



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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/26954>

To cite this version:

Fornes, Matthieu . *Étude de stabilité de l'hémogramme de chien, chat, cheval et bovin avec le sysmex XN-V*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 31 p.

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

ETUDE DE STABILITE DE L'HEMOGRAMME DE CHIEN, CHAT, CHEVAL ET BOVIN AVEC LE SYSMEX XN-V

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

FORNES Matthieu
Né, le 04/05/1995 à MARSEILLE (13)

Directrice de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENT :
M. Jean-Christophe PAGES

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Catherine TRUMEL
Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur: Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie –Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (HORS CLASSE)

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (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 **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie-Bactériologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie – Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe PAGES,

Professeur des Universités

Praticien hospitalier à la Faculté de Médecine de Toulouse

Président du Haut Conseil des Biotechnologies

Qui nous fait l'honneur de présider ce jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Catherine TRUMEL,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie Médicale Animale et Comparée

Pour nous avoir encadré dans la réalisation de cette thèse,

Sincères remerciements.

A Madame le Professeur Nathalie BOURGES-ABELLA,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie, Anatomie pathologique

Pour avoir accepté le rôle d'assesseur dans ce jury de thèse,

Sincères remerciements.

Table des matières

Table des matières	1
Table des illustrations.....	2
I. Introduction.....	3
a. Contexte général	3
b. Protocole de validation du Sysmex XN-V	3
c. Fonctionnement de l'analyseur.....	3
d. Etat actuel de la recherche sur la stabilité de l'hémogramme en fonction des conditions de stockage.....	5
i. Présentation de quelques études	5
ii. Tableaux et comparaisons.....	7
II. Matériels et méthodes	14
a. Echantillonnage	14
b. Prélèvements sanguins.....	14
c. Analyses.....	14
d. Statistiques	15
III. Résultats	16
a. Chez le chien.....	16
b. Chez le cheval	19
IV. Discussion	22
a. Concordance avec les données de la littérature	22
i. Chez le chien.....	22
ii. Chez le cheval	22
b. Aspects pratiques	22
c. Limites de notre étude	24
V. Conclusion	25
Bibliographie.....	26
Annexes	28
Annexe 1 : Déclaration de consentement éclairé signé par les propriétaires des animaux prélevés ...	28
Annexe 2 : Agrément du comité d'éthique ayant évalué le projet	29
Annexe 3 : Protocole de réalisation d'une série d'analyse	30
Annexe 4 : Exemple d'analyse fournie par le Sysmex XN-V	31

Table des illustrations

Tableaux :

Tableau 1 : Variables étudiées par le Sysmex XN-V et méthodes de mesure associées	4
Tableau 2 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le chien	8
Tableau 3 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le chat	10
Tableau 4 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le cheval	11
Tableau 5 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le bovin	12
Tableau 6 : Modifications mesurées des variables analytiques, rapportées à la moyenne mesurée à T0, chez le chien	17
Tableau 7 : Modifications mesurées des variables analytiques, rapportées à la moyenne mesurée à T0, chez le cheval 1.....	20
Tableau 8 : Erreur totale acceptable et erreur totale observée dans l'étude de répétabilité réalisée sur le Sysmex XN-V	23

Graphiques :

Graphique 1 : Effet de la durée de stockage sur l'hématocrite, à 4°C (cercles) et à 24°C (losanges)	18
Graphique 2 : Effet de la durée de stockage sur les comptages plaquettaires obtenus par variation d'impédance, à 4°C (cercles) et à 24°C (losanges)	18
Graphiques 3, 4 et 5 : Effet de la durée de stockage sur les comptages plaquettaires obtenus respectivement par variation d'impédance, par cytométrie optique et par fluorescence, à 4°C (cercles) et à 24°C (losanges)	21

I. Introduction

a. Contexte général

La majorité des cliniques vétérinaires sont aujourd'hui équipées d'analyseurs d'hématologie de paillasse, permettant une réalisation des analyses dans un délai assez court après prélèvement. Cependant, en fonction des conditions de prélèvement, notamment lors de visites sur le terrain, en élevage ou en consultation à domicile par exemple, il arrive régulièrement que des analyses soient reportées de 24h voire plus, sans forcément avoir un stockage réfrigéré des prélèvements dans les véhicules.

Dans les cliniques ne disposant pas de ce type d'analyseur, ou réalisant des prélèvements sur des espèces pour lesquels ces analyseurs n'ont pas été prévus (nouveaux animaux de compagnie ou faune sauvage par exemple), il est parfois nécessaire d'envoyer ces prélèvements dans un laboratoire spécialisé et mieux équipé, ce qui implique des délais d'analyse plus importants liés à l'expédition, les jours fériés... et des conditions de stockage des prélèvements parfois variables.

Il est donc important d'évaluer la stabilité et la fiabilité des résultats analytiques obtenus lorsque le prélèvement est analysé de façon retardée, au risque de conduire à une mauvaise interprétation diagnostique. Il en va de même pour la température de stockage, puisque la réfrigération n'est souvent pas possible.

b. Protocole de validation du Sysmex XN-V

Notre étude de la stabilité de l'hémogramme en fonction de la durée et de la température de stockage des prélèvements sanguins, sur quatre espèces différentes, chiens, chats, bovins et chevaux, a eu lieu dans le cadre du protocole général de validation de l'automate d'hématologie Sysmex XN-V, dirigé par M. Grébert sous la responsabilité de C. Trumel.

Ce protocole global englobe des études de linéarité des résultats, de précision des mesures, de reproductibilité, d'interférences avec certaines substances, de comparaison avec les résultats du Sysmex XT-2000iV précédemment en place dans le laboratoire, l'établissement d'intervalles de référence chez le cheval, des études dites de contamination, et cette étude de stabilité.

c. Fonctionnement de l'analyseur

L'automate Sysmex XN-V est fondé sur la combinaison de plusieurs méthodes d'analyse couramment utilisées en hématologie.

La première est une mesure de variation d'impédance entre deux électrodes, dans un flux dans lequel passent les cellules sanguines. Le passage des cellules dans ce flux entraîne une modification de la conductivité et une variation d'impédance proportionnelle au volume des cellules, qui permet donc un comptage cellulaire et une différenciation des cellules en fonction de leur volume. Elle est utilisée pour les comptages cellulaires des hématies et des plaquettes.

La seconde est la cytométrie de flux, méthode optique capable d'évaluer la taille des cellules ainsi que des éléments de structure interne. Elle repose sur la mesure des variables optiques des cellules mesurées individuellement dans un flux focalisé passant devant un laser. En fonction de la diffraction du laser, l'automate évalue la taille, le contenu et la structure des cellules.

La cytométrie est combinée à de la fluorescence optique, par l'utilisation de fluorochromes, des colorants spécifiques se liant aux acides nucléiques dans les cellules. Les différents fluorochromes utilisés par le Sysmex XN-V permettent la différenciation des différentes lignées de leucocytes, des érythroblastes, des réticulocytes ainsi que des plaquettes matures et immatures.

La troisième est une technique de spectrophotométrie avec du SLS (laurylsulfate de sodium), un composé non toxique capable de se lier à l'hémoglobine en formant un composé coloré détectable par spectrophotométrie. Elle permet une mesure de la concentration en hémoglobine.

La combinaison de ces techniques d'analyse permet de mesurer un grand nombre de variables en assurant une bonne fiabilité des résultats.

Le tableau I ci-dessous reprend les différentes variables mesurées et calculées par les différentes techniques.

Technologie	Spectrophotométrie	Impédance	Cytométrie de flux avec fluorescence	Cytométrie de flux
Mesurés	HGB	RBC-I ; PLT-I ; HCT ; PCT ; MCV ; MPV	RBC-O ; Reticulocytes ; PLT-O ; Neutro ; Lympho ; Mono ; Eosino ; Baso ; NRBC ; PLT-F ; IPF	WBC
Calculés		MCH ; MHCH ; RDW ; PDW ; P-LCR	Rapport de fluorescence des réticulocytes (LFR, MFR, HFR, IRF)	

Tableau 1 : Variables étudiées par le Sysmex XN-V et méthodes de mesure associées

d. Etat actuel de la recherche sur la stabilité de l'hémogramme en fonction des conditions de stockage

i. Présentation de quelques études

Plusieurs études ont déjà été réalisées pour évaluer la stabilité des variables hématologiques en fonction des conditions de stockage et du délai avant analyse. La majorité de ces études ont été réalisées sur des spécimens de sang humain, mais nous nous concentrerons ici sur des études menées chez différentes espèces d'animaux de compagnie ou de rente.

Les protocoles expérimentaux de ces études sont assez variés, les techniques d'analyses également, ce qui induit des conclusions parfois différentes d'une étude à l'autre.

Nous avons donc essayé de comparer de façon qualitative les variations statistiquement significatives observées dans différentes études (tableaux 2 à 5, pour les différentes espèces étudiées), que nous confronterons par la suite à nos résultats expérimentaux.

Au sein de l'ENVV, des études de stabilité des résultats d'hémogramme ont été réalisées avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV, étudiant les modifications de l'analyse des prélèvements sanguins de chiens (Bourgès-Abella et al., 2014) avec un stockage de 48h à 24°C, et de chats (Granat et al., 2013) après un stockage 48h à 24°C également.

L'étude réalisée par F. GRANAT compare également les effets de l'utilisation de différents anti-coagulants (EDTA et EDTA+CTAD) sur cette stabilité. Dans un but de comparaison avec les autres études et la nôtre, seuls les résultats obtenus avec des prélèvements sur EDTA seront considérés ici.

Ces deux études montrent une augmentation statistiquement significative du volume globulaire moyen et de l'hématocrite notamment ; et chez le chat une augmentation des comptages cellulaires en réticulocytes et éosinophiles. En parallèle ont été décrits une diminution significative de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine et du comptage des monocytes et chez le chien des plaquettes. Les autres variables étant relativement stables dans ces études.

Une autre étude réalisée avec ce même analyseur à Giessen en Allemagne (Bauer et al., 2012) sur des prélèvements issus de chiens, chats et chevaux, fondée sur des analyses de spécimens conservés à la fois à 4°C et 22°C sur 72h, donne des résultats similaires pour les chiens et les chats lors du stockage des prélèvements à température ambiante, mais aussi pour les chevaux. Cependant les résultats obtenus sur les chevaux montrent une diminution du comptage leucocytaire plus marquée que dans les deux autres espèces.

Cette étude introduit une dimension supplémentaire comparée à celles réalisées à l'ENVV, puisqu'elle étudie non seulement la déviation des variables analytiques avec le temps sur des spécimens stockés à température ambiante, mais qu'elle la compare avec la déviation obtenue sur des spécimens réfrigérés à 4°C. La réfrigération a semblé montrer ici des effets positifs par une diminution de la variation de la plupart des variables analytiques.

Une troisième étude française a été réalisée en 2006 sur 152 prélèvements de sang de chien (Médaille et al., 2006), analysés avec un automate Coulter T540, fonctionnant sur le principe de variation d'impédance, avec une mesure photométrique de la concentration en hémoglobine. Ces mesures étaient réalisées sur 48h après stockage à température ambiante et à 4°C.

L'étude porte sur un nombre réduit de variables mesurés par l'analyseur, et tous les résultats ne sont pas donnés pour les spécimens stockés à 4°C, nous n'exploiterons donc que les résultats obtenus sur les spécimens stockés à température ambiante. Une diminution modérée du comptage des hématies, une augmentation du volume globulaire moyen et une diminution plus marquée des comptages plaquettaires sont rapportés.

Une étude (Furlanello et al., 2006), réalisée sur des prélèvements sanguins de 5 chiens sains analysés à l'aide d'un automate ADVIA 120, fonctionnant sur une technique de cytométrie de flux, avec des prélèvements stockés à 4° et 24° durant 48h, tire des conclusions similaires.

Une autre étude (Sharif et al., 2012) a été réalisée à Garmsar en Iran sur des équidés, sur des prélèvements stockés à 4°C et 24°C sur 72h, à partir de lectures manuelles de frottis sanguins complétés par un micro-hématocrite et un dosage chimique (méthode de la cyanmethémoglobine) de la concentration en hémoglobine. Cette étude conclue également à une meilleure stabilité des variables sur les spécimens stockés à 4°C.

En ce qui concerne les animaux de rente, des études ont été réalisées à Nsukka au Nigeria (Ihedioha, Aba, 2010) sur des prélèvements de bovins, chèvres, porcs et poules, stockés sur 72h à 37°, 30° et 5°, analysés par une technique de Buffy Coat.

La seule variable étudiée avec cette technique est le Buffy Coat, qui représente donc la fraction du plasma contenant l'essentiel des leucocytes et des plaquettes. Les résultats montrent une augmentation nette de cette fraction, malgré une certaine stabilité dans les 24 premières heures de stockage quelle que soit la température, et une meilleure stabilité lors du stockage réfrigéré à 5°C.

Une étude réalisée par des chercheurs allemands et suisses (BLEUL et al., 2002), a été faite sur un échantillon de 20 bovins, avec des prélèvements stockés à 4°C et 20°C durant 24h, analysés avec un automate d'hématologie Cell-Dyn 3500, combinant des méthodes de variation d'impédance et de cytométrie de flux.

Cette étude est intéressante malgré la faible durée de stockage (analyses sur 24h maximum), car il s'agit d'une des seules études réalisées sur des bovins avec un automate aussi performant. Elle montre pour certaines variables, notamment les comptages plaquettaire et leucocytaire, une meilleure stabilité des analyses pour les spécimens stockés à 20°C qu'à 4°C, quoiqu'une

diminution des comptages soit observée avec la durée de stockage quelle que soit la température.

La dernière étude que nous évoquerons ici (Abd Ellah, 2011) a été réalisée en Egypte sur des prélèvements de 6 bovins et 6 ânes, stockés sur 72 heures à 4°C et à 30°C, analysés avec un automate MedonicCA620 fonctionnant par mesure de variation d'impédance, associée à de la spectrophotométrie pour mesurer la concentration en hémoglobine. Cet automate sépare les leucocytes en trois sous populations : granulocytes, lymphocytes et monocytes.

Les résultats montrent une absence de modifications significatives des comptages à 4°C dans les deux espèces, mais une diminution du comptage des leucocytes et notamment des granulocytes à 30°C, plus marquée et plus précoce chez l'âne.

ii. Tableaux et comparaisons

Légende : X indique une absence de variation statistiquement significative ; O indique que la variable n'a pas été mesurée dans cette étude ; RBC-I, comptage des hématies par impédance ; RBC-O, comptage des hématies par cytométrie ; Hct, hématoците ; MCV, volume globulaire moyen ; MCH, teneur corpusculaire en hémoglobine ; MCHC, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; RDW-SD, écart type de la plage de distribution des tailles des hématies ; RDW-CV, RDW- coefficient de variation associé ; LFR, MFR, et HFR, niveaux de maturation des réticulocytes (fonction de la fluorescence) ; IRF, fraction de réticulocytes immatures ; PLT-I, comptage plaquettaire par impédance ; PLT-O, comptage plaquettaire par cytométrie ; MPV, volume plaquettaire moyen ; P-LCR, proportion de plaquettes géantes ; PCT, plaquettocrite ; PDW, plage de distribution de taille des plaquettes ; WBC, comptage leucocytaire total.

Les lignes grisées correspondent aux mesures lors de conservation de spécimen à 4°C, qui ne sont pas disponibles pour toutes les études.

Les * désignent les variables pour lesquelles le stockage à 24°C a induit une variation significativement plus importante que pour le stockage à 4°C. Inversement, ** désignent les variables significativement plus altérées à 4°C qu'à 24°C.

1. Chez le chien

	Etude	Spécimen	Analyseur (technique)	RBC	RBC I	Hct	HGB	MCV	MCH	MCHC	Ret	RDW	RDW	LFR	MFR	HFR	IRF
				O							SD	CV					
Hématies	BOURGES-ABELLA 2014	42	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	+	X	+	X	-	+	+	-	-	X	+	+
	BAUER 2012 22°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	+*	X	+*	X	-	+	O	O	O	O	O	O
	BAUER 2012 4°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	+	X	+	X	-	+	O	O	O	O	O	O
	MEDAILLE 2006	152	Coulter T540 (Impédance)	O	-	O	X	+	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	FURLANELLO 2006 24°	5	ADVIA 120 (Cytométrie)	X	O	+*	+	+*	-	-*	O	+	O	O	O	O	O
	FURLANELLO 2006 4°	5	ADVIA 120 (Cytométrie)	X	O	+	+	+	+	-	O	X	O	O	O	O	O
Leucocytes				WBC	Neutro	Lympho	Mono	Eosino	Baso								
	BOURGES-ABELLA 2014	42	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	-	+	-	-	X	O								
	BAUER 2012 22°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	+	-	-	+	O								
	BAUER 2012 4°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	X	-	X	O								
	MEDAILLE 2006	152	Coulter T540 (Impédance)	+	O	O	O	O	O								
	FURLANELLO 2006 24°	5	ADVIA 120 (Cytométrie)	-	X	-	X	X	X								
FURLANELLO 2006 4°	5	ADVIA 120 (Cytométrie)	X	X	X	X	X	X									
Plaquettes				PLT O	PLT I	MPV	PDW	PCT	P LCR								
	BOURGES-ABELLA 2014	42	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	-	-	+	+	-	+								
	BAUER 2012 22°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	-	-	O	O	O	O								
	BAUER 2012 4°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	-	-	O	O	O	O								
	MEDAILLE 2006	152	Coulter T540 (Impédance)	O	-	O	O	O	O								
	FURLANELLO 2006 24°	5	ADVIA 120 (Cytométrie)	-	O	+	X	X	O								
FURLANELLO 2006 4°	5	ADVIA 120 (Cytométrie)	X	O	X	+	X	O									

Tableau 2 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le chien.

Les modifications qui ressortent dans ces études chez le chien sont notamment l'augmentation de l'hématocrite et du volume globulaire moyen, de façon plus marquée à température ambiante que pour les spécimens réfrigérés, associée logiquement à une diminution de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. Les comptages en réticulocytes semblent également augmenter avec le stockage à toute température, avec une fraction de réticulocytes immature mesurée plus importante.

Concernant les leucocytes, les effets du stockage sur le comptage total sont moins nets, et la réfrigération semble améliorer la stabilité des résultats analytiques. Plusieurs études montrent tout de même une augmentation du comptage des granulocytes neutrophiles et une diminution du comptage des monocytes et dans une moindre mesure des lymphocytes.

Les comptages plaquettaires également semblent diminuer avec le stockage, en association avec une augmentation du volume plaquettaire moyen.

2. Chez le chat

	Etude	Spécimen	Analyseur (technique)	RBC	RBC I	Hct	HGB	MCV	MCH	MCHC	Ret	RDW	RDW	LFR	MFR	HFR	IRF
				O	I					SD	CV						
Hématies	GRANAT 2012	46	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	+	X	+	X	-	+	+	X	X	X	X	X
	BAUER 2012 22°	9	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	+*	X	+*	X	-	+*	O	O	O	O	O	O
	BAUER 2012 4°	9	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	+	X	+	X	-	+	O	O	O	O	O	O
Leucocytes				WBC	Neutro	Lympho	Mono	Eosino	Baso								
	GRANAT 2012	46	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	X	-	+	O								
	BAUER 2012 22°	9	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	+	-	-	+	O								
	BAUER 2012 4°	9	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	X	X	X	O								
Plaquettes				PLT O	PLT I	MPV	PDW	PCT	P LCR								
	GRANAT 2012	46	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	+	+	O	O	O	O								
	BAUER 2012 22°	9	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	+*	+	O	O	O	O								
	BAUER 2012 4°	9	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	+	+	O	O	O	O								

Tableau 3 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le chat.

Nous retrouvons pour la lignée rouge les mêmes variations que chez le chien, avec une augmentation de l'hématocrite et du volume globulaire moyen, plus marquées à température ambiante, la diminution de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine et l'augmentation du comptage des réticulocytes.

Pour la lignée blanche, les variations communes aux deux études sont la diminution du comptage des monocytes et l'augmentation de celui des éosinophiles. La réfrigération des spécimens semble là encore améliorer la stabilité des comptages.

Les comptages plaquettaires sont contrairement à ce qui était observé chez le chien augmentés dans les deux études.

3. Chez le cheval

	Etude	Spécimen	Analyseur (technique)	RBC	RBC I	RBC	Hct	HGB	MCV	MCH	MCHC	Ret	RDW	RDW	LFR	MFR	HFR	IRF
				O											SD	CV		
Hématies	BAUER 2012 22°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	O	+	X	+	X	-	O	O	O	O	O	O	O
	BAUER 2012 4°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	O	X	X	X	X	X	O	O	O	O	O	O	O
	SHARIF 2012 24°	50	Manuel	O	O	-	+	+	O	O	X	O	O	O	O	O	O	O
	SHARIF 2012 4°	50	Manuel	O	O	X	-	X	O	O	-	O	O	O	O	O	O	O
Leucocytes				WBC	Neutro	Lympho	Mono	Eosino	Baso									
	BAUER 2012 22°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	-	+	-	-	X	O									
	BAUER 2012 4°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	X	X	X	X	X	O									
	SHARIF 2012 24°	50	Manuel	-	X	X	X	X	X									
	SHARIF 2012 4°	50	Manuel	X	X	X	X	X	X									
Plaquettes				PLT O	PLT I	MPV	PDW	PCT	P	LCR								
	BAUER 2012 22°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	+	+	O	O	O	O									
	BAUER 2012 4°	10	Sysmex XT-2000iV (Fluorocytométrie+impédance)	+	+	O	O	O	O									
	SHARIF 2012 24°	50	Manuel	O	O	O	O	O	O									
	SHARIF 2012 4°	50	Manuel	O	O	O	O	O	O									

Tableau 4 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le cheval.

Cette fois, les études dont nous disposons sont fondées sur des techniques d'analyses différentes : manuelle ou à l'aide d'un analyseur fonctionnant avec plusieurs techniques. Cependant nous retrouvons comme chez les deux espèces précédentes une augmentation de l'hématocrite et du volume globulaire moyen lors du stockage à température ambiante, mais pas sur les spécimens réfrigérés.

Pour les leucocytes, les deux études montrent une diminution du comptage leucocytaire total à température ambiante uniquement.

Une seule des études en question s'est intéressée aux plaquettes, avec comme chez le chat une augmentation des comptages plaquettaires, quelle que soit la température de stockage du prélèvement.

4. Chez le bovin

	Etude	Spécimen	Analyseur (technique)	RBC	Hct	HGB	MCV	MCH	MCHC	Ret	RDW SD	RDW CV	LFR	MFR	HFR	IRF
Hématies	BLEUL 2002 20°	20	Cell-Dyn 3500 (cytométrie+impédance)	X	+	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	BLEUL 2002 4°	20	Cell-Dyn 3500 (cytométrie+impédance)	X	+	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	ABD ELLAH 2011 30°	6	Medonic CA620 (impédance)	X	X	X	X	X	X	O	O	O	O	O	O	O
	ABD ELLAH 2011 4°	6	Medonic CA620 (impédance)	X	X	X	X	X	X	O	O	O	O	O	O	O
Leucocytes				WBC	Neutro	Lympho	Mono	Eosino	Baso							
	BLEUL 2002 20°	20	Cell-Dyn 3500 (cytométrie+impédance)	-	X	-	-	X	+							
	BLEUL 2002 4°	20	Cell-Dyn 3500 (cytométrie+impédance)	-**	X	-**	-	X	+**							
	ABD ELLAH 2011 30°	6	Medonic CA620 (impédance)	-	-	X	X									
ABD ELLAH 2011 4°	6	Medonic CA620 (impédance)	X	X	X	X										
Plaquettes				PLT	MPV	PDW	PCT	P LCR								
	BLEUL 2002 20°	20	Cell-Dyn 3500 (cytométrie+impédance)	-	O	O	O	O								
	BLEUL 2002 4°	20	Cell-Dyn 3500 (cytométrie+impédance)	-**	O	O	O	O								
	ABD ELLAH 2011 30°	6	Medonic CA620 (impédance)	X	X	X	X	X								
ABD ELLAH 2011 4°	6	Medonic CA620 (impédance)	X	X	X	X	X									

Tableau 5 : Comparaison qualitative de l'évolution des variables hématologiques dans différentes études, chez le bovin.

Nous avons cette fois des résultats plus variables entre les études. Dans une de ces études, nous retrouvons tout de même l'augmentation de l'hématocrite décrite chez les autres espèces.

Les deux études décrivent une diminution du comptage leucocytaire total, mais associée dans l'une à une diminution du comptage en granulocytes, et dans l'autre à une diminution des comptages lymphocytaires et monocytaires, comme ce qui avait été décrit chez le chat notamment.

L'étude menée par BLEUL montre, contrairement à ce qui a été décrit jusqu'alors, une diminution de la stabilité des comptages leucocytaires et plaquettaires avec un stockage réfrigéré, comparé à un stockage à température ambiante.

5. Bilan de ces études de stabilité

De toutes ces études ressortent des variations communes et certaines variables semblent principalement modifiées par la durée de stockage : il s'agit pour les hématies de l'hématocrite et du volume globulaire moyen, augmentés par le stockage et associés à une diminution de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine calculée. Le taux de réticulocytes n'a pas été mesuré dans toutes les études, mais lorsque c'était le cas toutes ont montrées une augmentation de ce taux.

Pour la lignée blanche, les conclusions sont plus variables selon les études, quoiqu'une diminution des comptages des monocytes et des lymphocytes soient régulièrement décrites.

Le comptage plaquettaire est très souvent modifié lors du stockage, cependant l'évolution semble différente selon l'espèce étudiée. Pour les chiens et les bovins, le comptage plaquettaire est diminué lors du stockage, alors qu'il semble augmenter chez le chat et le cheval.

Pour finir, le stockage réfrigéré des spécimens a été décrit comme bénéfique à la stabilité des analyses dans la majorité des études, sauf une (BLEUL et al., 2002) qui avance des effets délétères de la réfrigération sur les plaquettes notamment.

II. Matériels et méthodes

a. Echantillonnage

Des prélèvements de sang de 40 animaux ont été soumis au laboratoire central de biologie médicale du centre hospitalier de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, pour réalisation d'un hémogramme. 10 animaux de chacune des espèces étudiées ont été sélectionnés, et au sein de chaque espèce, chevaux exceptés, ont été sélectionnés 5 animaux sains et 5 animaux pour lesquels un hémogramme a été demandé par les cliniciens des hôpitaux de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Les 5 chiens sains, 5 chats sains et 10 chevaux sains appartenaient à des étudiants ou particuliers volontaires pour faire participer leur animal à l'étude.

L'exploitation des spécimens fut précédée d'un accord du propriétaire par consentement éclairé (Annexe 1), à l'exception des bovins pour lesquels un accord a été prévu avec le service de pathologie des animaux de rente de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, dont les cliniciens ont sélectionné les animaux intégrés dans l'étude.

Les prélèvements ont été réalisés entre le 29/10/2018 et le 15/07/2019.

b. Prélèvements sanguins

Des spécimens de sang total ont été prélevés sur les 40 animaux, sur des tubes contenant un anticoagulant EDTA-K3 (VACUETTE® EDTA K3, Greiner Bio-one).

Les prélèvements ont consisté en 2 tubes de 3mL pour les chiens, un tube de 3mL pour les chats, deux tubes de 4mL pour les chevaux et les bovins. Les prélèvements sur chiens, chats et chevaux ont été réalisés avec une contention usuelle, à une veine jugulaire, à l'aide d'un système porte tube VACUTAINER®. Les prélèvements sur les bovins ont été réalisés à la veine caudale, avec le même système de prélèvement.

Chaque tube était identifié et associé à une feuille d'accompagnement (Annexe 2), indiquant notamment l'identification de l'animal dans l'étude, la date et l'heure de prélèvement.

A l'arrivée au laboratoire, les prélèvements de chaque animal étaient mélangés et répartis en deux aliquotes égaux, puis homogénéisés par agitation mécanique durant 20 minutes et par 20 retournements manuels. Par la suite, un aliquote était stocké à 4°C, l'autre à 24°C.

c. Analyses

Chaque analyse réalisée chez les chiens, chevaux et bovins a été réalisée en duplicate en mode manuel sur l'automate. Pour les chats, une seule analyse a été effectuée à un temps donné, du fait du faible volume sanguin disponible.

Toutes les analyses ont été réalisées par un même manipulateur qualifié.

A chaque temps d'analyse, les deux aliquotes ont été homogénéisés 20 minutes et retournés, puis analysés via le Sysmex XN-V, et un frottis sanguin a été réalisé à chaque fois. Les deux aliquotes étaient ensuite rangés dans leur stockage respectif.

Des analyses ont été réalisées pour chaque spécimen à T0 (moins de deux heures après le prélèvement), puis après 2 heures (T2), 4 heures (T4), 8 heures (T8), 12 heures (T12), 24 heures (T24), 48 heures (T48) et 72 heures (T72).

d. Statistiques

Les moyennes des résultats obtenus pour chaque variable ont été étudiées selon un modèle intégrant deux facteurs de variabilité : la température et la durée de stockage, grâce à une ANOVA à deux facteurs de variabilité.

L'effet de la durée de stockage a été évalué selon un test de Dunnett par la comparaison des valeurs des variables aux différents délais d'analyse par rapport à la moyenne mesurée à T0.

III. Résultats

a. Chez le chien

Les variations observées avec la durée de stockage des aliquotes seront exprimées en pourcentage de variation par rapport aux valeurs mesurées à T0.

Concernant le comptage cellulaire en hématies, nous observons par mesure d'impédance une diminution statistiquement significative des valeurs obtenues lors du stockage à 24°C uniquement (-4% à 72h), variation non observée par la mesure par cytométrie de flux.

Une augmentation significative de l'hématocrite (+8% à 72h à 4°C, +18% à 72h à 24°C), du volume globulaire moyen (+9% à 72h à 4°C, +25% à 72h à 24°C), et plus faible de la teneur corpusculaire en hémoglobine (+2% à 72h à 4°C, +6% à 72h à 24°C) est observée, avec une diminution significative de la concentration corpusculaire en hémoglobine (-7% à 72h à 4°C, -15% à 72h à 24°C).

Ces variations sont croissantes avec le temps et sont plus marquées à 24°C qu'à 4°C.

Le comptage des réticulocytes est significativement plus élevé après 72h de stockage, notamment lors du stockage à 24°C (+9% à 4°C, +19% à 24°C).

Une diminution des comptages leucocytaires, statistiquement significative, est observée lors du stockage à 24°C uniquement à 72h (-5% par cytométrie et -9% par cytométrie associée à la fluorométrie). Le comptage le plus altéré est celui des monocytes (-43% à 72h à 24°C).

Concernant les plaquettes, une diminution significative et temps-dépendante des comptages est observée, et ce avec les trois méthodes de mesure permises par le Sysmex (variation d'impédance, cytométrie optique et fluorescence). Seuls les résultats obtenus par variation d'impédance montrent une différence statistiquement significative entre le stockage à 4°C et à 24°C (-47% à 72h à 4°C, -31% à 72h à 24°C).

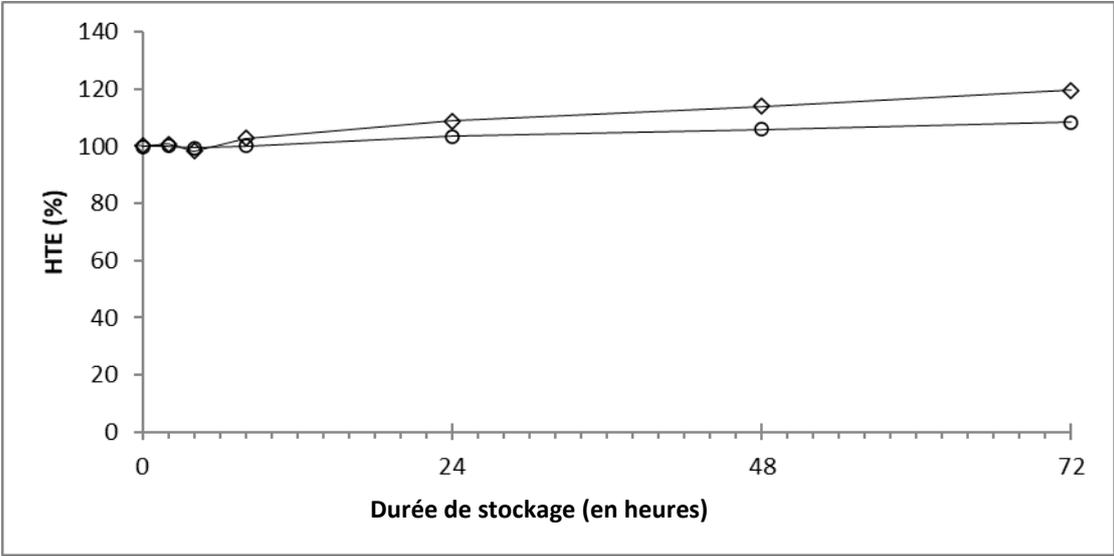
Le tableau ci-dessous représente les variations des différentes variables analytiques, en pourcentage de modification par rapport à la valeur mesurée à T0.

Légende : X indique une absence de variation statistiquement significative ; O indique que les données obtenues ne permettent pas de réaliser une analyse statistique fiable ; RBC-I, comptage des hématies par impédance ; RBC-O, comptage des hématies par cytométrie ; Hct, hématocrite ; MCV, volume globulaire moyen ; MCH, teneur corpusculaire en hémoglobine ; MCHC, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; RDW-SD, écart type de la plage de distribution des tailles des hématies ; RDW-CV, coefficient de variation associé ; LFR, MFR, et HFR, niveaux de maturation des réticulocytes (fonction de la fluorescence) ; IRF, fraction de réticulocytes immatures ; PLT-I, comptage plaquettaire par impédance ; PLT-O, comptage plaquettaire par cytométrie ; MPV, volume plaquettaire moyen ; P-LCR, proportion de plaquettes géantes ; PCT, plaquetto-crite ; PDW, plage de distribution de taille des plaquettes ; WBC, comptage leucocytaire total ; WBC-D, comptage leucocytaire total par le système de différenciation par fluorométrie.

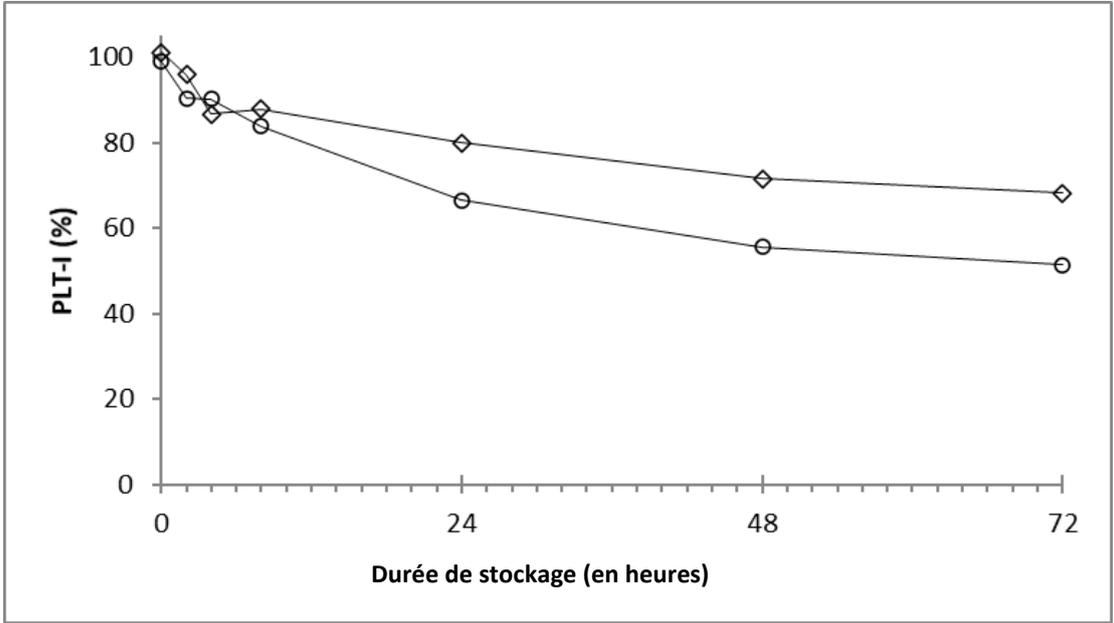
	Variable	Variation maximale comparée à T0		Différence significative liée à la température
		4°C	24°C	
Hématies	RBC-I	X	X	Oui
	RBC-O	X	X	X
	HGB	+1%	+1%	X
	Hct	+8%	+18%	Oui
	MCV	+9%	+25%	Oui
	MCH	+2%	+6%	Oui
	MHCH	-7%	-15%	Oui
	RDW-SD	+15%	+35%	Oui
	RDW-CV	+7%	X	Oui
	NRBC	+24%	+45%	X
	RBC-He	-3%	-5%	Oui
	Réticulocytes	+9%	+19%	Oui
	Réticulocytes %	+9%	+24%	Oui
	LFR	X	X	X
	MFR	X	-22%	Oui
	HFR	X	X	Oui
IRF	X	X	X	
Leucocytes	WBC	X	-5%	Oui
	WBC-D	X	-9%	Oui
	Neutrophiles	+7%	X	Oui
	Lymphocytes	-10%	X	X
	Monocytes	X	-43%	Oui
	Eosinophiles	X	+10%	X
Plaquettes	PLT-I	-47%	-31%	Oui
	PLT-F	-35%	-41%	X
	PLT-O	-28%	-21%	X
	PDW	+25%	+14%	X
	Pct	-42%	-27%	Oui
	MPV	+9%	+7%	Oui
	P-LCR	+31%	+24%	X
	IPF	+77%	+58%	X

Tableau 6 : Modifications mesurées des variables analytiques, rapportées à la moyenne mesurée à T0, chez le chien.

Les graphiques ci-dessous illustrent les modifications de deux des variables analysées, l'hématocrite et les comptages plaquettaires obtenus par mesure de la variation d'impédance, en pourcentage de variation par rapport à la moyenne obtenue juste après le prélèvement.



Graphique 1 : Effet de la durée de stockage sur l'hématocrite, à 4°C (cercles) et à 24°C (losanges).



Graphique 2 : Effet de la durée de stockage sur les comptages plaquettaires obtenus par variation d'impédance, à 4°C (cercles) et à 24°C (losanges).

b. Chez le cheval

Nous observons chez le cheval, contrairement au chien, une diminution statistiquement significative du comptage des hématies par cytométrie de flux, et ce uniquement à 4°C (-7% à 72h à 4°C). Le comptage par impédance ne varie lui quasiment pas avec la durée de stockage.

Une légère augmentation de l'hématocrite (+4% à 72h à 4°C, +6% à 24°C) et du volume globulaire moyen (+4% à 72h à 4°C, +6% à 24°C). L'effet de la température de stockage n'induit cependant pas une différence statistiquement significative pour ces deux variables.

Les valeurs de la teneur corpusculaire en hémoglobine et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine sont peu modifiées, une diminution de cette dernière apparaissant tout de même après 72h de stockage à 24°C uniquement (-5%).

Concernant la lignée leucocytaire, la seule variation significative est une diminution du comptage des éosinophiles lors du stockage à 24°C (-32% à 72h).

Pour les plaquettes, nous observons une diminution significative des comptages par impédance (à 72h : -27% à 4°C et -32% à 24°C), la température de stockage n'induisant pas une différence significative. A l'opposé, les comptages par fluorométrie sont augmentés lors du stockage à 4°C (+127% à 72h) et ne sont pas modifiés significativement à 24°C. Les comptages par cytométrie optique sont également très augmentés lors du stockage à 4°C (+368% à 72h) et beaucoup plus légèrement à 24°C (+29% à 72h). Le plaquettocrite diminue significativement avec la durée de stockage, quelle que soit la température (à 72h : -28% à 4°C, -35% à 24°C).

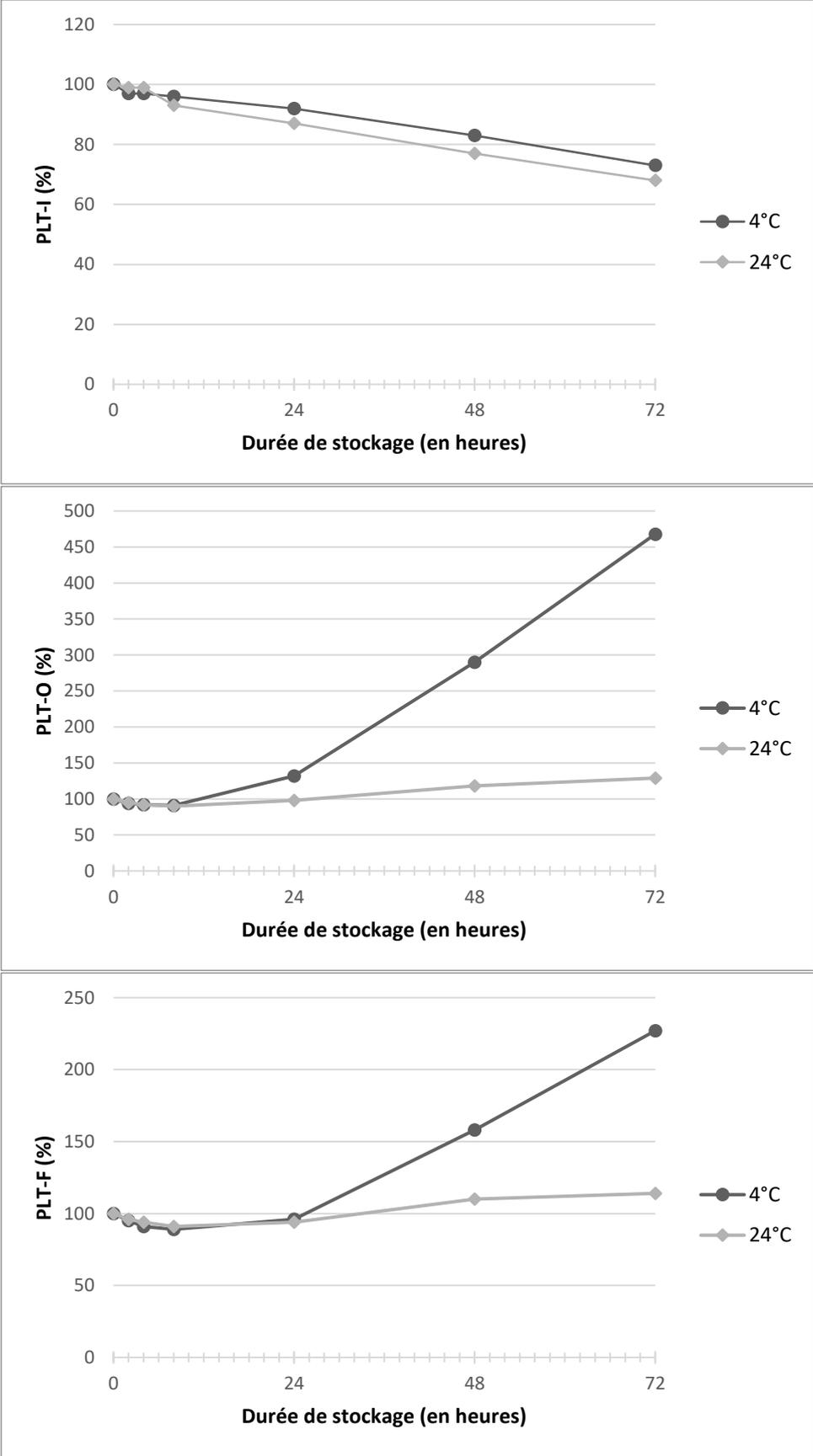
Le tableau 7 représente les variations des différentes variables analytiques, en pourcentage de modification par rapport à la valeur mesurée à T0. (Légende identique à celle du tableau 6).

	Variable	Variation maximale comparée à T0		Différence significative liée à la température
		4°C	24°C	
Hématies	RBC-I	X	+1%	Oui
	RBC-O	-7%	X	Oui
	HGB	+1%	+1%	Oui
	Hct	+4%	+6%	X
	MCV	+4%	+6%	X
	MCH	+2%	X	X
	MHCH	X	-5%	X
	RDW-SD	+18%	+16%	Oui
	RDW-CV	+24%	+9%	Oui
	RBC-He	-2%	-2%	Oui
Leucocytes	WBC	X	X	X
	WBC-D	X	-5%	Oui
	Neutrophiles	+2%	X	Oui
	Lymphocytes	X	X	Oui
	Monocytes	X	X	Oui
	Eosinophiles	X	-32%	Oui
Plaquettes	PLT-I	-27%	-32%	X
	PLT-F	+127%	X	Oui
	PLT-O	+368%	+29%	X
	PDW	X	-16%	Oui
	Pct	-28%	-35%	X
	MPV	X	-6%	Oui
	P-LCR	X	X	Oui

Tableau 7 : Modifications mesurées des variables analytiques, rapportées à la moyenne mesurée à T0, chez le cheval.

L'évolution des comptages plaquettaires avec la durée de stockage semble ainsi très dépendante de la méthode de mesure employée, ce que nous pouvons illustrer avec les graphiques suivants.

Graphiques 3, 4 et 5 : Effet de la durée de stockage sur les comptages plaquettaires obtenus respectivement par variation d'impédance, par cytométrie optique et par fluorescence, à 4°C (cercles) et à 24°C (losanges).



IV. Discussion

a. Concordance avec les données de la littérature

i. Chez le chien

Les tendances rapportées dans la littérature et résumées dans le tableau 2 correspondent avec les variations mesurées dans notre étude, notamment l'augmentation de l'hématocrite, du volume globulaire moyen et la diminution de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. L'augmentation du comptage des réticulocytes est également rapportée dans toutes les études l'ayant mesuré.

Concernant les leucocytes, certaines données divergent, mais plusieurs études semblent comme la nôtre montrer une diminution du comptage des monocytes avec la durée de stockage, notamment à température ambiante.

Pour finir, la diminution du comptage des plaquettes que nous avons observé avec les trois méthodes de mesures permises par le Sysmex XN-V est également rapporté dans la majorité des études précédentes.

ii. Chez le cheval

Les données bibliographiques disponibles dans l'espèce équine étant moins nombreuses que pour l'espèce canine, il est plus difficile de distinguer des tendances nettes concernant l'influence des conditions de stockage des prélèvements sur les variables analytiques. Comme dans les études antérieures, nous avons observé une augmentation de l'hématocrite et du volume globulaire moyen avec le stockage, quelle que soit la température.

La diminution des comptages leucocytaires, rapportée dans les deux études présentées précédemment, uniquement lors du stockage à température ambiante, n'a pas été mise en évidence dans notre étude.

Bauer décrivait dans son étude une augmentation du comptage plaquettaire avec le stockage, quelle que soit la température. Dans notre étude, les résultats divergent selon la méthode de mesure employée : la variation d'impédance donne une diminution du comptage indépendamment de la température de stockage, alors que la cytométrie et la fluorométrie indique une nette augmentation du comptage lorsque le spécimen est réfrigéré à 4°C.

b. Aspects pratiques

Une part importante des variables analytiques semble être modifiée par le stockage prolongé du prélèvement, et ce malgré la réfrigération. Il faut cependant comparer ces variations au biais de répétabilité des analyses, et à la notion d'erreur acceptable.

A partir des données de l'étude de répétabilité pratiquée dans le protocole de validation du Sysmex XN-V, ainsi que des recommandations ASVCP concernant l'erreur acceptable en hématologie (Nabity et al., 2018), nous pouvons extraire le tableau 8.

Variable	Erreur acceptable	Erreur totale observée
RBC	10%	4.02%
HGB	10%	
HCT	10%	
MCV	7%	
MCHC	10%	
Reticulocytes	20%	9.37%
WBC	15%	4.21%
Neutrophiles	15%	
Lymphocytes	15%	
Monocytes	60%	
Eosinophiles	50%	
PLT	20%	14.67%

Tableau 8 : Erreur totale acceptable et erreur totale observée dans l'étude de répétabilité réalisée sur le Sysmex XN-V

L'erreur totale acceptable est définie dans les recommandations ASVCP, l'erreur totale observée a été calculée selon ces recommandations dans l'étude de validation du Sysmex XN-V. La valeur indiquée correspond à la plus grande valeur calculée parmi les deux solutions de contrôle employée.

Nous pouvons donc souligner que malgré une modification statistiquement significative d'un certain nombre de variables analytiques avec le stockage, peu de ces variables présentent des altérations supérieures aux erreurs acceptables relatives à la répétabilité des mesures sur un même spécimen.

Chez le chien, les variations du volume globulaire moyen (MCV), quelle que soit la température, et de l'hématocrite (HCT), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MHCH) et le comptage des réticulocytes lors de la conservation à 24°C sont supérieures à ces valeurs. Les comptages plaquettaires et plaquettocrite, quelles que soient la température et la méthode d'analyse, sont modifiées de façon importante.

Chez le cheval, les variations importantes ne concernent que les plaquettes, avec des comptages modifiés de façon importante mais également différente selon la technique de mesure. La connaissance du principe de mesure de l'analyseur employé peut donc entrer en compte dans l'interprétation des comptages plaquettaires observés, cependant aucune des méthodes de mesure ne semble permettre une stabilité des variables lors d'un stockage prolongé.

La modification de la plupart des variables ne devrait donc pas modifier de façon importante l'interprétation des résultats d'analyse pour la prise en charge de l'animal, à l'exception des comptages plaquettaires, du volume globulaire moyen, de l'hématocrite et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. L'interprétation de ceux-ci devraient être fait avec réserves en cas de stockage prolongé du prélèvement, qu'il soit réfrigéré ou non. La confirmation à l'aide d'un frottis sanguin est recommandée.

Une étude antérieure (Imeri et al., 2008) avait cependant mis en évidence une influence relativement importante de l'analyseur utilisé sur la stabilité des variables hématologiques, les données obtenues dans notre étude doivent donc être appliquées uniquement à l'analyseur employé ici, à savoir le Sysmex XN-V.

c. Limites de notre étude

Nous avons limité pour le moment notre exploitation des résultats aux seules espèces canine et équine, du fait du temps nécessaire pour réaliser, vérifier et interpréter les résultats statistiques pour chacune des variables étudiées.

Une autre limite de notre étude est liée à l'échantillonnage des chevaux. Nous n'avons pour des raisons de disponibilité d'animaux donneurs à proximité du laboratoire de l'école pu prélever que des animaux "sains", alors que nous avons dans les autres espèces étudiées prélevé des animaux sains et d'autres présentant diverses pathologies. Si la majorité des études dans la bibliographie sont réalisées sur des groupes d'animaux en bonne santé, il faut cependant rappeler que la plupart des hémogrammes réalisés en pratique vétérinaire ont vocation à explorer une pathologie chez l'animal prélevé.

Dans l'objectif d'évaluer rapidement en conditions de pratique les effets du stockage sur un prélèvement donné, et d'adapter l'interprétation de celui-ci, il serait intéressant d'étudier l'effet du stockage sur les "dot plot" fournis par l'analyseur pour les différentes lignées cellulaires. Une étude mettant en relation les modifications de ces dot plot, des variables mesurées et des modifications observables sur les frottis sanguins permettrait ainsi d'estimer en quelques minutes seulement la qualité du stockage d'un prélèvement et les précautions à prendre dans l'interprétation des analyses réalisées.

V. Conclusion

Nous avons pu montrer au cours de cette étude une variation plus ou moins marquée de certaines variables hématologiques fournies par l'analyseur Sysmex XN-V en fonction des conditions de stockage des prélèvements.

Chez le chien, l'hématocrite, le volume globulaire moyen et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine mesurés par l'analyseur sont augmentés, tout comme le comptage des réticulocytes. Les comptages plaquettaires sont au contraire diminués significativement.

Pour la quasi-totalité des variables analytiques, la réfrigération semble réduire légèrement les altérations observées, à l'exception notamment des comptages plaquettaires

Chez le cheval, nous avons également observé une augmentation de l'hématocrite mesuré lors d'un stockage prolongé des spécimens. La plus grande variabilité est observée avec les plaquettes : selon la méthode de mesure, une diminution (mesure par variation d'impédance) ou une forte augmentation (mesures par cytométrie optique et fluorescence) des comptages est observée. Ces modifications sont également plus marquées lorsque le spécimen est réfrigéré à 4°C.

Bibliographie

- ABD ELLAH, Mahmoud, 2011. Effect of Storage Time and Temperature on Erythrocytes, Platelets and Leucocytes Pictures of Cattle and Equine Blood. In : *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 1 janvier 2011. Vol. 10, p. 2768-2771. DOI 10.3923/javaa.2011.2768.2771.
- BAUER, Natali, NAKAGAWA, Julia, DUNKER, Cathrin, FAILING, Klaus et MORITZ, Andreas, 2012. 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. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1 janvier 2012. Vol. 24, n° 1, p. 74-89. DOI 10.1177/1040638711436243.
- BLEUL, U., BLEUL, U., SOBIRAJ, A. et BOSTEDT, H., 2002. Effects of Duration of Storage and Storage Temperature on Cell Counts of Bovine Blood Samples as Determined by an Automated Haematology Analyser. In : *Comparative Clinical Pathology*. 1 octobre 2002. Vol. 11, n° 4, p. 211-216. DOI 10.1007/s005800200021.
- BOURGÈS-ABELLA, Nathalie H., GEFFRÉ, Anne, DESHUIILLERS, Pierre L., BRAUN, Jean-Pierre D. et TRUMEL, Catherine, 2014. Changes in hematology measurements in healthy and diseased dog blood stored at room temperature for 24 and 48 hours using the XT-2000iV analyzer. In : *Veterinary Clinical Pathology*. 1 mars 2014. Vol. 43, n° 1, p. 24-35. DOI 10.1111/vcp.12119.
- FURLANELLO, Tommaso, TASCIA, Silvia, CALDIN, Marco, CARLI, Erika, PATRON, Carlo, TRANQUILLO, Massimo, LUBAS, George et SOLANO-GALLEGO, Laia, 2006. Artfactual changes in canine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer. In : *Veterinary Clinical Pathology*. mars 2006. Vol. 35, n° 1, p. 42-46.
- GRANAT, Fanny, GEFFRÉ, Anne, BOURGÈS-ABELLA, Nathalie, BRAUN, Jean-Pierre et TRUMEL, Catherine, 2013. Changes in haematology measurements with the Sysmex XT-2000iV during storage of feline blood sampled in EDTA or EDTA plus CTAD. In : *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 1 juin 2013. Vol. 15, n° 6, p. 433-444. DOI 10.1177/1098612X12469967.
- IHEDIOHA, John I. et ABA, Patrick E., 2010. Artfactual changes in the haematocrit buffy coat of stored anti-coagulated blood samples of farm animals. In : *Comparative Clinical Pathology*. 1 octobre 2010. Vol. 19, n° 5, p. 493-497. DOI 10.1007/s00580-009-0915-7.
- IMERI, Fatime, HERKLOTZ, Roberto, RISCH, Lorenz, ARBETSLEITNER, Christine, ZERLAUTH, Manfred, RISCH, Gerhard et HUBER, Andreas, 2008. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. In : *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1 août 2008. Vol. 397, p. 68-71. DOI 10.1016/j.cca.2008.07.018.
- MÉDAILLE, C., BRIEND-MARCHAL, A. et BRAUN, J. P., 2006. Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours. In : *Veterinary Clinical Pathology*. 1 mars 2006. Vol. 35, n° 1, p. 18-23. DOI 10.1111/j.1939-165X.2006.tb00083.x.

NABITY, Mary B., HARR, Kendal E., CAMUS, Melinda S., FLATLAND, Bente et VAP, Linda M., 2018. ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. In : *Veterinary Clinical Pathology*. 2018. Vol. 47, n° 1, p. 9-21. DOI 10.1111/vcp.12583.

SHARIF, Maysam Tehrani, MAHABADI, Mehrdad Ameri, MOSHFEGHI, Sogand, SHARIFI, Hamid, HOSEINI, Seyed Mohammad et ALAVI, Seyed Mohsen, 2012. Artifactual changes in hematological variables in equine blood samples stored at different temperatures and various anticoagulants. In : *Comparative Clinical Pathology*. 1 août 2012. Vol. 21, n° 4, p. 449-452. DOI 10.1007/s00580-010-1116-0.

Annexes

Annexe 1 : Déclaration de consentement éclairé signé par les propriétaires des animaux prélevés

	Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 295; mail : c.trumel@envt.fr	Annexe 1 FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE
Validation du Sysmex XN-V chez le chien, le chat, le bovin et le cheval. Section stabilité		

Étude effectuée à l'école Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

L'objectif de cette étude est de réaliser la validation d'un nouvel automate d'hématologie, le Sysmex XN-V. La validation d'un nouvel automate permet de s'assurer que la procédure est conforme aux standards du laboratoire, elle est indispensable à son utilisation au laboratoire afin de pouvoir interpréter les résultats d'analyses.

Cette étude nécessite de prélever 4 ml de sang sur votre animal (2 tubes de 2ml chacun).

L'hémogramme sera effectué à titre gratuit et les résultats seront transmis au clinicien.

Je, soussigné(e)

Propriétaire de l'animal

Atteste avoir été clairement informé(e) des buts et moyens de l'étude envisagée

Atteste avoir lu le paragraphe précédent

Atteste avoir conscience du caractère facultatif de cette étude et de ma totale liberté de refuser ou d'accepter que mon animal rentre dans l'étude.

Et accepte que mon animal soit inclus dans l'étude

À Toulouse, le

Signature

Etiquette du dossier

Annexe 2 : Agrément du comité d'éthique ayant évalué le projet

Comité d'éthique en expérimentation animale
SCIENCE ET SANTE ANIMALES N°115

Ecole Nationale Vétérinaire
23 chemin des Capelles
BP 87614
31076 TOULOUSE cedex 3

A l'attention de

Dr C TRUMEL

A Toulouse le 15 avril 2019

Objet : Avis du comité d'éthique SSA N°115 concernant l'utilisation des animaux à des fins scientifiques dans votre projet.

Titre du projet : Validation du Sysmex XN-V chez le chien, le chat, le bovin et le cheval.

Votre dossier a reçu un avis favorable du comité SSA, enregistré sous le numéro SSA_2019_002.

La présidente,

Annabelle MEYNADIER

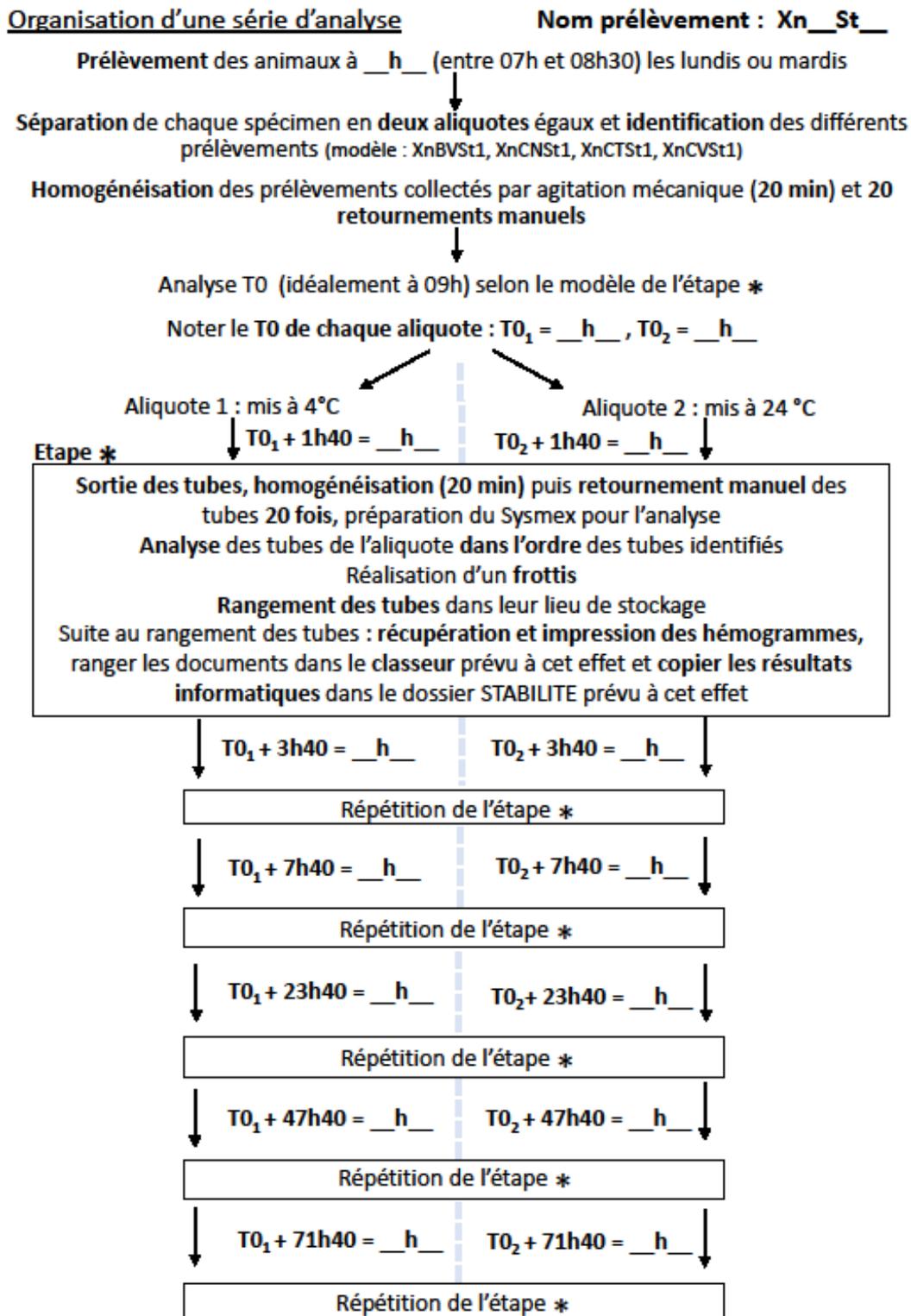


Présidente : Dr Annabelle Meynadier - Ecole Nationale Vétérinaire- 23, chemin des Capelles
- BP 87614 - 31076 Toulouse cedex 3 - Tel : 0561193270 - Fax : 0561193911

COM-PROC-002-Annexe 3

Annexe 3 : Protocole de réalisation d'une série d'analyse

Protocole Sysmex XN-V stabilité d'un spécimen



Annexe 4 : Exemple d'analyse fournie par le Sysmex XN-V

XN-V series xnv

Sample No.: XnCNSt05-T01
 Species: (003)Dog
 Sample Comment:

Rack:

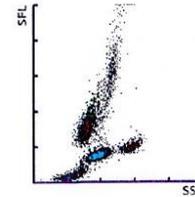
Position: 19/11/2018 09:31:33 WB

Nickname: XN-1000V-1-A

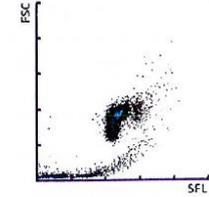
Negative

WBC	7.05	[10 ³ /uL]		
RBC	7.27	[10 ⁶ /uL]		
HGB	17.1	[g/dL]		
HCT	48.7	[%]		
MCV	67.0	[fL]		
MCH	23.5	[pg]		
MCHC	35.1	[g/dL]		
PLT &F	251	[10 ³ /uL]		
RDW-SD	31.7	[fL]		
RDW-CV	14.2	[%]		
PDW	13.5	[fL]		
MPV	10.9	[fL]		
P-LCR	34.6	[%]		
PCT	0.29	[%]		
NRBC	0.00	[10 ³ /uL]	0.0	[%]
NEUT	2.99	[10 ³ /uL]	42.5	[%]
LYMPH	2.70	[10 ³ /uL]	38.3	[%]
MONO	0.53	[10 ³ /uL]	7.5	[%]
EO	0.82	[10 ³ /uL]	11.6	[%]
BASO	0.01	[10 ³ /uL]	0.1	[%]
RET	0.31	[%]	0.0225	[10 ⁶ /uL]
IRF	21.2	[%]		
LFR	78.8	[%]		
MFR	4.4	[%]		
HFR	16.8	[%]		
RET-He	24.5	[pg]		
IPF	2.5	[%]		
WBC-BF		[10 ³ /uL]		
RBC-BF		[10 ⁶ /uL]		
MN		[10 ³ /uL]		[%]
PMN		[10 ³ /uL]		[%]
TC-BF#		[10 ³ /uL]		

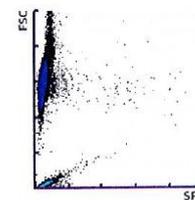
WDF



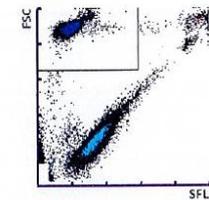
WNR



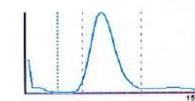
RET-EXT



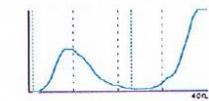
PLT-F



RBC



PLT

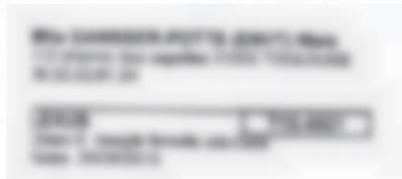


WBC IP Message

RBC IP Message

PLT IP Message

PLT-I	264	[10 ³ /uL]
PLT-O	268	[10 ³ /uL]
PLT-F	251	[10 ³ /uL]
WBC-D	6.93	[10 ³ /uL]
RBC-He	24.6	[pg]



Soin

00-05 19/11/2018 10:30 1/1

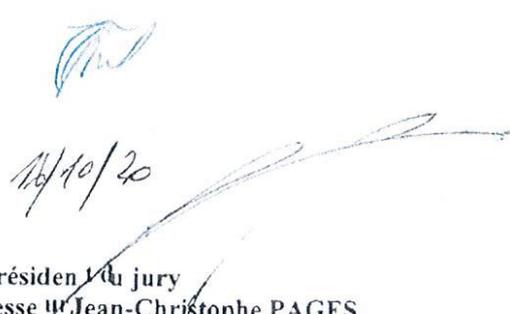
AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Catherine TRUMEL, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Matthieu FORNES** intitulée « Etude de stabilité de l'hémogramme de chien, chat, cheval et bovin avec le Sysmex XN-V » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 12/10/2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeure Catherine TRUMEL

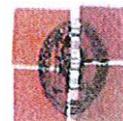
Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS


Vu :
Le Président du jury
Professeur Jean-Christophe PAGES


Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO


Le Président de l'Université Paul Sabatier,
La Faculté de Médecine Vétérinaire,
Le Centre de la CFVU
Jeanne ALARY

M. Matthieu FORNES
a été admis sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le : 15/10/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



TITRE : Stabilité des variables hématologiques mesurées par l'automate Sysmex XN-V® lors du stockage prolongé du prélèvement sanguin, à température ambiante ou réfrigéré à 4°C.

RESUME : L'hémogramme est un examen réalisé couramment dans la pratique vétérinaire actuelle, mais le praticien ne dispose pas toujours d'un analyseur à proximité du patient, et l'analyse du prélèvement sanguin est parfois reportée dans le temps. Il est donc intéressant de savoir quelles variables sont altérées par le stockage et dans quelle mesure elles le sont, pour éviter une erreur d'interprétation des résultats ainsi obtenus. Les résultats obtenus sur 10 chiens et chevaux montrent une altération significative de certaines variables, les plus importantes concernant l'hématocrite, le volume globulaire moyen et les comptages plaquettaires.

MOTS-CLES : HEMATOLOGIE, XN-V, STABILITE, TEMPERATURE DE STOCKAGE, VIEILLISSEMENT DU SANG

TITLE : Stability of hematology variables measured by Sysmex XN-V® analyzer in blood samples during extended storage at room temperature or at 4°C.

ABSTRACT : Hemogram is a routine exam in current veterinary medicine, even though the veterinary practitioner cannot always have an analyzer within reach when examining a patient and thus must delay blood analysis. It is therefore important to know which variable will be altered and the way it will be to avoid any misinterpretation of analysis result. Data collected from 10 dogs and horses show a significant modification of some variables, the most important ones being hematocrit, mean globular volume and platelets counts.

KEYWORDS : HAEMATOLOGY, XN-V, STABILITY, STORAGE TEMPERATURE, SAMPLE AGEING