,4-1,1 ^D 0,8-1,0 ^E 0,7-1,0 ^F | 0,1-1,7 | 3,544-16,322 ^G 1,645-13,421 ^H 3,95-14,65 ^I | 0,1-1,2 ^J 0,0-0,7 ^K | 0,99 ^L 0,76 ^M 0,21 ^N | 0,6-5,1 | 0,1-1,2 | 0,2-0,6 | 0,52-0,86 ^O 0,39-0,63 ^P 0,42-0,80 ^Q 0,43-0,79 ^R 0,28-0,50 ^S | 6,51-7,37% | 2% | 0,37-0,45 | 10,2% | 0,3-0,4 ^T 0,3-0,4 ^U | 0-1,3 | |
| Basophiles x 10 ³ /μL | 0-0,2 | 0-0,1 | NR | 0-0,3 | NR | NR | 0,03-0,04 ^D 0-0,1 ^E 0-0,1 ^F | 0-0,1 | 0-0,405 ^G 0-0,921 ^H 0-0,319 ^I | NR | NR ^L NR ^M 0,50 ^N | 0-1,92 | 0-0,2 | 0,08-0,12 | 0,06-0,08 ^O 0,11-0,15 ^P 0,03-0,07 ^Q 0,03-0,05 ^R 0,02-0,04 ^S | 0,83-1,29% | 0,8% | NR | NR | 0,1 ^T rare ^U | 0-0,3 | |
| N:L ratio | NR | NR | NR | 0,4-2,34 | NR | NR | NR | 0-0,1 | 0,11-0,75 ^G 0,27-0,73 ^H 0,13-0,81 ^I | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | 0,66-0,86 | NR | NR | NR | |

NR : Non Renseigné

^{NG} vaches entre 5-8 ans non gestantes, ^{Ges} vaches entre 5-8 ans de 4-6 mois de gestation, ^{PLM} vaches entre 6-8 ans en début de lactation (4-6 semaines de lactation) avec une production laitière moyenne 8-12L de lait/jour, ^{PLE} vaches entre 6-8 ans en début de lactation (4-8 semaines de lactation) avec une production laitière moyenne de 13-18L/jour

^A 1 mois avant vêlage, ^B Au vêlage, ^C 1 mois après vêlage

^D 170j après vêlage, ^E 200j de gestation, ^F 5-12j après vêlage

^G Période d'été, ^H Période des pluies, ^I Période d'hiver

^J 1 à 8 jours avant vêlage, ^K 0 à 7 jours post-vêlage

^L 1 mois avant vêlage, ^M 0-21j post-partum, ^N 40-120 jours en lait

^O 15 jours avant vêlage, ^P au vêlage, ^Q 15j post-partum, ^R 30jours post-partum, ^S 45j post-partum

^T vaches allaitantes de race Hanwoo, ^U vaches laitières de race Holstein

1. Matériels et méthodes

1.1. Sélection des sujets de la population de référence

156 vaches ont été prélevées entre décembre 2015 et juin 2016 avec pour objectif d'obtenir au moins 120 échantillons de vaches « saines » pouvant constituer la population de référence selon les recommandations du CLSI³ adaptées à la médecine vétérinaire par l'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP)²⁴.

Le critère de « bonne santé » des animaux est défini comme suit :

- Animal n'ayant pas été malade d'après l'éleveur et n'ayant subi aucun traitement (hors antiparasitaire) dans le mois précédant le prélèvement.
- Animal déclaré sain le jour du prélèvement sur la base de l'examen clinique.

Nous avons choisi de prélever au maximum 5 animaux par élevage afin de limiter un biais d'échantillonnage par un « effet élevage » : parenté, alimentation, conduite de troupeau...

1.1.1. Répartition géographique

Les sujets sains constituant la population de référence ont été sélectionnés, au hasard, au sein de 32 élevages répartis dans l'Ouest de la France (Haute Garonne, Aveyron, Gers, Cantal, Deux Sèvres). Ces élevages, sans trouble sanitaire majeur, ont été recrutés selon les conseils du vétérinaire traitant. Pour des raisons pratiques, chaque journée de prélèvement, soit 3 à 4 élevages, se concentrait dans une zone géographique limitée à environ 30km autour d'un cabinet vétérinaire.

Dans un souci de représentativité, l'altitude des élevages a été renseignée.

1.1.2. Age et sexe

Il a été décidé de ne mener cette étude que sur des vaches adultes, soit la population la plus représentée en élevage naisseur. Les génisses, les veaux et les mâles ont été exclus.

L'âge des vaches prélevées s'étend de 2 à 17 ans.

1.1.3. Stade Physiologique

Le choix des animaux à prélever est également conditionné par leur stade physiologique.

3 groupes ont été définis de la manière suivante :

- Vaches en premier trimestre post-partum (0 à 3 mois après le vêlage) : groupe 1
- Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage) : groupe 2
- Vaches en dernier trimestre de gestation : groupe 3

L'objectif était d'obtenir, en proportions équivalentes, des prélèvements de ces trois stades physiologiques.

1.1.4. Type de production et races

Les sujets ont été sélectionnés afin d'obtenir un échantillonnage le plus représentatif possible du cheptel bovin français. Le pourcentage de chaque bovin n'étant disponible que par race seulement les bovins pure race ont été sélectionnés.²⁵

Au final un total de 78 vaches laitières et 78 vaches allaitantes ont été prélevées.

1.1.5. Etat sanitaire des élevages

Les prélèvements ont été effectués dans 32 élevages différents. Tous ces élevages étaient indemnes de leucose bovine, le statut sanitaire concernant le virus BVD était soit indemne soit inconnu.

1.1.6. Alimentation

L'objectif était de prélever en proportions équivalentes les vaches dont la ration était à base de foin ou d'herbe et celles dont la ration était à base d'ensilage de maïs.

1.2. Critères d'inclusion d'un animal

Les critères d'inclusion de la population de bovins de référence sont les suivants :

- Vache adulte de race pure ayant déjà eu au moins un veau.
- Pour chaque race, un nombre de vaches proportionnel à la prévalence de cette race au sein du cheptel bovin français.
- Vache ayant été jugée en bonne santé. D'une part, d'après les réponses fournies par l'éleveur à un questionnaire portant sur l'état de santé de la vache, sa ration, son historique médical, sa production en lait ainsi que celle du troupeau pour les vaches laitières **[Annexe 1 : Questionnaire troupeau]**. D'autre part, grâce à un examen clinique réalisé le jour du prélèvement de l'animal comportant une fréquence cardiaque et respiratoire, les contractions ruminales auscultées pendant 5 min et la mesure du périmètre thoracique **[Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement]**.
- Un maximum de 5 animaux par élevage.

Les animaux sont inclus uniquement après une information complète du propriétaire associée à la signature du « Formulaire de consentement éclairé » **[Annexe 3 : Consentement éclairé de l'éleveur]**.

1.3. Critères d'exclusion d'un animal

Les critères d'exclusion sont les suivants :

- Animal ayant reçu un traitement (hormis antiparasitaire) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal avec un historique d'affection diverse (boiterie, mammite, métrite, etc.) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal déclaré malade sur la base des réponses de l'éleveur au questionnaire et/ou de l'examen clinique.

1.4. Caractéristiques pré-analytiques et prélèvements des spécimens

Un examen clinique est réalisé sur chaque vache avant prélèvement selon le protocole et la fiche d'accompagnement visible en [Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement].

1.4.1. Prélèvements sanguins

Le sang est prélevé à la veine coccygienne avec une aiguille Venoject® Terumo® de 20G 0,9 x 25mm et un vacutainer Venosafe® Holder Terumo®. La contention de la vache est effectuée par l'éleveur et est adaptée à chaque animal.

Pour chaque vache 4 prélèvements sont effectués, dans l'ordre chronologique suivant :

- 1 tube sec de 10mL (Venosafe®, Terumo, Europe)
- 2 tubes de 4mL héparinés (Lithium heparin 4mL, Venosafe®, Terumo, Guyencourt, France).
- 1 tube collecteur de 4mL d'EDTA (EDTA 3mL, Venosafe®, Terumo, Guyencourt, France).

Les tubes sont immédiatement identifiés par le numéro d'étude du bovin et homogénéisés après récolte par une dizaine de retournements lents. L'heure du prélèvement est notée sur la feuille d'accompagnement du bovin.

1.4.2. Conditions de conservation et d'acheminement des prélèvements

Les tubes EDTA et héparinés sont stockés à +4°C dans l'attente de leur analyse au laboratoire. Ils seront analysés au maximum 24 heures après le prélèvement au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Pour effectuer notre étude sur les hémogrammes de bovins, seuls les prélèvements sur tube d'EDTA nous sont utiles. Les autres tubes serviront dans la réalisation de nouvelles études.

1.5. Technique d'analyse des prélèvements sanguins

L'automate d'hématologie utilisé dans cette étude est le Sysmex XT-2000iV® (Sysmex, Villepinte, France) permettant d'obtenir une Numération de Formule Sanguine (NFS) complète à partir de 3 techniques : la cytométrie de flux, la variation d'impédance et la fluorescence optique.

1.5.1. Contrôle de qualité

Des contrôles journaliers sont effectués sur l'automate Sysmex XT-2000iV® (Sysmex, Europe GmbH, Norderstedt, Germany) selon un protocole de routine du laboratoire de biologie médicale de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Des spécimens de sang de contrôle fournis par le fabricant sont analysés afin de vérifier si chaque mesure correspond aux cibles fournies par le fabricant (Sysmex e-check XE L2, Sysmex, Villepinte, France). Si au bout du troisième passage du spécimen de contrôle, au moins une valeur hors cible persiste, diverses opérations correctrices sont prévues par le fabricant pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème.

Pour chaque jour d'analyse, l'imprécision et l'inexactitude de l'analyseur étaient calculées à partir des spécimens de contrôle de qualité fournis par le fabricant :

- Imprécision : Coefficient de variation CV (%) = $(SD/moyenne) * 100$ où SD = standard deviation = écart type
- Inexactitude (%) = $[(valeur mesurée - valeur attendue) / valeur attendue] * 100$

1.5.2. Critères d'exclusion du laboratoire

Les tubes exclus de l'étude sont ceux présentant un volume de sang prélevé insuffisant ou un volume trop important (limite matérialisée par le fabricant à l'aide d'un repère sur le tube) et les tubes de sang sur EDTA présentant un caillot macroscopique.

1.5.3. Procédures effectuées pour chaque prélèvement

Chaque tube est analysé au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse au maximum 24 heures après le prélèvement. Les tubes

EDTA sont placés sur un agitateur (Specie Mix®, Oxford, CT06478, USA) pendant 20 minutes, puis 30 retournements sont effectués afin d'homogénéiser les prélèvements.

Les analytes sanguins sont mesurés à l'aide de l'automate Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Villepinte, France) réglé sur l'analyse de sang bovin (software version 00-09).

1.6. Frottis sanguins

Pour chaque animal, 2 frottis sanguins sont réalisés par le même opérateur et identifiés par le numéro d'étude du bovin dans l'heure suivant le prélèvement sanguin. L'un des frottis est coloré, monté puis conservé dans une boîte prévue pour l'étude.

La lecture des frottis est effectuée par un même lecteur selon la procédure décrite en annexe **[Annexe 6 : Fiche de lecture des frottis sanguins]**. Les résultats concernant la formule leucocytaire et le degré d'agrégation plaquettaire sont reportés sur les fiches d'analyse de ce dernier **[Annexe 4 : Fiche de résultats des lectures des frottis sanguins]**.

Concernant la formule leucocytaire, une différenciation lors du comptage est faite entre les petits lymphocytes, les moyens lymphocytes, les grands lymphocytes et les lymphocytes à grains.

En effet 3 tailles de lymphocytes sont distinguables en microscopie chez les bovins ^{26,27} :

- Les petits lymphocytes : de diamètre égal de 1 à 1,5 fois le diamètre d'une hématie, leur noyau est rond avec une chromatine dense et laisse peu de place au cytoplasme gris bleu disposé en croissant autour du noyau. Ces caractéristiques font penser qu'ils ne sont pas métaboliquement actifs.
- Les moyens lymphocytes : leur diamètre est situé entre 1,5 et 2,5 fois celui d'une hématie, leur noyau est plus clair et présente un pattern de la chromatine caractéristique avec des tâches sombres séparées de tâches plus claires, le noyau est rond mais peut avoir une légère bosselure. Le cytoplasme est étroit repoussé sur les bords de la cellule ou d'un côté suivant la disposition excentrée du noyau. Le cytoplasme est bleu clair et peut être plus foncé sur les bords de la cellule.
- Les grands lymphocytes : leur diamètre est supérieur à 2,5 fois le diamètre d'une hématie, le noyau est rond ou en étoile et est excentré avec une chromatine d'apparence lisse présentant parfois des tâches plus sombres. Le cytoplasme est plus clair et occupe plus de place que celui des autres lymphocytes. Sa couleur est bleue

grise et peut contenir des petites vacuoles claires. Certains grands lymphocytes peuvent présenter un noyau en forme d'haricot ou avec une encoche profonde divisant le noyau en 2 lobes.

Les lymphocytes peuvent aussi présenter des petites granulations magenta (azurophile) de formes et de tailles variables. Certaines sont en baguettes, d'autres sont rondes de teinte rougeâtre à violet foncé. Ces granulations se retrouvent souvent en amas plutôt que libres dans le cytoplasme.

L'automate Sysmex XT-2000iV n'étant pas capable de différencier ces différents types de lymphocytes, seul un comptage manuel pourra nous informer sur la fréquence de ces lymphocytes chez les bovins.

1.7. Analytes sanguins

La totalité des analytes disponibles sur l'automate XT-2000iV ont été analysés et sont les suivants :

- **RBC-O** : numération des globules rouges par méthode optique (cytométrie en flux)
- **RBC-I** : numération des globules rouges par variation d'impédance
- **Hemoglobin** : hémoglobine (HB)
- **HCT**: hématocrite
- **MCV** : volume globulaire moyen
- **MCH** : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
- **MCHC** : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- **RET** : réticulocytes
- **LFR**: proportion de réticulocytes à faible fluorescence
- **MFR**: proportion de réticulocytes à fluorescence moyenne
- **HFR** : proportion de réticulocytes à forte fluorescence
- **IFR**: fraction de réticulocytes immatures (IRF= HFR +MFR)
- **WBC**: numération des globules blancs
- **Neutrophils** : numération des granulocytes neutrophiles
- **Eosinophils** : numération des granulocytes éosinophiles
- **Basophils** : numération des granulocytes basophiles
- **Lymphocytes** : numération des lymphocytes

- **Monocytes** : numération des monocytes
- **PLT-O** : numération des plaquettes par méthode optique (cytométrie en flux)
- **PLT-I** : numération des plaquettes par variation d'impédance
- **RDW-SD** : indice de distribution des globules rouges (mesuré)
- **RDW-CV** : indice de distribution des globules rouges (calculé)
- **P-LCR** : proportion des plaquettes de plus grande taille (platelet larger cell ratio)
- **PCT** : plaquettocrite
- **PDW** : indice de distribution des plaquettes

1.8. Analyses statistiques des données

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus sont régulièrement stockés dans un cahier d'expérimentation ainsi que dans un tableur Excel. Les intervalles de référence sont déterminés à l'aide du logiciel Reference Value Advisor®^{28,29}. Ce logiciel permet de calculer des intervalles de référence à partir de données contenues dans un tableur Microsoft Excel en respectant les lignes directrices du CLSI³.

Ce logiciel nous permet d'obtenir une analyse statistique descriptive qui indique : la taille de l'échantillon, la moyenne, la médiane, l'écart type et les valeurs minimales et maximales.

Le logiciel effectue une transformation Box-Cox sur les données brutes qui permet de transformer les variables de manière à se rapprocher de la distribution normale ou à les symétriser. La normalité des distributions des valeurs non transformées ou après transformation est contrôlée par un test de normalité selon Anderson-Darling avec histogrammes et Q-Q plots.

Les valeurs aberrantes des extrémités sont détectées par un test de Turkey. Le nombre de valeurs aberrantes potentielles est signalé sur la feuille principale des résultats et une liste de ces valeurs aberrantes est produite sur une feuille séparée. Un graphe en « boîte à moustache » (médiane, 25^e et 75^e percentiles, IC 95% de la moyenne), avec un diagramme de points montrent toutes les valeurs permettant également d'identifier visuellement les valeurs aberrantes.

Ces valeurs aberrantes sont écartées des analyses statistiques.

Pour toute série de données, Reference Value Advisor® calcule et rapporte 5 intervalles de référence fondés sur différentes hypothèses concernant la répartition des données. Dans notre étude, l'échantillon se composant de plus de 120 sujets, les intervalles de référence et les intervalles de confiance à 90% des limites des intervalles de référence ont été déterminés par une méthode statistique non paramétrique, conformément aux recommandations de l'IFCC-CLSI³ et l'ASVCP²⁴.

Les analyses de variances (ANOVA) ont été effectuées à l'aide du logiciel Systat 13® (Systat Software, San Jose, CA, USA). Le partitionnement des valeurs de référence selon le type de production de l'animal (allaitant ou laitier), le stade physiologique (début, milieu de lactation et tarissement), l'élevage (1 à 32) et l'âge a été testé par analyse de variance (ANOVA) multifactorielle. Lors de différence significative, la nécessité de réaliser de nouveaux intervalles de référence pour chaque groupe de partition a été évaluée à l'aide du test Z d'Harris et Boyd³⁰.

2. Résultats

2.1. Caractéristiques de la population de référence

Au total, 156 vaches signalées saines par l'éleveur et présentant un examen clinique normal ont été prélevées. 4 vaches ont été exclues de l'étude car les prélèvements révélaient la présence de caillot macroscopiquement visible ou une insuffisance de remplissage des tubes de sang sur EDTA (bovins n°10, 117, 124 et 154).

L'objectif de l'échantillonnage était d'avoir une population se rapprochant le plus possible du cheptel français²⁵. L'échantillon de vaches prélevées présente autant de vaches laitières que de vaches allaitantes (76 vaches dans chaque catégorie).

Au final, la distribution des races de notre échantillon diffère légèrement de celle du cheptel français. **[Tableau 2 : Caractéristiques de la population étudiée : races]**. La race Blonde d'Aquitaine est surreprésentée (15,1% de notre échantillon au lieu de 6% des vaches dans le cheptel français) alors que les races Montbéliarde et Normande sont légèrement sous-représentées (respectivement 6,6% et 3,3% au lieu de 8% et 5% dans le cheptel français). La principale race laitière reste la Prim'Holstein (56 vaches).

| Race | Nombre de prélèvements retenus | Pourcentage dans l'échantillon | Objectif du protocole |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Prim'Holstein | 56 | 36,8% | 32% |
| Charolaise | 25 | 16,4% | 19% |
| Blonde d'Aquitaine | 23 | 15,1% | 6% |
| Limousine | 21 | 13,8% | 14% |
| Montbéliarde | 10 | 6,6% | 8% |
| Normande | 5 | 3,3% | 5% |
| Salers | 5 | 3,3% | 3% |
| Aubrac | 2 | 1,3% | 2% |
| Autre : Brune des Alpes | 5 | 3,3% | 4% |

Tableau 2 : Caractéristiques de la population étudiée : races

Le panel d'âge des vaches est assez large : compris entre de 2,5 et 17 ans. **[Figure 1 : Caractéristiques de la population étudiée : âges]**. Néanmoins, 95% des vaches ont un âge

compris entre 2,5 et 11 ans. Les vaches allaitantes de notre échantillon sont significativement plus vieilles de 2 ans que les vaches laitières (ANOVA, $p = 0,035$).

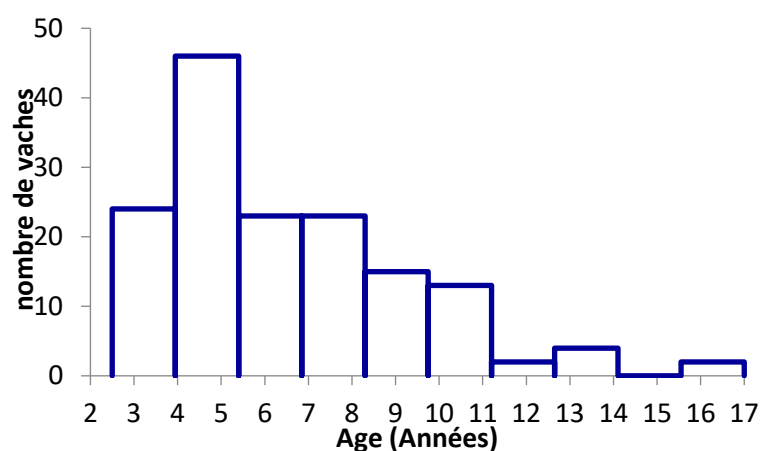


Figure 1 : Caractéristiques de la population étudiée : âges

Les vaches prélevées étaient aussi classées selon 3 stades physiologiques de façon à avoir un nombre globalement similaire dans chaque catégorie [**Tableau 3 : Caractéristiques de la population étudiée : stade physiologique**]:

- Vaches en premier trimestre post-partum (0 à 3 mois après le vêlage) : groupe 1
- Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage) : groupe 2
- Vaches en dernier trimestre de gestation : groupe 3

| Stade physiologique | Nombre de vaches N | Vaches en 1 ^{er} trimestre post-partum | Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage) | Vaches en dernier trimestre de gestation |
|---------------------|--------------------|---|---|--|
| Vaches allaitantes | 76 | 24 | 28 | 24 |
| Vaches laitières | 76 | 26 | 30 | 20 |
| Total | 152 | 50 | 58 | 44 |

Tableau 3 : Caractéristiques de la population étudiée : stade physiologique

Enfin les vaches sont classées dans 2 catégories selon leur alimentation : avec ensilage de maïs ou sans ensilage de maïs [**Tableau 4 : Caractéristiques de la population étudiée : alimentation**].

| Type de ration | Nombre de vaches N | Pourcentage de l'échantillon | Objectif de l'étude |
|-----------------------|--------------------|------------------------------|---------------------|
| Avec ensilage de maïs | 76 | 50% | 50% |
| Sans ensilage de maïs | 76 | 50% | 50% |

Tableau 4 : Caractéristiques de la population étudiée : alimentation

2.2. Contrôle de Qualité

Les résultats des échantillons du contrôle de qualité fournis par le fabricant sont répertoriés dans le tableau suivant. L'imprécision et l'inexactitude de l'analyseur étaient bas sauf pour les paramètres concernant les réticulocytes et la numération monocytaire :

[Tableau 5 : résultats des contrôles de qualité durant l'étude]

| Variable | Unité | Imprécision CV (%) | Inexactitude (%) | Valeur attendue CQ |
|--------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| RBC-I | 10 ¹² /L | 0.32 | -0.63 | 4.42 |
| RBC-O | 10 ¹² /L | 1.83 | -7.16 | 4.67 |
| HGB | g/L | 0.98 | +0.76 | 123,7 |
| HCT | L/L | 1.12 | +1.22 | 0.360 |
| MCV | fL | 0.99 | +0.17 | 82.8 |
| MCH | pg | 0.91 | -0.35 | 28.5 |
| MCHC | g/L | 0.94 | -0.45 | 343.7 |
| RDW-SD | fL | 1.49 | +0.77 | 43.5 |
| RDW-CV | % | 0.55 | +0.68 | 14.8 |
| RBC-HGB | pg | ND | | |
| RET | 10 ⁹ /L | 6.56 | +1.26 | 0.077 |
| RET | % | 6.63 | +0.23 | 1.8 |
| RET-HGB | pg | ND | | |
| Delta-HGB | pg | ND | | |
| LFR | % | 5.33 | -1.97 | 76.0 |
| MFR | % | 10.98 | +3.35 | 21.1 |
| HFR | % | 64.46 | +40.97 | 2.6 |
| IRF | % | 15.89 | +6.45 | 24.0 |
| WBC | 10 ⁹ /L | 3.40 | -2.97 | 7.43 |
| Neutrophiles | 10 ⁹ /L | 5.89 | -0.49 | 3.47 |
| Eosinophiles | 10 ⁹ /L | 5.82 | +1.13 | 0.71 |
| Basophiles | 10 ⁹ /L | 3.34 | +1.51 | 4.70 |
| Lymphocytes | 10 ⁹ /L | 7.52 | +1.76 | 2.24 |
| Monocytes | 10 ⁹ /L | 10.06 | -6.86 | 0.86 |
| PLT-I | 10 ⁹ /L | 6.04 | -0.46 | 218.0 |
| PLT-O | 10 ⁹ /L | 6.56 | -0.21 | 208.3 |
| MPV | fL | 1.13 | +0.02 | 9.6 |
| PDW | fL | 4.30 | +0.91 | 8.4 |
| MPV | fL | 1.13 | +0.02 | 9.6 |
| PCT | % | 7.32 | +1.57 | 0.21 |

Tableau 5 : résultats des contrôles de qualité durant l'étude

8 mesures faites à partir de l'échantillon de contrôle du fabricant; Imprecision CV (%) = (SD/Moyenne)*100; Inexactitude (%) = [(mesurée – attendue)/attendue]*100; CQ: contrôle qualité; ND: indisponible en CQ.

2.3. Intervalles de référence

La plupart des distributions ne suivaient pas la loi de Gauss exceptée celle concernant les hématies (RBC). Certaines d'entre elles se rapprochaient de la loi Normale après une transformation Box-Cox mais d'autres n'ont pas pu être transformées afin de suivre la loi de Gauss.

2.3.1. Intervalles de référence de la lignée rouge

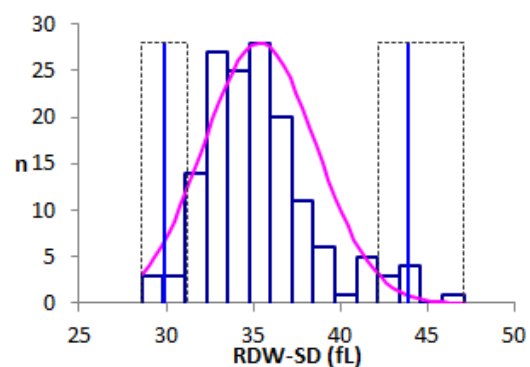
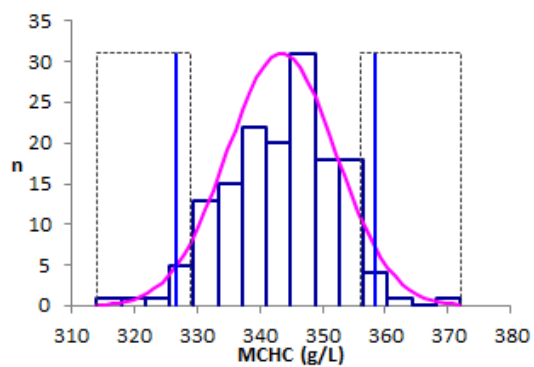
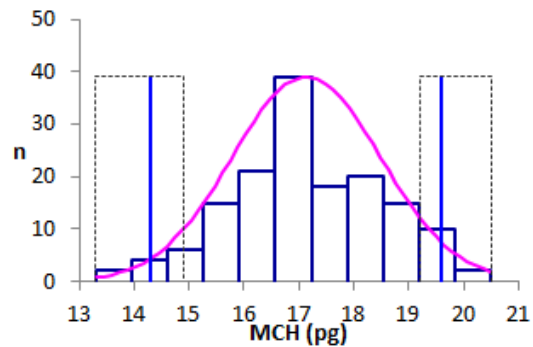
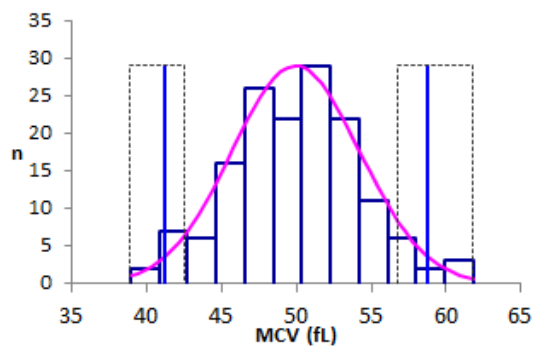
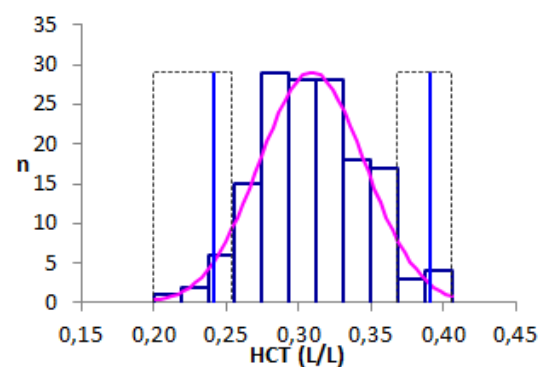
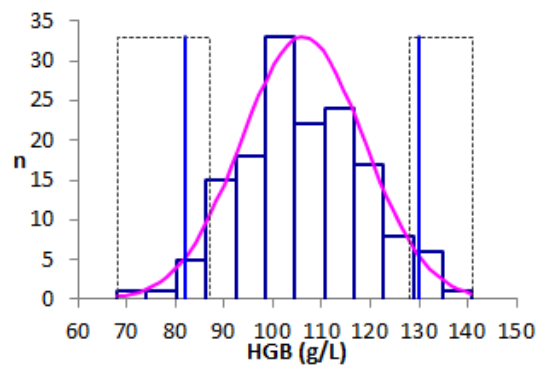
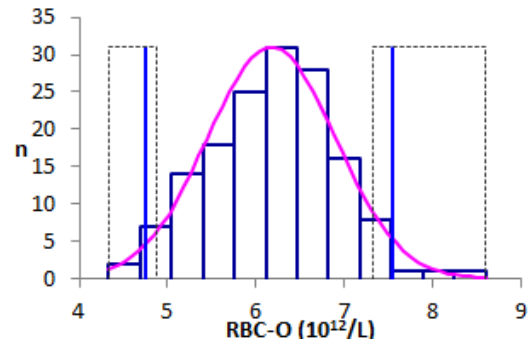
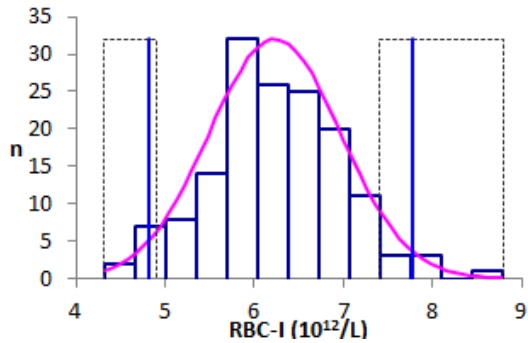
Les intervalles de référence concernant les analytes sanguins de la lignée rouge ont été obtenus à partir des prélèvements de 152 vaches.

Les valeurs sont résumées dans le tableau suivant [Tableau 6 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV pour les analytes sanguins de la lignée rouge et leurs index calculés] :

| | N | Moyenne SD | Médiane (Range) | P natif *P Box-Cox | Limites des intervalles de référence | |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------|--|--|
| | | | | | 2.5 (95%CI) | 97.5% (95%CI) |
| RBC-I 10 ⁶ /μL | 152 | 6,23 (0,74) | 6,29 (4,3-8,8) | 0.819 *0.729 | 4,8 (4,3-4,9) | 7,8 (7,4-8,9) |
| RBC-O 10 ⁶ /μL | 152 | 6,17 (0,73) | 6,19 (4,3-8,6) | 0.948 *0.903 | 4,8 (4,3-4,9) | 7,6 (7,3-8,6) |
| HGB g/L | 151 ^a | 106,1 (12,6) | 105,0 (68-141) | 0.215 *0.885 | 82,0 (68-87) | 130,0 (128-141) |
| HTE | 151 ^b | 0,309 (0,037) | 0,306 (0,200-0,406) | 0.451 *0.709 | 0,242 (0,200-0,254) | 0,391 (0,368-0,406) |
| L/L | 76 Laitières 75 Allaitantes | 0,293 (0,030) 0,326 (0,035) | 0,295 (0,200-0,359) 0,328 (0,257-0,406) | 0.514 0.127 | 0,220 (0,200-0,245) 0,258 (0,250-0,269) | 0,355 (0,336-0,359) 0,401 (0,388-0,412) |
| MCV fL | 152 | 50,0 (4,3) | 50,2 (38,9-61,8) | 0.928 *0.908 | 41,2 (38,9-42,5) | 58,7 (56,8-61,8) |
| MCH pg | 152 | 17,1 (1,4) | 17,0 (13,3-20,5) | 0.409 *0.378 | 14,3 (13,3-14,9) | 19,6 (19,2-20,5) |
| MCHC | 152 | 343,2 (9,3) | 344,0 (303-372) | 0.354 *0.642 | 324,3 (303-328) | 358,4 (356-372) |
| RDW-SD | 151 ^c | 35,4 (3,2) | 34,9 (28,6-47,1) | 0.000 *0.292 | 29,9 (28,6-31,2) | 43,9 (42,2-47,1) |
| RDW-CV % | 150 ^d | 21,2 (1,8) | 21,1 (17,3-27,6) | 0.042 *0.025 | 17,6 (17,3-18,1) | 25,5 (24,2-27,6) |
| RBC-HGB pg | 151 ^e | 16,5 (1,2) | 16,6 (13,7-19,2) | 0.356 *0.581 | 14,1 (13,7-14,5) | 18,7 (18,3-19,2) |
| Réticulocytes 10 ⁹ /L | 149 ^f | 2,754 (1,675) | 2,500 (0-6,900) | 0.000 *0.000 | 0,0 | 6,750 |
| Réticulocytes % | 149 ^f | 0,044 (0,027) | 0,040 (0,00-0,13) | 0.000 *0.000 | 0,000 | 0,100 |
| RET-HGB pg | 148 ^g | 16,7 (2,3) | 16,3 (11,9-24,2) | 0.000 *0.000 | 12,4 (11,9-13,6) | 22,7 (22,0-24,2) |
| Delta-HGB pg | 148 ^g | 0,1 (2,0) | -0,2 (-4,7-7,1) | 0.000 *0.001 | -3,1 (-4,7 - -3,4) | 5,7 (4,8-7,1) |

Tableau 6 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV pour les analytes sanguins de la lignée rouge et leurs index calculés

Outliers deleted : a #47= 146 g/L ; b #47= 0,477; c # = 48,8; d # 41 = 29,2 & #5 = 29,7 ; e#22=21.0; f: #33=11.30 (0.18%), #137=11.10(0.16%),#132=10.10(0.16%) ; g:#3=5.8(-9.4), #9=32.7(15), #130=28.6(11.3), #148=26.7(11.2)



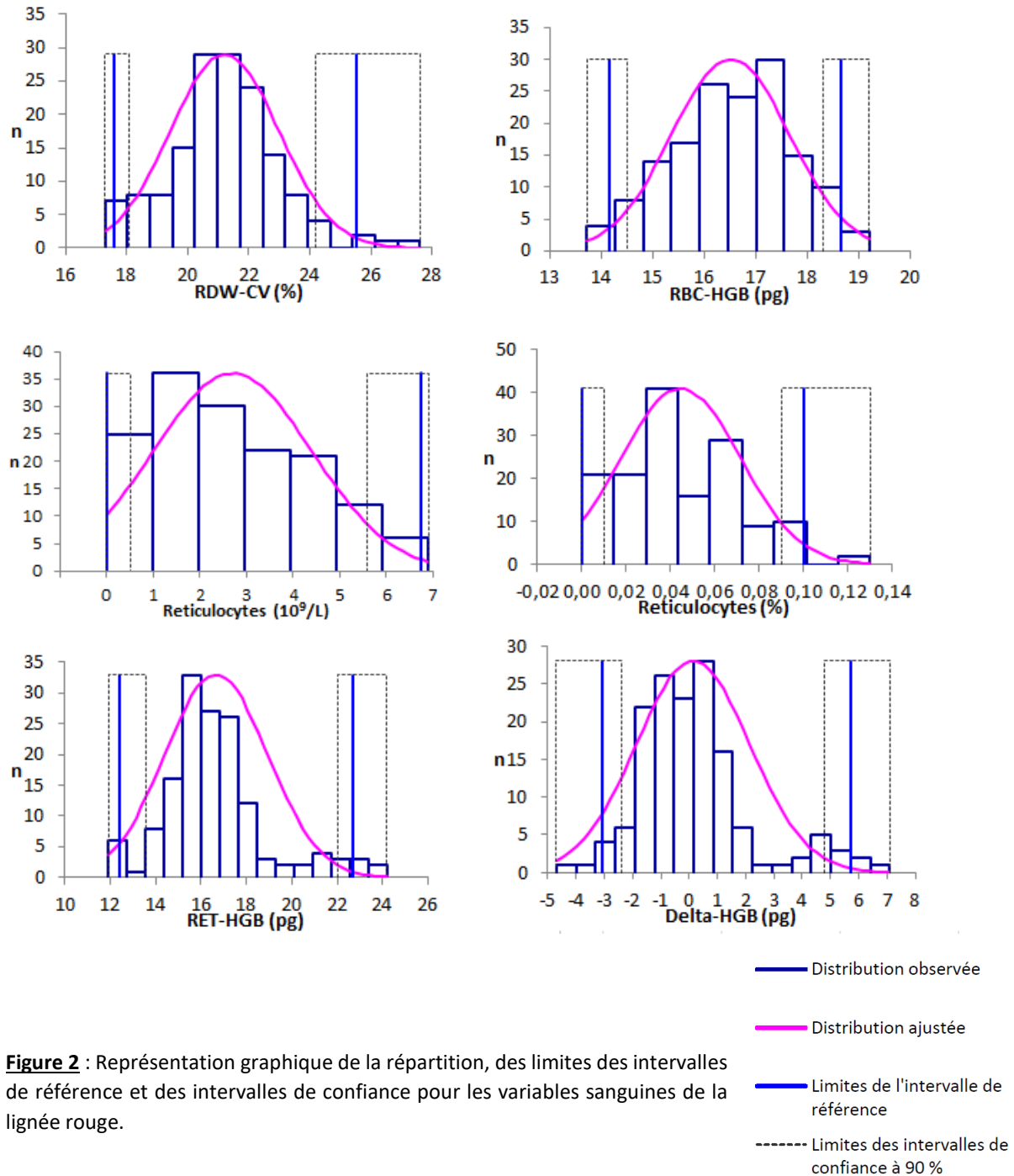


Figure 2 : Représentation graphique de la répartition, des limites des intervalles de référence et des intervalles de confiance pour les variables sanguines de la lignée rouge.

Concernant les réticulocytes, le calcul des intervalles de référence par la technique de fluorescence n'a pas été possible car 65,5% des vaches présentent un LFR = 100%. De plus le MFR, HFR et l'IRF étaient égales à zéro chez respectivement 74,3%, 84,5% et 65,5% des vaches.

2.3.2. Intervalles de référence de la lignée blanche

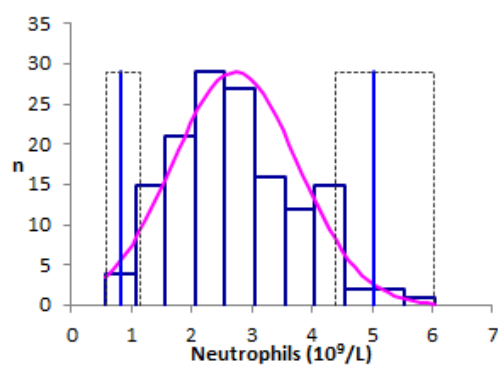
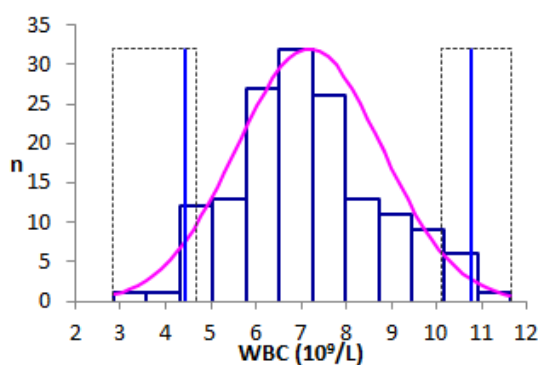
Les intervalles de référence concernant les analytes sanguins de la lignée blanche ont été obtenus à partir des prélèvements de 152 vaches.

Les valeurs sont résumées dans le tableau suivant [Tableau 7 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV pour les analytes sanguins de la lignée blanche et leurs index calculés] :

| | N | Moyenne SD | Médiane (Range) | P natif *P Box-Cox | Limites des intervalles de référence | |
|--|------------------|----------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| | | | | | 2.5% (95%CI) | 97.5% (95%CI) |
| WBC 10 ³ /μL | 152 | 7,17 (1.61) | 6,95 (2,85-11-64) | 0.054 *0.539 | 4,4 (2,85-4,69) | 10,8 (10,12-11,64) |
| Neutrophiles 10 ³ /μL | 145 | 2,71 (1.05) | 2,65 (0.57-6.03) | 0.150 *0.888 | 0,76 (0.57-1.13) | 5,02 (4.40-6.03) |
| Eosinophiles 10 ³ /μL | 145 | 0,69 (0,45) | 0,56 (0,04-2,31) | 0.000 *0.910 | 0,11 (0,04-0,18) | 2,12 (1,51-2,31) |
| Basophiles 10 ³ /μL | 144 ^a | 0,05 (0,02) | 0,04 (0,01-0,13) | 0.000 *0.000 | 0,01 (0,01-0,02) | 0,12 (0,09-0,13) |
| Lymphocytes 10 ³ /μL | 144 ^b | 3,1 (0,8) | 3,0 (1,7-5,5) | 0.003 *0.145 | 1,8 (1,7-1,9) | 4,9 (4,7-5,5) |
| Monocytes 10 ³ /μL | 145 | 0,57 (0,21) | 0,53 (0,16-0,35) | 0,000 | 0,26 (0,16-0,33) | 1,20 (0,91-1,35) |

Tableau 7 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV pour les analytes sanguins de la lignée blanche et leurs index calculés

Outliers deleted : a #101=0,17; b #77=9,94



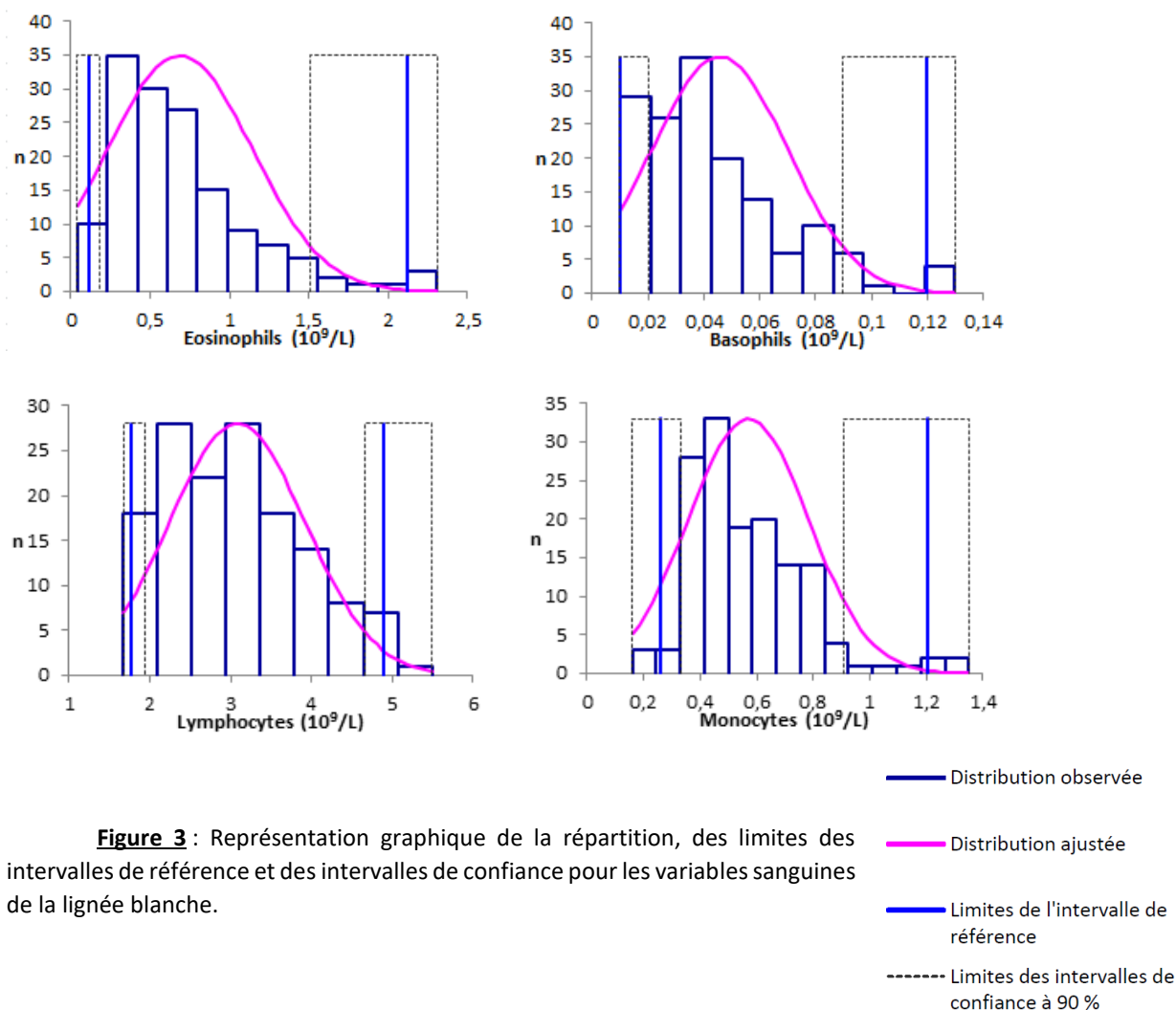


Figure 3 : Représentation graphique de la répartition, des limites des intervalles de référence et des intervalles de confiance pour les variables sanguines de la lignée blanche.

2.3.3. Intervalles de référence de la lignée plaquettaire

Concernant les plaquettes, pour 33 prélèvements issus de différentes vaches le Sysmex XT-2000iV n'a pas réussi à exécuter un comptage et aucun résultat n'est donc paru. De plus, lors de l'observation des frottis au microscope, 121 vaches présentaient des agrégats plaquettaires, soit dans 80% des cas. La limite basse de l'intervalle de référence était de $21,3 \cdot 10^9/L$ concernant le comptage des plaquettes par la méthode d'impédance (PLT-I). L'agrégat plaquettaire testé comme variable n'a pas d'effet significatif sur le comptage plaquettaire (ANOVA mono factorielle, $P = 0,537$ pour PKT-I et $P = 0,655$ pour PLT-O). En tenant compte des autres variables, il n'y avait une différence significative pour la mesure des plaquettes par impédance (PLT-I) qu'entre les scores 0 et 3.

Dans de telles conditions, l'analyseur est incapable de compter de façon optimale le nombre de plaquettes issues de chaque échantillon. Il n'était donc pas pertinent de calculer des intervalles de références à partir des échantillons de sang de vaches sur EDTA analysés par le Sysmex XT-2000iV.

2.3.4. Intervalles de référence d'après le comptage manuel

Le comptage manuel des cellules de la lignée blanche était significativement différent des concentrations obtenues par le Sysmex XT-2000iV (Test t de Student, $P \leq 0,0037$) pour tous les types de cellules exceptés les basophiles.

A l'observation microscopique les petits, moyens et grands lymphocytes ont pu être différenciés, ainsi que les lymphocytes à grains, aucun neutrophile non segmenté n'a été observé. Néanmoins très peu de petits lymphocytes étaient visibles et ils étaient difficilement distinguables des moyens lymphocytes. De ce fait, seulement trois groupes de lymphocytes ont été distingués : les petits et moyens lymphocytes, les grands lymphocytes, les lymphocytes à grains [Tableau 8 : Intervalles de référence établis par comptage manuel pour les analytes sanguins de la lignée blanche] :

| | N | Moyenne SD | Médiane (Range) | P natif | Limites des intervalles de référence | |
|--|------------------|----------------|---------------------|---------|---|---------------------|
| | | | | | 2.5% (95%CI) | 97.5% (95%CI) |
| Neutrophiles 10 ³ /μL | 152 | 2,44 (1.16) | 2,24 (0,29-5.91) | 0,000 | 0,66 (0.29-0.80) | 5,07 (4.86-5.93) |
| Eosinophiles 10 ³ /μL | 152 | 0,62 (0,47) | 0,53 (0,00-2.76) | 0,000 | 0,08 (0.00-0.12) | 2,22 (1.46-2,76) |
| Basophiles 10 ³ /μL | 151 ^a | 0,05 (0.06) | 0,05 (0.00-0.23) | 0,000 | 0,00 (0.00-0.00) | 0,19 (0.18-0,23) |
| Lymphocytes 10 ³ /μL | 152 | 3,70 (1.08) | 3,58 (1.69-7.95) | 0,012 | 2,02 (1.60-2.17) | 6,21 (5.61-7,95) |
| Petits et moyens L 10 ³ /μL | 152 | 3,45 (1.01) | 3,31 (1.59-6.46) | 0,031 | 1,79 (1.59-1.98) | 5,74 (5.15-6,46) |
| L à grains 10 ³ /μL | 151 ^b | 0,09 (0.10) | 0,07 (0.00-0.39) | 0,000 | 0,00 (0.00-0.00) | 0,38 (0.27-0.39) |
| Grands L 10 ³ /μL | 151 ^c | 0,14 (0.15) | 0,10 (0.00-0.76) | 0,000 | 0,00 (0.00-0.00) | 0,55 (0.44-0.76) |
| Monocytes 10 ³ /μL | 151 ^d | 0,57 (0,21) | 0,53 (0,16-0,35) | 0,000 | 0,26 (0,16-0,33) | 1,20 (0,91-1,35) |

Tableau 8 : Intervalles de référence établis par comptage manuel pour les analytes sanguins de la lignée blanche

Outliers deleted: a 0,37 (#28); b 0.55 (#123); c 1.57(#32); d 1.18 (#62);

Afin d'expliquer les différences entre le comptage manuel et les concentrations obtenues par le Sysmex XT-2000iV concernant la lignée blanche, la lecture des nuages de points fournis par l'analyseur pour chaque échantillon a été faite. Pour chaque prélèvement, la vérification de la séparation des nuages de points concernant les neutrophiles puis les lymphocytes et monocytes a été faite et reportée dans le tableur Excel correspondant.

2.4. Influence des critères de partition sur les intervalles de référence

2.4.1. Influence du type de production

La seule variable statistiquement différente selon le type de production était l'hématocrite. L'HCT était significativement plus élevé chez les vaches allaitantes que chez les vaches laitières. Les intervalles de référence étaient aussi significativement différents (Test d'Harris et Boyd $z > z^*$).

2.4.2. Influence du stade physiologique

Selon le comptage de l'analyseur, le stade de lactation était un facteur de variation pour certaines variables de la lignée rouge et pour les basophiles. Ces intervalles sont présentés dans le tableau suivant : [Tableau 9 : Intervalles de référence hématologiques suivant le stade de lactation (L1 : 1-90 jours ; L2 : 91-180 jours, L3 : tarissement)] :

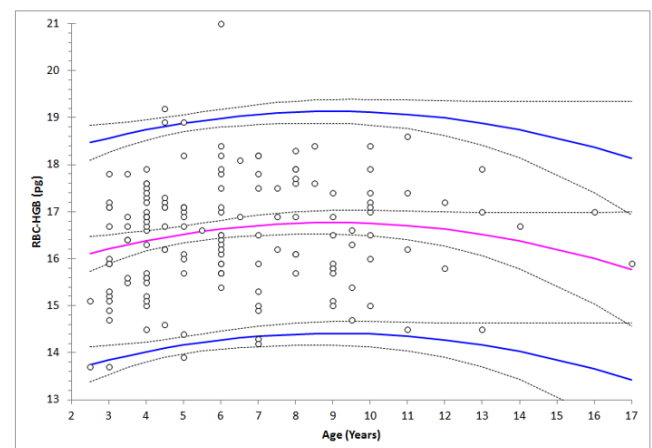
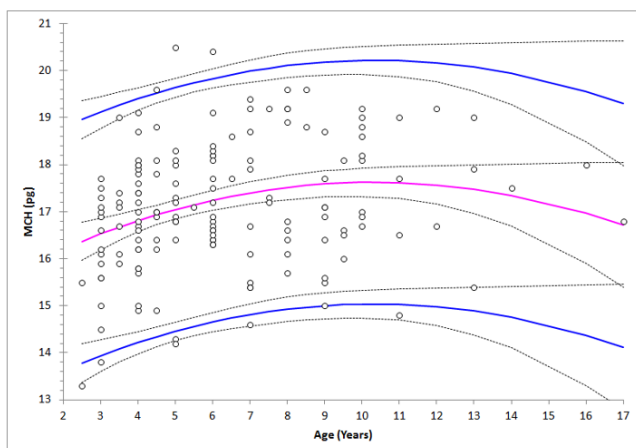
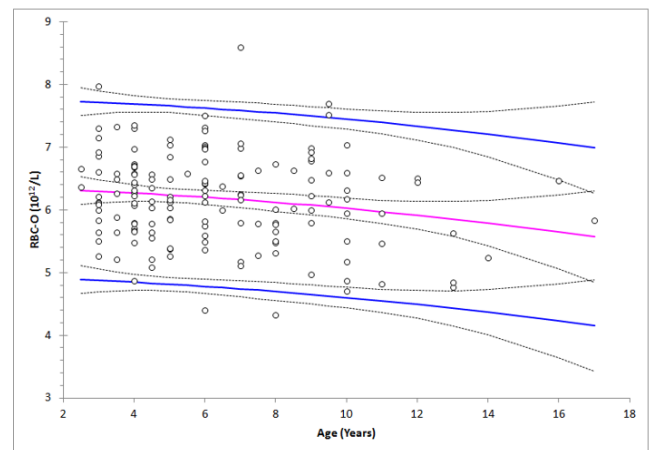
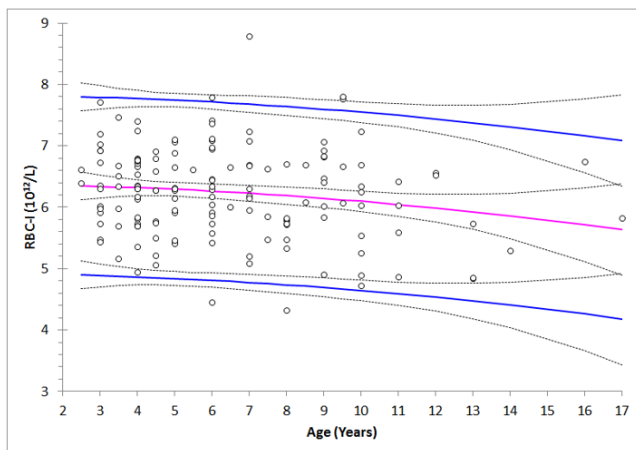
| | n | Stade de lactation | | | Test de Harris & Boyd |
|---------------|---------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | L1 50 | L2 57 | L3 45 | |
| HGB g/L | Médiane | 102.5 | 105.7 | 107.0 | NS |
| | 2.5 | 71.85 (68.0-83.9) | 80.5 (76.87) | 91 (91-92) | |
| | 97.5 | 138.25 (125.5-141.0) | 129.55 (127.7-130.0) | 158.9 (128.7-164.0) | |
| HCT L/L | Médiane | 0.300 | 0.308 | 0.313 | NS |
| | 2.5 | 0.209 (0.200-0.245) | 0.235 (0.222-0.254) | 0.258 (0.257-0.273) | |
| | 97.5 | 0.401 (0.371-0.406) | 0.393 (0.364-0.398) | 0.3968 (0.362-0.400) | |
| MCV fl | Médiane | 50.0 | 48.7 | 51.5 | L2vsL3 |
| | 2.5 | 41.53 (41.2-45.2) | 39.035 (38.9-42.2) | 41.0-45.4) | |
| | 97.5 | 57.825 (55.8-55.1) | 56.585 (54.8-56.9) | 61.785 (60.8-61.8) | |
| MCH pg | Médiane | 17.2 | 16.8 | 17.6 | L2vsL3 |
| | 2.5 | 14.465 (14.3-15.6) | 13.525 (13.3-14.6) | 14.305 (14.2-15.5) | |
| | 97.5 | 19.49 (18.9-19.6) | 19.2 (19.0-19.2) | 20.485 (19.6-20.5) | |
| RET-HGB pg | Médiane | 16.7 | 16.2 | 16.9 | L1vsL3 L2vsL3 |
| | 2.5 | 14.4 (14.4-15.2) | 13.7 (13.7-14.3) | 14.0 (14.0-18.9) | |
| | 97.5 | 18.3 (17.9-18.4) | 18.9 (17.9-18.2) | 18.9 (18.4-18.9) | |
| RDW-SD fl | Médiane | 34.0 | 34.6 | 35.9 | L1vsL3 L2vsL3 |
| | 2.5 | 30.0 (29.7-31.3) | 29.0 (28.6-30.4) | 31.9 (31.8-32.7) | |
| | 97.5 | 41.3 (37.2-42.4) | 43.3 (41.9-43.9) | 46.7 (43.7-47.1) | |

| | | | | | |
|--------------------|---------|------------------|------------------|------------------|--------|
| RDW-CV | Médiane | 20.8 | 21.7 | 20.9 | L1vsL2 |
| % | 2.5 | 17.5 (17.5-17.8) | 17.9 (17.3-19.3) | 17.8 (17.8-18.4) | L1vsL3 |
| | 97.5 | 23.1 (22.8-23.1) | 27.2 (25.1-27.6) | 29.6 (24.5-29.7) | |
| Basophils | Médiane | 0.04 | 0.04 | 0.03 | L1vsL3 |
| 10 ⁹ /L | 2.5 | 0.01 (0.01-0.02) | 0.02 (0.02-0.02) | 0.01 (0.01-0.01) | L2vsL3 |
| | 97.5 | 0.10 (0.09-0.10) | 0.13 (0.11-0.13) | 0.08 (0.07-0.08) | |

Tableau 9 : Intervalles de référence hématologiques suivant le stade de lactation (L1 : 1-90 jours ; L2 : 91-180 jours, L3 : tarissement)

2.4.3. Influence de l'âge

Quelle que soit la méthode de mesure, l'âge avait un effet sur les variables hématologiques suivantes : RBC-HGB, MCV, MCH, RDW-CV, WBC. L'âge avait aussi un effet sur le comptage des neutrophiles par l'analyseur et sur le comptage manuel des lymphocytes et grands lymphocytes.



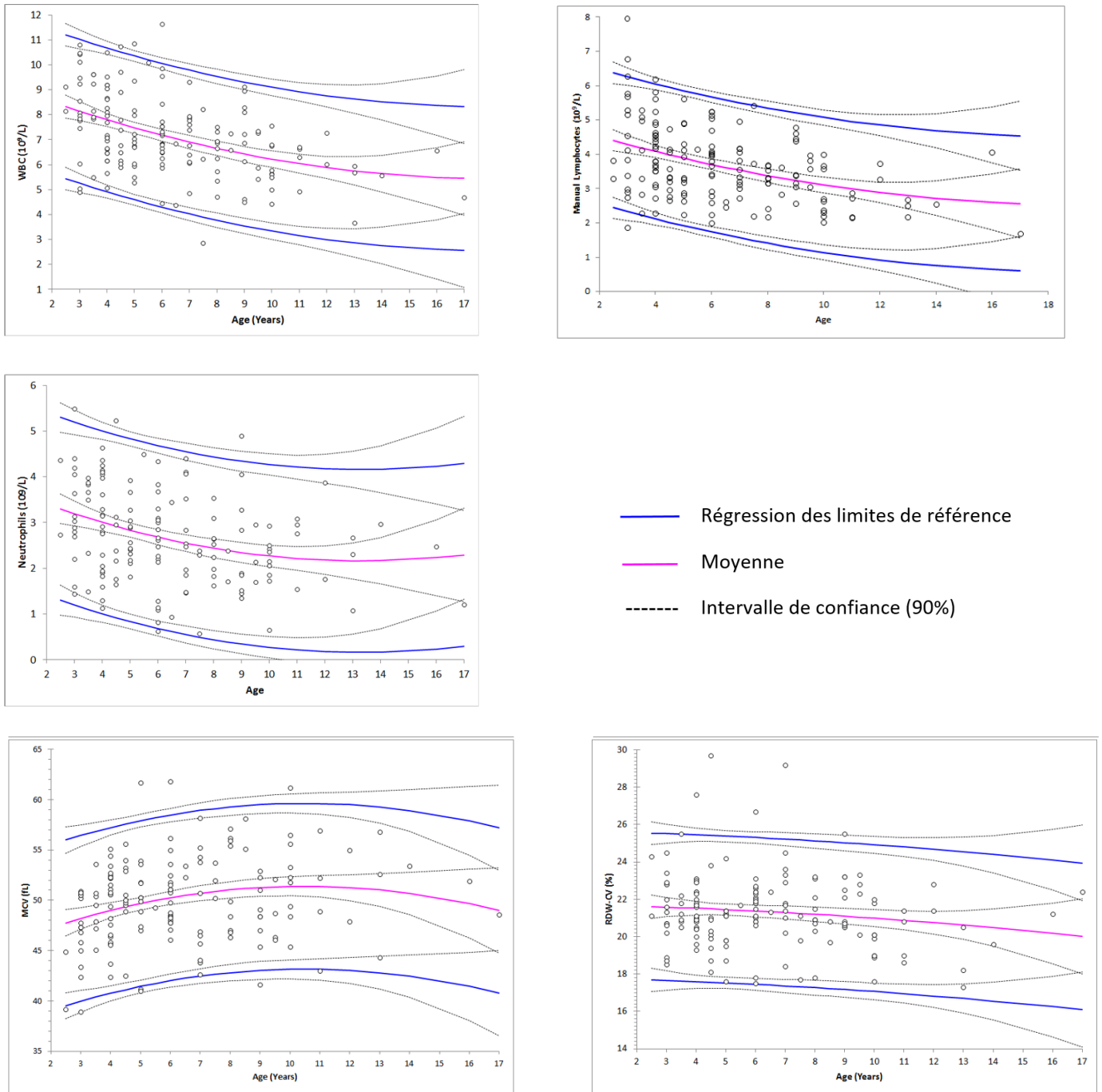


Figure 4 : Variables hématologiques significativement influencées par l'âge

La numération des globules rouges par méthode optique et par impédance (RBC-O et RBC-I) diminue très doucement avec l'âge mais la différence entre le groupe constitué de 25% des vaches les plus jeunes et celui de 25% des vaches les plus vieilles n'est pas significatif (Test de Student, $P = 0,3829$ et $0,2760$ respectivement).

L'hémoglobine (RBC-HGB) était globalement stable, mais la diminution de la moyenne (0,39 pg) entre le groupe constitué de 25% des vaches les plus jeunes et celui de 25% des vaches les plus vieilles n'était pas significatif (Test de Student, P = 0,1340).

Pour les vaches d'un âge supérieur à 10 ans, la moyenne du volume globulaire moyen (MCV) augmente. En effet la différence entre les moyennes du groupe constitué de 25% des vaches les plus jeunes et celui de 25% des vaches les plus vieilles égale à 1,2 fL était significative (Test de Student, P = 0,005).

Pour les vaches d'un âge supérieur à 10 ans la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCH) augmente. Néanmoins, la différence entre le groupe constitué de 25% des vaches les plus jeunes et celui de 25% des vaches les plus vieilles n'était pas significative (Test de Student, P = 0,3829).

L'indice de distribution des globules rouges calculé (RDW-CV) diminue légèrement avec l'âge alors que l'indice de distribution des globules rouges mesuré (RDW-SD) ne change pas de façon significative, néanmoins, la différence des moyennes (-0,67%) entre le groupe constitué de 25% des vaches les plus jeunes et celui de 25% des vaches les plus vieilles n'était pas significative (Test de Student, P = 0,0843).

La numération des globules blancs, D-WBC et le comptage des neutrophiles diminuent avec l'âge. La différence des moyennes entre le groupe constitué de 25% des vaches les plus jeunes et celui de 25% des vaches les plus vieilles était de $1,6 \cdot 10^9/L$ (Test de Student, $P < 0,001$) pour les WBC mesurés par l'analyseur et de $0,7 \cdot 10^9/L$ (Test de Student, P = 0,0021) pour les neutrophiles.

2.4.4. Influence de l'élevage

L'élevage avait un effet significatif sur de nombreuses variables hématologiques. Néanmoins seulement 5 vaches au maximum étaient prélevées par élevage ce qui ne permet pas d'avoir un échantillon assez large pour pouvoir les comparer entre eux.

3. Discussion

3.1. Sélection de la population de référence

La sélection de sujets censés être « sains » et représentatifs du cheptel français afin de constituer une population de référence sur lesquels pourront reposer les intervalles de référence ^{3,24} est une étape primordiale et représente une difficulté majeure.

Pour être considérées comme « en bonne santé » les vaches de cette étude devaient répondre à plusieurs critères d'inclusion et d'exclusion. Cette sélection se faisait en deux temps :

- Lors de l'anamnèse, les vaches ayant reçu un traitement autre que parasitaire ou ayant eu une affection de quelque sorte que ce soit le mois précédent le prélèvement étaient exclues de l'étude.
- Lors de l'examen clinique, tout animal présentant une anomalie à son examen clinique était exclu de l'étude.

Malgré toutes ces précautions le caractère « sain » d'un animal reste subjectif et repose sur la bonne foi de l'éleveur. De plus, un simple examen clinique ne permet pas de détecter toutes les affections pouvant influencer le comptage cellulaire en hématologie. Néanmoins cette étude respecte les conditions de terrain des vétérinaires praticiens qui ne font pas systématiquement d'examen complémentaire en plus d'un examen clinique.

Les vaches sélectionnées pour notre étude font toutes partie d'élevages situés dans le sud-ouest ceci est un autre biais de notre étude. Cela nous permettait de pouvoir réaliser l'analyse des spécimens par le Sysmex XT-2000iv moins de 24h après collecte ce qui assurait une bonne conservation du sang. Toutefois la dispersion des races bovines prélevées respecte les chiffres de l'Institut de l'Élevage ³¹. De ce fait, il est possible que le biais dû à la géographie n'ait que peu d'influence sur les intervalles de référence établis.

3.2. Facteurs pré-analytiques

Le protocole de prélèvement des spécimens sanguins a été établi pour se rapprocher au maximum des conditions de terrain des vétérinaires praticiens. Pour cela le sang était prélevé à la veine coccygienne puis immédiatement homogénéisé par retournements successifs. Si le spécimen présentait des caillots sanguins visibles à l'œil nu, la vache était de nouveau prélevée dans les mêmes conditions.

Une attention particulière a été apportée à la bonne contention du bovin mais aussi à minimiser son stress. En effet, les stéroïdes endogènes ou l'augmentation de la concentration d'adrénaline dans le sang peuvent entraîner une modification de la numération leucocytaire³². Ces formules de stress ont pu modifier les valeurs de certains hémogrammes cependant les vétérinaires praticiens seront aussi confrontés au stress de l'animal donc aux mêmes fluctuations de l'hémogramme.

La plupart des tubes (80%) ont été analysés dans les 4 à 8 heures après prélèvement mais certains spécimens n'ont pu être analysés que 24 heures après la collecte de sang. En effet la collecte des élevages les plus éloignés a obligé les opérateurs à rester dormir sur place avant de revenir analyser les spécimens au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Il a été prouvé que la conservation des spécimens de sang sur EDTA à 4°C plus de 5 heures entraînait l'apparition d'agrégats plaquettaires modifiant la numération des plaquettes par l'analyseur^{1,32,33}. Les frottis sanguins ont été réalisés dans l'heure suivant le prélèvement et les comptages dans les 24 heures. La lecture des frottis sanguins prend ici tout son sens dans la détection d'agrégats plaquettaires non visibles macroscopiquement. Dans notre étude 80% des spécimens présentaient des agrégats plaquettaires avec une concentration minimale en plaquettes égale à $11.10^9/L$ par variation d'impédance (PLT-I) et égale à $19.10^9/L$ par méthode optique (PLT-O). Néanmoins, les agrégats plaquettaires n'avaient pas d'effet significatif sur le comptage plaquettaire. Une étude parue en 2001³⁴ sur l'analyse de sang de 30 chiens montre que les agrégats plaquettaires ne sont pas répartis de façon homogène dans le tube de sang sur EDTA. De ce fait, l'analyse par variation d'impédance ne donne qu'une estimation de la valeur minimale de concentration en plaquettes dans les tubes présentant des agrégats alors que l'analyse du buffy coat donne une concentration minimale voire une estimation raisonnable de la concentration en plaquettes

dans le spécimen. Pour l'instant aucun analyseur n'est capable de donner une méthode fiable dans le comptage des plaquettes lorsque le spécimen contient des agrégats plaquettaires^{35,36}. C'est pourquoi l'établissement des intervalles de référence concernant les concentrations plaquettaires et les autres indices en relation n'ont pas été établis dans cette étude. Lors de suspicion de thrombopénie chez un bovin, il sera conseillé de faire un prélèvement sur tube EDTA à la veine jugulaire et de le faire analyser moins de 5 heures après récolte du sang. La lecture du frottis sanguin reste incontournable dans la détection des agrégats plaquettaires, ainsi que la lecture du cytogramme effectué par l'analyseur confirmant la bonne séparation des nuages de points concernant les plaquettes.

3.3. Performances analytiques de l'analyseur

Le Sysmex XT-2000iV est un analyseur utilisé dans de nombreux laboratoires de référence. Il a déjà été validé pour de nombreuses espèces comme les chiens, les chats, les chevaux et les rongeurs de laboratoire mais pas pour les bovins³⁷⁻⁴⁰.

Le Sysmex XT-2000iV réalise des mesures à la fois par cytométrie en flux et par variation d'impédance pour les numérations globulaires et plaquettaires. L'impédance permet de reconnaître les cellules par leur taille et la cytométrie en flux permet de reconnaître les cellules par leur structure interne et par la quantité d'ADN et d'ARN présente dans la cellule grâce à l'utilisation de colorant complémentaire ; en effet, les cellules sont marquées à la polyméthine, un colorant fluorescent qui se lie aux acides nucléiques.

Les variables RBC-I, HCT, PLT-I et PCT sont obtenues par impédance et MCV, MCH, MCHC, PDW et P-LCR sont calculées à partir des comptages obtenus par impédance. En revanche, les variables RET, RCB-O, PLT-O et WBC sont obtenues par méthode optique. Pour les numérations globulaires et plaquettaires, il a déjà été constaté qu'il existait une excellente corrélation entre deux séries de mesures pour une méthode donnée mais une différence significative entre variation d'impédance et méthode optique chez plusieurs espèces^{39,41}. Ceci justifie le fait que deux intervalles de références soient mis en place selon la méthode d'analyse utilisée.

Un autre analyseur avec des méthodes similaires au Sysmex XT-2000iV, l'ADVIA 2120, a été validé pour les bovins pour les variables suivantes : RBC-I, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, WBC, neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes mais avec une réserve concernant les monocytes et la numération plaquettaire³⁵. Pour l'ADVIA 2120 l'imprécision et l'inexactitude étaient satisfaisantes pour la majorité des variables sauf pour les monocytes et les indexes concernant la maturation des réticulocytes. En effet, ces dernières variables étant en concentrations très basses dans le sang de bovin, il n'est pas étonnant de trouver des valeurs d'imprécision et d'inexactitude élevées. Mais, le contrôle de qualité effectué lors de cette étude ne respectait pas la procédure recommandée par le CLSI⁴¹. Dans notre étude, nous avons effectué un contrôle de qualité journalier durant toute la période d'expérimentation ce qui nous paraissait plus adapté aux recommandations par le CLSI. Nos valeurs d'imprécision et d'inexactitude étaient similaires exceptés les paramètres en lien avec les réticulocytes où les valeurs étaient plus élevées.

3.4. Méthode de détermination des intervalles de référence

Les intervalles de référence ont été établis avec une méthode non paramétrique, suivant les recommandations de l'IFCC-CLSI³ et de l'ASVCP²⁴. Un nombre de 120 individus est recommandé pour l'application de cette méthode avec des intervalles de confiance à 90% des limites de référence. Nos intervalles de référence ont été déterminés avec 148 et 152 vaches pour les variables de la lignée rouge, 144 et 152 pour les variables de la lignée blanche et entre 151 et 152 pour le comptage manuel, soit un nombre au-dessus des recommandations.

3.5. Comparaison des intervalles de référence de la lignée rouge obtenus dans cette étude avec ceux de la littérature

Comme montre le [Tableau 10 : Comparaison des intervalles de référence avec ceux de la littérature pour les analytes sanguins de la lignée rouge], les intervalles de référence établis dans notre étude sont similaires à ceux des publications précédentes utilisant un analyseur à cytométrie en flux : l'ADVIA 120 et l'ADVIA 2120.

| | Intervalles de référence | | Schalm 2010 ¹⁶ | ADVIA 2120 ²³ | UC-Davis 2001 ⁵ |
|------------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | 2.5 (95%CI) | 97.5% (95%CI) | | | |
| RBC-I 10 ¹² /L | 4.8 (4.3-4.9) | 7.8 (7.4-8.9) | | | |
| RBC-O 10 ¹² /L | 4.8 (4.3-4.9) | 7.6 (7.3-8.6) | 4.9-7.5 | 5.0-7.2 | 5.1-7.6 |
| HGB g/L | 82.0 (68-87) | 130.0 (128-141) | 84-120 | 87-124 | 85-122 |
| HCT | 0.242 (0.200-0.254) | 0.391 (0.368-0.406) | | | |
| L/L | 0.220 (0.200-0.245) | 0.355 (0.336-0.359) | 0.21-0.30 | 0.25-0.33 | 0.22-0.33 |
| | 0.258 (0.250- 0.269) | 0.401 (0.388-0.412) | | | |
| MCV fL | 41.2 (38.9-42.5) | 58.7 (56.8-61.8) | 36-50 | 38-51 | 38-50 |
| MCH pg | 14.3 (13.3-14.9) | 19.6 (19.2-20.5) | 14-19 | 14-19 | 14-18 |
| MCHC g/L | 324.3 (303-328) | 358.4 (356-372) | 380-430 | 340-380 | 360-390 |
| RDW-SD | 29.9 (28.6-31.2) | 43.9 (42.2-47.1) | | | |
| RDW-CV % | 17.6 (17.3-18.1) | 25.5 (24.2-27.6) | 16-20 | 15-19.4 | 15.5-19.7 |
| RBC-HGB pg | 14.1 (13.7-14.5) | 18.7 (18.3-19.2) | | | |
| RET 10 ⁹ /L | 0.0 | 6.75 | 0 | | |
| RET % | 0.000 | 0.100 | | | |
| RET-HGB pg | 12.4 (11.9-13.6) | 22.7 (22.0-24.2) | | | |
| Delta-HGB pg | -3.1 (-4.7 - -3.4) | 5.7 (4.8-7.1) | | | |

Tableau 10 : Comparaison des intervalles de référence avec ceux de la littérature pour les analytes sanguins de la lignée rouge

Les intervalles de référence de la numération érythrocytaire et leurs variables associées sont légèrement plus élargis que ceux retrouvés dans la littérature sauf pour la CCMH. Par exemple, l'intervalle de référence de l'HGB est de 82,0-130,0 g/L dans notre étude alors qu'il est de 84,0-120,0 g/L pour Schalm et de 85,0-122,0 g/L pour UC-Davis. Cette différence de largeur d'intervalle peut être expliquée par le choix de la population de référence. En effet, dans notre étude nous avons choisi de prendre comme population de référence l'ensemble du cheptel français comprenant des vaches allaitantes et laitières en lactation et hors lactation alors que dans les deux autres études, la population de référence

était construite uniquement à partir de vaches de race Holstein en lactation. Ainsi notre population étant plus hétérogène les intervalles de référence s'en retrouvent plus larges.

A notre connaissance, aucun intervalle de référence n'a été publié concernant les variables suivantes : RBC-HGB, RET-HGB and delta-HGB. Les intervalles de référence établis dans notre étude pourraient être utilisés afin de documenter les anémies ferriprives comme ceux utilisés en humaine ⁴² et en canine ⁴³⁻⁴⁵.

3.5.1. Influence du stade de lactation

Dans notre étude, le stade de lactation avait un effet significatif sur l'HGB et l'HCT qui augmentaient avec le nombre de jour en lait. Pour autant, selon le test de Harris et Boyd, la partition des intervalles de référence selon le stade de lactation n'était pas pertinente [**Tableau 9 : Intervalles de référence hématologiques suivant le stade de lactation (L1 : 1-90 jours ; L2 : 91-180 jours, L3 : tarissement)**].

3.5.2. Influence du type de production

Dans notre étude seule l'HCT était significativement plus élevée chez les vaches allaitantes que chez les vaches laitières. A notre connaissance, seule une publication récente compare 2 races bovines une allaitante et une laitière ⁴. Dans cette publication les intervalles de référence de l'HGB étaient plus étroits que ceux trouvés dans notre étude avec 118-121 g/L pour les vaches allaitantes et 88-92 g/L pour les vaches laitières. Cependant, tous les animaux de cette étude étaient élevés au même endroit, le National Institute of Animal Science en Corée, ce qui enlève le biais amené par la géographie et l'élevage. De plus, le stade de lactation n'était pas renseigné dans cette étude.

3.6. Comparaison des intervalles de référence de la lignée blanche obtenus dans cette étude avec ceux de la littérature

Les intervalles de référence concernant les analytes de la lignée blanche sont similaires voire plus étroits que les intervalles trouvés dans la littérature ^{5,16,23} : [Tableau 11 : Comparaison des intervalles de référence avec ceux de la littérature pour les analytes sanguins de la lignée blanche]

| | Reference limits | | Schalm 1965 ² | Schalm 2010 ¹⁶ | ADVIA 2120 ²³ | UC-Davis 2001 ⁵ |
|--------------------------------|------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | 2.5% (95%CI) | 97.5% (95%CI) | | | | |
| WBC 10 ⁹ /L | 4.4 (2.85-4.69) | 10.8 (10.12-11.64) | 4.0-12.0 | 5.1-13.3 | 5.9-14.0 | 4.9-12 |
| Neutrophils 10 ⁹ /L | 0.76 (0.57-1.13) | 5.02 (4.40-6.03) | 0.6-4.0 | 1.7-6.0 | 1.8-7,2 | 1.8-6.3 |
| Eosinophils 10 ⁹ /L | 0.11 (0.04-0.18) | 2.12 (1.51-2.31) | 0-2.4 | 0.1-1.2 | 0-1.3 | 0-1.9 |
| Basophils 10 ⁹ /L | 0.01 (0.01-0.02) | 0.12 (0.09-0.13) | 0-0.2 | 0-0.2 | 0-0.3 | 0-0.1 |
| Lymphocytes 10 ⁹ /L | 1.8 (1.7-1.9) | 4.9 (4.7-5.5) | 2.5-7.5 | 1.8-8.1 | 1.7-7.5 | 1.6-5.6 |
| Monocytes 10 ⁹ /L | 0.26 (0.16-0.33) | 1.20 (0.91-1.35) | 0.025-0.84 | 0.1-0.7 | 0-0.9 | 0-0.9 |

Tableau 11 : Comparaison des intervalles de référence avec ceux de la littérature pour les analytes sanguins de la lignée blanche

La limite basse de l'intervalle de référence pour la numération des neutrophiles de notre étude est similaire à celle initialement publiée par Schalm en 1965 et est plus basse que celles établies dans des études récentes ^{5,16,23}. Dans une étude comparant des intervalles de référence obtenus entre 1957 et 2006 les auteurs avaient observé une augmentation de la numération en neutrophiles avec le temps ⁵ ce qui n'a pas été démontré dans notre étude puisque nos intervalles de référence se rapprochent le plus de ceux publiés en 1965 ².

3.7. Comparaison des résultats du Sysmex XT-2000iV et du comptage manuel

De nombreuses différences sont observables entre le comptage du Sysmex XT-2000iV et le comptage manuel [Tableau 12 : Comparaison des intervalles de référence entre le Sysmex XT-2000iV et le comptage manuel des analytes sanguins de la lignée blanche] :

| | Limites des intervalles de référence Sysmex XT-2000iV | | Limites des intervalles de référence comptage manuel | |
|--|---|-----------------------|--|---------------------|
| | 2.5% (95%CI) | 97.5% (95%CI) | 2.5% (95%CI) | 97.5% (95%CI) |
| WBC 10 ³ /μL | 4,4 (2,85-4,69) | 10,8 (10,12-11,64) | | |
| Neutrophiles 10 ³ /μL | 0,76 (0,57-1,13) | 5,02 (4,40-6,03) | 0,66 (0,29-0,80) | 5,07 (4,86-5,93) |
| Eosinophiles 10 ³ /μL | 0,11 (0,04-0,18) | 2,12 (1,51-2,31) | 0,08 (0,00-0,12) | 2,22 (1,46-2,76) |
| Basophiles 10 ³ /μL | 0,01 (0,01-0,02) | 0,12 (0,09-0,13) | 0,00 (0,00-0,00) | 0,19 (0,18-0,23) |
| Lymphocytes 10 ³ /μL | 1,8 (1,7-1,9) | 4,9 (4,7-5,5) | 2,02 (1,60-2,17) | 6,21 (5,61-7,95) |
| Petits et moyens L 10 ³ /μL | | | 1,79 (1,59-1,98) | 5,74 (5,15-6,46) |
| L à grains 10 ³ /μL | | | 0,00 (0,00-0,00) | 0,38 (0,27-0,39) |
| Grands L 10 ³ /μL | | | 0,00 (0,00-0,00) | 0,55 (0,44-0,76) |
| Monocytes 10 ³ /μL | 0,26 (0,16-0,33) | 1,20 (0,91-1,35) | 0,26 (0,16-0,33) | 1,20 (0,91-1,35) |

Tableau 12 : Comparaison des intervalles de référence entre le Sysmex XT-2000iV et le comptage manuel des analytes sanguins de la lignée blanche

La principale différence entre le comptage manuel et celui de l'analyseur concerne la valeur haute de numération des lymphocytes. Ceci doit être dû à la morphologie particulière des lymphocytes chez les bovins.

En effet, après lecture des nuages de points issus de la mesure par cytométrie en flux, 40% des cytogrammes issus des spécimens de sang présentaient une mauvaise différenciation des neutrophiles et 67% présentaient une mauvaise différenciation des nuages de points associés

aux lymphocytes et monocytes. Ainsi, le comptage manuel des cellules de la lignée blanche était significativement différent des concentrations obtenues par le Sysmex XT-2000iV (Test t de Student, $P \leq 0,0037$) pour tous les types de cellules exceptés les basophiles. Cette différence peut être due à la mauvaise différenciation des nuages de points des neutrophiles, lymphocytes et monocytes par le Sysmex XT-2000iV.

Les monocytes des bovins font en moyenne entre 13 et 19 μ m de diamètre et possèdent un noyau bilobé ou dentelé, un cytoplasme gris contenant de petites et indistinctes granulations éosinophiles à magenta. La présence de vacuole est fréquente. Les lymphocytes des bovins sont divisés en 3 catégories comprenant les grands lymphocytes. Ces derniers ont un diamètre supérieur à 2,5 fois le diamètre d'une hématie et possèdent un grand noyau central rond ou en étoile parfois avec une profonde encoche. Le cytoplasme est bleu à gris et peut contenir des vacuoles claires. Des petites granulations magenta, de taille et de nombre variable peuvent aussi être observées dans le cytoplasme ^{26,46} **[Annexe 7 : Aspect microscopique des différents lymphocytes de l'espèce bovine]**. Ainsi les monocytes et les grands lymphocytes sont difficilement distinguables par l'analyseur ce qui entraînerait une mauvaise séparation des nuages des points et donc une mauvaise numération des lymphocytes et monocytes dans certains échantillons **[Annexe 8 : Différents cytogrammes issus du Sysmex XT-2000iV]**.

D'autres spécimens présentaient des défauts de nuages de points sur le cytogramme sans autre anomalie que la présence d'agrégats plaquettaires ou parfois d'amas de cellules indifférenciées **[Annexe 8 : Différents cytogrammes issus du Sysmex XT-2000iV]**.

L'établissement d'intervalles de référence à partir du comptage manuel nous a permis de discriminer les différentes morphologies lymphocytaires. Les petits et moyens lymphocytes est la population la plus représentée. L'intervalle établi sur les lymphocytes à grains peut être une base de comparaison car ces derniers sont souvent associés au lymphocytes natural killer ⁴⁷. Il serait intéressant de comparer cet intervalle avec des valeurs de comptage de lymphocytes à grains sur sang de bovins malades.

3.8. Comparaison des intervalles de référence selon l'âge des bovins

L'effet de l'âge en hématologie bovine a été documenté dans de nombreux articles scientifiques et concernait tout particulièrement les variations chez le jeune sujet ^{11,48-50}. Pendant les 6 premiers mois de vie, le nombre de globules rouges diminuerait alors que le MCV augmenterait ¹¹. Concernant les variables de la lignée blanche, la numération leucocytaire serait plus élevée chez les vaches de moins de 3 ans que chez leurs aînées ⁴⁸.

Dans notre étude, le panel d'âges des vaches était assez grand (compris entre 2 et 17 ans) ce qui nous a permis de montrer les mêmes évolutions des paramètres sanguins que ceux observés chez les veaux ¹¹. C'est-à-dire une faible diminution du nombre de globules rouge avec l'âge ainsi qu'une augmentation du MCV pour les vaches ayant plus de 10 ans mais aussi une diminution du nombre de leucocytes et notamment des neutrophiles avec l'âge : **[Figure 4 : Variables hématologiques significativement influencées par l'âge]**.

3.9. Influence de l'élevage sur les variables sanguines

Le facteur le plus significatif de notre étude, car influençant la majorité des paramètres sanguins, est l'élevage. Ceci est un biais à notre étude. Il aurait été possible de déterminer des intervalles de référence propres à chaque élevage mais un nombre plus conséquent de bovins aurait dû être prélevé ce qui aurait augmenté de façon drastique les coûts de notre étude. De plus, ces intervalles n'auraient pu être utilisés que dans ces élevages ce qui n'est pas notre objectif. La diversité des élevages de cette étude est représentative du cheptel français ce qui permet au praticien d'utiliser les intervalles de référence établis quelle que soit l'origine de la vache prélevée.

L'effet de l'élevage sur notre population pourrait être comparé à l'effet interindividuel de chaque vache sur l'élevage : au même titre qu'au sein d'un même élevage il existe des différences entre chaque individu, si on se place à une autre échelle où on considèrerait un élevage comme un individu, la variété des élevages représenterait la variété interindividuelle.

Le biais de l'élevage dans notre étude peut avoir un effet négatif sur l'interprétation des variables hématologiques. Pour parfaire une interprétation il est possible d'établir un

profil métabolique biochimique d'une vache en comparant par exemple deux groupes de bovins, l'un malade et l'autre sain au sein d'un même élevage.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de réaliser des intervalles de référence des variables hématologiques chez les bovins obtenus avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV. Ces intervalles ont été construits à partir du prélèvement sanguin de 156 vaches de plus de 2 ans représentatives du cheptel français. Les conditions pré-analytiques et analytiques ainsi que l'établissement biostatistique de ces paramètres ont été effectués dans le respect des recommandations internationales et dans des conditions fidèles à la pratique vétérinaire de terrain.

Ainsi ces intervalles sont utilisables par les laboratoires possédant un Sysmex XT-2000iV et respectant les mêmes conditions pré-analytiques que cette étude.

De plus le comptage manuel nous a permis de mieux caractériser les différentes populations de lymphocytes des bovins. Une lecture attentive du frottis sanguin et du cytogramme est une étape indispensable dans la bonne interprétation des analyses sanguines en particulier chez les bovins où les grands lymphocytes peuvent être confondus avec des monocytes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Roland L, Drillich M, Iwersen M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J Vet Diagn Invest*. August 2014.
2. Schalm OW. In: *Veterinary Hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1965:220.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Proposed Guideline. *C28-P3*. 2008;28(11).
4. Kim Y-M, Lee J-A, Jung B-G, Kim T-H, Lee B-J, Suh G-H. Reference ranges of hematology and lymphocyte subsets in healthy Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein dairy cattle: HEMATOLOGY AND LYMPHOCYTE SUBSET IN HANWOO. *Anim Sci J*. 2016;87(6):796-801.
5. George JW, Snipes J, Lane VM. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006: Bovine hematology reference intervals. *Vet Clin Pathol*. 2010;39(2):138-148.
6. Lumsden JH, Mullen K, Rowe R. Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle. *Can J Comp Med*. 1980;44(1):24.
7. Kumar B, Pachauri S. Haematological profile of crossbred dairy cattle to monitor herd health status at medium elevation in Central Himalayas. *Res Vet Sci*. 2000;69(2):141-145.
8. Meglia G, Johannisson A, Petersson L, Waller K. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. *Acta Vet Scand*. 2001;42(1):1.
9. Zadnik T. A comparative study of the hemato-biochemical parameters between clinically healthy cows and cows with displacement of the abomasum. *ACTA Vet Beogr*. 2003;53(5/6):297-310.
10. Itay A, Nadav G, Hannah A, Monica R, Michael V. Assessing Normal Hematological parameters of high producing Dairy Cows in Israel. *israeldairy*.
11. Brun-Hansen, HC, Kampen, AH, Lund A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. *Vet Clin Pathol*. 2006;35(2):182-187.
12. Aengwanich W, Chantiratikul A, Pamok S, others. Effect of seasonal variations on hematological values and health monitor of crossbred beef cattle at slaughterhouse in northeastern part of Thailand. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci*. 2009;5(5):644-648.
13. Quiroz-Rocha G, LeBlanc S, Duffield T, Wood D, Leslie K, Jacobs R. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Can Vet J*. 2009;76:1216-1231.

14. Găvan C, Retea C, Motorga V. Changes in the hematological profile of Holstein primiparous in periparturient period and in early to mid lactation. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol.* 2010;43(2):244–246.
15. Yıldız H, Saat N, Şimşek H. An investigation on body condition score, body weight, calf weight and hematological profile in crossbred dairy cows suffering from dystocia. *Pak Vet J.* 2011;31:125–128.
16. Wood D, Quiroz-Rocha GF. Normal hematology of cattle. In: *Schalm's Veterinary Hematology.* 6th ed. Douglas J. Weiss, K Jane Wardrop; 2010:829-835.
17. Warren AL, Stokol T, Hecker KG, Nydam DV. Storage-associated changes in the bovine hemogram with the ADVIA 120 hematology analyzer. *Comp Clin Pathol.* 2013;22(6):1235-1240.
18. Joksimović Todorović M, Davidović V. Changes in white blood pictures and some biochemical parameters of dairy cows in peripartum period and early lactation. *Mljekarstvo.* 2012;62(2):151-158.
19. Mahima N, Singh KV, Verma AK, Kumar V, Singh SK, Roy D. Hematological and serum biochemical profile of apparently healthy haryana cattle heifers in northern India. *Pak J Biol Sci PJS.* 2013;16(21):1423-1425.
20. Botezatu A, Vlagioiu C, Codreanu M, Oraşanu A. BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PROFILE IN CATTLE EFFECTIVE. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Vet Med.* 2014.
21. O'Driscoll K, McCabe M, Earley B. Differences in leukocyte profile, gene expression, and metabolite status of dairy cows with or without sole ulcers. *J Dairy Sci.* 2015;98(3):1685-1695.
22. Dänicke S, Meyer U, Winkler J, et al. Haematological and immunological adaptations of non-pregnant, non-lactating dairy cows to a high-energetic diet containing mycotoxins. *Arch Anim Nutr.* 2016;70(1):1-16.
23. Hematology Reference Intervals for Advia 2120. <https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/reference/hema.cfm>. Accessed November 14, 2016.
24. Friedrichs K, Harr K, Freeman K, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 2012;41(4):441-453.
25. Chiffres-clés Bovins Lait et Viande 2016. idele.fr. <http://idele.fr/reseaux-et-partenariats/reseaux-mixtes-technologiques/publication/idelesolr/recommends/chiffres-cles-bovins-lait-et-viande-2016.html>. Accessed October 20, 2016.
26. Jain NC. *Essentials of Veterinary Hematology.* Wiley; 1993.

27. Wood D, Quiroz-Rocha GF. *Schalm's Veterinary Hematology*. Vol Normal hematology of cattle. 6th ed. Douglas J. Weiss, K Jane Wardrop; 2010.
28. Geffré A, Concordet D, Braun J-P, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel: Reference Value Advisor. *Vet Clin Pathol*. 2011;40(1):107-112.
29. Biostatistique Toulouse www.biostat.envt.fr - Reference Value Advisor. <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63>. Accessed November 29, 2016.
30. Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem*. 1990;36(2):265-270.
31. Groupe Economie du Bétail (GEB). Chiffres clés 2015 : productions bovines lait et viande. Institut de l'élevage (Idele). <http://idele.fr/domaines-techniques/economie-des-filieres/analyse-des-filieres/publication/idelesolr/recommends/chiffres-cles-bovins-2015.html>. Accessed October 16, 2015.
32. Jones ML, Allison RW. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2007;23(3):377-402, v.
33. Russel K. Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Vol 6th edition. Weiss DJ, Wardrop KJ; 2010:576-585.
34. Koplitz SL, Scott MA, Cohn LA. Effects of platelet clumping on platelet concentrations measured by use of impedance or buffy coat analysis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2001;219(11):1552-1556.
35. Goldmann F, Bauer N, Moritz A. Comparison of the ProCyt Dx analyzer with the ADVIA 2120 and the manual differential for validation of equine and bovine hemograms. *Comp Clin Pathol*. 2013;22(5):855-868.
36. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count1. *Int J Lab Hematol*. 2007;29(2):77-91.
37. Bauer N, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV™ compared to the ADVIA® 2120 for its use in dogs, cats, and horses: Part I--precision, linearity, and accuracy of complete blood cell count. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*. 2011;23(6):1168-1180.
38. Bauer N, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV™ compared to the ADVIA® 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*. 2012;24(1):74-89.
39. Lilliehöök I, Tvedten H. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet Clin Pathol*. 2009;38(2):163-174.

40. Mathers RA, Evans GO, Bleby J, Tornow T. Evaluation of the Sysmex XT-2000iV haematology analyser for rat, dog and mouse whole blood samples. *Comp Clin Pathol.* 2008;17(3):137.
41. Bourgès-Abella N, Geffré A, Concordet D, Braun J-P, Trumel C. Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Vet Clin Pathol.* 2011;40(3):303-315.
42. Weimann A, Cremer M, Hernáiz-Driever P, Zimmermann M. Delta-He, Ret-He and a New Diagnostic Plot for Differential Diagnosis and Therapy Monitoring of Patients Suffering from Various Disease-Specific Types of Anemia. *Clin Lab.* 2016;62(4):667-677.
43. Radakovich LB, Santangelo KS, Olver CS. Reticulocyte hemoglobin content does not differentiate true from functional iron deficiency in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2015;44(4):511-518.
44. Schaefer DMW, Stokol T. The utility of reticulocyte indices in distinguishing iron deficiency anemia from anemia of inflammatory disease, portosystemic shunting, and breed-associated microcytosis in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2015;44(1):109-119.
45. Steinberg JD, Olver CS. Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHR) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(1):23-27.
46. Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology.* 4th ed. Lea and Febiger; 1986.
47. Storset AK, Kulberg S, Berg I, Boysen P, Hope JC, Dissen E. NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):669-676.
48. Kramer J. Normal hematology of cattle, sheep and goats. In: *Schalm's Veterinary Hematology.* Vol 5th edition. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC; 2000:1075-1084.
49. Mohri M, Sharifi K, Eidi S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res Vet Sci.* 2007;83(1):30-39.
50. Tonquist S, Rigas J. Interpretation of ruminant leukocyte responses. In: *Schalm's Veterinary Hematology.* 6th edition. Weiss DJ, Wardrop KJ; 2010:307-313.

ANNEXES



Unité de Pathologie des Ruminants

ENVV, 23 Chemin des Capelles,
BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France
☎ : 05.61.19.38.36

Annexe 1 :
Questionnaire
troupeau

Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine obtenus par le SYSMEX XT-2000iV et des méthodes manuelles

NUMEROS D'IDENTIFICATION DES VACHES POUR L'ETUDE :

.....

COORDONNEES DE L'ELEVEUR :

Nom :

Adresse :

.....

Coordonnées téléphoniques :

ALTITUDE DE L'ELEVAGE :



COORDONNEES DU VETERINAIRE TRAITANT :

Nom :

Adresse :

.....

Coordonnées téléphoniques :

| | | |
|--|---|---|
|   | <p>Unité de Pathologie des Ruminants</p> <p>ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France</p> <p>☎ : 05.61.19.38.36</p> | <p>Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement</p> |
| <p>Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine obtenus par le SYSMEX XT-2000iV et des méthodes manuelles</p> | | |

Anamnèse

| | |
|--|--|
| N° d'étude | |
| N° identification | |
| Race | |
| Age | |
| Stade physiologique 1 : mise bas < 3 mois 2 : mise bas : 3-9 mois 3 : tarie | |

Alimentation et traitements


| | |
|---|--|
| Alimentation (fourrage dominant) | |
| Traitement antiparasitaire (nom déposé et date) | |
| Confirmation absence de traitement en cours | |
| Antécédents médicaux | |

Examen clinique

| | |
|--------------------------------|---|
| Examen cardiaque | <i>FC =</i> <i>Auscultation cardiaque :</i> |
| Examen respiratoire | <i>FR =</i> <i>Type respiratoire :</i> <i>Auscultation respiratoire :</i> |
| Contractions ruminales / 5 min | |
| Température rectale | |
| Périmètre thoracique | |

Caractéristiques du prélèvement :

| | |
|------------------------|--|
| Date | |
| Heure | |
| Volume d'urine récolté | |

| | | |
|--|--|--|
|  | <p>Unité de Pathologie des Ruminants ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : 05.61.19.38.36</p> | <p>Annexe 3 : Consentement éclairé de l'éleveur</p> |
| <p>Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine obtenus par le SYSMEX XT-2000iV et des méthodes manuelles</p> | | |

Étude effectuée en élevage de décembre 2015 à juin 2016.

Le but de cette étude est d'établir des intervalles de références hématologiques, biochimiques et urinaires chez les vaches adultes saines. Les prélèvements seront réalisés par prise de sang à la veine coccygienne et par sondage urinaire.

Chaque animal sera examiné avant inclusion dans l'étude.

Nous nous engageons à analyser uniquement ces données, dans le but de compléter les informations de l'examen clinique quant à la bonne santé de l'animal.

Je, soussigné(e)

Propriétaire du (des) bovin(s) :

.....
.....
.....
.....
.....
.....


Atteste avoir lu les paragraphes précédents et avoir reçu une copie du protocole expérimental de l'étude.

Atteste avoir été clairement informé du caractère facultatif de cette étude, avoir conscience de ma totale liberté de refuser que mes vaches y participent, et accepte que ma (mes) vache(s) soi(en)t incluse(s) dans l'étude.

À

le

Signature :

| | | |
|---|---|---|
|  | Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎: +33 561 193 831 ; mail : c.trumel@envt.fr | Annexe 4 : Fiche de résultats des lectures des frottis sanguins |
| Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine obtenus par le SYSMEX XT-2000iV et des méthodes manuelles | | |

Date : / /

Bovin n°

Microhématocrite : %

Formule leucocytaire :

Neutrophile : %

Band cells : %

Eosinophiles : %

Basophiles : %

Lymphocytes : %

Monocytes : %

Erythroblastes : /100GB

Hématie :

Appréciation quantitative :

Organisation :

Morphologie :

Réticulocytes :

Taux de réticulocytes :

Taux corrigé :

Leucocytes :

Appréciation quantitative :

Organisation :

Morphologie :

Lymphocytes à grains :

Grands lymphocytes :

Plaquettes :

Appréciation quantitative :


Organisation :

Morphologie :

Synthèse des anomalies vraies :

Diagnostic et différentiel :

Examens complémentaires :

| | | |
|--|---|---------------------------------|
|  | <p>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée</p> <p>ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France</p> <p>☎: +33 561 193 831 ; mail : c.trumel@envt.fr</p> | <p>Annexe 5 : Protocole</p> |
| <p>Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine obtenus par le SYSMEX XT-2000iV et des méthodes manuelles</p> | | |

Sommaire

| | |
|---|----|
| 1. Problématique et objectifs | 56 |
| 2. Personnes impliquées | 57 |
| 3. Période et durée de l'étude | 57 |
| 4. Protocole expérimental | 57 |
| 4.1. Critères de partition des animaux | 57 |
| 4.2. Race | 58 |
| 4.3. Stade physiologique | 58 |
| 4.4. Alimentation | 59 |
| 4.5. Altitude..... | 59 |
| 5. Critères d'inclusion de l'animal..... | 59 |
| 6. Critères d'exclusion de l'animal..... | 60 |
| 6.1. Exclusion initiale..... | 60 |
| 6.2. Exclusion au laboratoire..... | 60 |
| 7. Identification des animaux | 60 |
| 8. Déroulement..... | 61 |
| 8.1. Examen clinique | 61 |
| 8.2. Prise de sang | 61 |
| 9. Etapes pré-analytiques | 62 |
| 10. Etapes analytiques au laboratoire | 62 |
| 10.1. Analyses sanguines..... | 62 |
| 10.2. Contrôles de qualité | 63 |
| 10.3. Lecture des frottis sanguins | 63 |
| 11. Interprétation des résultats scientifiques – statistiques | 63 |

1. Problématique et objectifs

L'hémogramme est un examen complémentaire de choix en médecine vétérinaire. Il permet d'orienter un diagnostic, de suivre l'évolution d'un animal malade et parfois de formuler un pronostic ¹.

Chez les bovins, différents intervalles de référence en hématologie sont disponibles dans la littérature. Les plus utilisés pour l'hémogramme sont ceux de Schalm établis en 1965 sur 62 vaches de race Holstein ².

De nos jours, l'établissement d'intervalles de référence est encadré par l'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) et le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ³. Afin d'établir de nouveaux intervalles de référence, ces derniers recommandent un nombre d'au moins 120 sujets sains, dont l'ensemble des caractéristiques démographiques, physiologiques et de méthode d'élevage devront être détaillées. L'analyse statistique des données se fera par une méthode non paramétrique.

En répertoriant l'ensemble des intervalles des variables hématologiques établis depuis 1965 sur des bovins de plus de 2 ans considérés comme « en bonne santé », nous n'avons trouvé à notre connaissance aucune publication respectant les recommandations internationales.

L'objectif de cette étude est d'établir des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine avec l'automate Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Villepinte, France) dans les conditions de prélèvement inhérentes aux pratiques courantes des vétérinaires en milieu rural et selon les recommandations internationales.

En complément, un comptage manuel sur frottis sanguin sera réalisé afin de contrôler les comptages leucocytaires faits par l'automate mais aussi pour différencier les différents types de lymphocytes présents dans le sang des bovins ce que le Sysmex XT-2000iV n'est pas en capacité d'établir aujourd'hui.

Le critère de « bonne santé » des animaux est défini comme suit :

- Animal n'ayant pas été malade d'après l'éleveur et n'ayant subi aucun traitement (hors antiparasitaire) dans le mois précédant le prélèvement.
- Animal déclaré sain le jour du prélèvement sur la base de l'examen clinique.
- Animal dont l'analyse préliminaire des urines ne révèle aucune anomalie.

2. Personnes impliquées

L'étude est effectuée et coordonnée par C. Ancel, sous la responsabilité de N. Herman, et C. Trumel, avec l'assistance de :

- C. Trumel : préparation du protocole, préparation des prélèvements, analyse préliminaire et au laboratoire des échantillons de sang, traitement des données et interprétation des résultats.
- J-P Braun : analyse statistique des données
- N. Herman : préparation du protocole, recrutement des animaux, réalisation des prélèvements, traitement des données et interprétation des résultats.
- C. Ancel : préparation du protocole, réalisation des prélèvements urinaires, traitement des données et interprétation des résultats sur les urines.
- M. Thibault : lecture des frottis sanguins, traitement des données et interprétation des résultats sur les échantillons de sang.

3. Période et durée de l'étude

Les prélèvements seront réalisés de décembre 2015 à février 2016.

4. Protocole expérimental

4.1. Critères de partition des animaux

Un nombre de 156 prélèvements sera effectué dans l'objectif de recueillir un minimum de 120 résultats exploitables.

Les génisses, les veaux et les mâles ont été exclus de notre échantillonnage en raison de la difficulté de sondage urinaire. Seules les vaches adultes sont donc prélevées.

4.2. Race

De façon à obtenir un échantillonnage représentatif du cheptel bovin français, le pourcentage de chaque race prélevée dans cette étude est corrélé à l'importance de cette race au sein du cheptel français ³¹. Soit 156 prélèvements répartis comme suit :

| Race | Nombre de prélèvements retenus | Pourcentage dans l'échantillon | Objectif du protocole |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Prim'Holstein | 56 | 36,8% | 32% |
| Charolaise | 25 | 16,4% | 19% |
| Blonde d'Aquitaine | 23 | 15,1% | 6% |
| Limousine | 21 | 13,8% | 14% |
| Montbéliarde | 10 | 6,6% | 8% |
| Normande | 5 | 3,3% | 5% |
| Salers | 5 | 3,3% | 3% |
| Aubrac | 2 | 1,3% | 2% |
| Autre : Brune des Alpes | 5 | 3,3% | 4% |

4.3. Stade physiologique

Le choix des animaux à prélever est également conditionné par leur stade physiologique. On prélèvera en proportions équivalentes :

- Vaches en premier trimestre post-partum (0 à 3 mois après le vêlage) : groupe 1
- Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage) : groupe 2
- Vaches en dernier trimestre de gestation : groupe 3

Le stade physiologique sera confirmé par palpation transrectale ou examen échographique.

4.4. Alimentation

Afin d'établir un échantillonnage le plus représentatif possible, une attention particulière sera portée au rationnement des vaches prélevées. L'objectif sera de prélever en proportions équivalentes des vaches avec :

- Ration avec foin dominant.
- Ration avec ensilage de maïs dominant.

4.5. Altitude

De même, dans un souci de représentativité, l'altitude des élevages sera renseignée.

5. Critères d'inclusion de l'animal

- Vache adulte de race pure ayant déjà eu au moins un veau.
- Pour chaque race, un nombre de vaches proportionnel à la prévalence de cette race au sein du cheptel bovin français
- Vache ayant été jugée en bonne santé. D'une part, d'après les réponses fournies par l'éleveur à un questionnaire [**Annexe 1 : Questionnaire troupeau**]. D'autre part, grâce à un examen clinique réalisé le jour du prélèvement de l'animal [**Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement**].
- Un maximum de 5 animaux par élevage.

Les animaux sont inclus uniquement après une information complète du propriétaire, associée à la signature du « Formulaire de consentement éclairé » [**Annexe 3 : Consentement éclairé de l'éleveur**].

6. Critères d'exclusion de l'animal

6.1. Exclusion initiale

- Animal ayant reçu un traitement (hormis antiparasitaire) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal avec un historique d'affection diverse (boiterie, mammite, métrite...) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal déclaré malade sur la base des réponses de l'éleveur au questionnaire et/ou de l'examen clinique.

6.2. Exclusion au laboratoire

Les tubes exclus de l'étude sont ceux :

- Présentant un volume de sang prélevé insuffisant ou un volume trop important (limite matérialisée par le fabricant à l'aide d'un repère sur le tube)
- Les tubes de sang EDTA présentant un caillot macroscopique.

7. Identification des animaux

Chaque vache sélectionnée pour l'étude aura une fiche d'accompagnement du prélèvement [**Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement**]. Cette fiche comportera l'identification, la race, l'âge, le poids, le stade physiologique de l'animal, le type d'alimentation, l'altitude de la ferme ainsi que la date, l'heure du prélèvement et le numéro d'identification de l'animal dans l'étude. Les bovins sont identifiés de la façon suivante : « de 1 à 156 », et seul leur numéro d'étude sera mentionné sur les résultats d'analyses.

Pour chaque bovin inclus dans l'étude, des fiches d'analyses sanguines seront réalisées, sur lesquelles ne sera mentionné que le numéro d'étude de l'animal.

8. Déroulement

8.1. Examen clinique

Chaque vache est soumise à un examen clinique avant la réalisation des prélèvements afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'anomalie notable de son état général. Les paramètres évalués sont la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, les contractions ruminales auscultées sur 5 minutes et la température rectale [**Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement**].

8.2. Prise de sang

La prise de sang est réalisée à la veine coccygienne par P. Ragot, C. Ancel ou N. Herman. La contention usuelle, adaptée à l'animal, est faite par l'éleveur.

Pour chaque vache, 4 prélèvements (sur tubes sec, EDTA et Hépariné) sont effectués dans l'ordre chronologique indiqué. Les 4 tubes de prélèvement ont été préparés au préalable et identifiés « Sang X » : où X est le numéro d'étude du bovin.

- 1 tube sec de 10 mL (Venosafe™, Terumo, Europe)
- 2 tubes de 4mL Héparinés (Lithium heparin 4mL, Venosafe™, Terumo, Guyencourt, France)
- 1 tube collecteur de 4mL EDTA (EDTA 3mL, Venosafe™, Terumo, Guyencourt, France)

Les prélèvements sont ensuite homogénéisés par une dizaine de retournements lents. Chaque tube est identifié avec le numéro de l'animal écrit au marqueur noir indélébile. L'heure du prélèvement est notée sur la fiche d'accompagnement du bovin.

Le contrôle de chaque prélèvement permet d'éliminer les tubes EDTA et héparinés présentant des caillots macroscopiques, ou les tubes insuffisamment ou trop remplis suivant le repère indiqué par le fabricant sur le tube. Dans ce cas-là un nouveau tube sera prélevé.

Les tubes EDTA et Héparinés sont stockés à 4°C pendant le transport jusqu'au laboratoire.

9. Etapes pré-analytiques

3 frottis sanguins par animal sont réalisés par le même manipulateur (C. Trumel), à l'aide d'une lame porte objet en verre, lavée (Thermo scientific, Menzel-Gläser, lame porte-objet prête à l'emploi, ca/env 76x26mm) sur laquelle est déposée une goutte de sang prélevée à l'aide d'une pipette pasteur en verre à usage unique (C.E.B., Angers, France) dans les tubes de sang sur EDTA. Cette goutte est étalée avec une lame rodée (Menzel-Gläser, lame à bords rodés, LRE 50x20mm) positionnée à 45°, conformément aux normes C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standard Institute). Les frottis sanguins sont rapidement séchés à l'air libre par agitation. La qualité de l'étalement est vérifiée, puis le frottis est identifié « Frottis X » où X est le numéro d'étude de la vache.

Un des trois frottis est coloré et monté dans l'heure suivant sa réalisation. La coloration se fait de façon automatique par un automate (Aerospray®, Hematology slide stainer-cyto centrifuge, model 7150) utilisant une coloration de type May-Grünwald-Giemsa modifiée (une combinaison d'Aerofix® additive for metahol SS-148, Reagent B Thiazin stain SS-071B, Reagent C Eosin stain SS-071C, et de buffer (pH=7,2) concentrate SS-172A). Les frottis sont ensuite rangés par numéro d'étude avant d'être analysés au microscope. Ils ont tous été lus selon la procédure présentée en [Annexe 6 : Fiche de lecture des frottis sanguins].

10. Etapes analytiques au laboratoire

10.1. Analyses sanguines

Chaque tube est analysé au maximum 24 heures après le prélèvement au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Les tubes EDTA sont placés sur un agitateur (Specie Mix®, Oxford, CT06478, USA) pendant 20 minutes, puis 30 retournements sont effectués afin d'homogénéiser les prélèvements.

Les analytes sanguins sont mesurés à l'aide de l'automate Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Villepinte, France) réglé sur l'analyse de sang bovin (software version 00-09).

10.2. Contrôles de qualité

Des contrôles journaliers sont effectués sur l'automate Sysmex XT-2000iV® (Sysmex, Europe GmbH, Norderstedt, Germany) selon un protocole de routine du laboratoire de biologie médicale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Des échantillons de sang de contrôle fournis par le fabricant sont analysés afin de vérifier si chaque mesure correspond aux cibles fournies par le fabricant. Si au bout du troisième passage de l'échantillon de contrôle, au moins une valeur hors cible persiste, diverses opérations correctrices sont prévues par le fabricant pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème.

10.3. Lecture des frottis sanguins


Les frottis sanguins sont lus par M. Thibault et corrigés par C. Trumel selon la procédure présentée en [Annexe 6 : Fiche de lecture des frottis sanguins]. Les résultats concernant la formule leucocytaire et le degré d'agrégation plaquettaire sont reportés sur les fiches d'analyse des frottis sanguins [Annexe 4 : Fiche de résultats des lectures des frottis sanguins].

Toutes les fiches d'analyse des frottis sanguins ainsi qu'une impression des résultats des hémogrammes sont conservées dans un classeur de manipulation par C. Trumel.

11. Interprétation des résultats scientifiques – statistiques

Un fichier Excel est réalisé par C. Trumel pour recenser tous les résultats des hémogrammes et par M. Thibault pour recenser l'analyse des frottis sanguins.

Les calculs statistiques sont effectués par J.P. Braun grâce au logiciel Excel, Analyse-It et Reference Value Advisor®.

| | | |
|--|---|---|
|  | <p>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée</p> <p>ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France</p> <p>☎: +33 561 193 831 ; mail : c.trumel@envt.fr</p> | <p>Annexe 6 : Fiche de lecture des frottis sanguins</p> |
| <p>Estimation semi-quantitative de la formule leucocytaire et estimation de la taille moyenne des agrégats plaquettaires d'après un frottis sanguin chez le bovin</p> | | |

Réalisation du frottis sanguin :

Un frottis est réalisé, toujours par le même manipulateur, à partir des prélèvements sanguins obtenus selon le protocole principal.

L'étalement est effectué à l'aide d'une lame porte objet en verre, lavée (Thermo scientific, Menzel-Gläser, lame porte-objet prête à l'emploi, ca/env 76x26mm) sur laquelle est déposée une petite goutte de sang prélevée à l'aide d'une pipette pasteur en verre à usage unique (C.E.B., Angers, France) dans les tubes de sang sur EDTA. Cette goutte est étalée avec une lame rodée (Menzel-Gläser, lame à bords rodés, LRE 50x20mm) positionnée à 45°, conformément aux normes C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standard Institute). Le frottis sanguin est rapidement séché à l'air libre par agitation. La qualité de l'étalement est vérifiée, puis le frottis est identifié « Frottis X » où X est le numéro d'étude de la vache.

La coloration du frottis se fait de façon automatique par un automate (Aerospray®, Hematology slide stainer-cytocentrifuge, model 7150) utilisant une coloration de type May-Grünwald-Giemsa modifiée (une combinaison d'Aerofix® additive for metahol SS-148, Reagent B Thiazin stain SS-071B, Reagent C Eosin stain SS-071C, et de buffer (pH=7,2) concentrate SS-172A). Les frottis sont ensuite rangés par numéro d'étude avant d'être analysés au microscope.

La lecture du frottis est réalisée par le même manipulateur et sous un unique microscope Eclipse E400 (Nikon, Japan) tout au long de la manipulation.

Estimation de la taille des amas plaquettaires observés sur le frottis :

Le lecteur procède à une première observation grossière du frottis à faible grossissement, x100 à l'aide de l'objectif 10 (Olympus UPlanFl x10 / 0.30, ∞ / -) puis x 200 à l'aide de l'objectif 20 (Olympus UPlanFl x 20 / 0.5, ∞ / 0.17), en commençant par la goutte de sang et la tête du frottis, puis en faisant des créneaux balayant l'intégralité du frottis jusqu'à la queue. Une vigilance particulière sera portée au bord du frottis ainsi qu'à la queue pour prendre connaissance de l'existence ou l'absence d'amas plaquettaires. Cette observation sera mentionnée dans les résultats lors de l'estimation de la taille des agrégats plaquettaires.

Pour déterminer la taille moyenne des amas plaquettaires présents ou non sur le frottis, le lecteur va les scorer. Une note est donnée entre 0 et 5 d'après le barème suivant :


- 0 : aucun agrégat
- 1 : agrégat plaquettaire composé de 2 à 4 plaquettes
- 2 : agrégat plaquettaire composé de 5 à 9 plaquettes
- 3 : agrégat plaquettaire composé de 10 à 19 plaquettes
- 4 : agrégat plaquettaire composé de 20 à 29 plaquettes
- 5 : agrégat plaquettaire composé 30 plaquettes et plus

Estimation semi-quantitative de la formule leucocytaire :

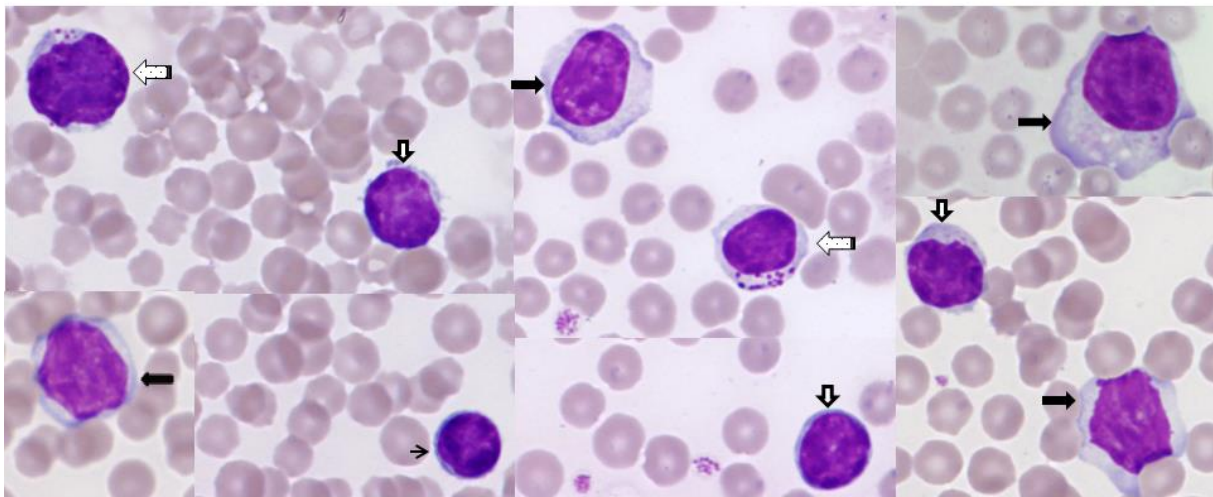
Le lecteur se place sur un bord du frottis dans une zone de lecture où les hématies sont disposées en monocouche et où la moitié des globules rouges sont en contact entre eux. A fort grossissement, à l'aide de l'objectif à immersion x100 (Olympus UPlanFl x100 / 1.30 oil) soit à un grossissement x1000, le lecteur procède au comptage et à la reconnaissance des leucocytes. Parmi les lymphocytes, le lecteur différenciera les lymphocytes « normaux », des lymphocytes à grains et des lymphocytes géants (diamètre d'au moins 1,5 fois le diamètre moyen d'un lymphocyte normal).

La formule est réalisée sur 200 cellules et les résultats sont consignés dans un classeur d'étude

[Annexe 4 : Fiche de résultats des lectures des frottis sanguins].

| | | |
|--|---|---|
|  | <p>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée</p> <p>ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France</p> <p>☎: +33 561 193 831 ; mail : c.trumel@envt.fr</p> | <p>Annexe 7 : Aspect microscopique des différents lymphocytes de l'espèce bovine.</p> |
| <p>Différentiation microscopique des petits, moyens, grands lymphocytes et des lymphocytes à grains chez l'espèce bovine.</p> | | |

Différents lymphocytes provenant de 4 frottis sanguins issus de vaches appartenant à cette étude (May Grünwald Giemsa X1000) :




Petits lymphocytes de diamètre égal à 1-1,5 fois celui d'un globule rouge (→)

Moyens lymphocytes de diamètre égal à 1,5-2,5 fois celui d'un globule rouge (⇨)

Grands lymphocytes de diamètre supérieur à 2,5 fois celui d'un globule rouge (⇨)

Les lymphocytes à grains peuvent être petits, moyens ou grands avec des granulations azurophiles dans leur cytoplasme (⇨).

| | | |
|---|---|---|
|  | <p>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée</p> <p>ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France</p> <p>☎: +33 561 193 831 ; mail : c.trumel@envt.fr</p> | <p>Annexe 8 : Différents cytogrammes issus du Sysmex XT- 2000iV</p> |
| <p>Exemples de cytogrammes issus du Sysmex XT-2000iV chez l'espèce bovine.</p> | | |

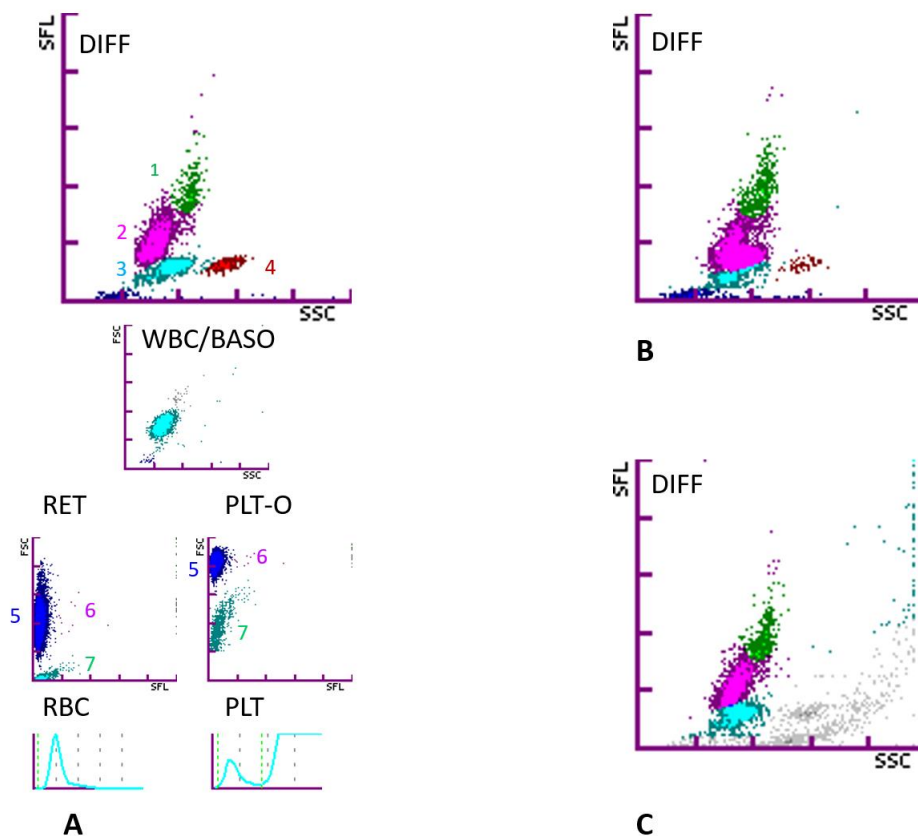


Figure A : Exemple d'un cytogramme (mesure optique) classique des cellules sanguines de la lignée blanche (DIFF), des réticulocytes (RET) et des plaquettes (PT-O) avec séparation des nuages de points correspondants aux différentes cellules sanguines et exemple d'histogrammes (mesure par variation d'impédance) de globules rouges (RBC) et plaquettes (PLT).

Comptage Sysmex/manuel : Neutrophiles 27.5 % / 28%; Éosinophiles 5.4 % / 4 %; Basophiles 0.4 % / 0%; Lymphocytes 59.7 % / 59 %; Monocytes 7.0 % / 9 %.

1= monocytes, 2 = lymphocytes, 3 = neutrophiles, 4 = éosinophiles, 5 = globules rouges,

6 = réticulocytes et 7 = plaquettes

Figure B : Exemple d'une mauvaise séparation des nuages de points entre les neutrophiles, lymphocytes et monocytes (DIFF) et des erreurs de comptage par le Sysmex XT-2000iV comparé au comptage manuel Sysmex/manuel : Leucocytes 11.64 $10^9/L$; Neutrophiles 7 % /49 %, Lymphocytes 85.4 % / 45 %, Monocytes 6.8 % / 3 %.

Figure C : Exemple d'un nuage de point gris anormal dans le cytogramme correspondant aux cellules de la lignée blanche (DIFF) évocateur de la présence d'agrégats plaquettaires associés à une erreur de comptage des plaquettes par le Sysmex XT-2000iV :

Comptage plaquettaire par mesure optique : 35. $10^9/L$; comptage par variation d'impédance : 18. $10^9/L$; à la lecture du frottis de nombreux agrégats plaquettaires ont été observés.

NOM : THIBAULT

PRENOM : Marion

TITRE : Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques chez l'espèce bovine obtenus par le SYSMEX XT-2000iV et des méthodes manuelles.

DIRECTRICE DE THESE : TRUMEL Catherine

RESUME : Les intervalles de référence des variables hématologiques ont été déterminés chez l'espèce bovine d'après les recommandations internationales, sous contrôle de conditions pré-analytiques et analytiques, pour une bonne caractérisation de la population constituée de vaches allaitantes et laitières représentatives du cheptel français. Ces intervalles de référence peuvent être adoptés par les laboratoires utilisant le même équipement que celui décrit dans cette étude et avec les mêmes performances analytiques. Pour les laboratoires travaillant avec une population présentant des caractéristiques démographiques différentes de cette étude, une validation des intervalles de référence doit être effectuée au préalable.

MOTS-CLES : intervalles de référence ; sang ; bovins ; nuage de points ; plaquettes ; lymphocytes ; recommandations internationales

TITLE: Establishment of reference intervals of cattle hematology variables with SYSMEX XT-2000iV and manual methods.

ABSTRACT: Reference intervals for hematological variables were determined under controlled preanalytical and analytical conditions for a well-characterized population of adult dairy and beef cows representative of the French cattle population and according to international recommendations. These RI can be adopted by laboratories using the same equipment with similar analytical performance. For laboratories serving a patient population with different demographic characteristics, validation of these RI should be performed before use.

KEYWORDS: reference values; blood; cows; dot plots, platelets, lymphocytes, international recommendations