



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 5225

To cite this version :

Fauchon , Emilie. *Établissement des intervalles de référence des variables hématologiques mesurées par le Sysmex XT-2000iV® pour des spécimens sanguins collectés dans des microtubes contenant de l'EDTA chez le chat*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2011, 76 p.

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

ETABLISSEMENT DES INTERVALLES DE REFERENCE DES VARIABLES HEMATOLOGIQUES MESUREES PAR LE SYSMEX XT-2000iV® POUR DES SPECIMENS SANGUINS COLLECTES DANS DES MICROTUBES CONTENANT DE L'EDTA CHEZ LE CHAT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2011
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

FAUCHON Emilie

Née, le 12 Février 1986 à BORDEAUX (33)

Directeur de thèse : Mme Cathy TRUMEL

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE SAÏDI

Professeure à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Cathy TRUMEL

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nathalie BOURGES ABELLA

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU
M. J. CHANTAL
M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE
M. JF. GUEIFI
M. DORCHIES
M. C. PAVAU
M. EECKHOUTTE

M. F. LESCURE
M. D.GRIESS
M. A. RICO
M. CABANIE
M. A. CAZIEUX
M. DARRE
Mme V. BURGAT
M. HENROTEAUX

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
M. SAUTET Jean, *Anatomie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
 M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
 M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
 M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
 M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
 M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
 M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
 Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
 Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
 Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
 M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
 M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
 M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
 M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
 Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
 Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
 M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
 Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
 M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A notre Président de Thèse,

Madame le Professeur Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur des universités

Praticien hospitalier

Histologie, Embryologie

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

Hommages respectueux.

A notre Jury de Thèse,

Madame le Professeur Catherine TRUMEL

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie médicale

Pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse dans la réalisation de cette thèse.

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 Docteur Nathalie BOURGES-ABELLA

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie

Qui a aimablement accepté de participer à notre jury de thèse,

Trouvez ici l'expression de nos 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 Fanny Granat

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

A Mademoiselle le Docteur Anne Geffré,

Pour son aide précieuse

Après tout, l'occasion de dire Merci, on la rencontre au quotidien mais on ne prend peut-être pas assez la peine ou le temps de le faire...pour toutes ces occasions ratées, je me rattrape et voici mes remerciements, pour cette thèse, mais aussi pour tout le reste...

A cette grande famille qui m'est si chère,

A mes parents, pour votre amour, votre soutien, pour m'avoir permis de réaliser mes rêves, pour vos sacrifices qui m'ont permis de ne jamais manquer de rien, je vous en serai toujours reconnaissante.

Maman, tu es la « mère-veilleuse » que chacun pourrait espérer avoir, tu as toujours été là pour moi, tu as su m'apprendre à ne jamais renoncer à mes ambitions. J'admire ton courage et ta force face aux différentes épreuves de la vie.

Papa, les paroles n'ont pas toujours été si faciles que ça, mais ta grande générosité a toujours su dire beaucoup sur tes sentiments. Je sais que je pourrai toujours compter sur toi quels que soient mes projets de vie. Ne cesse jamais de voir le bonheur et l'amour qui t'entourent.

A Yyou, ma grande sœur, pour notre complicité, pour ce lien qui nous unit pour toujours. Tu as toujours su me reconforter, me comprendre et me soutenir. Parce que ma vie ne sera jamais envisageable sans ta présence à mes côtés...

A Eric, qui as su rendre ma sœur heureuse et lui offrir une merveilleuse famille.

A Inès, parce que tu es mon rayon de soleil, parce que ton amour inconditionnel et tes yeux qui pétillent me donnent la force d'avancer. Ces moments déjà partagés avec toi et ceux à venir ne sont que bonheur.

A mes anges gardiens partis trop tôt,

Odile qui, j'en suis sûre, a toujours veillé sur moi.

Papi qui est resté le ciment de notre grande famille.

Grand-père, pour ces bons moments partagés gravés dans ma mémoire.

A Grand-mère, pour ton amour immense, pour l'image si belle que tu as toujours su me renvoyer de moi-même, pour ta force et ta détermination qui saura toujours me pousser à ne pas laisser passer mes chances et mes opportunités.

A Mamie, pour ton amour chaleureux, pour ta sagesse, pour m'avoir appris ce que signifie vraiment une famille unie, pour tes attentions délicates qui réchauffent le cœur.

A Florence, ma marraine, pour m'avoir accompagnée jusqu'ici. Tu as toujours voulu faire au mieux pour moi et je l'ai ressenti à chaque instant, te savoir à mes côtés a su me rassurer dès que j'en avais besoin. **A Bernard,** pour ta gentillesse, pour ton amour de la science et de la découverte qui a su me passionner.

A Sylvie et Christian, pour votre bon cœur, votre sens de l'accueil et les si bons moments partagés.

A Véro et Domi, pour ces moments de partages, ces fous rires et votre soutien.

A tous mes petits cousins chéris,

Julie et Marion, pour votre force. J'admire votre détermination et votre force de caractère, vous pouvez être fières de vous aujourd'hui. Je serai toujours là pour vous quoi qu'il arrive.

Marie, pour nos passions et nos ambitions communes. Tu as su devenir une femme belle et brillante, je suis ravie de pouvoir être à tes côtés dès que tu en as besoin ou simplement envie.

Mathieu et Thomas, pour votre gentillesse et nos moments de complicité. Vous avez su apporter un peu de masculinité et beaucoup de bonne humeur dans nos cousinades si précieuses.

Louis et Léa pour vos sourires et votre réussite qui se profile de jour en jour. J'ai été moins présente à vos côtés mais vous pourrez toujours compter sur moi quoi qu'il arrive.

A **Grégoire**, pour nos bons moments partagés trop peu nombreux.

A **Catherine et Jean-Pierre, Camille et Guillaume**, ma famille de cœur.

A **Séba et Anne**, parce que vous êtes bien mieux dans la catégorie famille que dans toute autre...votre gentillesse et votre joie de vivre ont toujours fait de nos moments partagés des souvenirs inoubliables.

A **Steve**, pour ces moments de bonheur partagés depuis plus d'un an qui ont fait de cette année la plus douce de toutes...tu es quelqu'un de formidable. Que ta passion et tes voyages continuent à te faire briller les yeux sans te mener trop loin de moi...tu me manques déjà...♥

A mes amis de toujours,

Sidelys, une grande aventure, des week-ends, un QG, des chérinous...

Pauline, ma Popo, comment dire en si peu de mots tout ce qui nous unit. On a grandi côte à côte en partageant nos expériences, nos moments de bonheur, nos découvertes mais aussi nos peines. Même éloignées, notre lien est resté unique et je sais qu'aujourd'hui, rien ne pourra l'affaiblir. Merci pour ton soutien, et félicitations à ton français irréprochable!

Sandrine, ma Sandrinou, pour tous ces moments délirants, passionnants et souvent si émouvants. Depuis toutes ces années, notre amitié n'a cessé de se renforcer et notre complicité est très précieuse. Ne change rien, ni ton côté psychorigide, ni ton sens de la fête et tes folies ! (je passerai les détails, ceci est un document officiel !)

Morgane, ma Morgou, pour ton sens de l'amitié à toute épreuve. Plus le temps passe et plus notre amitié grandit malgré la distance. Ton franc parlé et ta force de caractère te mèneront loin.

Sandra, ma Sandrou, pour ta folie, tes fleurs roses et tes papillons dans le ventre. Tous ces moments mythiques et ces choses qui n'arrivent qu'à toi. Il n'y a aucun doute, si tu n'avais pas fait partie de ma vie, j'aurais du t'inventer.

A **Aurore**, pour tous nos moments et fous rires partagés. Ton silence est parfois bien trop long mais je ne doute en rien de nos sentiments réciproques.

A **Sophie**, pour cette amitié née au lycée, nous étions les sœurs Fauchon et fières de l'être ! Nos convictions communes nous ont si souvent permis de passer des bons moments plein de fous rires inoubliables. Je sais que tu seras toujours là pour moi de la même façon que je le suis pour toi même si aujourd'hui nos chemins nous séparent mais bien évidemment, que par la distance.

A **Nadège**, pour notre amitié à toute épreuve qui a su rendre nos années de prépa peut être un peu plus douces. Nos sorties décalées, nos cafés à la terrasse de l'Ali et nos confidences dans cette chambre d'internat. Ta présence me manque.

A **François** qui a également permis que mes années de prépa ne me laissent que des bons souvenirs. Ces soirées à chanter M voire des paillardes...et ce punch qu'aucun de nous deux n'oubliera... Notre complicité semble si naturelle qu'elle en est rassurante ; et te voir continuer ton petit chemin me ravit chaque jour.

A **Pierre**, notre petit groupe n'aurait pas été le même sans toi. Tant de dérisions en apparence et un très grand cœur. Tu as su suivre un parcours qui te correspond tellement, mais malgré la distance, fidèle à toi-même, tu n'as jamais oublié tes VRAIS amis (tu noteras la belle référence).

A **Marjo**, pour avoir été mon double pendant ces moments uniques, ces colos, nos retrouvailles puis, à nouveau nos aurevoirs... Aujourd'hui beaucoup de choses nous séparent mais tu gardes toute mon affection.

A toutes ces personnes rencontrées à Toulouse,

A **Julie**, pour tout ! Tout a commencé pendant un week-end de brimades à Biarritz, puis... Qu'auraient bien pu être ces années sans toi ? Comme tu le dis si bien, les mots me paraissent si fades pour te transmettre tout ce que je ressens. Tu as été mon soutien, l'épaule sur laquelle je pouvais me reposer, celle qui comprenait mes joies et mes peines à travers un simple regard. Tu as supporté mes caprices, mes coups de gueules, partagé mes joies, mes interrogations mais aussi mes délires les plus fous. Nous avons partagé une amitié passionnelle, des moments uniques, le Brésil, Munich, la Réunion et Toulouse, une si belle aventure. Une aventure qui ne fait que commencer parce que tu fais désormais partie de ma vie, déjà quelques mois que nous sommes éloignées et j'ai l'impression qu'il me manque une petite partie de moi. Tu es quelqu'un d'exceptionnel et n'en doute pas comme tu sais si bien le faire... Je ne peux cesser de me rendre compte à quel point tu es une personne merveilleuse et la chance que j'ai d'avoir croisé ton chemin.

A **Aurélië**, une rencontre en or, tout d'abord grâce à un gilet Carrouf dans un rang de l'accueil 2006...comme quoi ! Ta gentillesse et ta générosité font de toi quelqu'un de si attachant. Tu es toujours la première motivée pour les soirées, la déconne, les chansons à tue-tête dans la voiture ! Mais ton grand cœur nous a également laissé nous perdre dans des moments de confidences, intimes et très personnelles... Ce lien d'amitié qui nous unit aujourd'hui est très fort et nos souvenirs inoubliables. Tu es heureuse dans ta nouvelle vie qui commence et je t'imposerai comme seule contrainte des coups de téléphone réguliers (mais je sais que tu adores ça) et l'organisation de quelques week-end de retrouvailles de folie !

A **Aurélië**, le troisième élément de notre club des quatre, tout d'abord en TD puis tout simplement tout le temps ! Nous étions rarement les unes sans les autres, parce que ces moments étaient toujours uniques, plein de fous rires et de complicité. Tu as su animer nos soirées grâce à Barry White ou même encore ton côté psychorigide si vite tourné en dérision. Tu étais également là quand j'en ai eu besoin de parler et je t'en suis très reconnaissante. C'est sur, si tu n'avais pas été là, il aurait fallu t'inventer ! Que les prochaines années ne nous séparent sous aucun prétexte !

A **Laura**, pour ta joie de vivre et ta disponibilité. C'était une révélation en 2^{ème} année, comment ça ne pouvait pas l'être avant ? Nos passions communes pour la danse (même si je ne reste que l'élève...) et nos sorties parsemées de rencontres en tout genre n'auront cessé de nous rapprocher. Sans oublier : merci pour ta présence si rassurante à Nantes !

A **Sarah**, notre rayon de soleil espagnol...arrivée dans notre groupe de TD il y a plus de 3 ans ! Merci pour tes mots justes avec cet accent si chantant et ta présence à mes côtés.

A **Laurie**, pour ton grand cœur parfois dissimulé derrière un mur de pierres que l'on a su traverser. Nous avons partagés des moments forts ensemble et je voudrais être là à chaque instant si tu en as besoin.

A **Elise**, pour nos longues confidences et ces moments partagés d'abord à la cité puis au Château, sans oublier nos soirées à danser jusqu'au bout de la nuit.

A **Aline**, ma blonde aigrie préférée. Tu es bien la seule à ne pas voir à quel point tu es quelqu'un de génial !

A **Morgane** pour ta gentillesse et ta douceur.

A **Petite Manon** et **Grande Manon** pour vos rires merveilleux et vos moments de folie.

A **Benoit**, parce que j'adore nos discussions à la fois cultivées et déjantées. A nos moments de complicité dans ce fameux groupe de TD, au Québec et tant d'autres...

A **Germain**, pour ces moments de réconfort dans nos moments difficiles au début puis plein de fous rires au Château.

A **Fabien** et **Antonio** pour vos anecdotes toujours plus déplacées et drôles à table et vos grands cœurs qui ont toujours fait que je me suis sentie bien en venant chez vous.

A **Evence**, pour nos grandes discussions et nos petites prises de bec en cliniques.

A **Pierre**, pour ton grand cœur, ton sens de l'accueil et toutes les paroles amicales et rassurantes glissées à l'oreille en boom.

A **Miramar**, **Martin**, tant d'années partagées, les dernières peut être moins complices mais qui ne changent rien à toute l'affection que je te porte, **FX** pour nos années de groupe de TD et ton grand cœur malgré une façon parfois maladroite de le faire parler, **Jérôme** pour ton humour et ta gentillesse à toute épreuve, **Mumu** pour ta joie de vivre et ta douceur, **Julien** pour ce qui a su parfois nous unir.

A **Michou**, pour ton côté grand sage et tes blagues si surprenantes et piquantes.

A **Ed**, pour son charme ravageur à la parisienne et à **Gaston** pour ton grand côté théâtral.

A **Romain** pour nos corrections de Médecine de folie, et à **Pauline** pour son aide précieuse en mes débuts de thèse.

A tous mes co-promos pour ces années partagées.

A **mes petits poulots**, **Toute petite Manon** pour nos repas et discussions interminables à refaire le monde, **Lili** pour tous ces moments de complicité qui nous manquent autant qu'à toi, **Julien** pour ses danses endiablées, **Anna**, **Julie**, **Marine**, **Romain**, **Noldou**, **Clem**, **Chouin**, **Max**, **Gus** pour ces bons moments.

A **mes petits petits poulots, Maylīs** pour ton accueil chaleureux que ce soit chez toi autour d'un rhum ou dans ton île paradisiaque, **Marie** pour ta fashionitude, **Guillaume** pour nos confidences, **Myriam, Sophie, Salim, Hugo, Antoine, Vincent, Julien, Mathieu, Quentin** pour tous ces bons moments.

A **mes docs, Aude, Nico, Mado, Brice, Foufoune, Ben, Fanny, Ronsard, Taquet, Marie, Guillaume**...Vous nous avez accompagnés dans nos premiers pas à l'ENVT plein de naïveté, puis vous nous avez beaucoup manqué ! Au plaisir de vous revoir...

A mes co-internes et nantais préférés,

A **Marie-Laure**, pour ton côté aventurière passionnée et cultivée, ta force de caractère, et pour nos angoisses partagées dans ce travail et après ce fameux concours !

A **Ludi**, pour ta gentillesse, ton hospitalité, ta présence rassurante et tous ces bons moments et longues conversations déjà partagés notamment au Québec.

A **Laetitia**, parce que finalement, après toutes ces années, tu n'as pas changé et ça me plait bien, à **Irene**, pour ton accent chantant et ta tortilla, à **Pauline**, pour ton sens de l'organisation, à **Pauline**, pour tes imitations de nos chers clients bourrés au téléphone des urgences, à **Alexia**, pour ta gentillesse au naturel et ton humour parfois malgré toi, à **Agnès**, pour ton côté très sérieuse, à **Manu**, notre marié préféré, à **Pierre**, pour ton accent belge, à **Michel** pour nos discussions de filles, à **Alex** pour les petits surnoms du jour, à **Eloy**, pour tes talents cachés de chanteur.

A **Corinne, Pauline** et **Maria** pour leur folie, leur amour du karaoké et leur accompagnement dans nos premiers pas tremblants aux urgences.

A **Georges**, pour m'avoir transmis sa passion du métier, guidée et prise sous son aile et pour m'avoir aidée et réconfortée dans mes choix d'avenir. A **Emilie** pour m'avoir également accueillie chaleureusement.

Et à tous ces vétérinaires croisés durant mon parcours qui ont su me transmettre leur savoir et leur passion.

A **Khyra**, ma fidèle et si douce compagne...mais surtout ma teigne préférée!! Et à **Vénus**, la plus parfaite des chiennes !

A tous les chats prélevés pour leur patience et surtout, à leur propriétaire pour avoir accepté qu'ils participent à notre étude.

« De tout ce qui est écrit, je ne lis que ce que quelqu'un écrit avec son sang. Ecris avec ton sang : et tu verras que le sang est esprit. »

NIETZSCHE F.W.

« Je n'ai rien d'autre à offrir que du sang, du travail, des larmes et de la sueur. »

CHURCHILL W.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	21
1. LA NOTION D'INTERVALLES DE REFERENCE.....	23
2. LES PARTICULARITES HEMATOLOGIQUES FELINES.....	26
2.1. Les hématies.....	26
2.1.1. Morphologie et données numériques.....	26
2.1.2. Physiologie.....	27
2.2. Les leucocytes.....	27
2.2.1 Morphologie et données numériques.....	27
2.2.2. Physiologie.....	28
2.3. Les plaquettes.....	28
2.3.1. Morphologie et données numériques.....	28
2.3.2. Physiologie.....	29
3. ETUDE EXPERIMENTALE	31
3.1. Objectifs de l'étude	31
3.2. Matériels et méthode.....	31
3.2.1. Inclusion des animaux	31
3.2.2. Méthode de prélèvement	32
3.2.3. Matériel	33
3.3. Analyses	34
3.3.1. Contrôles de qualité	34

3.3.2. Critères d'exclusion au laboratoire	35
3.3.3. Procédures effectuées sur chaque spécimen.....	35
3.3.4. Calculs.....	37
3.4. Résultats	39
3.4.1. Caractéristiques de la population de référence.....	39
3.4.2. Intervalles de référence de la lignée rouge.....	40
3.4.3. Intervalles de référence de la lignée blanche	43
3.4.4. Intervalles de référence de la lignée Plaquettaire	45
4. DISCUSSION.....	49
4.1. Sélection de la population de référence	49
4.2. Les facteurs préanalytiques.....	50
4.3. Performances analytiques de l'analyseur.....	51
4.4. Méthode de détermination des intervalles de référence	51
4.5. Comparaison des intervalles de référence déterminés dans cette étude avec les données de la littérature.....	52
CONCLUSION.....	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	59
ANNEXES.....	63

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

<u>Tableau n°1</u> : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV® pour les analytes sanguins de la lignée rouge et leurs index calculés.....	41
<u>Tableau n°2</u> : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV® pour les analytes sanguins de la lignée blanche.....	44
<u>Tableau n°3</u> : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT 2000iV® pour les analytes sanguins de la lignée plaquettaire.....	46
<u>Tableau n°4</u> : Intervalles de référence en hématologie féline existant dans la littérature comparés aux intervalles de référence établis dans notre étude avec le Sysmex XT-2000iV®	53

FIGURES

<u>Figure n°1</u> : Distribution des facteurs "âge" et "sexe" des 104 chats utilisés pour la détermination des intervalles de référence hématologiques félins avec l'automate Sysmex XT-2000iV®.....	40
<u>Figure n°2</u> : Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les variables sanguines de la lignée rouge	42 - 43
<u>Figure n°3</u> : Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les analytes sanguins de la lignée blanche	44 - 45
<u>Figure n°4</u> : Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les analytes sanguins de la lignée plaquettaire	46 - 47

TABLE DES ANNEXES

<u>Annexe n°1</u> : Formulaire de consentement éclairé.....	64
<u>Annexe n°2</u> : Feuille d'accompagnement.....	65
<u>Annexe n°3</u> : Protocole.....	66
<u>Annexe n°4</u> : Affiches pour le recrutement des chats (originales en format A3).....	71
<u>Annexe n°5</u> : Estimation semi-quantitative de la formule leucocytaire et estimation de la taille moyenne des agrégats plaquettaires d'après un frottis sanguin chez le chat.....	72
<u>Annexe n°6</u> : Exemple de résultat obtenu pour l'analyte HGB à l'aide du logiciel Reference Value Advisor.....	74

INTRODUCTION

Aujourd'hui, le chat occupe une place de plus en plus importante en clinique des animaux de compagnie. En effet, la population féline française (10,96 millions de chats) est en constante augmentation chaque année (+278.000 en 2 ans, +923.000 en 4 ans d'après une enquête FACCO de 2010). Le chat est désormais l'animal de compagnie préféré des français avec 26,1% des foyers français qui possèdent au moins un chat en 2010. Ces chats sont également de plus en plus médicalisés. Ceci explique le nombre grandissant des consultations de pratique féline.

Ces consultations s'accompagnent très souvent d'examen complémentaires dans un but de prévention, de diagnostic, de suivi ou de traitement des chats. Les analyses hématologiques font partie de ces examens complémentaires réalisés régulièrement en consultation. Il est alors nécessaire d'interpréter leurs résultats en les replaçant dans leur contexte clinique. Il apparaît évident de se demander si les résultats d'analyses obtenus sont « normaux ». C'est dans ce cadre là qu'intervient la notion d'intervalles de référence déterminés sur une population d'animaux « sains » qui sera indispensable en pratique féline.

Si l'on s'intéresse à la bibliographie disponible de nos jours, on se rend compte qu'il n'existe aucun intervalle de référence établi selon les recommandations internationales en ce qui concerne les différentes variables de l'hémogramme dans l'espèce féline sur des automates d'hématologie utilisés fréquemment aujourd'hui.

Il nous a donc semblé nécessaire de déterminer des intervalles de référence hématologiques, dans des conditions de prélèvement inhérentes aux pratiques courantes de clinique, selon les recommandations internationales, sur un automate d'hématologie largement utilisé en laboratoire vétérinaire.

Nous aborderons dans un premier temps la notion d'intervalles de référence et les particularités hématologiques du chat. Le travail expérimental ayant mené à l'établissement d'intervalles de référence sera ensuite présenté, suivi d'une discussion sur les facteurs pré-analytiques, analytiques et la sélection de la population de référence.

1. LA NOTION D'INTERVALLES DE REFERENCE

Le concept de valeur de référence a été défini pour la première fois en médecine humaine il y a plus de 30 ans pour décrire les fluctuations des variables biologiques dans des groupes de sujets parfaitement caractérisés, maintenant le plus souvent des sujets en bonne santé. Ces valeurs de référence sont un outil indispensable en biologie médicale et notamment en hématologie. Cette notion a ensuite été travaillée et mise à jour pour aboutir à la dernière version des recommandations internationales par l'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) et le Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) [2]. Ces publications plus récentes ont donc permis de clarifier ce concept afin de le rendre applicable.

L'établissement d'intervalles de référence peut s'effectuer en respectant les étapes successives suivantes :

- Etablir une liste des facteurs de variations pré-analytiques, analytiques et biologiques.

Ils doivent être déterminés par des recherches bibliographiques. Identifier ces facteurs permet de pouvoir les contrôler au maximum durant l'établissement des intervalles de référence et ainsi, minimiser les variations des résultats obtenus. Certains de ces facteurs de variations peuvent être retenus comme des facteurs d'exclusion dans la sélection de la population de référence. D'autres de ces facteurs peuvent cependant s'avérer très compliqués à contrôler tel que le stress dont le degré a une grande importance chez le chat.

- Etablir les critères d'inclusion et d'exclusion des individus de la population de référence.

Il faut au minimum exclure les animaux présentant une anomalie d'examen clinique ou ayant reçu un traitement à l'exception peut-être des antiparasitaires. Un questionnaire simple doit être réalisé afin de catégoriser les individus. Les individus doivent également subir un examen clinique et d'éventuels tests complémentaires requis par le protocole. Les potentiels individus de référence peuvent alors être classés en différentes catégories ou même exclus de l'étude après ces étapes. Il faut faire cependant attention à ne pas être trop restrictif en ce qui concerne ces critères d'inclusion et d'exclusion au risque de ne se retrouver qu'avec une population de jeunes animaux en bonne santé qui ne serait pas représentative de la population des chats présentés en consultation. Dans le cas de la médecine vétérinaire, un

formulaire de consentement doit être également réalisé à l'attention du propriétaire de l'individu de référence.

- Décider du nombre d'individus de référence.

Le nombre minimum d'individus recommandé est 120 pour utiliser une méthode non paramétrique d'estimation des intervalles de confiance des limites de référence. Cependant, pour certaines expérimentations, il est difficile d'atteindre ce nombre minimal d'individus. Il est alors recommandé d'atteindre le plus grand nombre possible, sans minimum précisé et d'utiliser des méthodes mathématiques plus complexes pour les calculs.

- Préparer les individus de référence et collecter les prélèvements

La préparation des individus de référence doit se faire en tenant compte de la première étape référençant les facteurs de variations pré-analytiques, analytiques et biologiques, et en fonction des critères d'inclusion et d'exclusion. La procédure de prélèvement doit ensuite être standardisée pour tous les individus. Les prélèvements non conformes à cause d'un biais dans la manipulation doivent être exclus a posteriori.

- Analyser les prélèvements avec une méthode contrôlée

Les prélèvements doivent tous être analysés de la même façon. La fiabilité des valeurs obtenues est fonction de la qualité de l'analyse. La méthode d'analyse doit être minutieusement décrite en rapportant toutes les imprécisions et interférences que l'on peut rencontrer lors des prélèvements et des mesures. Une traçabilité de chaque prélèvement doit également être établie rigoureusement et doit pouvoir être fournie sur demande.

- Contrôler et analyser les données

Les données doivent être contrôlées afin de mettre en évidence des erreurs ou des valeurs aberrantes. Les intervalles de référence et leurs intervalles de confiance doivent ensuite être déterminés. Il est communément admis que l'intervalle de référence comprend 95% des valeurs de référence avec pour limites les quantiles 2,5% et 97,5%. Certains scientifiques suggèrent que d'autres valeurs limites soient considérées (comprenant 99,9% des valeurs de

référence) ce qui éviterait un nombre trop élevé de résultats « faux positifs » [17]. Les limites de référence doivent être déterminées par la méthode non-paramétrique. Cependant, une méthode paramétrique peut être utilisée quand la répartition des données le permet ou peut être transformée en répartition Gaussienne. Certains auteurs recommandent de comparer les intervalles de référence obtenus avec plusieurs méthodes statistiques différentes afin de détecter de trop grandes différences entre les valeurs limites de l'intervalle et donc, de détecter une anomalie de distribution de la population de référence trop hétérogène. Il faut également recourir à un test de détection des valeurs aberrantes tel que celui de Dixon-Reed, ou de Tukey qui est le seul applicable en présence de plusieurs valeurs aberrantes.

- Documenter toutes les étapes précédentes

Il existe d'autres méthodes pour l'établissement d'intervalles de référence :

- D'une part, il peut s'agir d'un transfert d'intervalle préalablement déterminé, applicable uniquement si la démographie du laboratoire « receveur » est similaire à celle du laboratoire « donneur ».
- D'autre part, Il est possible de valider un intervalle de référence préalablement publié par un laboratoire « donneur » vers un laboratoire « receveur » en testant seulement un échantillon de vingt individus de référence dans des conditions pré-analytiques et analytiques similaires au sein des deux laboratoires.
- Cela peut également se faire en utilisant un nombre plus limité d'individus de référence. Dans ce cas là, des outils statistiques tels que la méthode robuste permettent de pallier le faible nombre d'individus. Cependant, pour des échantillons de référence de très petites tailles, les intervalles de référence générés peuvent être très variables.

- Enfin, il peut s'agir d'une exploitation a posteriori de bases de données collectées dans les centres de médecine préventive, les hôpitaux ou les grands laboratoires de biologie médicale. Cependant, ces données renferment à la fois des résultats d'individus considérés comme « sains » et d'individus « malades » donc cela nécessite l'utilisation de modèles mathématiques séparant les deux séries de données. Il faut néanmoins bien faire attention à l'homogénéité des sous-populations ainsi analysées.

2. LES PARTICULARITES HEMATOLOGIQUES FELINES

Nous allons ici aborder les caractéristiques morphologiques et physiologiques des différentes lignées cellulaires sanguines chez le chat en insistant particulièrement sur les particularités pouvant amener à des difficultés de comptage.

Des intervalles de référence en hématologie féline ont déjà été décrits mais il est difficile de remonter aux sources primaires de ces données, ou ces intervalles de référence n'ont pas été établis selon les critères requis par les normes CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Nous avons répertorié -ici- les données numériques bibliographiques les plus couramment utilisées.

2.1. Les hématies

2.1.1. Morphologie et données numériques

Chez le chat sain, les hématies sont des cellules anucléées à forme biconcave. Cependant, ces hématies ont la particularité de ne présenter qu'une très légère pâleur centrale par rapport aux autres espèces domestiques. Elles sont de petite taille, assez proche de celle des plaquettes ce qui peut rendre la distinction difficile entre ces deux types cellulaires. Leur diamètre est de 5,5 à 6,3 μm et leur Volume Corpusculaire Moyen (MCV) est de l'ordre de 39 à 55 fL [6]. Cependant, plus le chat est jeune, plus les hématies sont de grande taille [6]. Le MCV des hématies chez le fœtus peut atteindre 90 fL, puis diminue avec l'âge pour atteindre les valeurs usuelles citées précédemment aux

environs de 4 mois. La numération érythrocytaire établie jusqu'ici dans la bibliographie est de l'ordre de $5,0 \text{ à } 10,0 \cdot 10^{12}/\text{L}$ [6].

On peut trouver une anisocytose modérée et une légère polychromatophilie physiologiques dans environ 0,5% de la population érythrocytaire chez le chat. On peut également noter la présence de corps d'Howell Jolly sur 0 à 1% des hématies et des corps de Heinz sur presque 5% des hématies.

2.1.2. Physiologie

La durée de vie moyenne des hématies dans l'espèce féline est de 66 à 78 jours. Cette durée de vie peut être raccourcie in vitro en fonction des conditions de stockage.

Les hématies félines ont aussi tendance à former des rouleaux identifiables sur les frottis sanguins.

2.2. Les leucocytes

2.2.1 Morphologie et données numériques

La taille moyenne des leucocytes est de l'ordre de 9 à 20 μm , soit deux fois celle des hématies [29].

Chez l'espèce féline, il existe un important pool de leucocytes marginés qui peut influencer sur le nombre de leucocytes circulants. En effet, chez le chat, le stress affecte la numération et la formule leucocytaire de façon non négligeable.

Les automates hématologiques actuels effectuent de bons comptages des granulocytes neutrophiles et des lymphocytes mais leurs données restent parfois peu fiables pour les monocytes, les granulocytes éosinophiles et les basophiles.

De plus, jusqu'à 5-6 mois, le chaton possède une numération leucocytaire moyenne de l'ordre de $23,0 \cdot 10^9/\text{L}$ et une formule leucocytaire dominée par les lymphocytes contrairement au chat adulte

dont la formule est dominée par les granulocytes neutrophiles avec une numération leucocytaire de l'ordre de $5,5$ à $19,5 \cdot 10^9/L$ [6].

2.2.2. Physiologie

Lors de phénomène inflammatoire, on retrouve souvent une agrégation de leucocytes sur le frottis sanguin.

Un phénomène de satellisme des leucocytes par les plaquettes et une agglutination EDTA-dépendante entre les granulocytes neutrophiles et les plaquettes ont été rapportés en médecine humaine [42], mais n'ont pas été mentionnés en médecine vétérinaire à notre connaissance.

Ces mécanismes d'agglutination pourraient entraîner une sous-estimation des leucocytes voire une fausse leucopénie dans des cas extrêmes.

2.3. Les plaquettes

2.3.1. Morphologie et données numériques

Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques anucléés, généralement de forme sphérique. Cependant, chez le chat, on trouve souvent des formes plus allongées ou plus grandes appelées macrocytaires. Le volume moyen plaquettaire est compris entre 12 et 17 fL [43]. On constate donc que la différence de taille entre les hématies et les plaquettes est moins importante chez le chat que chez le chien. Ceci entraîne une difficulté de distinction entre les deux types cellulaires pour les automates se fondant sur la différence de taille, comme nous l'avons cité dans le paragraphe concernant les hématies.

L'intervalle de référence de la numération plaquettaire chez le chat est très étendu, de $296 \cdot 10^9/L$ à $850 \cdot 10^9/L$ [39]. En effet, cela peut s'expliquer par le fait que lors de stress, comme dans le cas d'une prise de sang, il existe une splénocontraction augmentant la quantité de plaquettes circulantes chez

le chat et par le fait que leur taille et leur forte capacité d'agrégation entraîne des erreurs de comptage.

2.3.2. Physiologie

Lors de l'hémostase, les plaquettes interagissent avec les cellules endothéliales endommagées. Une plaquette va adhérer à leur surface, s'activer et recruter d'autres plaquettes pour former un agrégat plaquettaire.

Les plaquettes félines ont tendance à s'agréger très facilement. On peut alors observer une masse amorphe sur le frottis nommé agrégat plaquettaire, qui peut être à l'origine d'une sous-estimation de la numération plaquettaire par les automates d'hématologie.

3. ETUDE EXPERIMENTALE

3.1. Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons exposé précédemment, si l'on s'intéresse à la bibliographie, on se rend compte qu'il n'existe aucun intervalle de référence conduit selon les recommandations internationales en ce qui concerne les différents paramètres de l'hémogramme dans l'espèce féline sur le Sysmex XT-2000iV®.

Le but de cette étude est donc d'établir des intervalles de référence en hématologie féline sur le Sysmex XT-2000iV® selon les recommandations IFCC-CLSI, dans des conditions de prélèvement inhérentes aux pratiques courantes de clinique.

3.2. Matériels et méthode

3.2.1. Inclusion des animaux

Les prélèvements ont été effectués sur 116 chats d'Octobre 2010 à Juin 2011, à partir de 120 chats recrutés en première intention.

Ces animaux appartenaient à des employés et étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ou étaient présentés en consultation vaccinale, en consultation de reproduction ou pour un bilan de santé aux cliniques de l'ENVT. Les propriétaires ont accepté la participation de leur animal à l'étude sur la base du volontariat et ont alors signé un formulaire de consentement pour chaque animal (Annexe n°1)

Afin de recruter un maximum de chats, de nombreux mails ont été envoyés aux étudiants et employés de l'ENVT. Pour aider ce recrutement, des affiches (Annexe n°4) ont également été installées, d'une part sur le site de l'ENVT et d'autre part, dans les salles de consultation de médecine préventive et de reproduction où les animaux étaient susceptibles d'être recrutés.

Chaque chat recruté s'est vu attribuer une feuille d'accompagnement (Annexe n°2) sur laquelle étaient rapportés :

- Une étiquette comportant les coordonnées du propriétaire, le nom de l'animal, sa race et sa date de naissance, ainsi que son numéro de dossier
- Son numéro d'étude
- Un questionnaire concernant son alimentation, son statut vaccinal, ses antécédents médicaux et son état général
- L'examen clinique comportant une évaluation de l'aspect extérieur, une auscultation cardiaque et pulmonaire, un relevé de fréquences cardiaque et respiratoire, une prise de température rectale, une observation de la couleur des muqueuses, une palpation des nœuds lymphatiques et une palpation abdominale
- la présence ou non de critère d'exclusion en fonction des données précédentes
- la date et l'heure du prélèvement
- le niveau de difficulté du prélèvement coté de 1 à 5
- le résultat du test de dépistage de la leucose féline et du syndrome d'immunodéficience acquise

Les critères d'exclusion de la population des chats de référence étaient les suivants :

- Un chat âgé de moins de 6 mois
- Un chat ayant reçu un traitement durant le mois précédent la consultation excepté un traitement antiparasitaire externe
- Un chat ayant souffert d'une quelconque affection durant le mois précédent la consultation
- Un chat avec au moins une anomalie détectée à l'examen clinique
- Un chat ayant eu un résultat positif au dépistage de la leucose féline et du syndrome d'immunodéficience acquise au cours de sa vie ou à celui réalisé lors de la consultation.

3.2.2. Méthode de prélèvement

Aucune précaution particulière n'a été prise pour la réalisation du prélèvement afin de reproduire les conditions réelles obtenues lors d'une consultation courante chez un vétérinaire. Seule une contention usuelle adaptée à l'animal a été réalisée par une personne expérimentée. La tonte est réalisée juste avant le prélèvement. Ces prélèvements sanguins sont réalisés par un nombre restreint de cliniciens expérimentés.

La prise de sang est réalisée sur un membre antérieur, à la veine céphalique accessoire.

Une cotation semi-quantitative est utilisée pour caractériser la difficulté de réalisation du prélèvement. Cette cotation est comprise entre 1 et 5,1 qualifiant une prise de sang réalisée dans des conditions idéales (l'animal semble avoir été peu stressé, n'a pas bougé lors de la réalisation du prélèvement etc...).

3.2.3. Matériel

Ce prélèvement est réalisé à l'aide du matériel suivant :

- Un microtube collecteur contenant de l'EDTA (0,5 mL K3EDTA, Minicollect®, Greiner-bio-one, Kremsmünster, Austria), identifié pour chaque chat « n° CTxEDTA », et associé à un capillaire de 80 µL (capillary tube 80 µL for EDTA, Minicollect®, Greiner-bio-one, Kremsmünster, Austria).



Source : www.gbo.com/preanalytics

- Une aiguille de 23G (0,6 x 25 mm, 23G, NEOLUS®, Terumo) posée dans la veine céphalique accessoire.

Le capillaire connecté au microtube correspondant est ensuite placé à l'extrémité de l'aiguille afin de le remplir (capillary tube 80 µL for serum, Minicollect®, Greiner-bio-one ou capillary tube 80 µL for EDTA, Minicollect®, Greiner-bio-one, Kremsmünster, Austria).

Les spécimens sont ensuite homogénéisés par 10 retournements lents. Chaque tube est identifié selon la procédure mentionnée précédemment. L'heure du prélèvement est notée sur la feuille d'accompagnement du chat.

- L'automate d'hématologie utilisé est le Sysmex XT-2000iV® qui est un analyseur utilisant trois techniques de pointe afin d'obtenir une Numération Formule Sanguine (NFS) la plus complète disponible en médecine vétérinaire : la cytométrie de flux, la variation d'impédance et la fluorescence optique.



3.3. Analyses

3.3.1. Contrôles de qualité

Le Sysmex XT-2000iV® (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany) est contrôlé chaque matin selon le protocole de routine du laboratoire de biologie médicale de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse :

Des sangs de contrôle sont analysés pour vérifier la calibration de l'analyseur. Si une (ou plusieurs) mesures de contrôle est (sont) en dehors des cibles fournies par le fabricant, l'échantillon contrôle est repassé. Si au troisième passage maximum, la (les) valeur(s) hors cible persistent, les diverses opérations correctrices prévues par le fabricant sont mises en œuvre pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème et obtention des résultats de contrôles dans les cibles.

3.3.2. Critères d'exclusion au laboratoire

Sont exclus de l'étude :

- Les tubes n'ayant pas un volume de sang prélevé suffisant ou un volume trop important (+/- 5 %, les limites sont indiquées par des repères préalablement ajoutés sur les microtubes).
- Les tubes de sang présentant un caillot macroscopique

3.3.3. Procédures effectuées sur chaque spécimen

Dès leur arrivée au laboratoire, tous les spécimens étaient placés pendant 20 minutes sur l'agitateur (Speci Mix®, Oxford, CT06478 USA).

Les analyses étaient faites selon les modalités suivantes :

Une analyse en duplicate, après 30 retournements, était effectuée sur le Sysmex XT2000iV®. Les analyses étaient identifiées de la façon suivante : S1EDTAX, S2EDTAX (X étant le n° d'étude de l'animal).

Une mesure de l'hématocrite a également été réalisée (tubes micro-hématocrite, verre de soude, BRIS®, Vitrex medical et Haematokrit 2010®, Hettich Zentrifugen) pour chacun des spécimens, et son résultat noté sur la feuille d'analyse correspondante donnée par le Sysmex XT-2000iV® puis dans la feuille récapitulative des résultats.

Des frottis sanguins étaient également réalisés en duplicate et identifiés de la façon suivante : 1EDTAX, 2EDTAX (X étant le n° d'étude l'animal). Ces frottis ont été colorés, montés puis conservés dans une boîte prévue pour l'étude. Ils ont tous été lus selon la procédure présentée en annexe (Annexe n°6), à la fin des analyses effectuées pour un animal donné. Les résultats concernant la formule leucocytaire et le degré d'agrégation plaquettaire sont reportés sur les fiches d'analyse de ce dernier.

Une photocopie de toutes les impressions des résultats de ces analyses ainsi que toutes les feuilles d'accompagnement ont été conservées par le Dr. F.Granat dans le cahier de manipulation qui lui avait été remis. Un fichier Excel est rempli quotidiennement pendant toute la durée de l'étude.

Les analytes sanguins qui ont été déterminés sont les suivantes :

- **RBC-O** : numération des globules rouges par méthode optique (cytométrie en flux)
- **RBC-I** : numération des globules rouges par variation d'impédance
- **Hemoglobin** : hémoglobine (HB)
- **HCT** : hématocrite
- **MCV** : volume globulaire moyen
- **MCH** : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
- **MCHC** : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
- **RDW-CV** : indice de distribution des globules rouges (calculé)
- **RDW-SD** : indice de distribution des globules rouges (mesuré)
- **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
- **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

3.3.4. Calculs

Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Reference Value Advisor [9][30]. Il s'agit d'un logiciel qui calcule les intervalles de référence à partir des données contenues dans un tableur Microsoft Excel. Il suit les lignes directrices du CLSI.

Ce logiciel nous permet d'obtenir d'une part, un tableau contenant le rapport de l'analyse, et d'autre part, un tableau contenant des informations sur les valeurs aberrantes pour chaque analyte. Un exemple des résultats obtenus pour un analyte est présenté en annexe (Annexe n°6).

Les différentes informations obtenues grâce au logiciel sont les suivantes:

- Une analyse statistique descriptive : la taille de l'échantillon, la moyenne, la médiane, l'écart-type et les valeurs minimales et maximales.
- Un test de normalité selon Anderson-Darling avec des histogrammes et Q-Q plots. Indépendamment des résultats de ce test sur des données brutes, la transformation Box-Cox généralisée est effectuée. Ses paramètres λ_1 et λ_2 sont déterminés par l'estimateur du maximum de vraisemblance qui fournit la plus haute précision.
- Des tests de valeurs aberrantes : Les tests de Dixon-Reed et Tukey sont utilisés. Le premier détecte une potentielle valeur aberrante unique en se fondant sur le rapport de sa distance à la valeur la plus proche divisé par l'étendue de l'ensemble des valeurs. Le second est fondé sur la

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

- Les calculs des intervalles de référence : pour toute série de données, Reference Value Advisor calcule et rapporte 5 intervalles de référence fondés sur différentes hypothèses concernant la répartition des données. Les 4 premiers intervalles sont obtenus en utilisant les méthodes Standard et Robuste à la fois sur les données non transformées et transformées. Cela permet à la fois de combiner le besoin ou non de transformation de données avec des hypothèses concernant la distribution des données. Le dernier intervalle est obtenu sans aucune hypothèse concernant la distribution des données. Ainsi, il s'agit d'une méthode non paramétrique, seulement calculable lorsque la taille de l'échantillon est suffisamment grande ($n \geq 40$). Les intervalles standards nécessitent une distribution des données Gaussienne avant ou après la transformation de Box-Cox, tandis que la méthode Robuste ne nécessite que la symétrie des données.
- Les intervalles de confiance des limites de l'intervalle de référence calculées par chaque méthode : pour la méthode standard, l'intervalle de confiance à 90% est obtenu grâce à un bootstrap paramétrique quand $n \leq 20$. Dans tous les autres cas, une méthode bootstrap non paramétrique est utilisée. Pour la méthode non paramétrique, l'intervalle de confiance est déterminé d'après des tableaux si $120 < n < 370$; si $n < 120$, une méthode bootstrap est utilisée.

Il a été décidé de fournir constamment tous les résultats des calculs pour permettre leur sélection par des utilisateurs expérimentés. Cependant, il a également été convenu que, pour les utilisateurs inexpérimentés, une aide devrait être fournie reposant sur les recommandations de l'IFCC-CLSI. Ainsi, un code couleur est utilisé lorsque les limites de référence sont rapportées: le vert indique « en accord avec les recommandations », l'orange indique « à utiliser avec prudence ou éviter d'utiliser car des valeurs aberrantes possibles sont détectées », et le rouge indique que la distribution n'est pas Gaussienne. Dans une section de commentaires, des explications sont ajoutées et sont activées en fonction de la série de données analysées, de l'information dans les recommandations IFCC-CLSI et des méthodes de calcul utilisées.

3.4. Résultats

3.4.1 Caractéristiques de la population de référence

Lors de notre étude, 120 chats ont initialement été recrutés. Certains ont été exclus dès la première étape à cause de critères d'exclusion relatifs aux commémoratifs ou à l'examen clinique. Le chat n°1 avait subi sa primo-vaccination moins d'un mois auparavant. Le chat n°64 avait été trouvé seulement 10 jours avant ; donc il était impossible d'avoir des antécédents et commémoratifs complets. Le chat n°71 présentait une kératopathie tropicale suite à un long séjour à la Martinique. Et enfin, le chat n°78 présentait un souffle systolique de grade 4/6 à l'examen clinique.

116 chats ont donc ensuite été prélevés dans le cadre de notre étude. Sur ces 116 chats, 4 ont été exclus car les conditions de prélèvement ne nous ont pas permis d'obtenir des tubes EDTA convenablement remplis. Il s'agissait alors des chats n°20, 23, 31 et 53.

Les prélèvements de 112 chats ont donc été analysés. Sur ces 112 prélèvements, 5 ont été exclus suite à la réalisation du test FIV/ FeLV. En effet, les chats n°11, 55 et 93 n'ont pas eu un test réalisé dans les bonnes conditions, le chat n°73 était FeLV positif et le chat n°103 FIV positif.

Les prélèvements de 3 chats n°2, 6 et 44 ont été exclus lors de l'analyse des résultats à cause d'anomalie dans la réalisation ou la lecture de leur frottis sanguin.

Le nombre total d'échantillons analysés en vue de l'établissement des intervalles de référence est donc de 104.

Les chats faisant partie de notre étude sont essentiellement des chats européens. En effet, seuls 6 chats sur les 104 retenus sont des chats de race : deux Persans, deux siamois, un Main Coon et un Bleu de Russie. Notre population de référence est donc constituée à 94,2% de chats européens et à 5,8% de chats de race.

La population est constituée de 49 femelles et de 55 mâles. La médiane de la population est de 25 mois. Il n'y a pas d'effet observé du facteur « sexe » sur le facteur « âge », les moyennes d'âge étant de 27,1 et de 33,0 mois pour les mâles et les femelles respectivement.

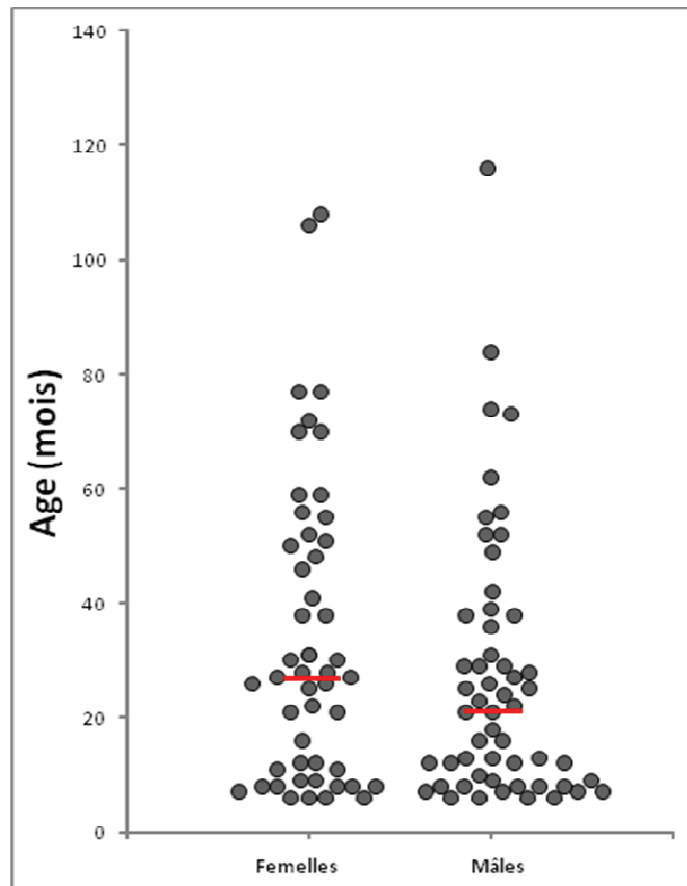


Figure n°1: Distribution des facteurs “âge” et “sexe” des 104 chats utilisés pour la détermination des intervalles de référence hématologiques félines avec l’automate XT-2000iV

(les barres horizontales représentent les médianes des 55 mâles et 49 femelles)

3.4.2. Intervalles de référence de la lignée rouge

Les intervalles de référence concernant les analytes sanguins de la lignée rouge ont été obtenus à partir des prélèvements de 104 chats.

Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau n°1 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT 2000iV® pour les analytes sanguins de la lignée rouge et leurs index calculés

Analytes	Unités	N	Moyenne Médiane	P Natif	P Box-Cox	Quantile 2.5	Quantile 97.5
RBC-I	10 ¹² /L	104	9.45 9.47	0.236	0.748	6.72 (6.13-7.62)	11.39 (10.97-12.06)
RBC-O	10 ¹² /L	104	9,11 9,22	0.102	0.776	6.58 (5.97-7.28)	10.95 (10.44-11.58)
HGB	g/dL	104	13.6 13.7	0.559	0.636	9.8 (9.7-11.3)	16.9 (15.9-17.2)
HTE	L/L	104	0,38 0,38	0.743	0.913	0,29 (0,27-0,31)	0,48 (0,46-0,51)
MCV	fL	104	40.5 41.6	0.725	0.592	33.6 (31.4-34.4)	48.3 (46.4-52.5)
MCH	pg	104	14.4 14.6	0.210	0.475	12.1 (11.4-12.5)	16.6 (16.0-17.2)
MCHC	g/dL	104	35.8 35,8	0.582	0.544	32.9 (30.8-33.5)	39.1 (38.3-39.5)
RDW-CV	%	104	24.1 23.8	0.029		19.6 (19.3-20.7)	29.9 (28.9-33.0)
RDW-SD	fL	104	28.4 27.9	0.00	0.167	25.1 (24.8-25.3)	35.4 (32.9-47.4)
RET	10 ⁹ /L	104	49.2 44.2	0.000	0.097	14.1 (10.5-23.6)	104.5 (91.3-106.2)
IRF	%	104	9.4 9.3	0.381	0.382	0.9 (0.7-2.3)	19.1 (17.6-24.6)
LFR	%	104	90.6 90.6	0.381	0.720	80.9 (75.5-82.3)	99.1 (97.8-99.3)
MFR	%	104	7.2 7.0	0.353		0.5 (0.0-1.9)	14.5 (13.1-19.2)
HFR	%	104	2.2 2.1	0.009	0.009	0.0 (0.0-0.3)	5.6 (4.9-7.6)

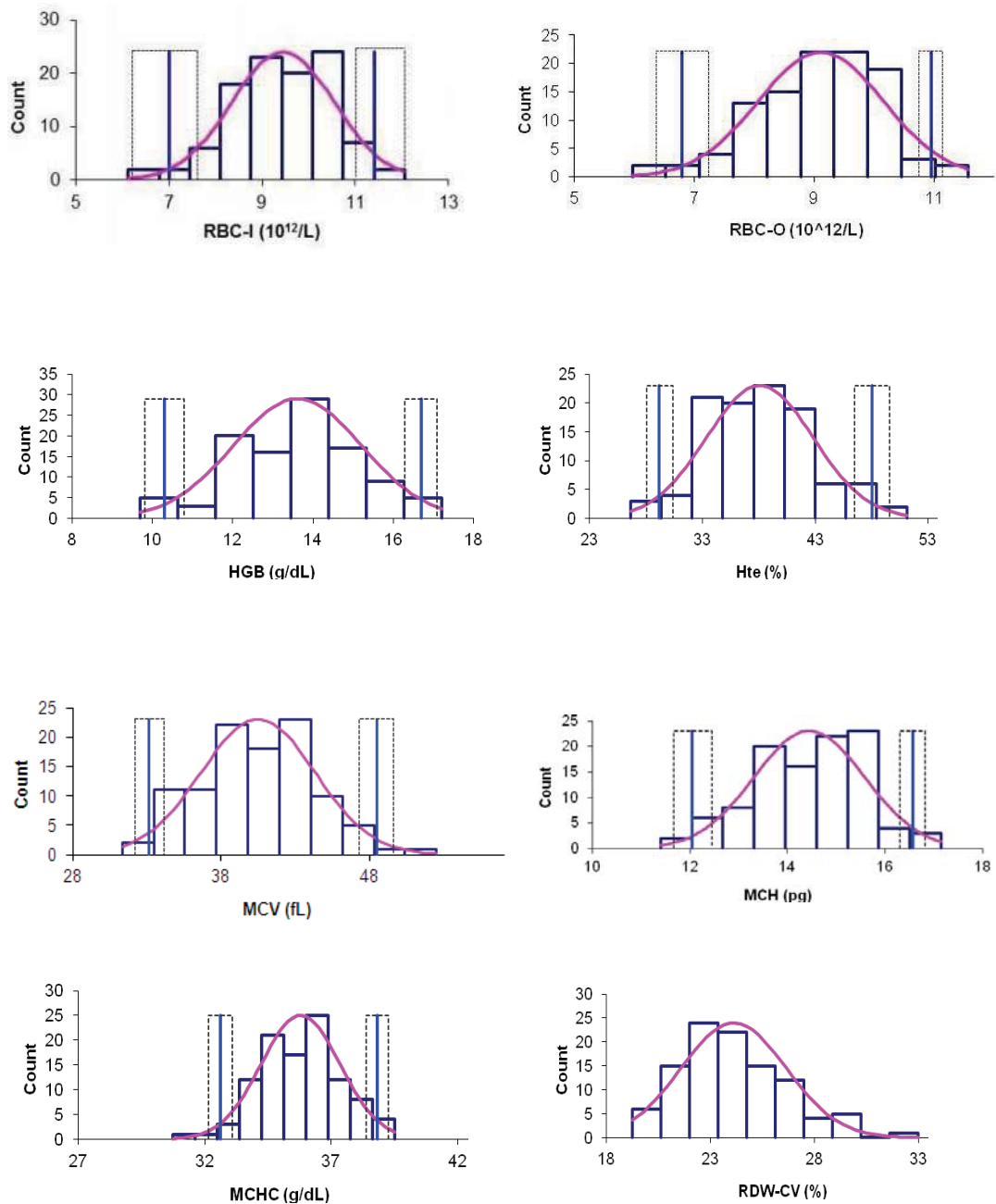


Figure n°2: Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les variables sanguines de la lignée rouge de 104 chats adultes sains. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé)

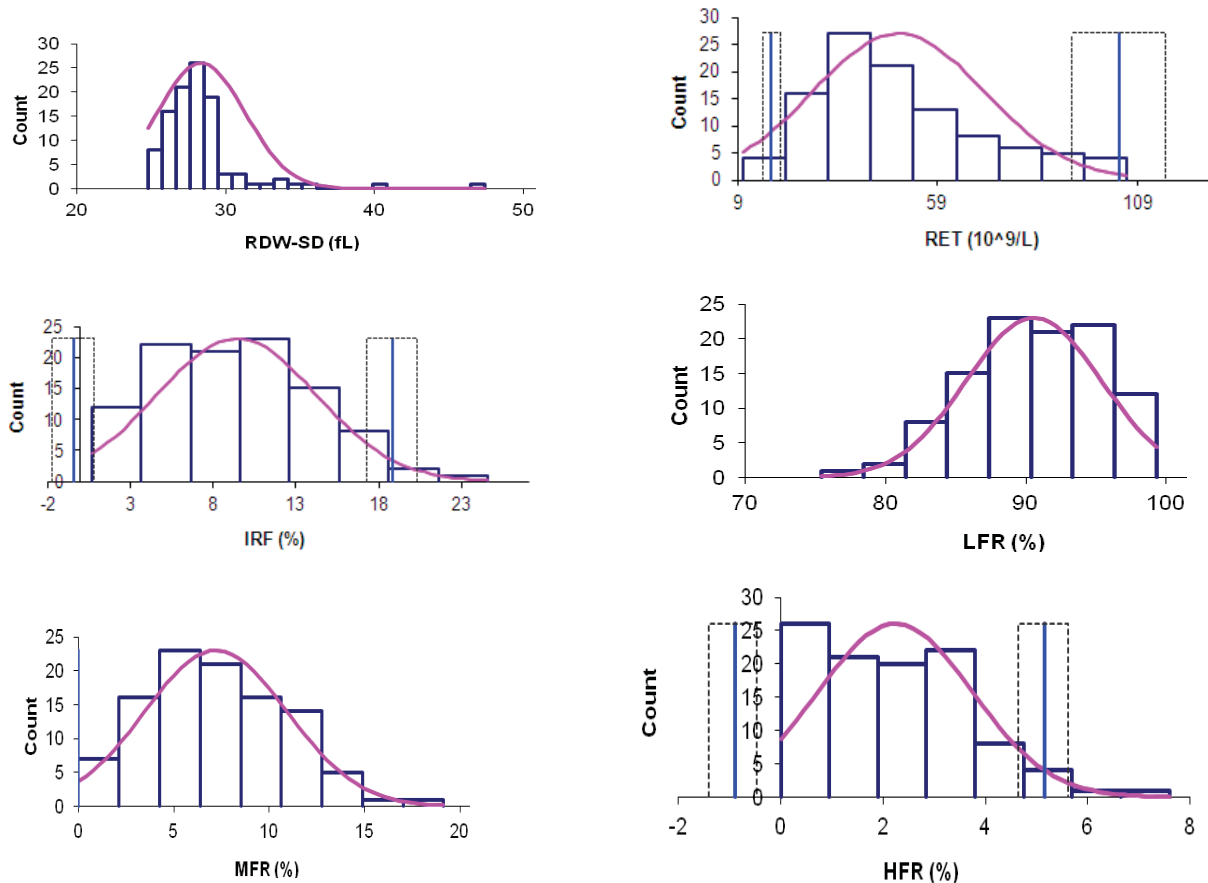


Figure n°2 (suite): Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les variables sanguines de la lignée rouge de 104 chats adultes sains. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé)

3.4.3. Intervalles de référence de la lignée blanche

Les intervalles de référence des analytes sanguins de la lignée blanche ont été obtenus à partir des prélèvements de 104 chats à la base, cependant, pour les chats n°86 et 87, les formules leucocytaires n'ont pas été établies par l'automate donc les intervalles de référence des neutrophiles, lymphocytes, monocytes et éosinophiles n'ont été fournis qu'à partir des données de 102 chats sains de notre échantillon.

Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau n°2 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV® pour les analytes sanguins de la lignée blanche.

Analytes	Unités	N	Moyenne	P	P	Quantile	Quantile 97.5
			Mediane	Natif	Box-C	2.5	
GB	10 ⁹ /L	104	9.33 8.62	0.003	0.984	3.70 (3.51-4.45)	18.66 (15.61-25.27)
Neutrophiles	10 ⁹ /L	102	3.98 3.37	0.000	0.821	1.45 (1.18-1.77)	9.62 (8.25-11.50)
Lymphocytes	10 ⁹ /L	102	4.32 4.19	0.010	0.443	1.18 (1.14-1.30)	10.36 (7.79-10.85)
Monocytes	10 ⁹ /L	102	0.32 0.28	0.000	0.740	0.09 (0.09-0.13)	0.82 (0.64-1.18)
Eosinophiles	10 ⁹ /L	102	0.65 0.54	0.000	0.198	0.16 (0.15-0.22)	1.81 (1.44-1.90)

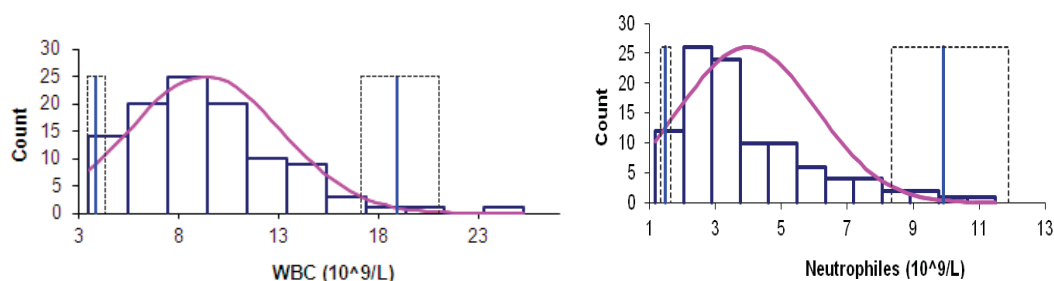


Figure n°3 : Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les variables sanguines de la lignée blanche. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé)

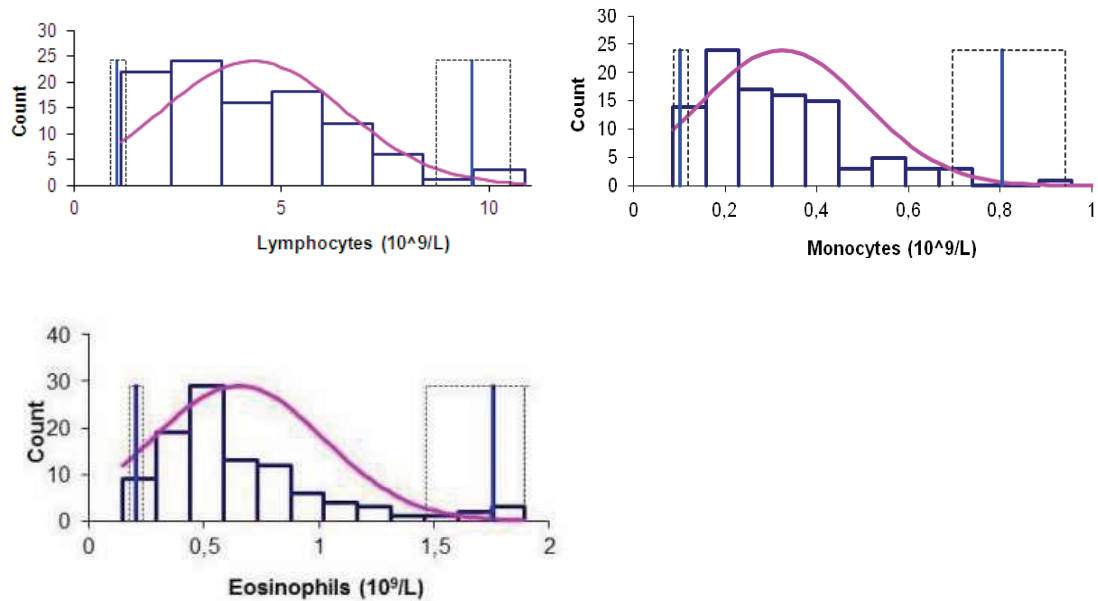


Figure n°3 (suite) : Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les variables sanguines de la lignée blanche. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé)

Les basophiles ne sont pas rapportés car il a déjà été montré que le Sysmex XT2000iV® n'était pas fiable pour cet analyte.

3.4.4. Intervalles de référence de la lignée plaquettaire

Les résultats de la lignée plaquettaire sont fournis d'une part, pour l'ensemble de la population de référence constituées de 104 chats sains (ou 103 pour PLT-O) et d'autre part, pour deux sous populations prenant en compte le degré d'agrégation sur le frottis sanguin.

En effet, l'analyse des frottis sanguins a permis de classer les échantillons selon deux sous-populations appelées d'une part NLA pour les échantillons peu ou non agrégés constituée de 55 individus et HA pour les échantillons fortement agrégés constituée de 49 individus.

Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau n°3 : Intervalles de référence établis avec l'analyseur Sysmex XT-2000iV® pour les analytes sanguins de la lignée plaquettaire

Analytes	Unités	N	Moyenne	P	P	Quantile 2.5	Quantile 97.5
			Médiane	Natif	Box-C		
PLT-I	10 ⁹ /L	104	138			16	354
		All	112	0.000	0.126	(3-32)	(304-520)
		55 (NLA)	186 180	0.291	0.789	39 (27-57)	417 (367-475)
		49 (HA)	84 62	0.000	0.531	10 (5-18)	280 (198-390)
PLT-O	10 ⁹ /L	103	205			40	446
		All	181	0.005	0.052	(29-54)	(384-620)
		54 (NLA)	270 268	0.176	0.133	72 (26-124)	457 (411-510)
		49 (HA)	134 106	0.000	0.929	35 (29-43)	425 (318-573)

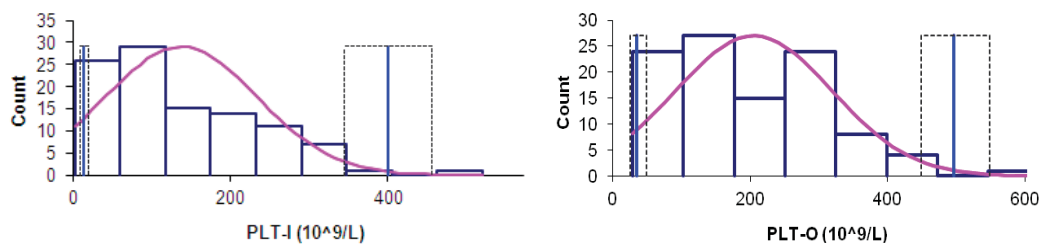


Figure n°4 : Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les variables sanguines de la lignée plaquettaire de 104 (ou 103 pour PLT-O) chats adultes sains. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé)

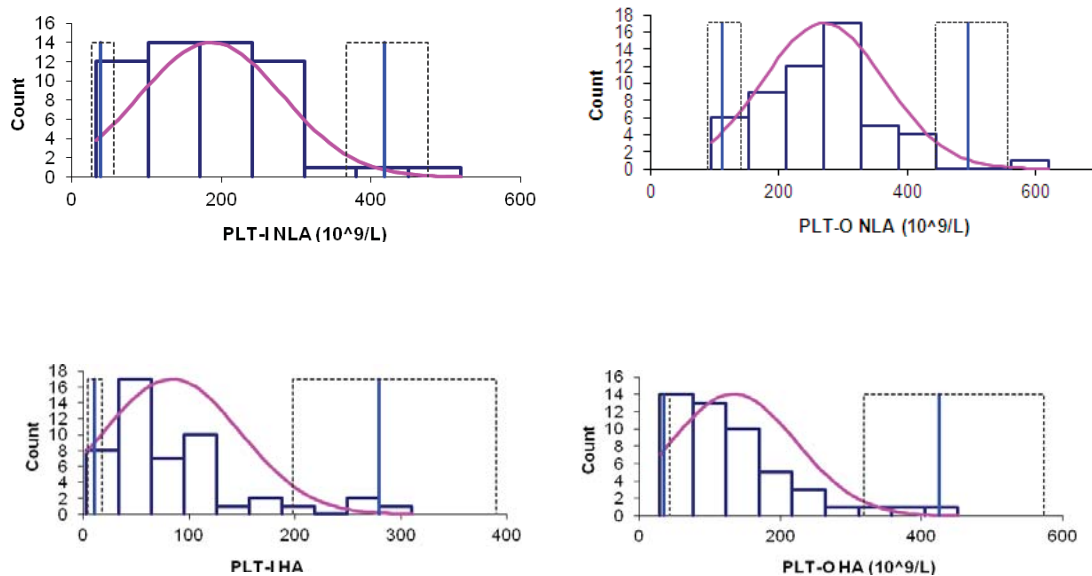


Figure n°4 (suite): Distributions observées (rectangles) et ajustées (courbe) pour les variables sanguines de la lignée plaquettaire de 104 (ou 103 pour PLT-O) chats adultes sains. Les droites verticales en trait plein représentent les limites de l'intervalle de référence (avec l'intervalle de confiance à 90% correspondant sous forme de droite en trait pointillé)

4. DISCUSSION

4.1. 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 » .

Dans cette étude, nous nous sommes attachés à trouver une population féline provenant de la région toulousaine qui répondait à la fois à nos critères de sélection et qui permettait de réaliser les analyses le jour même du prélèvement dans un délai très court. Il nous a semblé plus aisé de recruter ces chats aux consultations des cliniques des animaux de compagnie de l'ENVT essentiellement car l'échantillon est alors représentatif des chats médicalisés, présentés habituellement en consultation chez n'importe quel vétérinaire. Cependant, la nécessité d'avoir des chats « sains » a limité le recrutement à certains services tels que la reproduction ou la médecine préventive où les animaux ne sont en général pas présentés pour une altération de leur état de santé. Nous avons également recruté un grand nombre de chats appartenant à des élèves ou du personnel de l'école afin de pouvoir obtenir un échantillon de population le plus important possible.

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 patients. C'est la raison pour laquelle les animaux sélectionnés dans cette étude se répartissent dans une fourchette d'âges assez large. Cependant, les méthodes de recrutement ont amené à sélectionner une population relativement jeune en moyenne. En effet, comparativement aux chats qui peuvent être présentés en consultations de pratique féline, tous services confondus, ceux présentés en médecine préventive et reproduction sont plus jeunes. Le recrutement d'animaux âgés considérés « sains » selon les critères de l'étude en clinique vétérinaire semble plus difficile. De même, les chats d'étudiants ont souvent moins de 5 ans car ils sont fréquemment adoptés lors de l'arrivée des élèves à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ou durant leur cursus vétérinaire à l'école. Il semblait alors intéressant de recruter des chats dans des refuges, mais se posait alors le problème des commémoratifs et des antécédents médicaux qui avaient besoin d'être renseignés sur un mois précédent le prélèvement.

De même, le prélèvement d'animaux d'élevages aurait amenés à une trop forte prévalence des chats de race dans cette étude, pouvant conduire à un biais.

Comme nous l'avons présenté précédemment, notre population de référence était constituée à 94,2% de chats européens et à 5,8% de chats de race. Cette répartition semble relativement bien correspondre à la population féline française car 4,5% des chats sont déclarés comme étant de pure race par leurs propriétaires d'après une étude menée par la FACCO d'Octobre à Décembre 2010 [5]. Cependant, d'après cette étude, le trio de races les plus représentées est constitué des Siamois, Persans et Chartreux. Les Siamois et les Persans sont en effet bien représentés dans notre étude mais aucun chartreux n'est recensé.

4.2. Les facteurs préanalytiques

Le contrôle des facteurs pré-analytiques est essentiel pour minimiser leur effet éventuel sur les résultats chiffrés et donc sur l'interprétation clinique des résultats. Les conditions pré-analytiques ont donc été choisies en respectant les recommandations établies en biologie clinique vétérinaire pour la collecte et la manipulation des échantillons sanguins [16].

Les prises de sang ont été réalisées par des vétérinaires expérimentés sur des chats au repos n'ayant pas trop été manipulés auparavant afin de minimiser les variations physiologiques de numérations consécutives au stress ou à l'excitation de l'animal.

En effet, le facteur « stress » est très important chez le chat qui est une espèce possédant un pourcentage très important de leucocytes marginés, estimé à 70% [6]. De ce fait, l'augmentation du flux sanguin engendrée par le stress va entraîner les leucocytes marginés dans le « pool » circulant amenant à de grandes variations du nombre de leucocytes circulants et de la formule leucocytaire.

Cependant, toute tranquillisation visant à diminuer le stress est proscrite dans cette étude car la littérature rapporte également que les anesthésiques et/ou tout traitement médicamenteux peuvent influencer sur les mesures des variables hématologiques du chat [36].

De plus, les tubes collectés étaient immédiatement conduits au laboratoire pour une analyse dans un délai très court, inférieur à une heure, pour limiter les altérations possibles des spécimens inhérentes aux conditions de stockage.

4.3. Performances analytiques de l'analyseur

L'analyseur Sysmex XT-2000iV® utilisé dans cette étude a déjà été validé pour la majorité des analytes et index sanguins étudiés en routine chez le chat.

Cependant, pour certains analytes comme LFR, MFR, HFR, IFR, la validation n'a pas encore été faite dans cette espèce. Nous avons choisi de quand même rapporter les résultats pour ces 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 et anecdotiquement en hématologie vétérinaire.

Dans notre étude, la précision intra-laboratoire de l'analyseur sur sang humain a été satisfaisante. 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 fabriquant.

Cet analyseur réalise des mesures à la fois par cytométrie de flux et par variation d'impédance pour les numérations globulaires et plaquettaires. Il a déjà été constaté qu'il existait une excellente corrélation entre deux séries de mesures pour une méthode donnée mais une différence significative entre variation d'impédance et méthode optique sur le Sysmex XT-2000iV® [1][21]. Ceci justifie le fait que deux intervalles de références soient mis en place selon la méthode d'analyse utilisée.

4.4. Méthode de détermination des intervalles de référence

La détermination des intervalles de référence a été réalisée selon les recommandations de la méthode non paramétrique. Celle-ci est réalisable dans la mesure où le nombre total d'individus de référence est supérieur à 40 et que seul un très faible nombre de valeurs aberrantes est mis en évidence sur les distributions initiales ou transformées. Une détermination complète des IR aurait dû être réalisée en constituant des groupes de partition selon l'âge, le sexe ou la race de l'animal, mais au final 80 individus a minima pour chaque groupe de partition auraient du être recrutés, ce qui aurait représenté un travail beaucoup plus long que nous n'avons pas eu le temps de réaliser. De ce

fait, nous ne pouvons pas réellement étudier l'influence de ces facteurs sur les valeurs de référence hématologiques que nous avons établies.

4.5. Comparaison des intervalles de référence déterminés dans cette étude avec les données de la littérature

Les IR en hématologie féline les plus cités encore à l'heure actuelle dans la littérature vétérinaire sont originaires d'ouvrages publiés en 1986 [6]. Les auteurs ne connaissaient pas les recommandations internationales depuis éditées. De plus, les conditions pré-analytiques et analytiques, les caractéristiques de la population de chats de référence et les procédures statistiques n'étaient pas reportées. Ces premiers intervalles de référence publiés ont été établis grâce à la méthode manuelle. Cependant, les performances techniques des automates d'hématologie ont été grandement améliorées depuis l'établissement de ces intervalles de référence, ce qui a justifié plusieurs mises à jour de leur détermination. Des intervalles de référence ont alors été publiés en 1999 à partir d'automates d'hématologie utilisant la cytométrie de flux [24]. Et enfin, une nouvelle tentative a été publiée récemment, en 2004, avec l'analyseur ADVIA120® et est fondée sur une population de référence, limitée, trop faible pour utiliser au mieux la méthode non paramétrique recommandée.

Les différents intervalles de référence référencés de nos jours en hématologie féline, et ceux établis dans notre étude sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°4 : Intervalles de référence en hématologie féline existant dans la littérature comparés à aux Intervalles de référence établis dans notre étude avec le Sysmex XT-2000iV.

Analytes	Unités	Moritz ¹	Jain ²	Tvedten ³	Kraft et al. ⁴	Intervalles obtenus dans notre étude	
RBC	10 ¹² /L	5,92-11,16	5,0-10,0	6,12-11,86	5-10	RBC-O	6,58-10,95
						RBC-I	6,72-11,39
HGB	g/dL	8,17-15,26	8,0-15,0	9,01-15,59	9,02-14,98	9,8-16,9	
HTE	L/L	0,24-0,46	0,24-0,45	0,29-0,50	0,30-0,44	0,29-0,48	
MCV	fL	37,0-55,0	39,0-55,0	41,9-54,8	40-55	33,6-48,3	
MCH	pg	11,3-17,2	-	12,57-17,56	12,89-16,11	12,1-16,6	
MCHC	g/dL	26,2-35,9	31,0-35,0	28,10-31,99	30,61-35,44	32,9-39,1	
RDW-CV	%	13,8-21,1	-	14,2-17,6	-	19,6-29,9	
RET	10 ⁹ /L	3,7-94,0	-	-	0-60	14,1-104,5	
GB	10 ⁹ /L	7,73-18,60	5,50-19,50	4,87-20,10	6-18	3,70-18,66	
Neutrophiles	10 ⁹ /L	3,14-12,52	2,50-12,80	2,5-12,5	3,0-11,6	1,45-9,62	
Lymphocytes	10 ⁹ /L	1,31-7,46	1,50-7,00	1,5-7,0	1,0-4,0	1,18-10,36	
Monocytes	10 ⁹ /L	0,13-1,08	0,00-0,85	0,00-0,85	0,04-0,50	0,09-0,82	
Eosinophiles	10 ⁹ /L	0,06-2,21	0,00-1,50	0-1,50	0,04-0,60	0,16-1,81	
PLT	10 ⁹ /L	42-630	300-800	230-680	180-550	PLT-I	16-354
						PLT-O	40-446

1. données obtenues avec l'ADVIA 120®

2. données obtenues avec la méthode manuelle

3. données obtenues avec le Technicon H*1® (PLT n'incluse que les échantillons sans agrégat plaquettaire)

4. données RBC et GB obtenues avec le Cell-Dyn 3500®, PLT par hemocytomètre et la formule leucocytaire et RET par méthode manuelle

Comme indiqué dans le tableau n°4, la plupart des intervalles étaient relativement similaires à ceux obtenus dans notre étude. Cependant, il existe des différences qui peuvent être attribuées à la

différence des techniques utilisées par les automates d'une part mais aussi à un manque de précision des intervalles précédemment publiés à cause du faible nombre d'individus de référence.

Nous allons donc voir quelles sont les différentes méthodes de comptage employées pour la réalisation de ces différents intervalles de référence et si elles peuvent expliquer les différences observées ou non.

La méthode manuelle est un gold-standard. Il s'agit d'une méthode relativement rapide et fiable. Cependant, les résultats dépendent fortement de la qualité du frottis analysé, de l'expérience du lecteur et sont influencés par la zone du frottis qui est examinée, le nombre de cellules comptées et le nombre de chaque type cellulaire présent sur le frottis. De plus, la lecture d'un frottis en vue d'un comptage cellulaire nécessite un lecteur ayant beaucoup d'expérience connaissant les spécificités hématologiques du chat précisément et capable d'identifier toutes les anomalies potentiellement présentes sur le frottis. De plus, cette méthode donne des résultats moins précis et exacts à cause du faible nombre de cellules analysées pour chaque échantillon par rapport aux méthodes automatisées où des milliers de cellules sont comptées pour chaque échantillon. De ce fait, les intervalles de référence obtenus par cette méthode sont peu précis.

Nous n'avons pas trouvé, dans la bibliographie, d'intervalle de référence en hématologie féline déterminé sur un automate utilisant la variation d'impédance.

Les intervalles de référence suivants ont été établis avec des automates d'hématologie utilisant la cytométrie de flux afin de compter et d'identifier les différentes cellules sanguines d'un échantillon. Les cellules sanguines passent à travers un faisceau laser et absorbent ou dispersent la lumière. L'interruption du faisceau laser au passage des cellules permet de les compter, alors que la dispersion de ce même faisceau permet de déterminer leur taille, leur granulosité et leur densité. La concentration en hémoglobine est mesurée par spectrophotométrie. Ces automates ont l'avantage de distinguer plus précisément les différents types cellulaires que les autres automates et sont donc particulièrement utiles pour la distinction entre les plaquettes et les hématies chez le chat. Les plaquettes de grande taille sont identifiées en tant que telles car leur indice de diffraction est nettement différent de celui des hématies malgré des tailles cellulaires proches. Cependant, les agrégats plaquettaires ne sont pas pris en compte ou parfois comptés comme des leucocytes, ce qui peut entraîner des biais.

Les intervalles de référence mesurés ensuite ont été déterminés grâce à des automates d'hématologie associant plusieurs techniques telles que la variation d'impédance, la cytométrie de flux et la fluorescence optique. Ces automates sont les plus perfectionnés disponibles en

hématologie vétérinaire. De ce fait, les variations entre les intervalles de référence obtenus sont essentiellement attribuables aux conditions pré-analytiques et analytiques, aux caractéristiques de la population de chats de référence et aux procédures statistiques utilisées.

Les résultats obtenus pour la numération plaquettaire sont difficilement évaluables en raison du fort degré d'agrégation rapporté pour de nombreux échantillons de cette étude. La numération plaquettaire semble être la plus imprécise chez le chat, quelle que soit la méthode hématologique employée.

La numération des granulocytes basophiles n'a pas été rapportée dans cette étude parce que des études précédentes ont démontré le très faible accord entre les résultats du Sysmex XT-2000iV® et la méthode manuelle. Un tel écart a déjà été observé avec l'ADVIA 120® et l'analyseur CELL-DYN® [22].

CONCLUSION

Les intervalles de référence pour les analytes et index hématologiques calculés ont été déterminés selon les recommandations internationales à partir d'un échantillon de chats bien caractérisé, avec des procédures de contrôles pré-analytiques et analytiques bien définies. Ils pourront être directement utilisés par des laboratoires possédant le même automate et une population d'animaux supposés malades présentant des caractéristiques démographiques similaires à celle des individus de référence utilisés.

Cependant, dans la plupart des cas, la population de patients analysés et les conditions pré-analytiques sont propres au laboratoire même. De ce fait, l'utilisation directe ne sera pas forcément envisageable et il sera probablement préférable d'utiliser des procédures de validation des intervalles déterminés dans cette étude.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussignée, *Cathy TRUMEL*, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *FAUCHON Emilie* intitulée « *Intervalles de référence de variables hématologiques du chat avec le Symex XT 2000iV pour des spécimens collectés dans des microtubes EDTA* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le
Docteur *Cathy TRUMEL*,
Enseignant chercheur
de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur *Alain MILON*




Vu :
Le Président du jury :
Professeur *Monique COURTADE SAÏDI*



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier 27 JUIN 2011
Professeur *Gilles FOURTANIER*




Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.


REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Bourgès-Abella N, Geffré A, Concordet D, Braun JP, Trumel C.**, Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Vet Clin Pathol.* 2011 Sep; 40(3): 303-15.
2. **CLSI**, Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. Third edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document C28-A3. Wayne, Pennsylvania, 2008.
3. **CLSI**, User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document EP15-A2. Second edition. Wayne, Pennsylvania, 2005.
4. **Concordet D, Geffre A, Braun JP, Trumel C.**, A new approach for the détermination of reference intervals from hospital-based data. *Clin Chim Acta.* 2009 Jul; 405(1-2): 43-8. Epub 2009 Apr 5.
5. **FACCO**, Chambre Syndicale des Fabricants d'Aliments pour Chiens, Chats, Oiseaux et autres animaux familiers. Homme et animal. Enquête FACCO/TNS SOFRES 2010 sur le Parc des Animaux Familiers Français. Available at : <http://www.facco.fr/-Population-animale->
6. **Feldman B.F, Zinkel J.G, Jain N.C.**, Schalm's veterinary hematology. Fifth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 2000, p3-11, 1057-1063, 1064-1068, 448-467.
7. **Gaston-Carrere S.**, Intervalles de référence hématologiques chez l'espèce canine avec l'analyseur XT-2000iV (Sysmex). Th D : Toulouse, 2009.
8. **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 Dec; 38(4):477-84. Epub 2009 May 15.
9. **Geffré A, Concordet D, Braun JP, Trumel C.**, Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol.* 2011 Mar; 40(1): 107-12.
10. **Geffré A., Friedrichs K., Harr K., Concordet D., Trumel C., Braun J.P.**, Reference values: a review. *Vet Clin Pathol.* 2009 Sep; 38(3): 288-98.
11. **Granat F.**, Comparaison de l'effet de différents agents antiagrégants sur le degré d'aggrégation plaquettaire et leur impact sur les comptages plaquettaires et leucocytaires dans des prélèvements sanguins de chat. Th D : Toulouse, 2009.
12. **Gräsbeck R., Saris NE.**, Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Lab Invest.* 1969; 26(Suppl.110): 62-63.

13. **Gräsbeck R.**, The evolution of the reference value concept. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42(7): 692-7.
14. **Harris EK, Boyd JC.**, On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem.* Feb 1990; 36(2): 265-270.
15. **Horn PS, Pesce AJ, Copeland BE.**, A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem.* 1998 Mar; 44(3): 622-31.
16. **Jain NC.**, Examination of the blood and bone marrow. In: Jain NJ, ed. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993; 1-18.
17. **Jørgensen LG, Brandslund I, Hyltoft Petersen P.**, Should we maintain the 95 percent reference intervals in the era of wellness testing? A concept paper. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42(7): 747-51.
18. **Kim YR, Ornstein L.**, Isovolumetric spherizing of erythrocytes for more accurate and precise cell volume measurement by flow cytometry. *Cytometry.* 1983 May; 3(6): 419-27.
19. **Kraft W, Dürr UM, Fürll M, et al.**, Referenzbereiche [Reference intervals]. In : Kraft W, Dürr UM, eds. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 5th ed. Stuttgart: Schattauer Verlag; 1999: 43-77.
20. **Lawler DF, Chase K, Teckenbrock R, Lark KG.**, Heritable components of feline hematology, clinical chemistry, and acid-base profiles. *J Hered.* 2006 Nov-Dec; 97(6): 549-54. Epub 2006 Dec 8.
21. **Lilliehöök I, Tvedten H.**, Validation of the sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats and horses. I. Erythrocytes, platelets and total leukocyte counts. *Vet Clin Pathol.* 2009 Jun; 38(2): 163-74. Epub 2009 Apr 6.
22. **Lilliehöök I, Tvedten H.**, Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. *Vet Clin Pathol.* 2009 Jun;38(2):175-82. Epub 2009 Apr 6.
23. **Meinkoth J, Clinkenbeard K.** Normal hematology of the cat In: Feldman BF ZG, Jain NC, et al., ed. *Schalm's Veterinary Hematology*. Fifth edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000;811-820.
24. **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.
25. **NCCLS**, Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. Document EP9-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
26. **Norman EJ, Barron RC, Nash AS, Clampitt RB.**, Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell Counts. *Vet Clin Pathol.* 2001; 30(3): 124-132.
27. **O'Brien M, Murphy MG, Lowe JA.**, Hematology and clinical chemistry parameters in the cat (*Felis domesticus*). *J Nutr.* 1998 Dec; 128(12 Suppl): 2678S-2679S.
28. **Osselaer JC, Jamart J, Scheiff JM.**, Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. *Clin Chem.* 1997 Jun

- 29. Rebar AH, MacWilliams PS, Feldman BF, Metzger FL, Pollock RVH, Roche J.,** Guide to hematology in dogs and cats. IDEXX Laboratories. Teton NewMedia. 2002, 264.
- 30. Reference Value Advisor macroinstructions.** Available at: <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63>.
- 31. Reynolds BS, Boudet KG, Faucher MR, Germain C, Geffre A, Lefebvre HP.,** Comparison of a new device for blood sampling in cats with a vacuum tube collection system - plasma biochemistry, haematology and practical usage assessment. *J Feline Med Surg.* 2007 Oct; 9(5): 382-6. Epub 2007 May 10.
- 32. Reynolds BS, Boudet KG, Germain CA, Braun JP, Lefebvre HP.,** Determination of reference intervals for plasma biochemical values in clinically normal adult domestic shorthair cats by use of a dry-slide biochemical analyzer. *Am J Vet Res.* 2008 Apr; 69(4): 471-7.
- 33. 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.
- 34. Sysmex XT-iV Series.** Available at: <http://www.sysmex-europe.com/index.asp?id=245>
- 35. Tvedten H.,** General laboratory concepts. In : Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH, eds. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods.* 4th ed. Philadelphia, PA : Saunders ; 1999 : 1-10
- 36. Vaucoret S.,** Influence de la contention chimique par un protocole ketamine – diazepam sur les analytes sanguins chez le chat. Th D : Toulouse, 2008.
- 37. Virtanen A, Kairisto V, Uusipaikka E.** Regression-based reference limits: determination of sufficient sample size. *Clin Chem.* 1998 Nov; 44(11): 2353-8.
- 38. Wassmuth AK, Riond B, Hofmann-Lehmann R, Lutz H.,** Evaluation of the Mythic 18 hematology analyzer for use with canine, feline, and equine samples. *J Vet Diagn Invest.* 2011 May; 23(3): 436-53.
- 39. Weiser MG, Kociba GJ.,** Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. *Am J Vet Res.* 1984 Mar; 45(3): 518-22.
- 40. Weissenbacher S,** Evaluation of the Sysmex XT-2000iV hematology instrument for use with feline blood. Th D : Zurich 2009
- 41. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A.,** Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hematol.* 2007 Feb; 29(1): 4-20.
- 42. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A.,** Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol.* 2007 Feb; 29(1): 21-41.
- 43. Zelmanovic D, Hetherington EJ.,** Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol.* 1998; 27(1): 2-9.

ANNEXES

	<p align="center">Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 295; mail : a.geffre@envt.fr</p>	<p align="center"><u>Annexe 1</u> Formulaire de consentement éclairé</p>
<p align="center">Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques mesurées par le Sysmex XT2000iV® et le Procyte DX® pour des spécimens sanguins collectés dans des microtubes contenant de l'EDTA chez le chat et comparaisons des résultats obtenus sur des microtubes contenant du CTAD</p>		

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

Le but de cette étude est d'établir les intervalles de références des variables hématologiques mesurées par deux automates différents pour des prélèvements sanguins réalisés sur des tubes de petit volume contenant différents antiagrégants plaquettaires chez le chat, afin de limiter les volumes sanguins prélevés et améliorer la précision des résultats des hémogrammes obtenus en pratique dans l'espèce féline.

Un dépistage gratuit de la leucose féline (FeLV) et le syndrome d'immunodéficience féline acquise (FIV) sera offert à chaque animal participant à l'étude.

Je, soussigné(e)

Propriétaire du chat

Atteste avoir été clairement informé 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 chat rentre dans l'étude.

Et accepte que mon chat soit inclus dans l'étude

À Toulouse, le

Signature

Etiquette du dossier



Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée

ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614

31076 Toulouse Cedex 3, France

☎ : +33 561 193 295; mail : a.geffre@envt.fr

Annexe 2

Feuille
d'accompagne
ment

Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques mesurées par le Sysmex XT2000iV® et le Procyte DX® pour des spécimens sanguins collectés dans des microtubes contenant de l'EDTA chez le chat et comparaisons des résultats obtenus sur des microtubes contenant du CTAD

Etiquette du dossier

N° étude :

Résultats dépistage :
FeLV : _____ et FIV : _____

Vaccination (date et nature du dernier vaccin) : _____

Vermifugation (date et nature de la dernière) : _____

Antécédents médicaux : _____

Date et nature du dernier traitement médical administré à votre chat :

Comportement.

Appétit : Polyphagie Normal Faible Anorexie

Miction/ défécation : Normal Anormal : _____

Évaluation générale En forme Baisse d'activité/de forme

Aspect extérieur Normal Anormal : _____

Température rectale T°C = _____

Couleur des muqueuses Rosées Autre : _____

Auscultation cardiaque FC = bpm Anomalie : _____

Auscultation pulmonaire FR = mpm Anomalie : _____


Palpation des NII Normaux Taille augmentée

Palpation abdominale Normale Anormale : _____

Présence d'un critère d'exclusion OUI NON

Toute anomalie soulevant un doute sur l'état de santé de l'animal est un critère d'exclusion pour l'étude.

Difficulté du prélèvement : 1 2 3 4 5

	<p align="center">Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France : +33 561 193 831; mail : c.trumel@envt.fr</p>	<p align="center"><u>Annexe 3</u> Protocole</p>
<p align="center">Etablissement des intervalles de référence des variables hématologiques mesurées par le Sysmex XT2000iV® pour des spécimens sanguins collectés dans des microtubes contenant de l'EDTA chez le chat</p>		

1 Problématique et objectifs

L'hémogramme fait partie des analyses classiques nécessaires au diagnostic d'une affection chez un animal malade. Cependant, il est très difficile d'obtenir des numérations plaquettaires et leucocytaires automatisées fiables chez le chat, cette espèce étant notamment très sensible à l'agrégation plaquettaire *in vitro* (Zelmanovic, 1998). La proximité de taille entre les plaquettes et les hématies dans cette espèce est également une difficulté analytique non négligeable. Ainsi, différentes études ont montré que les automates d'hématologie ont tendance à surestimer les thrombopénies chez le chat (Norman, 2001 et Tasker, 1999). Les conditions pré-analytiques semblent également jouer un rôle clé chez le chat. Les conditions : (éviter le stress) et le mode de prélèvement (préférer la veine jugulaire, les aiguilles de grand diamètre, les tubes en plastique ; éviter les pressions négatives) (Mackin, 2006), l'anticoagulant (EDTA vs citrate vs CTAD...) et le délai prélèvement - analyse sont des facteurs qui ont fait l'objet de diverses études, tout comme la technique de comptage utilisée par les automates (cytométrie en flux vs variation d'impédance vs QBC).

Les microtubes capillaires, d'utilisation récente en médecine vétérinaire, semblent présenter un réel intérêt lors de prélèvements sanguins chez le chat, en raison de leur facilité d'utilisation et du faible volume de prélèvement nécessaire. (Reynolds, 2007) Mais si l'intérêt est réel lors d'analyses biochimiques, l'analyse hématologique semble plus délicate. Malgré leur facilité d'utilisation dans la pratique de routine, les différentes variables hématologiques mesurées par des automates d'hématologie n'ont encore été établies pour ce type de prélèvement.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer l'intervalle de référence concernant des variables hématologiques mesurées par un automate d'hématologie utilisant la cytométrie en flux : le SYSMEX XT2000iV®, à partir de prélèvements réalisés sur microtubes contenant de l'EDTA dans l'espèce féline.

2 Personnes impliquées

L'étude est effectuée et coordonnée par F. Granat, R. Froment et E. Fauchon, sous la responsabilité de C. Trumel, avec l'assistance de :

- C. Trumel : préparation du protocole, interprétation des résultats
- J.P. Braun : traitement et analyse des résultats

- F. Granat : préparation du protocole, examen clinique des animaux, réalisation des prélèvements, et interprétation assistée des résultats
- R. Froment, ML. Theron : réalisation des analyses et interprétation assistée des résultats
- E. Fauchon : recrutement et préparation des chats
- J.Mortier : examen clinique des animaux, réalisation des prélèvements réalisation des analyses
- H. Thibert assistée par N. Bourges-Abella : lecture des frottis sanguins
- P. Rouch-Buck, V. Pujol : recrutement et examen clinique des animaux

3 Période et durée de l'étude

D'octobre 2010 à Juin 2011

4 Protocole expérimental

4.1 Recrutement des animaux

Le plus grand nombre de prélèvements possible sera effectué sur la période donnée.

Les critères d'inclusion des animaux sont les suivants :

- Chat âgé de plus de six mois
- Animal en bonne santé d'après les propriétaires, sans affection connue le jour de leur inclusion dans le protocole, ne présentant pas d'anomalies à l'examen clinique (cf. annexe 2) et ayant eu un test FeLV et FIV.
- Animal présenté en consultation vaccinale à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ou amené par leur propriétaire (personnel administratif ou étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) sur la base du volontariat.

Les animaux sont inclus uniquement après une complète information du propriétaire associée à la signature du « Formulaire de consentement éclairé » (annexe 1).

4.2 Identification des animaux

Chaque chat sélectionné pour l'étude aura une fiche d'accompagnement du prélèvement sur laquelle sera inscrit le nom du propriétaire, son numéro de dossier, son numéro d'identification pour l'étude (annexe 2) et des fiches d'analyse (annexe 3, 4 et 5). Pour préserver l'anonymat, les chats sont identifiés de la façon suivante ; « de 1 à X », et seul leur numéro d'étude sera mentionné sur les résultats d'analyses.

4.3 Modalités de recrutements des animaux

Chaque chat est examiné pendant la consultation vaccinale par P. Rouch-Buck, V. Pujol ou à leur arrivée par F. Granat en cas de consultation non vaccinale (propriétaires venus sur la base du volontariat). On procède à un examen clinique complet (annexe 2).

Un dépistage de la leucose féline et du syndrome d'immunodéficience acquise est également réalisé (test sur sang total EDTA, Rapid FIV Ab/FelV Ag, KITVIA).

4.4 Critères d'exclusion des animaux

Les critères d'exclusion des animaux sont les suivants :

- Un animal ayant pris un traitement durant le mois précédent la consultation excepté un traitement antiparasitaire externe.
- Un animal ayant souffert d'une quelconque affection durant le mois précédent la consultation.
- Un animal avec anomalie détectée à l'examen clinique.
- Un animal ayant eu un résultat positif au dépistage de la leucose féline et du syndrome d'immunodéficience acquise au cours de sa vie ou à celui réalisé lors de la consultation comme précédemment décrit.

4.5 Réalisation des prélèvements

4.5.1 Site du prélèvement :

La prise de sang est réalisée sur un membre antérieur, à la veine céphalique accessoire. Le prélèvement est réalisé par P. Rouch-Buck, V. Pujol ou F. Granat.

4.5.2 Conditions pré-analytiques

Aucune précaution particulière n'est prise pour la réalisation du prélèvement afin de reproduire les conditions réelles obtenues lors d'une consultation courante chez un vétérinaire. Seule une contention usuelle adaptée à l'animal est réalisée. Une cotation semi-quantitative est utilisée pour caractériser la difficulté de réalisation du prélèvement. Cette cotation est comprise entre 1 et 5, 1 qualifiant une prise de sang réalisée dans des conditions idéales (l'animal semble avoir été peu stressé, n'a pas bougé lors de la réalisation du prélèvement etc...).

4.5.3 Matériel utilisé

Les tubes sont préparés au laboratoire par R. Froment :

- Un microtube collecteur contenant de l'EDTA (0,5 ml K3E K3EDTA, Minicollect®, Greiner-bio-one, Kremsmünster, Austria), identifié pour chaque chat « n° CTxEDTA », et associé à un capillaire de 80 µl (capillary tube 80 µl for EDTA, Minicollect®, Greiner-bio-one, Kremsmünster, Austria).

- Une aiguille de 23G (0,6 x 25 mm, 23G, NEOLUS®, Terumo) est posée dans la veine céphalique. Un capillaire connecté au microtube correspondant est ensuite placé à l'extrémité de l'aiguille afin de le remplir (capillary tube 80 µl for serum, Minicollect®, Greiner-bio-one ou capillary tube 80 µl for EDTA, Minicollect®, Greiner-bio-one, Kremsmünster, Austria).

Les spécimens sont ensuite homogénéisés par 10 retournements lents. Chaque tube est identifié selon la procédure mentionnée précédemment. L'heure du prélèvement est notée sur la feuille d'accompagnement du chat.

5 Analyses

5.1 Contrôles de qualité

Le Sysmex XT2000iV® (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany) est contrôlé chaque matin par C. Germain, F. Palanché, C. Marche ou R. Froment selon le protocole de routine du laboratoire :

Des sangs de contrôle sont analysés. Si une ou plusieurs mesures de contrôle est (sont) en dehors des cibles fournies par le fabricant, les diverses opérations correctrices prévues par le fabricant sont mises en œuvre pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème et obtention des résultats de contrôles dans les cibles.

5.2 Critères d'exclusion au laboratoire

Sont exclus de l'étude :

- les tubes n'ayant pas un volume de sang prélevé suffisant ou un volume trop important (+/- 5 %, les limites sont indiquées par des repères préalablement ajoutés sur les microtubes).

-Les tubes de sang présentant un caillot macroscopique

5.3 Procédures effectuées sur chaque spécimen

Dès leur arrivée au laboratoire, tous les spécimens sont placés pendant 20 minutes sur l'agitateur (Speci Mix®, Oxford, CT06478 USA). Les analyses sont faites selon les modalités suivantes :

Une analyse en duplicate, après 30 retournements, sera effectuée sur le Sysmex XT2000iV®. Les analyses seront identifiées de la façon suivante : S1EDTAX, S2EDTAX (X étant le n° d'étude de l'animal). Il sera reporté sur la feuille d'analyse (annexe 3) de l'animal : l'heure de réalisation ainsi que les différentes variables mesurées par le Sysmex XT2000iV®.

Un microhématocrite manuel sera également réalisé (tubes micro-hématocrite, verre de soude, BRIS®, Vitrex medical et Haematokrit 2010®, Hettich Zentrifugen) pour chacun des tubes, et noté sur la feuille d'analyse correspondante donnée par le Sysmex XT2000iV® puis dans la feuille récapitulative des résultats (annexe 3).

Des frottis sanguins sont également réalisés en duplicate et identifiés de la façon suivante : 1EDTAX, 2EDTAX (X étant le n° d'étude l'animal). Ces frottis sont colorés, montés puis conservés dans une boîte prévue pour l'étude. Ils sont tous lus selon la procédure présentée en annexe 6, à la fin des analyses effectuées pour un animal donné par R. Froment et F. Granat. Les résultats concernant la formule leucocytaire et le degré d'agrégation plaquettaire sont reportés sur les fiches d'analyse de ce dernier (annexes 4 et 5).

Une photocopie de toutes les impressions des résultats de ces analyses ainsi que toutes les feuilles d'accompagnement sont conservées par R. Froment et F. Granat dans le cahier de manipulation qui leur a été remis. Un fichier Excel est rempli par R. Froment et F. Granat quotidiennement pendant toute la durée de l'étude.

6 Interprétation des résultats scientifiques – statistiques

Le fichier Excel est transmis par e-mail chaque semaine à C. Trumel et J.P. Braun. Les calculs statistiques sont effectués par JP Braun grâce au logiciel Excel, Analyse-It et Reference Value Advisor® (Geffre et al, in press).

Affiches pour le recrutement des chats (originales en format A3)

Votre chat est en bonne santé, vous êtes intéressé (e) par un dépistage **gratuit** de la leucose féline (*FeLV*) et du syndrome d'immunodéficience acquise (*FIV*) ?

Pour plus d'informations, n'hésitez pas à contacter Emilie Fauchon.
e.fauchon_06@envt.fr / 0670537934



Merci par avance pour nos amis félins,
L'équipe de biologie médicale

Votre chat est en bonne santé, vous êtes intéressé (e) par un dépistage **gratuit** de la leucose féline (*FeLV*) et du syndrome d'immunodéficience acquise (*FIV*) ?

Pour plus d'informations, n'hésitez pas à en parler à votre clinicien.



Merci par avance pour nos amis félins,
L'équipe de biologie médicale



Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée

ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614

31076 Toulouse Cedex 3, France

: +33 561 193 831; mail : c.trumel@envt.fr

Annexe 5

Estimation semi-quantitative de la formule leucocytaire et estimation de la taille moyenne des agrégats plaquettaires d'après un frottis sanguin chez le chat

Réalisation du frottis sanguin :

Un frottis est réalisé, toujours par le même manipulateur, à partir des prélèvements sanguins obtenus selon le protocole principal, après leur passage dans l'analyseur Sysmex XT2000iV. L'étalement est effectué sur une lame porte objet en verre, lavée (Thermo scientific, Menzel-Gläser, lame porte-objet prête à l'emploi, ca/env 76x26mm) sur laquelle est déposée une petite goutte de sang à l'aide d'une pipette pasteur à usage unique. Cette goutte est ensuite étalée avec une lame rodée (Menzel-Gläser, lame à bords rodés, LRE, 50x20mm) positionnée à 45°. Le frottis est rapidement séché à l'air par agitation, sa qualité est vérifiée, une zone de lecture doit clairement être présente, puis ce dernier est directement identifié selon la nomenclature détaillée dans le protocole principal.

La coloration du frottis s'effectue de façon automatique par un automate dédié à cette fonction (Aerospray®, Hematology slide stainer-cyto centrifuge, model 7150) utilisant une coloration de type May-Grünwald-Giemsa modifiée (une combinaison d'Aerofix® additive for metahol SS-148, Reagent B Thiazin stain SS-071B, Reagent C Eosin stain SS-071C, et de buffer (pH=7.2) concentrate SS-172A).

La lecture du frottis est uniquement réalisée à la fin de l'obtention de tous les résultats concernant un échantillon donné, par le même manipulateur et sous un unique microscope standard (Olympus BX60, oculaire Olympus Japan WH10X/22) tout au long de la manipulation.

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

Le lecteur procède à une première observation grossière du frottis à faible grossissement, x 100 soit à l'aide de l'objectif 10 (Olympus UPlanFI x 10 / 0.30, ∞ / -) puis x 200 soit à l'aide de l'objectif 20 (Olympus UPlanFI x 20 / 0.5, ∞ / 0.17), en insistant sur les bords du frottis, et notamment la queue du frottis, afin de prendre connaissance de l'existence ou absence d'amas

plaquettaires sur le frottis. Cette observation sera bien entendu mentionnée dans les résultats lors de l'estimation de la taille des agrégats plaquettaires.

Pour déterminer la taille moyenne des amas plaquettaires présents ou non sur le frottis, le lecteur va les scorer. Il suffit de donner une note aux amas observés sur un champ à l'objectif x 100 à immersion, et d'en faire une moyenne. Cette opération est répétée sur 10 champs, dont 5 étant choisis dans la queue du frottis et 5 autres sur les bords latéraux (3 en haut et 2 en bas)g b. La note est comprise entre 0 et 5 d'après le barème suivant d'après Norman et al, 2001:

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

Une taille moyenne des agrégats plaquettaires, lorsqu'ils existent, est enfin calculée à partir des données obtenues pour chacun des frottis et consignées dans l'annexe 4.

Estimation semi-quantitative de la formule leucocytaire :

Le lecteur se place sur un bord du frottis dans la zone de lecture, où les hématies sont disposées en monocouche et en contact pour la moitié d'entre elles. A fort grossissement, soit à l'objectif à immersion x 100, soit à grossissement x 1000, (Olympus UPlanFI x 100 / 1.30 oil), le lecteur procède au comptage et à la reconnaissance des leucocytes. La formule est réalisée sur 200 cellules et les résultats consignés dans l'annexe 5.

Exemple de résultat obtenu pour l'analyse HGB à l'aide du logiciel Reference Value Advisor

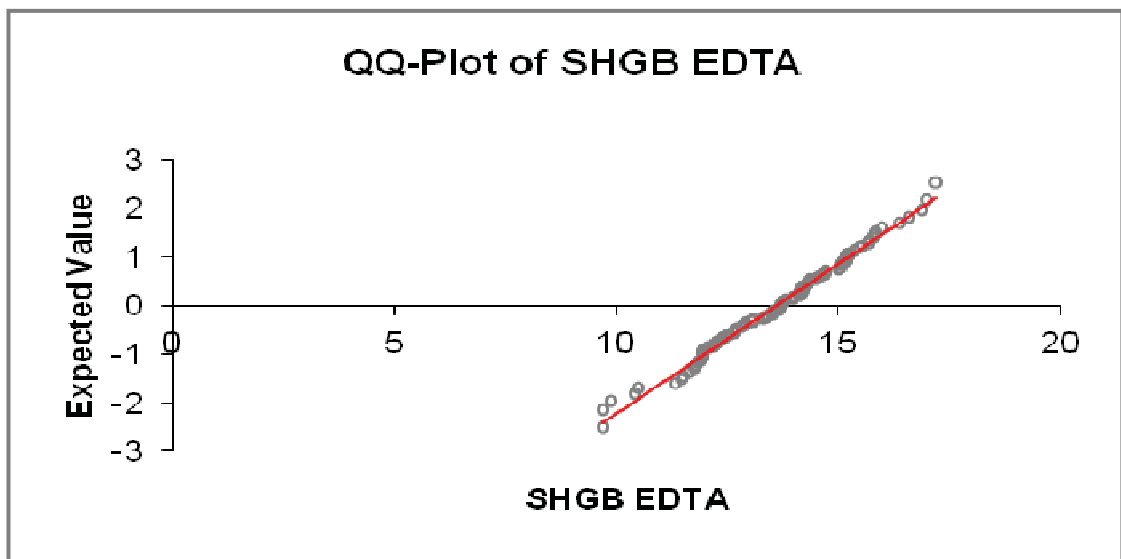
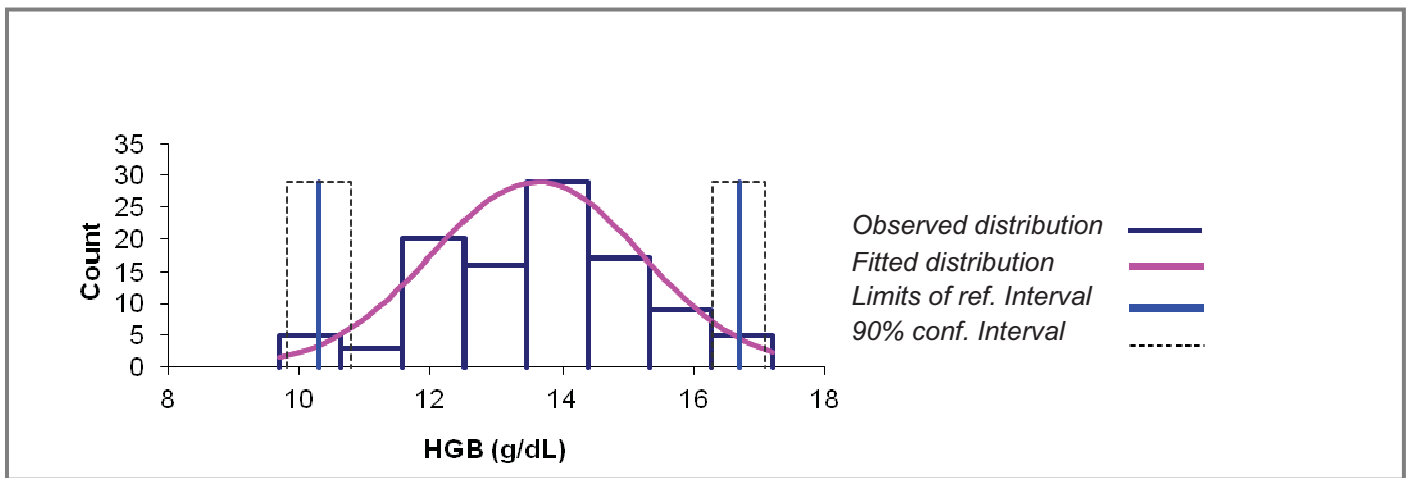
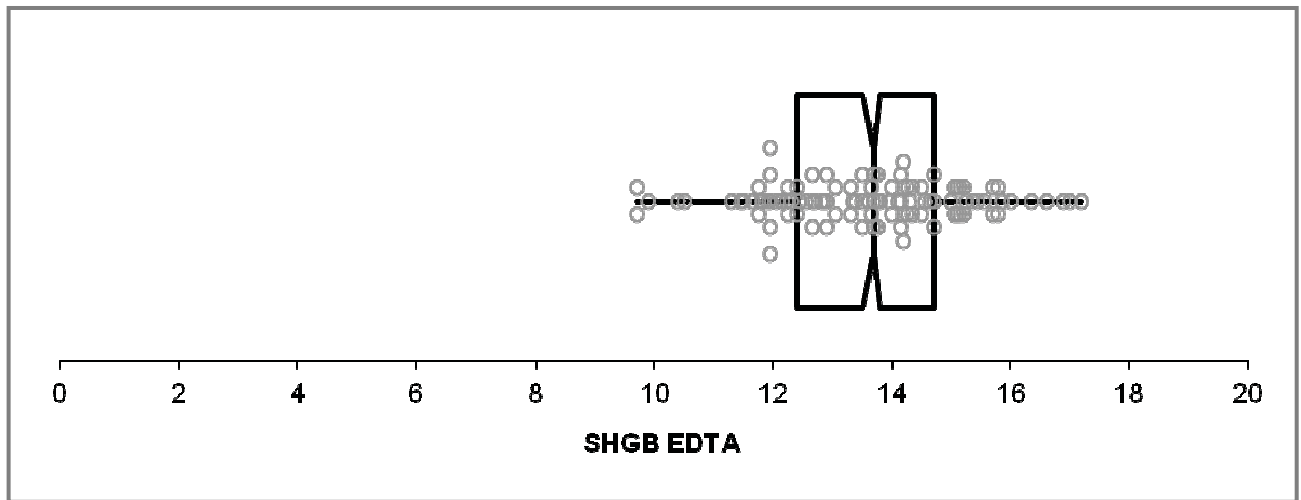
Reference Value Advisor v1.3	Results for SHGB EDTA				
				Date	12/10/2011
				Performed by	Clovis
	Untransformed data		Box-Cox transformed data		
Method	Standard	Robust	Standard	Robust	Nonparametric
N	104	104	104	104	104
Mean	13,6		314,3		
Median	13,7	13,6	315,3	314,3	
SD	1,6	1,6	31,1	31,3	
Minimum	9,7	9,7	241,6	241,6	
Maximum	17,2	17,2	387,1	387,1	
λ 1 coefficient Box-Cox			16,5	16,5	
λ 2 coefficient Box-Cox			1,872	1,872	
p-value Anderson-Darling	0,559	0,559	0,636	0,636	
Outliers Dixon					
Outliers Tukey	0	0	0	0	
Suspect data Tukey	0	0	0	0	
Lower limit of reference interval	10,4	10,4	10,3	10,3	9,8
Upper limit of reference interval	16,8	16,8	16,7	16,7	16,9
90% CI for lower limit	10,0	10,0	9,8	9,8	9,7
	10,8	10,9	10,8	10,8	11,3
90% CI for upper limit	16,4	16,4	16,3	16,3	15,9
	17,2	17,3	17,1	17,1	17,2

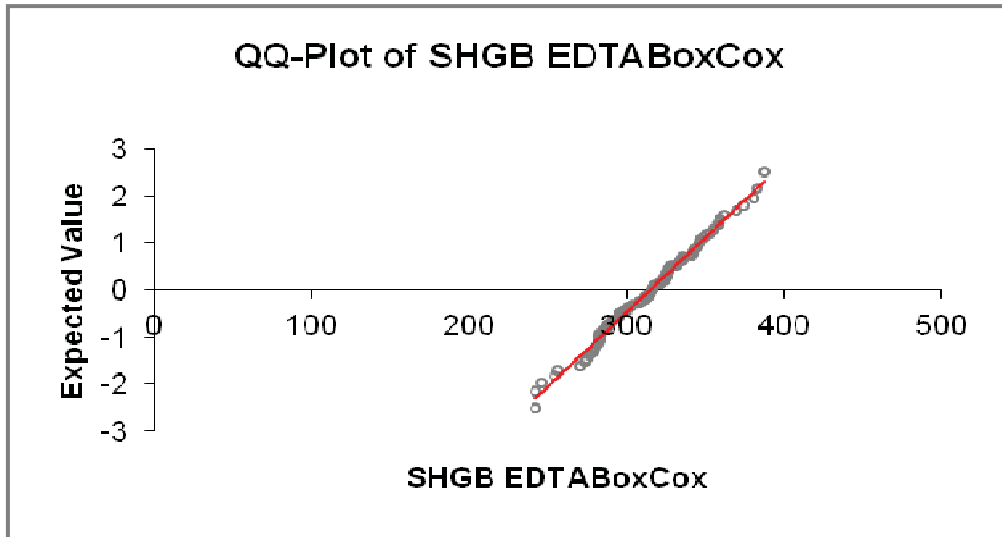
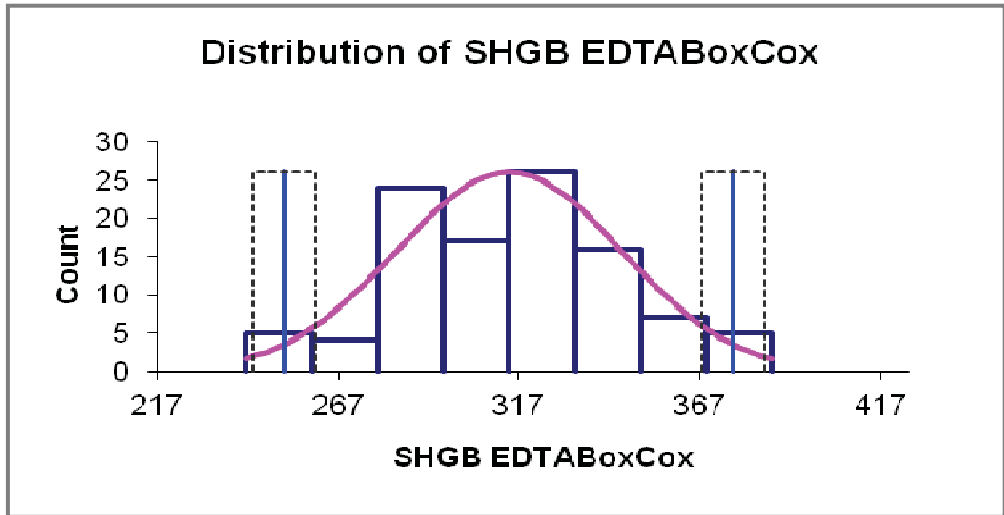
Comments

The sample size is large enough to compute the nonparametric reference interval : [9,8 ; 16,9].

The confidence intervals of the limits of the nonparametric reference interval was determined using a bootstrap method.

The 90% CI of one (or more) limit is larger than recommended in IFCC-CLSI C28-A3.





Toulouse, 2011

NOM : FAUCHON

PRENOM : Emilie

TITRE : ETABLISSEMENT DES INTERVALLES DE REFERENCE DES VARIABLES HEMATOLOGIQUES MESUREES PAR LE SYSMEX XT-2000iV® POUR DES SPECIMENS SANGUINS COLLECTES DANS DES MICROTUBES CONTENANT DE L'EDTA CHEZ LE CHAT

RESUME : Les intervalles de référence des variables hématologiques ont été déterminés chez 104 chats en bonne santé par une méthode non-paramétrique, conformément aux recommandations internationales. Les principaux résultats sont les suivants : [6,58-10,95].10¹²/L pour les globules rouges mesurés par cytométrie, [6,72-11,39].10¹²/L pour les globules rouges mesurés par impédance, [9,8-16,9]g/dL pour l'hémoglobine, [0,29-0,48]L/L pour l'hématocrite, [33,6-48,3]fL pour le VGM, [12,1-7,6]pg pour TCMH, [32,9-39,1]g/dL pour CCMH, [14,1-104,5].10⁹/L pour les réticulocytes, [3,7-18,66].10⁹/L pour les globules blancs, [1,45-9,62].10⁹/L pour les neutrophiles, [1,18-10,36].10⁹/L pour les lymphocytes, [0,09-0,82].10⁹/L pour les monocytes, [0,16-1,81].10⁹/L pour les éosinophiles, [40-446].10⁹/L pour les plaquettes mesurées par cytométrie, et [16-354].10⁹/L pour les plaquettes mesurées par impédance.

MOTS-CLES : Intervalle de référence – Chat – Féline – Hématologie – EDTA

ENGLISH TITLE : ESTABLISHMENT OF REFERENCE INTERVALS OF FELINE HEMATOLOGY VARIABLES WITH SYSMEX XT-2000iV® FOR BLOOD SPECIMENS COLLECTED IN EDTA MICROTUBES

ABSTRACT : Reference intervals of hematology variables were determined in 104 healthy cats with a nonparametric method according to international recommendations. Main results are : [6,58-10,95].10¹²/L for Red Blood Cells measured by cytometry, [6,72-11,39].10¹²/L for Red Blood Cells measured by impedance, [9,8-16,9]g/dL for Haemoglobin, [0,29-0,48]L/L for Hematocrit, [33,6-48,3]fL for Mean Corpuscular Volume, [12,1-7,6]pg for Mean Corpuscular Haemoglobin, [32,9-39,1]g/dL for Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration, [14,1-104,5].10⁹/L for Reticulocytes, [3,7-18,66].10⁹/L for White Blood Cells, [1,45-9,62].10⁹/L for Neutrophils, [1,18-10,36].10⁹/L for Lymphocytes, [0,09-0,82].10⁹/L for Monocytes, [0,16-1,81].10⁹/L for Eosinophils, [40-446].10⁹/L for Platelets measured by cytometry, and [16-354].10⁹/L for Platelets measured by impedance.

KEYWORDS : Reference intervals – Cat – Feline – Hematology – EDTA