
Intervalles de référence hématologiques chez l'espèce canine avec l'analyseur XT-2000iV (Sysmex)

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

**Sophie, Johanne, Laurence
Gaston-Carrère**
27 juin 1984 à Marseille

Directeur de thèse : Mme le Docteur Nathalie Bourgès-Abella

JURY

PRESIDENT :

Madame Elisabeth ARLET-SUAU Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Catherine TRUMEL Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A notre président de thèse,

Madame le professeur Elisabeth ARLET-SUAU
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
Médecine interne

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Madame le docteur Nathalie Bourgès-Abella
Maître de conférences à l'école nationale vétérinaire de Toulouse
Histologie

Pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse dans la réalisation de ce manuscrit.
Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre profond respect et gratitude pour tout ce qu'elle nous a apporté pendant ces cinq années et particulièrement ces derniers mois.

Madame le professeur Catherine Trumel
Professeur à l'école vétérinaire de Toulouse
Biologie Médicale

Qui a aimablement accepté de participer à notre jury de thèse et qui a largement contribué à cette étude.
Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements

A monsieur le professeur Jean-Pierre Braun,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Physique et chimie biologiques et médicales

Pour son aide précieuse dans cette étude et ses conseils.
Très sincères remerciements

A mademoiselle le Docteur Anne Geffré,

Pour son aide précieuse, sa gentillesse et sa grande disponibilité.

A zazou

Pour ton soutien de toute heure (de jour comme de nuit), ta patience infinie, ton amour débordant. A toutes les heures passées au téléphone avec toi (vive SFR illimyhtic), à tous nos fous rires mais aussi à toutes nos larmes. Merci pour avoir su toujours trouver les mots qu'il fallait, pour m'avoir toujours soutenue dans mes décisions. Sans toi il est certain que les choses auraient été beaucoup plus difficiles ! S'il y a une chose que tu dois retenir de ces quelques lignes maman, c'est que je t'ai mis en premier et que ce n'est pas pour rien !!!

Au dro

Pour ton amour et ton soutien, même s'il est parfois discret ou timide, je l'ai toujours senti prêt de moi. Merci papa pour m'avoir toujours soutenue dans les moments difficiles, pour ta générosité et ta justesse. Je terminerai ta partie papa en te disant que : « oui mon vélo est toujours crevé, oui ma voiture va bien, et non tu devras trouver quelqu'un d'autre pour payer ta retraite ! »

A nico

Merci pour cette relation si particulière qui nous unit, pour tous les apéros passés ensemble, ces soirées à la charrette, nos week-ends de féria mémorables, de plongée, de ski, nos plans machiavéliques étant enfant pour regarder la télé ou les cadeaux de noel... Merci pour avoir toujours été présent et pour m'avoir toujours remonté le moral quand il le fallait. A tous ces merveilleux souvenirs que j'ai avec toi et à tous ceux qui viendront ! A jean jaures et louis 14...

A ma trite

Pour m'avoir fait autant rigoler, pour ta sensibilité et ta gentillesse. Pour les semaines à « ta puisse », tes teddy smitch, tes plus tendres, les gremlins et j'en passe...Merci pour tes visites à Toulouse et ses commissariats, pour tous les repas ou j'ai jamais autant rigolé. Surtout reste toujours aussi pétillant, attendrissant et juste !! Envole toi mon petit orville !

A valou

A tous ces bons moments passés ensemble, et tout ceux qui viendront ! Si j'avais du choisir une belle sœur, c'est toi que j'aurais choisi !

A anaelle,

Ma première petite nièce, en espérant que vous serez bientôt plus nombreux ;)

A manou

Merci pour tout l'amour que tu nous as apporté, pour tous les moments passés tous ensemble à Perpezac, ces moments d'exceptions ou chacun notre tour tu nous faisais découvrir un musée, une expo, une pièce de théâtre.... Même si à l'époque, on traînait un peu la patte, avec le recul, on s'aperçoit que ce n'est pas donné à tout le monde d'avoir une grand mère comme

toi ! Merci pour avoir été la personne qui nous a tous si souvent rassemblés et qui nous a transmis le goût de la famille ! Bon, ce manuscrit n'est pas trop un livre de chevet mais trouves y le témoignage de mon amour et de la grande admiration que j'éprouve pour une femme d'exception !

A mon papi et ma mamie

Un grand merci pour votre soutien et votre amour tout au long de ces années. Merci pour avoir été les seuls pendant toutes ces années à m'avoir toujours souhaité ma fête ! Toutes ces petites attentions qui ont souvent embellies ma journée. Vous ne lirez sûrement pas ces quelques lignes avant le mois de juillet mais je voulais vous souhaiter un joyeux anniversaire : 80 ans et toujours unis, voilà une jolie preuve qu'on peut être heureux à deux ! Merci pour les petits goûtés préparés avec amour par mamie, nos petits allez retour aux Lecques papi, pour tous ces bons moments passés chez vous !

Au reste de ma famille

Un énorme merci à mes cousins : Léa, Andréa, Eliot et constance, pour tous ces bons moments passés tous ensemble.

A mes autres cousins que hélas je vois un peu moins mais que je retrouve toujours avec plaisir: julien, cécile, cédric et stéphane.

A mes oncles et tantes : Laurent, Joël, pascalle, Florence, Anne, Sylvie.

A ma marraine

A Maguy, une de mes premières maîtresses. Si tu trouves des fautes d'orthographe, ce sera un peu comme si c'était les tiennes !

A Robert et michelle

A Michel, Evelyne, Jojo, mimi, Fabienne Michel...

Et puis une pensée toute particulière pour Jean-Louis! C'est loin d'être un mémoire de l'ENA...mais ça a le mérite de laisser à mon tour une petite trace sur mon passage.

A Frédéric Dard et Manu France, sans qui mes études n'auraient certainement pas pu être financées !!

A mes amis de Brive

A Tetelle, mon amie de toujours ! Pour toutes ces heures passées à jouer aux barbies, pour toutes nos chorégraphies qui ont du souvent emmerder nos mamans, pour toutes nos cabanes extraordinaires, pour toutes nos ventes de téléshopping, pour nos réveillons devant Arthur, pour avoir toujours été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments, bref

pour avoir été ma meilleure amie depuis plus de 25 ans ! Un grand merci à toute ta petite famille aussi!

A Loulou,

Pour tous les fou rires qu'on a eu ensemble, pour toutes nos soirées passées à la piscine, nos nombreuses soirées caps, pour toutes ces heures passées dans ton garage ou à écouter de la musique, pour avoir voulu rester mon ami après notre séparation. Pour ton humour qui m'a toujours fait fondre, pour ta gentillesse, pour avoir été la personne qui m'a toujours donné le plus joli reflet de moi même !

A Pierrick, que j'ai rencontré un peu plus tard, mais qui a cependant une grande place dans mon cœur. Pour toutes nos soirées avec la bande du lycée, on y a souvent beaucoup ri quand même ! Pour notre nouvelle amitié qui a pris jour après le lycée, pour toutes ces bières, ces barbecues, ces heures passées à discuter tous les deux ! Vive les galas de médecine !

A Arnaud, je ne sais pas si je n'aurais pas du te classer avec la famille toi d'ailleurs ! Merci pour toutes les soirées Inoubliables passées en ta compagnie, pour ta bonne humeur permanente, pour tous tes conseils donnés l'air de rien et qui m'ont toujours beaucoup aidé, pour ta philosophie de la vie, qui avec toi, paraît de suite beaucoup plus simple et jolie !

Et puis à tous les autres. camille, Julie, Amélie, Germain, Grégoire; et bien sur à toute la bande de stico (Marco, Mathias, Franc, Fab..) avec qui j'ai passé de merveilleux moments ;

Et puis la prépa...

A ma poule, tu es la première personne de qui je me suis rapprochée en arrivant à Toulouse et je ne le regrette pas ! Si je ne t'avais pas trouvée, je ne suis pas sûre que je l'aurais eu moi ce concours ! A toutes nos soirées chez Bousc, à toutes ces nuits chez Damien et la poire, à tous nos repas du dimanche au quick, à tous nos fou rires incontrôlables en cours, à ces férias mythiques de Daxe, à nos heures passées au téléphone alors qu'on était à deux pas, à nos vacances avec la poire à Biarritz, à notre appart de jeunes cadres dynamiques et aux soirées mémorables qu'on y a passé ! Je te dois réellement un grand merci ma belle !

A ma poire et mon coby, que hélas je ne vois plus mais avec qui je garde de merveilleux souvenirs ! Mon seul regret : que la prépa nous ait séparés !

Enfin l'école,

A Clémence,

Par où commencer, il y a eu des tonnes de booms, des soirées en ville, des fou rires et des délires que je ne peux pas compter, une semaine culte à la spi, une escapade grandiose à Barcelone, quelques petites ruptures donc quelques larmes aussi, des petits séjours chez toi à Noël, des grandes clopes, et puis des heures et des heures et des heures de discussion ! En

résumé, tu as été pendant ces 5 années mon amie la plus proche, ma confidente, celle à qui je savais que je pouvais tout confier sans crainte d'être jugée. Si on se demande en sortant de l'école quels seront les amis que l'on conservera, et bien pour toi, je me suis même pas posé la question ! Et puis à papa !

A mes colocs, Miloute et Claire, pour cette année extra passée avec vous à la pinède, faite essentiellement de soirées, de rires, de barbec, mais finalement très peu de travail ou de ménage d'ailleurs, enfin juste ce qu'il fallait ! Seul regret, ne pas avoir passé plus de temps avec vous dans cette maison (cf chloé...)

Merci Miloute pour toutes nos boomettes de plumes et de doc, pour toutes nos séances shopping, nos lendemains de boom magiques, ces heures passées à être bien contente d'être des filles, à s'imaginer des vengeance terribles...pourvu que ça dure !

Merci Clairette pour toutes ces soirées passées chez toi et chloé, les pumpycrowpitup under the sea show, les refoulements multiples à l'opus ensuite, nos féria à vic sur des coup de tête, ces litres de vin dont tu nous as si généreusement arrosés, pour nos fins de booms à dormir ensemble on ne sait plus où ! Et surtout pour ton merveilleux smurf !vive mémovet !

A chloé, qui comme vous l'avez compris aurait pu être sous l'intitulé mes colocs ! Merci bien sur pour les mêmes soirées que j'ai cité pour claire avec une dédicace spéciale pour notre premier we à vic toutes les 3, à bob l'éponge, à ton enthousiasme et ta joie de vivre légendaire. A ce petit mois de Janvier dernier passé avec nous à la maison, et à l'anniversaire de l'anaconda !! Et enfin à nos petits mails sur facebook qui te montrent que tu nous as bien manqué cette année !

A Steph, pour toutes nos boomettes et nos nuits en équine avec Miloute, pour ta confiance que tu m'as souvent accordée pour ta sagesse et tes bons conseils, aux soirées passées toutes les deux à se faire pourrir par les docs, à nos courses d'endurance. Merci pour cette soirée mémorable à la spi, notre dévouement pour passer à la télé reste légendaire !

A Mélo, pour ta gentillesse, ta bonne humeur permanente, ta spontanéité, pour toutes nos soirées nana et nos confidences! 5 ans dans le même groupe de TP et jamais ne serait ce qu'une dispute...pas mal pour des filles !

A tous « nos gros lourds du groupe de TP », sans qui mes 5ans auraient été bien moins marrant : j'appelle à la barre Rymbow, Beubeuil, Bali, Fabien, Marcho, Thomas, Allain, Rominou, Julien, Guigui ! Merci pour votre humour, votre bonne humeur, votre finesse qui n'a pas son pareil !!

En clair, si je devais refaire un groupe de TP, je dirais on prend les mêmes et on recommence !! Et Je pourrais même rajouter Jean Seb, la Muss, Marco qui en ont vraiment l'étoffe.

Une pensée toute particulière aux habitants de saint sim, merci pour tous ces bons moments passés chez vous les gars !

A aude, et au reste de mes copromos,

A mes docs, Ko, rénat, Pétrus, Po, le ché, Zorba, Puche, bugs, Baz et les autres

A mes petits poulots, Nico, Arthur, Guineth, Margaux, Bala, Greg, Franssou, Camille, Lucie, Rémi et les autres !

A Miramar

A tous ceux que j'ai appris à mieux connaître aux cliniques : mon petit chat, aurore, alexis, ivizova, baptiste, jerome, julie, thomas, milou, bouss, aude,.

A mes co internes d'atlantia

A notre Lulu

A Charles, mon unique mais non moins plus jolie chope de boom...Je vais te citer comme promis ma chanson de promo : « pourvu que ça dure cette belle aventure! » ❤️

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
I. Matériels et méthodes	14
I.1 Echantillons sanguins : facteurs pré-analytiques et prélèvements	14
I.2. Technique d'analyse	14
I.3. Frottis sanguins	15
I.4 Choix de la population des animaux de référence	15
I.5. Analytes sanguins	17
I.6. Analyses statistiques	18
II. Résultats	19
II.1. Caractéristiques analytiques	19
II.2. Comparaison des résultats obtenus pour les numérations globulaires et plaquettaires en fonction de la méthode d'analyse	20
II.3. Caractéristiques de la population de référence	21
II.4. Intervalles de référence	24
II.5. Effets de l'âge et du sexe sur les intervalles de référence	29
II.5. Effets de l'âge et du sexe sur les intervalles de référence	30
III. Discussion	32
III.1. Les facteurs pré-analytiques	32
III.2. Performances analytiques de l'analyseur	32
III.3. Sélection de la population de référence	33
III.4. Méthodes de détermination d'un intervalle de référence	34
III.5. Comparaison des IR déterminés dans cette étude avec les résultats de la littérature	34
III.6. Effets de l'âge, du sexe et de la race du chien	35
CONCLUSION	37

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	38
-----------------------------------	----

TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Race et nombre de chiens sélectionnés dans l'étude expérimentale.....	16
<u>Tableau 2</u> : Imprécision et justesse intra-laboratoires des analytes sanguins avec l'analyseur d'hématologie XT-2000iV	20
<u>Tableau 3</u> : Comparaison de la distribution des différentes races utilisées dans la population de référence de notre étude avec la répartition des races françaises les plus représentées.....	22
<u>Tableau 4</u> : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT 2000iV pour les analytes sanguins préalablement validés et pour les index calculés à partir de ces derniers.....	25
<u>Tableau 5</u> : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT 2000iV pour les analytes sanguins et index non préalablement validés.....	26
<u>Tableau 6</u> : Estimation de l'intervalle de référence pour l'hématocrite chez les chiens males et femelles à partir des valeurs transformées par la méthode robuste de Box Cox.....	30

FIGURES

<u>Figure 1</u> : Distribution des facteurs "âge" et "sexe"	23
<u>Figure 2</u> : Distributions observées et ajustées pour les analytes sanguins de 132 chiens adultes sains.....	27
<u>Figure 3</u> : Effet de l'âge sur les valeurs des numérations leucocytaires, lymphocytaires et granulocytaires neutrophiles chez 132 chiens adulte.....	31

INTRODUCTION

Les nouvelles avancées technologiques et les progrès incontestables réalisés en médecine vétérinaire durant ces dernières années offrent aux examens complémentaires une place essentielle dans la démarche diagnostique d'un vétérinaire clinicien. L'existence d'intervalles de références est alors indispensable pour l'interprétation des résultats d'examens réalisés dans le domaine de la biologie clinique et notamment en hématologie. Les valeurs de références ont été définies pour la première fois en 1969¹ et des publications récentes définissent ce concept de façon claire et exhaustive^{2,3}.

Pour chaque nouvel automate, des intervalles de référence propres devraient être attribués, soit par transfert de données à partir d'anciens automates, soit par validation d'intervalles de référence préexistants. Dans le cas où les deux procédés cités ne peuvent être appliqués, de nouveaux intervalles de référence doivent être établis en suivant les recommandations internationales de l'Institut international des normes en biologie médicale humaine (Clinical and Laboratory Standards Institut : CLSI) et de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (International Federation of Clinical chemistry and Laboratory medicine: IFCC), mises à jour en 2008².

A notre connaissance, seule une étude a été réalisée sur les intervalles de référence chez le chien avec un cytomètre en flux, et a porté sur 46 individus⁴, nombre largement inférieur aux 120 prélèvements recommandés pour établir des intervalles de référence en biologie médicale². La principale difficulté pour déterminer un intervalle de référence réside dans la sélection de la population de référence. Pour cette raison, nous avons estimé que des chiens de pure race pourraient constituer une base solide, à condition que le nombre d'animaux sélectionnés dans chaque race soit représentatif de la prévalence de cette race en France⁵, qui est, par ailleurs, identique à celle rencontrée dans le sud ouest de la France.

L'objectif de cette étude expérimentale est d'établir les intervalles de référence hématologiques sur une population de 132 chiens sains adultes, de pure race, choisis selon leur prévalence dans le sud ouest de la France, avec l'automate XT-2000iV (Sysmex), en suivant les procédures de recommandations de l'IFCC-CLSI.

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le protocole expérimental a été élaboré en suivant les recommandations de l'IFCC-CLSI nécessaires à l'obtention des valeurs de référence et à l'établissement des intervalles de référence pour un nouvel analyte ou une nouvelle méthode d'analyse de biologie médicale. Cette étude expérimentale a été réalisée entre Février et Mars 2008.

I.1 Echantillons sanguins : facteurs pré-analytiques et prélèvements

Les facteurs pré-analytiques ont été définis en accord avec les recommandations pour la collection des prélèvements sanguins et leur analyse en clinique vétérinaire ⁶, à savoir, les prises de sang ont été réalisées à la veine jugulaire sur tube EDTA par un opérateur expérimenté, sur des animaux à jeun depuis la veille et au repos. Pour chaque animal, un échantillon de 5mL a été prélevé à la veine jugulaire sur tube K3-EDTA (VenoJect EDTA (K₃) K3E, Terumo Europe- Belgium) à l'aide d'une aiguille 0.8x40 mm (Venoject, Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium), homogénéisé immédiatement après récolte par une dizaine d'inversions, identifié et stocké à + 4°C dans l'attente de son analyse au laboratoire. Le délai maximum écoulé entre la réalisation du prélèvement et le traitement des échantillons au laboratoire a été de 6 heures mais la majorité des échantillons sanguins ont été traités en moins de 4 heures. En moyenne, chaque jour, une quinzaine de prélèvements étaient réalisés, sur deux à trois élevages différents.

I.2. Technique d'analyse

Les prélèvements sanguins ont été déposés sur un agitateur-homogénéisateur de tubes 20 minutes avant d'être analysés avec l'automate d'hématologie XT-2000iV (Sysmex, Kobe, Japan) utilisant à la fois la variation d'impédance et la cytométrie en flux. Pour chaque prélèvement, l'analyse a été réalisée deux fois consécutives (analyse de doublons) en mode automatique par deux opérateurs. Les résultats graphiques et numériques ont été sauvegardés sur fichier informatiques, imprimés et stockés dans le cahier d'expérimentation pour les deux passages de chaque tube en attendant l'analyse statistique finale.

Durant la durée de l'expérimentation, des contrôles qualité journaliers ont été réalisés à l'aide d'échantillons de sang contrôle fabricant de niveaux bas, moyen et haut (Sysmex e-check L1,

L2 et L3) en accord avec les recommandations internationales EP 15-A2 ⁷ ayant trait à la précision et à la justesse dans un laboratoire de biologie médicale. Chaque sang contrôle a été analysé deux fois successives (analyse de doublons) pour assurer la répétabilité de la manipulation.

L'ensemble des opérations effectuées sur l'analyseur XT-2000iV et des difficultés rencontrées au cours de l'analyse ont été manuscrites sur le cahier d'expérimentation, assurant ainsi la traçabilité de cette étude.

I.3. Frottis sanguins

Deux frottis sanguins ont été réalisés simultanément à l'analyse par l'automate XT-2000iV et colorés au May-Grünwald Giemsa. Une observation semi-quantitative au moyen (X200) et fort grossissement (X400) du microscope photonique a été réalisé par un lecteur expérimenté pour chaque doublon afin de rechercher la présence d'éventuels agrégats plaquettaires et leucocytaires.

I.4 Choix de la population des animaux de référence

Les critères d'inclusions de la population de chiens de référence ont été les suivants :

- des animaux de pure race,
- pour chaque race: un nombre d'animaux proportionnel à la prévalence de chacune des races en France,
- des animaux jugés en bonne santé suite d'une part, aux réponses des éleveurs à un questionnaire et d'autre part, à un examen clinique complet effectué par un vétérinaire compétent incluant fréquences cardiaque et respiratoire, mesure du temps de remplissage capillaire, prise de température rectale, auscultation cardio-respiratoire, et digestive ainsi que palpations abdominale et mammaire.

Les critères d'exclusion *a priori* retenus ont été les suivants:

- une affection déclarée dans le mois précédant le prélèvement sanguin,
- un historique de saignement inhabituel,
- la prise de tout traitement à l'exception d'antiparasitaires internes,
- une anomalie détectée au cours de l'examen clinique,
- un animal stressé ou une prise de sang difficile à réaliser,
- un animal non à jeun,

- un remplissage du tube insuffisant,
- un caillot visible dans le tube EDTA.

Un formulaire de consentement éclairé a été rempli par l'ensemble des éleveurs.

Toujours selon les recommandations, il a été décidé d'obtenir au minimum 120 résultats, afin de pouvoir utiliser une méthode statistique de type non paramétrique. Pour anticiper le fait que certains chiens seraient exclus du protocole, nous avons sélectionné un total de 137 chiens, et après prise en compte des critères d'exclusion, nous avons travaillé sur une population de 132 animaux (Tableau 1) âgés de 6 mois à 14 ans (9 chiens de moins de 1 an).

Tableau 1 : Race et nombre de chiens sélectionnés dans l'étude expérimentale

Race	Nombre
Epagneul Breton	14
Berger Allemand	11
Labrador	10
Yorkshire	9
Berger Australien	9
Malinois	8
Bulldog Français	8
Pointer Anglais	8
Rottweiler	7
West Highland White Terrier	7
Golden Retriever	6
Cavalier King Charles	6
American Staffordshire Terrier	6
Cocker Spaniel	6
Teckel à poil dur	5
Boxer	4
Bernese Mountain dog	3
Shih Tzu	3
Beauceron	2
Total	132

Les chiens avaient été nourris la veille au soir et prélevés le lendemain en matinée dans leur élevage, afin d'éviter toute variation liée au transport ou au rythme circadien de l'animal.

I.5. 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
- Hémoglobine** : 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

I.6. Analyses statistiques

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus ont régulièrement été stockés dans le cahier de l'expérimentation ainsi que dans un tableur Excel. Pour chaque analyte, une courbe de distribution a été réalisée et visuellement inspectée afin de détecter toute mesure aberrante, confirmé ensuite par le critère de Tukey, i.e. la valeur médiane +/- 3 interquartiles ².

La normalité des distributions des valeurs natives ou transformées a été testée par le test de normalité d'Anderson-Darling. Enfin, les intervalles de références (IR) ainsi que les intervalles de confiance à 90% des limites des IR ont été déterminés par une méthode non paramétrique à l'aide des macro-instructions du conseiller en IR pour logiciel Excel ⁸.

La comparaison des méthodes (optique vs impédance) pour les plaquettes et les globules rouges a été basée sur l'EP15-A2 ⁷ et sur les recommandations générales éditées pour les comparaisons de méthodes ^{9,10}.

Le partitionnement des valeurs de référence selon le sexe de l'animal a été réalisé à l'aide du test Z d'Harris & Boyd ¹¹. Dans les échantillons partitionnés de plus petites tailles, les IR ont été estimés à l'aide des méthodes paramétrique et robuste à partir d'une distribution dont l'allure se rapprochait le plus d'une distribution gaussienne ^{12, 13}. Le partitionnement selon l'âge de l'animal a été impossible à réaliser en raison du faible nombre d'individus par sous groupes d'âge. Les effets possibles de l'âge ont donc été estimés à partir de limites de références obtenues par une régression polynomiale. Ces limites sont définies comme les intervalles de prédiction à 95% de la régression des valeurs de références en fonction de l'âge ¹².

II. RESULTATS

II.1. Caractéristiques analytiques

Les coefficients de variation (CV) de l'imprécision intra-laboratoire (within laboratory) ont été inférieurs à ceux indiqués par le fabricant (Tableau 2); l'imprécision du fabricant n'était pas disponible pour la numération des globules rouges par méthode optique (RBC-O). Quelque soit l'échantillon de sang contrôle, un coefficient de variation (CV) faible (inférieur ou égal à 1.3 %) a été observé pour : RBC-O, RBC-I, HB, HCT, MCV, MCH, MCHC et un CV élevé (entre 9.8% et 41.3%) a été obtenu pour MFR, HFR et IFR.

Les CV de répétabilité pour les différents analytes sanguins des 132 doublons réalisés au cours de l'expérimentation sont apparus inférieurs à ceux du fabricant (Tableau 2).

Tableau 2 : Imprécision et justesse intra-laboratoires des analytes sanguins avec l'analyseur d'hématologie XT-2000iV (Sysmex). La répétabilité a été estimée à partir des mesures des doublons d'échantillons sanguins utilisés pour déterminer les intervalles de référence. L'imprécision et la justesse ont été calculées selon EP15-A2⁷ à l'aide des échantillons de sang contrôles de niveaux L1, L2 et L3 fournis par le fabricant. L'imprécision fournie par le fabricant est donnée à titre de comparaison.

Analyte	Unité	Imprecision intra-laboratoire									Imprecision du fabricant	Répétabilité
		L1			L2			L3				
		Valeurs attendues	Moyenne mesurée	CV (%)	Valeurs attendues	Moyenne mesurée	CV (%)	Valeurs attendues	Moyenne mesurée	CV (%)		
RBC-O*	10 ¹² /L	2.16-2.64	2.33	1.3	3.87-4.73	4.16	0.8	4.69-5.73	5.05	1.0	-	1.00
RBC-I*	10 ¹² /L	2.24-2.48	2.36	0.6	4.27-4.53	4.38	0.5	5.04-5.58	5.29	0.5	1.5	0.58
HB*	g/L	56-60	58.4	0.9	117-125	120.8	0.8	156-166	161.5	0.6	1.5	0.53
HCT*	L/L	0.169-0.191	0.179	0.7	0.341-0.377	0.359	0.4	0.447-0.495	0.472	0.5	1.5	0.52
MCV*	fL	72.5-80.1	76.07	0.5	77.5-85.7	82.14	0.2	84.3-93.1	89.22	0.2	1.5	0.19
MCH*	pg	23.4-25.8	24.70	1.0	26.1-28.9	27.58	0.8	28.8-31.8	30.56	0.7	1.5	0.58
MCHC*	g/dL	30.3-34.1	32.44	1.1	31.7-35.7	33.56	0.9	32.1-36.3	34.24	0.7	2.0	0.56
RDW-SD*	fL	37.8-51.2	42.73	0.4	39.0-52.8	45.20	0.5	38.2-51.8	44.65	1.0	3.0	0.50
RDW-CV*	%	13.9-18.7	15.78	0.9	13.4-18.2	15.48	0.7	12.3-16.7	14.45	0.6	3.0	1.20
RET*	10 ⁹ /L	0.12-0.24	0.16	4.6	0.07-0.14	0.10	3.9	0.039-0.080	0.045	4.7	15.0	7.68
RET*	%	4.97-10.33	6.94	4.6	1.55-3.23	2.29	4.1	0.73-1.51	0.92	4.7	15.0	7.78
WBC*	10 ⁹ /L	2.65-3.25	3.02	2.5	6.45-7.27	6.89	1.6	15.78-17.80	17.17	1.2	3.0	1.32
Neutrophils*	10 ⁹ /L	0.88-1.64	1.35	3.7	2.29-4.25	3.31	2.4	6.34-11.78	9.28	1.7	8.0	1.80
Lymphocytes	10 ⁹ /L	0.61-1.43	1.05	4.0	1.46-2.72	2.10	6.2	2.90-5.38	4.31	1.4	8.0	2.93
Monocytes*	10 ⁹ /L	0.04-0.74	0.34	8.7	0.08-1.54	0.75	7.2	0.17-3.33	1.68	4.5	20.0	5.46
Eosinophils*	10 ⁹ /L	0.14-0.42	0.29	7.1	0.34-1.04	0.73	7.3	0.92-2.76	1.90	8.6	25.0	4.98
PLT-O*	10 ⁹ /L	29-75	54.4	5.3	172-232	201.0	3.2	431-583	473.2	2.5	6	3.38
PLT-I*	10 ⁹ /L	33-77	52.8	5.1	180-244	206.0	2.3	432-560	474.3	1.6	4.0	2.16
LFRT†	%	58.8-88.8	73.60	3.7	59.4-89.4	71.55	3.9	68.5-98.5	79.88	3.9	30.0	3.64
MFR†	%	8.4-34.4	21.78	9.9	7.9-33.9	23.44	10.3	1.3-27.3	16.67	12.2	50.0	22.19
HFR†	%	0.0-9.8	4.63	21.7	0.0-9.7	5.02	15.1	0.0-7.2	3.46	41.3	100.0	35.03
IRF†	%	8.2-44.2	26.40	10.2	7.6-43.6	28.46	9.8	0.0-34.5	20.12	15.5	30.0	18.14
MPV†	fL	7.3-9.9	9.00	2.7	7.8-10.6	9.46	1.3	7.8-10.6	9.43	0.6	4.0	1.45
P-LCR†	%	1.6-20.0	12.65	10.0	6.7-20.3	14.98	4.9	6.5-19.7	14.21	3.2	18.0	2.82
PCT†	L/L	0.0002-0.0008	0.0005	9.1	0.0014-0.0026	0.0019	3.2	0.0034-0.0056	0.005	1.7	6.0	2.72
PDW†	fL	6.1-9.1	7.78	4.7	6.8-10.2	8.66	3.1	6.9-10.3	8.59	1.7	10.0	3.19

* analytes déjà validés pour le sang de chien^{14, 15, 16} †: analytes non validés.

II.2. Comparaison des résultats obtenus pour les numérations globulaires et plaquettaires en fonction de la méthode d'analyse

La comparaison des résultats obtenus pour les numérations globulaires et plaquettaires selon la méthode d'analyse optique ou la méthode par impédance montre une étroite corrélation (coefficient r de Pearson respectivement égal à 0.99 et 0.98).

Des différences significatives ont cependant également été mises en évidence (Test de Student, $p < 0.001$). Les équations de Passing-Bablok (Intervalle de confiance à 95% notés entre parenthèses) ont été :

RBC-I = 1.10 (1.07/1.12), RBC-O = -0.36 (-0.51/-0.23) et pour PLT-I = 1.10 (1.06/1.13), PLT-O = -11.75 (-21.79/-1.62). Les biais ont été proportionnels.

Les différences (Optique – Impédance) étaient significativement différentes dans 25% des numérations les plus élevées comme des numérations les plus faibles. L'écart dans les moyennes des différences était compris entre -0.18 et 0.33 $10^{12}/L$ pour les numérations globulaires (Test des Student après vérification de l'homogénéité des variances, $P < 0.001$) et compris entre - 42.0, et 18.2 $10^9/L$ pour les numérations plaquettaires (Test de Mann-Whitney après vérification de l'hétérogénéité des variances, $P < 0.001$).

II.3. Caractéristiques de la population de référence

Cinq des tubes ont été exclus de l'étude car soit des caillots étaient visibles soit la quantité de sang était insuffisante. Le nombre total d'échantillons sanguins finalement analysés était de 132. La distribution de la population selon les races (Tableau 3) montre que les races canines utilisées dans l'étude font partie des races françaises les plus représentées et que la proportion relative des différentes races est également représentative de la répartition de ces mêmes races en France, exception faites pour les Bergers Australiens, Epagneuls Bretons et Pointers Anglais, sur-représentés, et les Setter Anglais, absents.

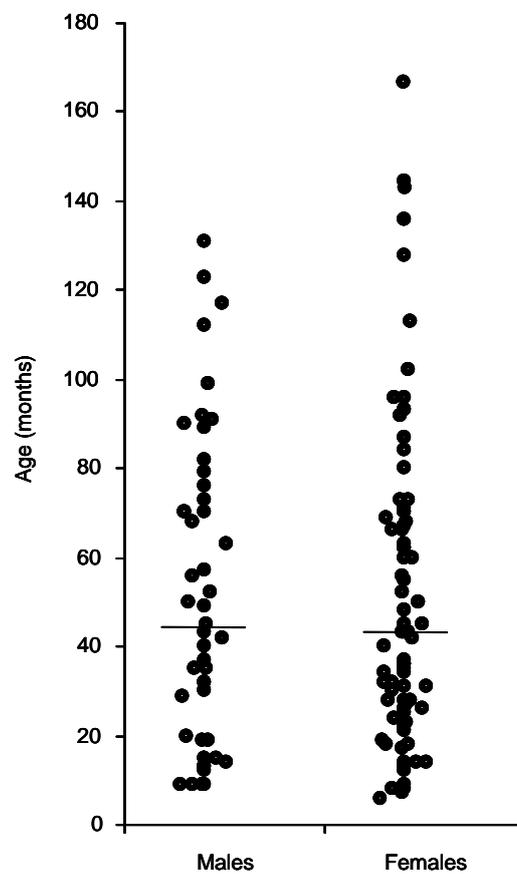
Tableau 3: Comparaison de la distribution des différentes races utilisées dans la population de référence de notre étude avec la répartition des races françaises les plus représentées.

	Races de chiens		
	Races en France ¹ (%)	Echantillons de référence	
		n	%
Setter Anglais	8.4	-	-
Berger Allemand	7.6	11	8.3
Cavalier King Charles	6.7	6	4.5
Epagneul Breton	6.6	14	10.6
Golden Retriever	6.5	6	4.5
American Staffordshire Terrier	5.5	6	4.5
Yorkshire	5.4	9	6.8
Labrador	5.2	10	7.6
Bulldog Français	4.9	8	6.1
Cocker Spaniel	4.6	6	4.5
Rottweiler	4.1	7	5.3
Berger belge (Malinois)	3.7	8	6.1
Beagle	3.3	-	-
Teckel à poil dur	3.1	5	3.8
Boxer	3.0	4	3.0
Beauceron	2.9	2	1.5
Montagne des Pyrénées	2.9	3	2.3
Pointer anglais	2.5	8	6.1
West Highland White Terrier	2.4	7	5.3
Pointers (German Shorthaired)	2.3	-	-
English springer spaniel	2.1	-	-
Shih Tzu	2.1	3	2.3
Berger australien	2.0	9	6.8
Chihuahua	2.0	-	-
Total		132	100

¹ Société Centrale Canine, breed registration for 2006 (<http://www.scc.asso.fr/mediatheque/statistiques/2006/Conft.pdf>)

La population était composée de 83 femelles dont 2 stérilisées et de 47 males. La médiane de l'âge était de 43 mois avec 85.6% des individus compris entre 1 et 8 ans (Figure 1). Il n'y avait pas d'effet du facteur « sexe » sur le facteur « âge », les moyennes d'âge étant de 51.8 et de 50.4 mois pour respectivement les males et les femelles (Test de Student après homogénéisation des variances, $P=0.999$).

Figure 1: Distribution des facteurs “âge” et “sexe” pour les 132 chiens utilisés pour la détermination des intervalles de référence hématologiques canins avec l'automate XT-2000iV (les barres horizontales représentent les médianes des 47 males et des 85 femelles).



II.4. Intervalles de référence

Les moyennes, distributions et intervalles de référence obtenus à partir des résultats des analyses de l'automate XT-20000iV sont présentés dans le Tableau 4 et la Figure 2, pour les analytes mesurés qui ont déjà été validés et dans le Tableau 5 pour les autres analytes. Pour la majorité des analytes, aucune valeur aberrante n'a été identifiée lors de l'inspection visuelle des histogrammes ou par le critère de Tukey. Toutes les valeurs aberrantes supprimées ont été notifiées au bas des tableaux 4 et 5. Les résultats de MPV, P-LCR, PCT et PDW n'ont pu être obtenus pour 6 individus en raison d'une mauvaise séparation des plaquettes et des globules rouges par variation d'impédance. Les IR des analytes permettant l'évaluation de la population plaquettaire n'apparaissent pas dans les tableaux en raison de la présence d'agrégats plaquettaires observés sur les frottis sanguins dans un grand nombre de prélèvements (15%). Pour cette raison, les IR de PLT-O, PLT-I, MPV, PCT, P-LCR et PDW n'ont pas été établis.

De nombreuses distributions étaient significativement différentes d'une distribution gaussienne (Test d'Anderson-Darling, $P < 0.05$) mais le sont devenues après transformation de type Box-Cox. Cependant la distribution de l'HCT n'a pas pu être transformée en une distribution gaussienne, quelque soit le type de transformation testé.

Tableau 4: Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT 2000iV pour les analytes sanguins préalablement validés et pour les index calculés à partir de ces derniers (n=132, sauf quand les valeurs aberrantes (outliers) ont été supprimés, voir notes en bas du tableau)

Analyte	Unité	Moyenne	2.5 th centiles (90% CI)	97.5 th centile (90% CI)	Normalité P	Automate non rapporté ¹⁷	ADVIA 120 ⁴
RBC-O	10 ¹² /L	6.3	5.1 (4.73-5.26)	7.6 (7.32-8.02)	N : 0.7153 Box-Cox : 0.719	-	5.68-9.08
RBC-I	10 ¹² /L	6.6	5.2 (4.89-5.39)	7.9 (7.67-8.52)	N : 0.7103 Box-Cox : 0.705	5.5-8.5	-
Hb	g/L	158	124.0 (120-129)	191.5 (183-200)	N : 0.38 Box-Cox : 0.413	120-180	137.7-203.8
HCT	L/L	0.43	0.35 (0.33-0.36)	0.52 (0.50-0.54)	N : 0.0135 Box-Cox : 0.016	0.37-0.55	0.42-0.62
MCV	fL	66	60 (56.4-61.0)	71 (70.3-73.0)	N : 0.8253 Box-Cox : 0.884	60.0-77.0	62.7-74.56
MCH	pg	24	22 (20.5-22.6)	26 (25.8-26.9)	N : 0.5921 Box-Cox : 0.516	19.5-24.5	20.46-24.81
MCHC	g/L	366	344 (328-353)	381 (379-383)	N : 0.0110 Box-Cox : 0.183	32.0-36.0	31.61-34.35
RDW-SD	fL	35.1	31.1 (3.5-32.3)	38.9 (38.3-41.7)	N : 0.4923 Box-Cox : 0.791	-	-
RDW-CV	%	16.2	13.2 (12.5-13.5)	19.1 (18.9-19.4)	N : 0.3276 Box-Cox : 0.328	-	12.00-13.15
Reticulocytes	10 ⁹ /L	58.2	19.4 (12.5-20.9)	150.1 (120.1-168.3)	N : <0.0001 Box-Cox : 0.150	-	10.92-110.96
Reticulocytes	%	0.89	0.30 (0.22-0.32)	2.3 7(1.99-2.56)	N : <0.0001 Box-Cox : 0.140	0.0-1.5	0.14-1.48
WBC ^a	10 ⁹ /L	11.0	5.6 (4.89-5.93)	20.4 (19.43-21.66)	N : <0.0001 Box-Cox : 0.927	6.0-17.0	5.84-20.26
Neutrophils ^b	10 ⁹ /L	6.6	2.9 (2.54-3.52)	13.6 (12.32-15.46)	N : <0.0001 Box-Cox : 0.106	3.0-11.8	4.27-9.06
Lymphocytes	10 ⁹ /L	2.6	1.14 (0.66-1.37)	5.28 (4.74-5.81)	N : <0.0001 Box-Cox: 0.461	1.0-4.8	2.04-4.66
Monocytes ^c	10 ⁹ /L	0.7	0.35 (0.30-0.39)	1.56 (1.43-1.72)	N : <0.0001 Box-Cox : 0.522	0.15-1.35	0.24-2.04
Eosinophils ^d	10 ⁹ /L	0.9	0.13 (0.02-0.16)	3.05 (2.66-3.41)	N : <0.0001 Box-Cox : 0.154	0.10-1.25	0.10-1.20

Outliers: ^a: WBC (1 = 27.68); ^b: Neutrophils (2 = 17.34 & 21.2); ^c: Monocytes (1 = 2.38); ^d: Eosinophils (1 = 6.34).

Tableau 5: Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT 2000iV pour les analytes sanguins et index non préalablement validés (n=132, sauf quand les valeurs aberrantes (outliers) ont été supprimés, voir notes en bas du tableau)

Analyte	Unité	Moyenne	2.5 th centiles (90% CI)	97.5 th centile (90% CI)	Normalité P	Automate non rapporté ¹⁷	ADVIA 120 ³
LFR	%	83.3	63.7 (58.1-68.5)	93.8 (93.3-94.8)	N : 0.0001 Box-Cox : 0.837	-	-
MFR	%	11.6	4.1 (2.6-4.5)	23.6 (21.9-25.8)	N : 0.0029 Box-Cox : 0.491	-	-
HFR ^f	%	5.1	1.2 (0.9-1.5)	14.3 (11.1-16.9)	N : <0.0001 Box-Cox : 0.808	-	-
IRF	%	16.7	6.2 (5.3-6.8)	36.3 (31.5-42.0)	N : 0.0001 Box-Cox : 0.986	-	-

Outliers : f : HFR (1= 20.05)

Figure 2: Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les analytes sanguins de 132 chiens adultes sains. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé).

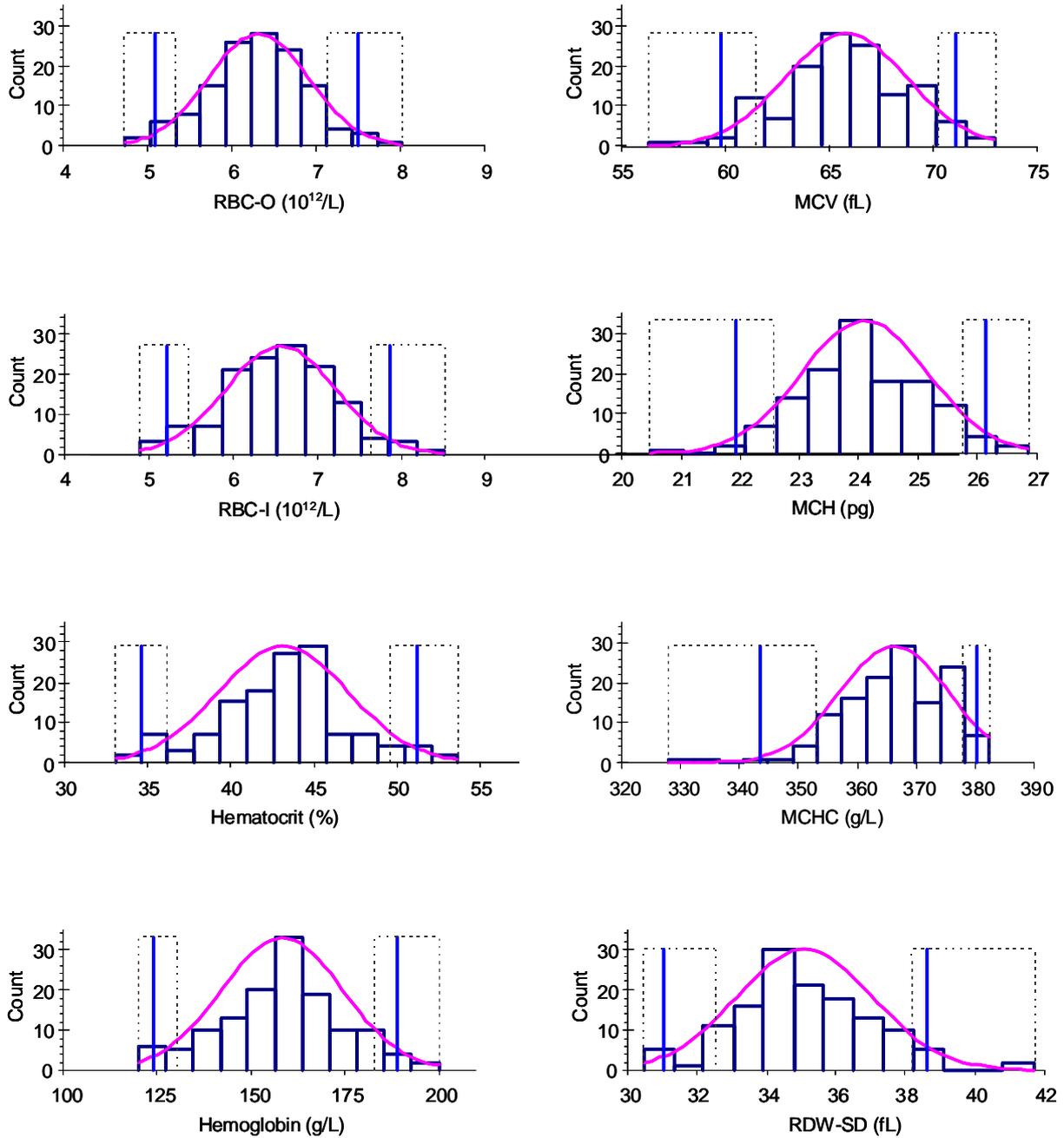


Figure 2 (suite-1): Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbes) pour les analytes sanguins de 132 chiens adultes sains. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé).

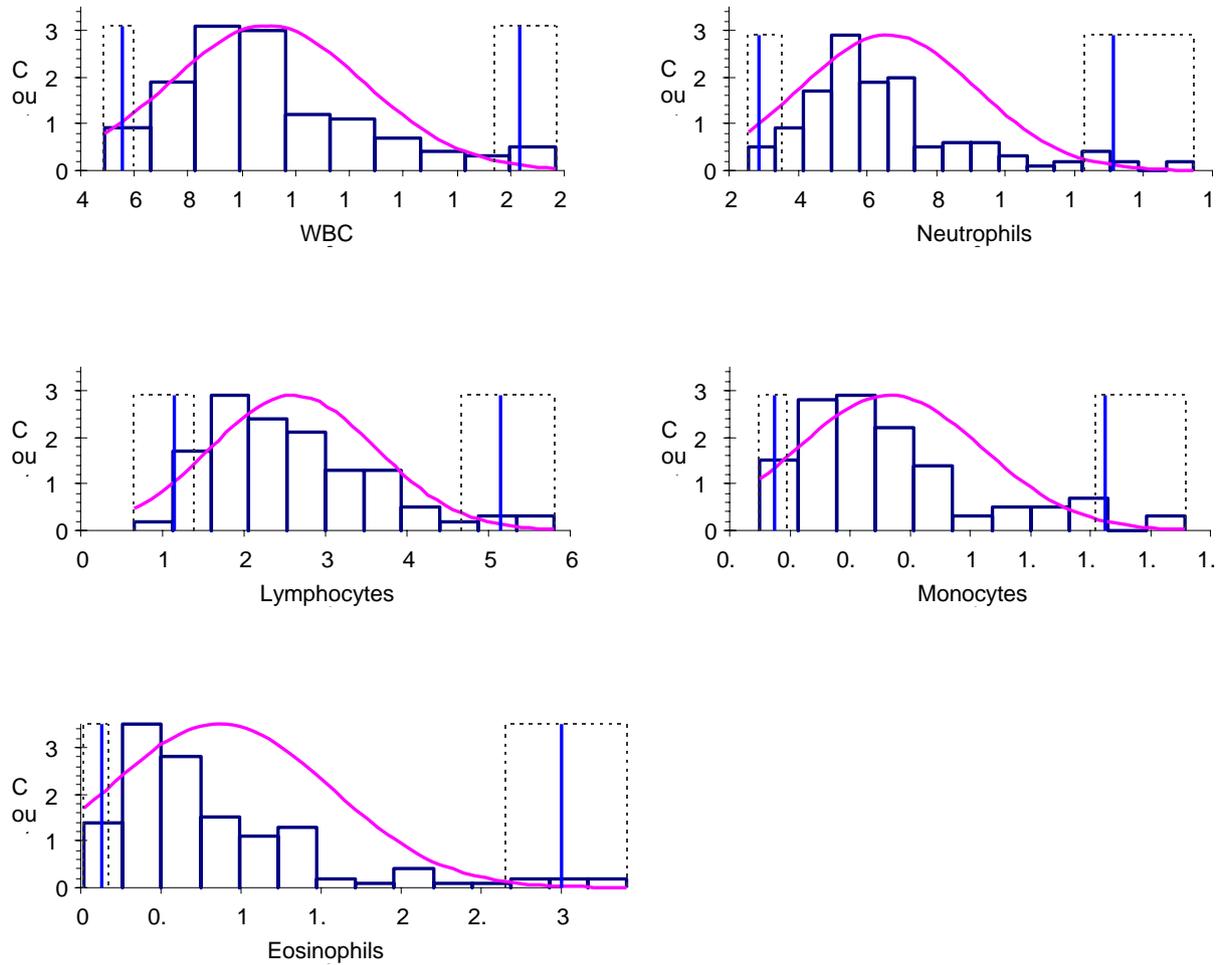
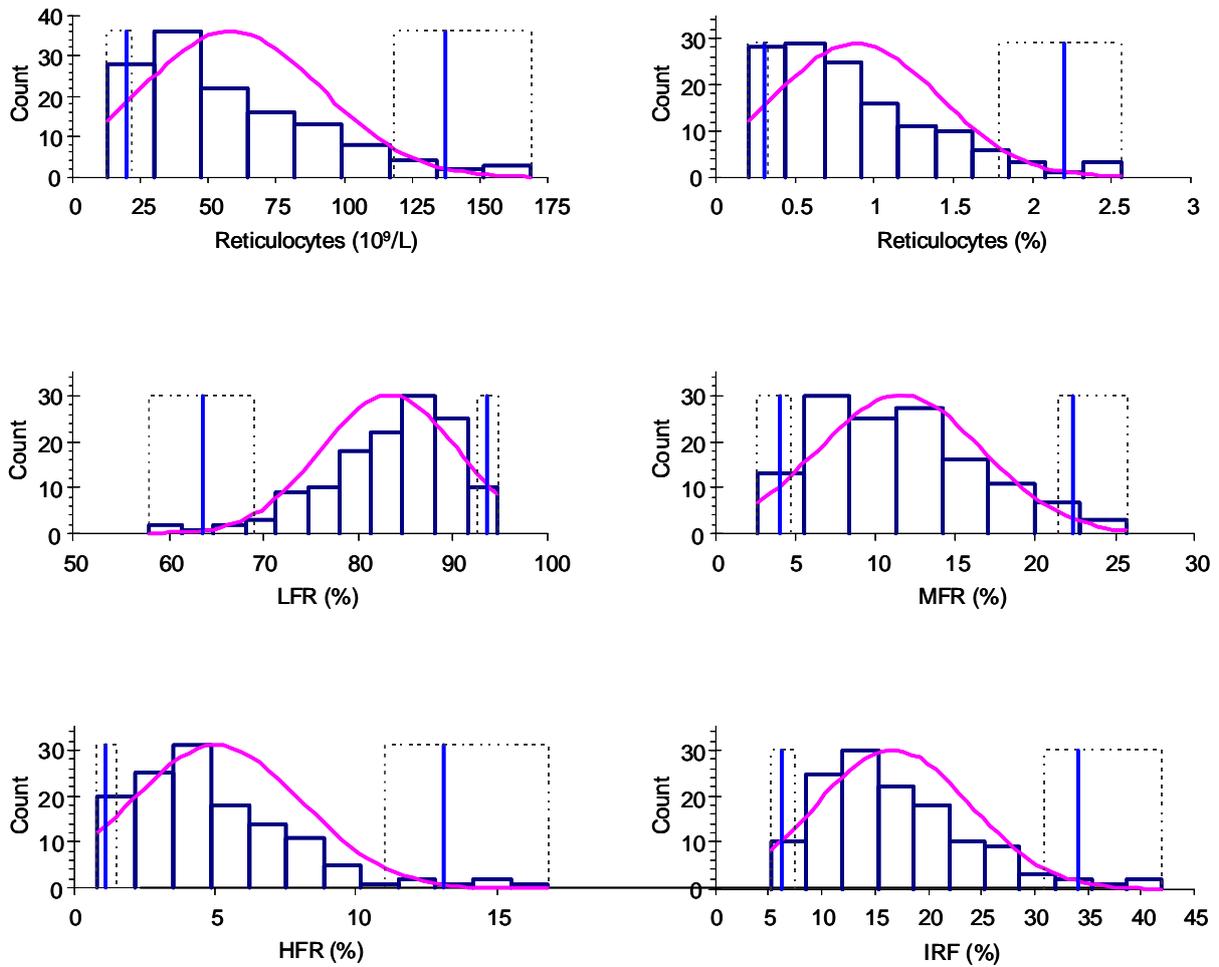


Figure 2 (suite-2): Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbes) pour les analytes sanguins de 132 chiens adultes sains. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé).



II.5. Effets de l'âge et du sexe sur les intervalles de référence

Comme il n'y avait que 2 femelles stérilisées dans la population de référence, elles n'ont pas été prises en compte dans l'étude de l'effet du sexe sur les variables mesurées. Selon le facteur z de Harris & Boyd, le phénomène de partition n'a pu être considéré que seulement pour l'hématocrite. Les IR évalués pour les sous-groupes « sexe » après transformation par la méthode robuste de Box-Cox ont été présentés dans le Tableau 6. Il est observé très peu de différence entre les IR définis à partir du sexe de l'animal et les IR déterminés à partir de la totalité de la population de référence c'est-à-dire sexes confondus.

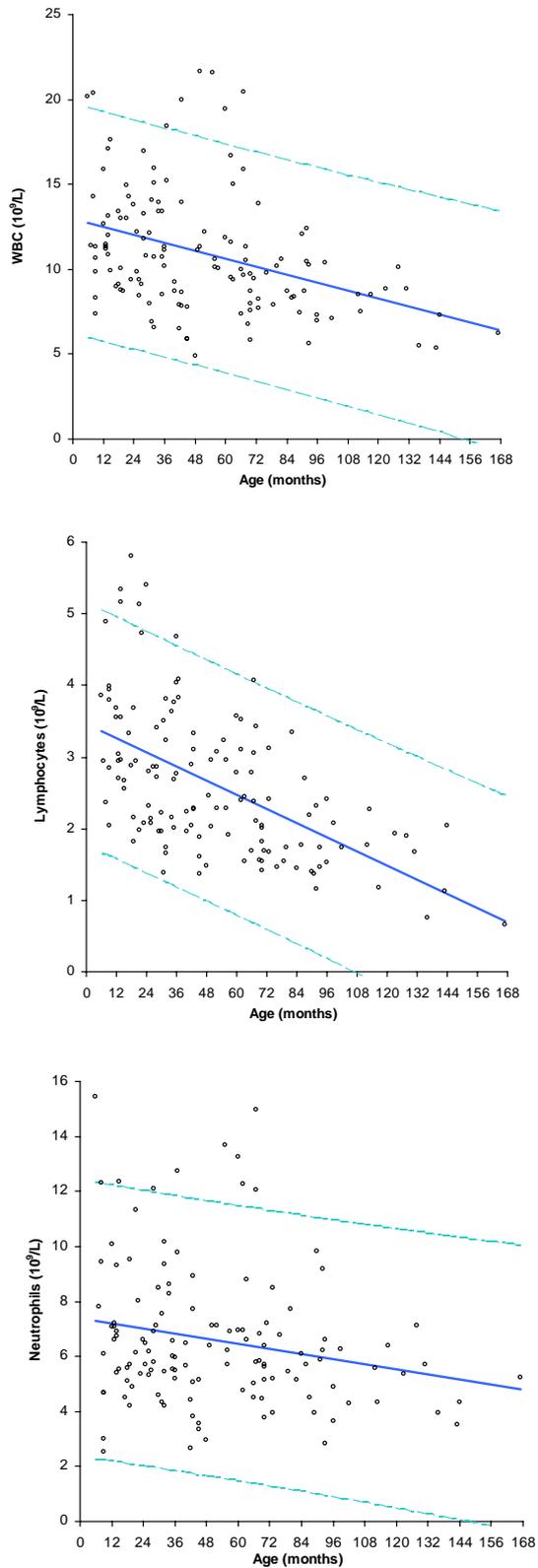
Tableau 6: Estimation de l'intervalle de référence pour l'hématocrite chez les chiens males et femelles à partir des valeurs transformées par la méthode robuste de Box-Cox (valeur Z de partition ¹¹ ; z* = 2.2079; test de normalité d'Anderson-Darling à partir des données natives (N) et des données transformées de Box-Cox)

		Anderson-Darling	Méthode robuste	
		P	Limite inférieure	Limite supérieure
HCT (L/L) z=2.2296	Males	N: =0.2415 Box-Cox: =0.4555	0.37 (0.36-0.38)	0.52 (0.50-0.54)
	Femelles	N: =0.0293 Box-Cox: =0.0871	0.34 (0.33-0.36)	0.50 (0.49-0.51)

Une diminution significative des numérations leucocytaires, lymphocytaires et granulocytaires neutrophiles a été observée avec l'âge (ANOVA P<0.05) (Figure 3). Cette diminution a été plus marquée pour la numération lymphocytaire qui décroît d'environ 50% entre 1 an et 9 à 10 ans.

Une revue systématique des résultats race par race a montré que la numération moyenne des granulocytes éosinophiles était plus élevée chez les Epagneuls bretons ($1.98 \cdot 10^9/L$), les Rottweilers ($1.65 \cdot 10^9/L$) et les Bergers allemands ($1.42 \cdot 10^9/L$) que dans l'ensemble de la population de référence ($0.9 \cdot 10^9/L$). Quand ces trois races étaient retirées de l'ensemble des résultats, l'IR établi sur les 100 chiens restants par transformation par la méthode robuste de Box-Cox était de $0-1.5 \cdot 10^9/L$.

Figure 3: Effet de l'âge (en mois) sur les valeurs des numérations leucocytaires (WBC), lymphocytaires et granulocytaires neutrophiles (Neutrophils) chez 132 chiens adultes sains (Les nuages de points sont représentés avec un tracé polynomial en trait plein et de l'intervalle de prévision à 95% en traits pointillés).



III. DISCUSSION

III.1. Les facteurs pré-analytiques

Il apparaît que le contrôle des facteurs pré-analytiques est essentiel pour minimiser leur effet éventuel sur les résultats chiffrés et donc sur l'interprétation clinique. C'est pourquoi, les conditions pré-analytiques ont été choisies en respectant les recommandations établies en biologie clinique vétérinaire pour la collecte et la manipulation des échantillons sanguins ⁶. Les prises de sang ont été réalisées par un phlébologue expérimenté sur des chiens au repos afin d'une part de minimiser les variations physiologiques de numérations consécutives au stress ou à l'excitation de l'animal et d'autre part pour éviter également toute erreur d'analyse liée à une lipémie postprandiale.

Les tubes collectés étaient immédiatement stockés à 4°C et transportés au laboratoire pour une analyse dans un délai très court afin de limiter les possibles altérations pré-analytiques des spécimens.

III.2. Performances analytiques de l'analyseur

L'analyseur XT-2000iV utilisé dans cette étude a déjà été validé pour la majorité des analytes et index sanguins étudiés en routine chez le chien ^{15, 16, 18}. Cependant, pour certains analytes comme RDW-SD, RDW-CV, LFR, MFR, HFR, IFR, P-LCR, PCT et PDW, la validation n'a pas encore été faite. C'est pourquoi, les résultats sont rapportés dans deux tableaux différents. Nous avons choisi de rapporter les résultats pour les analytes non validés car ces informations pourraient être utiles pour de nouvelles utilisations, même si à l'heure actuelle la signification clinique de ces nouveaux indices a été très peu étudiée chez l'homme ^{19, 20, 21} et anecdotiquement en hématologie vétérinaire ²².

Dans notre étude, la précision intra-laboratoire de l'analyseur sur sang humain et sa répétabilité sur sang de chien ont été satisfaisantes comme le montrent les faibles coefficients de variation mesurés. L'exactitude ou justesse ne pouvait être testée que sur des échantillons de sang contrôle humain ; pour chaque cas, les résultats donnés par l'analyseur étaient compris dans la gamme d'acceptabilité fournie par le fabricant.

Cet analyseur réalise des mesures à la fois par cytométrie en flux et par variation d'impédance pour les numérations globulaires et plaquettaires. Nous avons constaté une excellente corrélation entre les deux séries de mesures pour une méthode donnée mais une différence significative entre variation d'impédance et méthode optique, qui justifie que deux intervalles de références soient mis en place selon la méthode d'analyse utilisée. Cependant la présence d'agrégats plaquettaires sur les frottis sanguins dans 15% des prélèvements n'autorise pas à donner d'IR pour la numération plaquettaire. Concernant la numération globulaire, les différences entre les deux méthodes étaient si faibles qu'il n'y avait pas de différence dans l'interprétation clinique des résultats.

III.3. Sélection de la population de référence

Lorsqu'on cherche à établir des intervalles de références pour des individus sains, la tâche la plus difficile réside dans la sélection d'une population de référence et dans la mise en place de critères bien définis qui excluent de la population de référence tout individu alors considéré comme « non sain »^{2, 6}. Dans cette étude, nous nous sommes attachés à trouver une population canine dans l'ouest de la France en sélectionnant des chiens dans des élevages situés au maximum à 200 kilomètres de Toulouse qui répondaient à la fois à nos critères de sélection et qui permettaient à la fois de réaliser les analyses le jour même du prélèvement dans un délai court tout en respectant la prévalence des principales races françaises. Cette limite géographique a ainsi engendré un biais sur nos résultats puisque les Setter Anglais, qui font partis des dix races les plus présentes en France, sont absents. Cependant, les races sélectionnées dans notre étude sont représentatives des races françaises les plus représentées.

Par ailleurs, selon les recommandations du CLSI, les individus de référence nécessaires à l'établissement d'une population de référence ne doivent pas nécessairement tous être de jeunes adultes mais doivent être représentatifs au mieux de la population de patient.¹ C'est la raison pour laquelle les animaux sélectionnés dans cette étude se répartissent dans une fourchette d'âges assez large. Cependant, dans les élevages canins, les individus destinés à la reproduction sont relativement jeunes, ce qui explique que la majorité des animaux sont dans la tranche d'âge comprise entre 1 an à 8 ans. Il a également été décidé de retirer *a priori* les chiots de moins de 6 mois car des travaux ont montré que les analytes sanguins ne fluctuaient pas après 6 mois^{23, 24, 25, 26, 27}. Utiliser des animaux destinés à la reproduction explique

également que la majorité des animaux soient des femelles (2/3 de la population de référence).

III.4. Méthodes de détermination d'un intervalle de référence

La détermination des intervalles de référence a été réalisée selon les recommandations de la méthode non paramétrique ². Celle-ci est réalisable dans la mesure où le nombre total d'individus de référence est supérieur à 120 et que seul un très faible nombre de valeurs aberrantes ne sont mises en évidence sur les distributions initiales ou transformées. Comme il est dit textuellement, « l'accent doit être mis sur le maintien plutôt que sur la suppression (cf outliers) »² Une détermination complète des IR aurait dû être réalisée en réalisant des groupes de partition selon l'âge, le sexe ou la race de l'animal, mais au final 120 individus *a minima* pour chaque groupe de partition auraient dû être recrutés, ce qui aurait représenté un travail énorme et coûteux. Pour l'effet sexe, le nombre d'individus était suffisant pour estimer les IR en utilisant la méthode paramétrique. Celle-ci a été montrée plus adaptée aux petits échantillons, après une transformation permettant d'approcher au mieux une distribution de type gaussienne, même si des biais importants peuvent être observés sur de faibles effectifs ². Pour l'effet âge, une analyse de régression a été réalisée même si il a été a priori démontré que l'imprécision serait élevée consécutivement aux faibles nombres de données disponibles ²⁸.

III.5. Comparaison des IR déterminés dans cette étude avec les résultats de la littérature

Les IR en hématologie canine les plus cités encore à l'heure actuelle dans la littérature vétérinaire sont originaires d'ouvrages originaux publiés en 1961 et 1965 ^{17, 29}. Les auteurs ne connaissaient pas les recommandations internationales depuis éditées et concernant les conditions pré-analytiques et analytiques, les caractéristiques de la population de chiens de référence et les procédures statistiques n'étaient pas reportées. En outre la technologie des automates d'hématologie a été grandement améliorée, ce qui justifierait une mise à jour de la détermination des intervalles de référence. Une première tentative a été publiée récemment avec l'analyseur ADVIA120 ⁴, et est basée sur une population de référence, limitée, trop faible pour utiliser la méthode non paramétrique recommandée. Cependant, comme indiqué

dans le Tableau 4, la plupart des intervalles étaient similaires à ceux obtenus dans notre étude, mis à part pour les réticulocytes et l'hématocrite.

Comme précédemment publié ¹⁶ la numération des réticulocytes avec l'analyseur XT-2000iV était plus élevée qu'avec l'ADVIA 120. L'IR obtenu sur l'ADVIA était semblable à celui de Schalm obtenu par méthode manuelle. Paradoxalement, les comptages manuels ont récemment été rapportés comme étant en accord avec le XT-2000iV ¹⁴. Ceci justifierait que des IR différents soient utilisés pour chacun de ces analyseurs. L'intervalle de référence pour l'hématocrite avec le XT-2000iV était inférieur à celui obtenu avec l'ADVIA 120, mais similaire à celui de Schalm. Comme XT-2000iV et ADVIA120 sont des analyseurs validés, la différence observée pourrait être liée à la population de référence. La numération des granulocytes basophiles n'a pas été reportée dans cette étude parce que des études précédentes ont démontré le très faible accord entre les résultats du XT-2000iV et la méthode manuelle ^{14, 16}. Un tel écart a déjà observé avec l'ADVIA 120 et l'analyseur CELL-DYN ¹⁴.

III.6. Effets de l'âge, du sexe et de la race du chien

Les animaux de référence utilisés dans cette étude étaient pour la plupart de jeunes adultes, avec comme déjà dit, 85% de l'effectif compris entre 1 à 8 ans. Comme précédemment évoqué, ceci a rendu le partitionnement en fonction de l'âge quasi impossible, étant donné le faible nombre de très jeunes ou de vieux animaux. De plus, le fait de qualifier un animal de jeune ou de vieux est souvent considéré comme race-dépendant. En effet les races de grand format sont considérées comme adultes à l'âge de 15 mois alors que les petits formats terminent la puberté vers 9 mois ³⁰. A l'opposé, les grands formats sont considérés comme des seniors voire des patients gériatriques plus tôt que les petits chiens ³¹. L'ensemble de ces éléments empêche de tirer des conclusions pertinentes dans cette étude à l'exception des 3 effets significatifs suivants observés.

Dans cette étude, le nombre absolu de leucocytes décroît avec l'âge comme déjà rapporté chez le Beagle de laboratoire et le Labrador retriever ^{23, 24}. Chez cette dernière race, une diminution de cinquante pour cent du nombre de lymphocytes a également été observée, comme dans notre étude. Cela devrait être étudiée davantage et probablement pris en compte. Ceci doit être pris en compte au cours du suivi clinique lors de l'interprétation des résultats de l'hémogramme de chiens malades.

Le partitionnement en fonction du sexe de l'animal, n'est pertinent que pour l'hématocrite selon le critère de Harris & Boyd. Ce critère cliniquement plus pertinent a été choisi car « toute différence observée, quelque soit son importance clinique, peut être significative statistiquement dès lors que la taille de l'échantillon sur laquelle elle est observée est suffisamment grande ». A notre connaissance, seule une étude effectuée sur des beagles rapporte une légère augmentation de l'hémoglobine chez le male par rapport à la femelle ³¹.

Le nombre limité de données disponibles par race dans cette expérimentation empêche toute étude statistique pertinente sur l'influence de la race sur les analytes observés. Toutefois, un nombre plus élevé de granulocytes éosinophiles a déjà été signalé chez le Berger allemand et le Rottweiler ¹⁵, mais pas chez l'Epagneul Breton. Ces résultats pourraient s'expliquer par la forte pression parasitaire des chiens de chasse bien que vermifugés régulièrement. Des valeurs élevées de numération globulaire, d'hémoglobinémie et d'HCT ont été rapportées ³³ chez le Berger allemand, le boxer et le Teckel mais pas dans notre étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Grasbeck R., Saris N.E., establishment and use of normal values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1969 ; 26(Suppl.110) : 62-63.
2. CLSI. *Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline.* Third ed. Wayne, PA; 2008.
3. Geffré A., Friedrichs K., Harr K., Concordet D., Trumel C., Braun J.P., Reference values: a review. *Vet. Clin. path.* 2009, 288–298.
4. Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K, Failing K, Weiss DJ. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol.* 2004;33(1):32-38.
5. Livre des origines français, <http://www.scc.asso.fr/mediatheque/statistiques/2006/confit.pdf>
6. Jain NC. Examination of the blood and bone marrow. In: Jain NJ, ed. *Essentials of veterinary hematology.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1993:1-18.
7. CLSI. *User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline.* Second ed. Wayne, PA; 2005.
8. Référence Value advisor : freeware, <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63>
9. NCCLS. *Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. Document EP9-A2.* Wayne, PA: NCCLS; 2002.
10. Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol.* Sep 2006;35(3):276-286.
11. Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem.* Feb 1990;36(2):265-270.
12. Horn PS, Pesce AJ, Copeland BE. A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem.* 1998;44:622-631.
13. Geffré A, Braun JP, Trumel C, Concordet D. Estimation of reference intervals from small samples: an example with canine plasma creatinine. *Vet Clin Pathol.* 2009;in press. hia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:1057-1063.
14. Lilliehook 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. path.* 2009, 38:163-174
15. Lilliehook I, Tvedten H. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. *Vet Clin Pathol* 2009;38:175-182.
16. Mathers RA, Evans GO, Bleby J, Tornow T. Evaluation of the Sysmex XT-2000iV hematology analyser for rat, dog and mouse whole samples. *Comp Clin Pathol.* 2008;17:137-144.
17. Schalm OW. *Veterinary hematology.* second ed: Lea & Febiger, 1965.
18. Lilliehook I, Tvedten H., Investigation of hypereosinophilia and potential treatments. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Practice* 2003; 33: 1359-1378.
19. Osselaer JC, Jamart J, Scheiff JM. Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. *Clin Chem.* 1997 Jun

20. Singh H, Chaudhary R, Ray V. Platelet indices as quality markers of platelet concentrates during storage. *Clin Lab Haematol.* 2003 Oct;25(5):307-10.
21. Wiwanitkit V. The importance of platelet counts in dengue infection: 35 cases and literature review. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2004 Oct;10(4):399-402.
22. Yilmaz Z, Eralp O, Ilcol YO. Evaluation of platelet count and its association with plateletcrit, mean platelet volume, and platelet size distribution width in a canine model of endotoxemia. *Vet Clin Pathol.* 2008 Jun;37(2):159-63.
23. Bulgin MS, Munn SL, Gee W. Hematologic changes to 4 and one-half years of age in clinically normal beagles. *J Am Vet Med Assoc* 1970;157:1064-1070.
24. Harper EJ, Hackett RM, Wilkinson J, et al. Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. *J Am Vet Med Assoc* 2003;223:1436-1442.
25. Kley S. Labordiagnostische referenzwerte des hundes unter berücksichtigung von alter, rasse, gebrauchszweck, haltung and geschlecht [DVM thesis]: Departement of Clinical Veterinary Sciences, University of Bern, Switzerland, 2001;137.
26. Meinkoth J, Clinkenbeard K. Normal hematology of the dog In: Feldman BF ZG, Jain NC, et al., ed. *Schalm's Veterinary Hematology*. Fifth edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000;1057-1063.
27. Shifrine M, Munn SL, Rosenblatt LS, et al. Hematologic changes to 60 days of age in clinically normal beagles. *Lab Anim Sci* 1973;23:894-898.
28. Virtanen A, Kairisto V, Uusipaikka E. Regression-based reference limits: determination of sufficient sample size. *Clin Chem.* 1998;44:2353-2358.
29. Schalm OW. *Veterinary hematology*: Lea & Febiger, 1961.
30. Hawthorne AJ, Booles D, Nugent PA, Gettinby G, Wilkinson J. Body-weight changes during growth in puppies of different breeds. *J Nutr.* 2004 Aug;134(8 Suppl):2027S-2030S
31. Metzger FL. Senior and geriatric care programs for veterinarians. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005 May;35(3):743-53
32. Meinkoth JH, Clinkenbeard, K.D. Normal hematology of the dog. In: Feldman BF ZG, Jain NC, et al., ed. *Schalm's Veterinary Hematology*. Fifth edition ed. Philadelphia: *Labordiagnostische referenzwerte des hundes unter berücksichtigung von alter, rasse, gebrauchszweck, haltung and geschlecht [DVM thesis]*, Departement of Clinical Veterinary Sciences, University of Bern, Switzerland; 2001.
33. Jain NC. The dog: normal hematology with comments on response to disease. In: Jain NC, ed. *Schalm's Veterinary hematology*. fourth ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986;103-125.