

NOTES

TECHNIQUES ET REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS EN HÉMATOLOGIE

(manuscrit reçu le 21 juillet 1967)

RÉSUMÉ

Les auteurs ont déterminé les erreurs expérimentales qui entachent les résultats des numérations, résultats obtenus en pratique courante par le laboratoire d'hématologie; pour cela, ils ont calculé le coefficient de fidélité de chacune des techniques utilisées sur des couples de résultats donnés par des mesures répétées systématiquement.

Pour la numération des hématies dans une dilution de sang, et aussi pour celle des leucocytes, la technique automatique, s'avérant préférable (erreurs de 3 % et de 8 %, respectivement), a été substituée à l'observation visuelle d'une cellule hématimétrique (erreurs de 10 % et de 5,4 % respectivement).

Thrombocytes et réticulocytes sont toujours comptés à vue, en même temps, dans le même hématimètre, avec une précision médiocre.

Pour la formule leucocytaire, les résultats de nos cinq laborantines ne diffèrent pas statistiquement de façon significative; l'erreur relative expérimentale va de 10 % pour le taux des polynucléaires neutrophiles, à 60 % pour celui des polynucléaires éosinophiles comme pour celui des monocytes.

1 - INTRODUCTION

En matière de protection contre les dangers des rayonnements ionisants, un décret récent [1] prescrit, pour les travailleurs affectés ou occupés de façon habituelle à des travaux exécutés à l'intérieur de la zone contrôlée, en particulier, un examen hématologique approprié. Des recommandations qui datent d'une dizaine d'années [2] proposent de sanctionner les résultats de l'examen hématologique en classant les travailleurs en : « aptes », « en observation », « inaptes »; ces recommandations officielles précisent, avec raison, que : « seuls doivent être retenus les résultats confirmés par des examens successifs répétés ».

En effet, de nombreux facteurs conditionnent la variabilité des résultats chez un sujet en bonne santé; on peut les classer en physiologiques et expérimentaux. Nous avons déjà considéré les premiers [3] et les reprendrons bientôt. Nous avons également abordé les seconds [4, 5]; nous nous proposons aujourd'hui d'en faire une étude globale.

La précision des résultats doit être déterminée au moment de la mise au point de la technique qui les donne; par la suite, pour contrôler régulièrement cette précision, nous reprenons les résultats obtenus sans précautions particulières durant l'année écoulée.

Après avoir décrit sommairement le matériel et les techniques de mesure, indiqué le principe de la méthode d'interprétation statistique, nous exposerons et discuterons les résultats pour ce qui concerne les numérations d'éléments figurés du sang et la formule leucocytaire.

2 - MATÉRIEL ET TECHNIQUES DE MESURE

Nous comptons les érythrocytes et les leucocytes concurremment à l'aide d'un compteur automatique de globules et par l'examen au microscope des carrés d'une cellule hématimétrique.

2.1. - MATÉRIEL

Pour la numération automatique, un échantillon de sang dilué est aspiré à travers un orifice de cent microns de diamètre, où circule un courant électrique produit entre deux électrodes plongeant dans la solution. Le passage d'une cellule à travers l'orifice cause une augmentation de la résistance électrique à laquelle correspond une impulsion de tension dont l'amplitude varie avec le volume de la cellule. Après amplification et mise en forme, les impulsions, envoyées sur un circuit à seuil, ne sont comptées que si elles dépassent une valeur réglable; on peut ainsi discriminer et ne compter que les éléments qui dépassent une certaine dimension. L'appareil est réglé pour aspirer — en un temps donné — un demi-centimètre cube de solution, pour chaque numération.

Pour les numérations à vue, nous utilisons deux types d'hématimètre : la cellule de Malassez pour les numérations des éléments rouges et blancs, la cellule de Piette pour celles des plaquettes et des réticulocytes.

2.2 - TECHNIQUES DE MESURE

Nous prélevons le sang capillaire au lobule de l'oreille et le sang veineux au pli du coude, avec anticoagulant (Wintrobe ou citrate de sodium). Nous comptons systématiquement sur l'un et l'autre sang, à l'exception de la numération des plaquettes et de celle des réticulocytes, effectuées uniquement sur sang veineux.

a) Numérations automatiques

Nous partons d'un prélèvement de $0,02 \text{ cm}^3$ de sang dilué dans du sérum physiologique tamponné au pH de 7,2 — au $1/50\ 000$ pour le comptage des globules rouges et au $1/500$ pour celui des blancs; dans ce dernier cas, les hématies sont hémolysées par addition de saponine à 1%. Ainsi, les numérations sont établies sur les éléments contenus dans $1/100 \text{ mm}^3$ de sang pour les hématies, et dans 1 mm^3 de sang pour les leucocytes.

b) Numérations à vue

Nous comptons les érythrocytes sur quatre photographies qui représentent chacune quatre rectangles répartis sur la cellule hématimétrique remplie d'une solution au $1/500$.

Pour les leucocytes, nous prélevons le sang et le diluons au $1/20$ à l'aide de la pipette de Potain. La lecture porte sur un hématimètre complet, soit 2 mm^3 de la dilution, ou $0,1 \text{ mm}^3$ de sang.

Nous comptons les plaquettes et les réticulocytes sur cinquante carrés de la cellule de Piette, au microscope équipé d'un dispositif à contraste de phase, sur du sang silué au $1/30$.

c) Formule leucocytaire

Nous déterminons la formule leucocytaire par l'identification de 250 éléments répartis sur l'ensemble d'un étalement mince (cellules juxtaposées mais ne se chevauchant pas) coloré par la méthode du Giemsa lent, suivant une technique déjà décrite ici-même [5].

2.3 - MÉTHODE DE CALCUL D'ERREUR

Nous avons utilisé une méthode statistique qui permet, à partir de séries de mesures effectuées en double sur des individus différents, de déterminer l'erreur qui aurait été trouvée en répétant un grand nombre de fois le prélèvement sur le même individu.

A chaque résultat de mesure d'une variable x_i (x_i représentant par exemple un nombre de leucocytes) est attachée une erreur, e , qui dépend de la technique utilisée.

Si l'on fait en double chaque mesure de x_i sur des individus différents, on peut déterminer le coefficient de corrélation (r) qui traduit le degré de liaison entre les deux mesures de x_i et la variance observée des mesures (σ^2); on peut en déduire la variance due à l'erreur (σ_e^2) par la relation [6]:

$$r = 1 - \sigma^2/\sigma_e^2. \quad (1)$$

Connaissant σ_e^2 , on détermine l'erreur relative V des résultats au risque de 5% par l'expression:

$$V = \pm 1,96 \times \sigma_e/m, \quad (2)$$

m étant la valeur moyenne de x_i .

Le coefficient r s'appelle également coefficient de fidélité car il est l'indice de la fidélité ou reproductibilité des mesures; nous avons calculé ses limites inférieures et supérieures probables avec 5% de risque de se tromper [7].

L'incertitude attachée à un résultat provient de l'addition d'incertitudes partielles. Sans entrer dans le détail, nous avons, dans certains cas, déterminé: d'une part l'erreur due uniquement à la technique de comptage, d'autre part l'erreur globale relative à l'ensemble des manipulations, y compris le prélèvement sanguin.

Dans l'un et l'autre cas, nous avons considéré une soixantaine de couples de résultats, à l'exception de la numération des globules rouges sur photographies, dont nous avons estimé la précision à partir de vingt-cinq couples seulement.

3 - RÉSULTATS

Nous étudions séparément les résultats relatifs aux numérations et ceux relatifs à la formule leucocytaire.

3.1 - LES NUMÉRATIONS

Le tableau I donne, avec 1 risque de se tromper de 5 %, les limites inférieures et supérieures des coefficients de fidélité et l'erreur relative que l'on en déduit; il donne également les valeurs des moyennes obtenues pour les numérations des érythrocytes, leucocytes, plaquettes et réticulocytes, avec mention de la technique correspondante: numération automatique (A) ou au microscope (M); il est précisé, dans la colonne « observations », si la mesure a été répétée sur la « même dilution », ou si l'on a effectué « deux prélèvements successifs ».

TABLEAU I
COEFFICIENTS DE FIDÉLITÉ ET ERREURS DE MESURE
SUIVANT LA MÉTHODE DE NUMÉRATION

Élément		Coefficient fidélité de... à...	Erreur V (%)	Moyenne (/mm ³)	Observations
<i>Erythrocytes</i>	A	0,98 - 0,99	1,7	4 766 000	même dilution
	A	0,94 - 0,98	3,0	4 765 000	2 prélèvements successifs
	M	0,79 - 0,94	10	4 751 000	
<i>Leucocytes</i>	A	0,98 - 0,99	2,9	7 810	même dilution
	A	0,94 - 0,98	8,1	7 690	2 prélèvements successifs
	M	0,88 - 0,96	5,4	7 190	
<i>Plaquettes</i>	M	0,50 - 0,85	24	230 000	2 prélèvements successifs
<i>Réticulocytes</i>	M	0,50 - 0,85	42	16 700	

3.2 - LA FORMULE LEUCOCYTAIRE

Comme plusieurs techniciens participent à la lecture des lames, il convenait d'abord de s'assurer de l'homogénéité de l'équipe.

a) Comparaison des lecteurs

Le tableau II indique les valeurs moyennes des résultats obtenus par cinq des lecteurs (1 à 5) pour chaque type de cellules, sur une série de 15 lames lues, dans ce cas particulier, sur 500 éléments.

TABLEAU II
MOYENNES DE RÉSULTATS DONNÉS PAR CHACUN DES LECTEURS

Lecteurs	Neutro.	Baso.	Eosino.	Lympho.	Mono.
1	58,9	0,6	2,8	31,5	6,2
2	58,4	0,7	2,1	32,4	6,4
3	62,2	0,9	2,2	29,6	5,1
4	59,2	0,6	2,5	32,2	5,5
5	58,5	0,7	2,3	33,4	5,1

Les résultats de l'analyse de variance à deux dimensions montrent que si la différence entre lames est significative au risque de 5 %, quel que soit le type de cellules, elle ne l'est pas entre lecteurs, même au risque de 1 % : l'équipe est bien homogène.

b) *Précision*

Le tableau III donne, au risque de 5 %, les limites inférieures et supérieures des coefficients de fidélité et, dans la quatrième colonne (« expér. ») l'erreur relative expérimentale moyenne que l'on en déduit, par application de la formule (1). On peut trouver, dans la troisième colonne, la valeur moyenne de la formule leucocytaire. En généralisant la loi binomiale, sachant que les lectures, en pratique courante, ont porté sur 250 cellules, nous avons calculé les valeurs de l'intervalle de confiance au risque de 5 %, et nous en avons déduit l'erreur relative théorique correspondante, dont les valeurs figurent dans la dernière colonne (« théor. »).

TABLEAU III
COEFFICIENTS DE FIDÉLITÉ ET ERREURS DE MESURE
SUR LA FORMULE LEUCOCYTAIRE

Elément	Coefficient fidélité de... à...	Moyenne (%)	Erreur relative (%)		
			expér.	théor.	
<i>Granulocytes</i>	neutro.	0,90 - 0,95	57,2	10	15
	éosino.	0,65 - 0,82	2,7	60	100
	totaux	0,87 - 0,94	60,8	10	14
<i>Lymphocytes</i>	petits	0,55 - 0,77	13,6	45	40
	grands	0,81 - 0,91	20,9	30	30
	totaux	0,76 - 0,88	34,5	24	21
<i>Monocytes</i>	0,32 - 0,62	4,7	60	80	

4 - DISCUSSION

Considérons les résultats des tableaux I, II et III.

4.1 - PRÉCISION DES NUMÉRATIONS

Soit un sujet qui présenterait un nombre invariable de 5 000 000 d'hématies par millimètre cube de sang; sachant que la précision de la mesure (tableau I) est de 3 % ou de 10 % suivant la technique ⁽¹⁾, 95 % des résultats d'un grand nombre de prélèvements seraient compris dans des intervalles allant de :

- 4 850 000 à 5 150 000 avec l'appareil de comptage automatique;
- 4 500 000 à 5 500 000 avec le microscope.

De la même façon, pour 8 000 leucocytes par millimètre cube de sang, on trouverait des intervalles de confiance allant de :

- 7 360 à 8 640 avec l'appareil de comptage automatique;
- 7 560 à 8 440 avec le microscope;

les erreurs relatives étant respectivement de 8,1 % et 5,4 % (tableau I).

4.2. - CHOIX D'UNE TECHNIQUE DE NUMÉRATION

Le compteur automatique de globules ne présente que des avantages pour les hématies.

En ce qui concerne les leucocytes, nous estimons que le léger gain en précision que procure la lecture au microscope sur hématimètre ne justifie pas d'astreindre le personnel à un travail long, fatigant et fastidieux. En effet, les fluctuations que peut provoquer l'erreur expérimentale sur les résultats sont, dans tous les cas, noyées du fait de l'amplitude des variations physiologiques.

Nous effectuons simultanément la numération des thrombocytes et celle des réticulocytes avec des précisions respectives de 24 % et de 42 % (tableau I), que nous jugeons acceptables. Nous n'avons fait que quelques essais de comptage automatique des thrombocytes parce qu'ils sont comptés dans la cellule de Piette en même temps que les réticulocytes.

4.3 - PRÉCISION DE LA FORMULE LEUCOCYTAIRE

Pour une équipe telle que la nôtre, il est possible de négliger l'erreur personnelle (tableau II); toutefois, si avec des techniques de lecture strictement définies, nous avons très vite obtenu des résultats homogènes sur les numérations de granulocytes, il nous a fallu plusieurs mises au point successives pour atteindre une homogénéité satisfaisante pour la différenciation entre monocytes et grands lymphocytes.

La limitation à deux cent cinquante du nombre total de cellules comptées sur lame donne une précision (tableau III) de 10 % sur le taux de polynucléaires neutrophiles dans la formule, et de 25 % sur celle des lymphocytes; toujours en raison de l'amplitude des variations physiologiques, elles nous paraissent satisfaisantes.

Par contre, la lecture de deux cent cinquante cellules ne donne, pour le taux de polynucléaires éosinophiles (éléments rares), comme pour celle des monocytes (difficiles à identifier), qu'une précision de 60 % (tableau III).

TABLEAU IV
VARIATION DE LA FORMULE,
EXPRIMÉE EN NOMBRES D'ÉLÉMENTS,
PROVOQUÉE PAR LES ERREURS EXPÉRIMENTALES

Elément	Limite	
	inférieure	supérieure
Neutro.	3 750 (3 880)	5 410 (5 280)
Eosino.	69 (74)	363 (358)
Lympho.	1 870 (1 950)	3 650 (3 570)

⁽¹⁾ En fait, la précision de la numération des hématies au microscope est meilleure : elle a été déterminée à partir de vingt-cinq couples seulement, contre une soixantaine de couples pour les autres résultats.

Pour le sujet considéré tout à l'heure, qui présente un nombre invariable de 8 000 leucocytes par millimètre cube de sang et une formule leucocytaire également invariable, 95 % des résultats que nous donneraient de nombreux prélèvements seraient compris dans les intervalles dont les limites sont indiquées dans le tableau IV (entre parenthèses sont rapportées les limites qui correspondraient à la numération à l'hématimètre).

Les intervalles de confiance sont sensiblement les mêmes quelle que soit la technique de numération.

Si l'on se propose de suivre la variation des polynucléaires éosinophiles, il faut compter un plus grand nombre d'éléments sur le frottis; la lecture sur deux mille cinq cents cellules ramènerait l'erreur due au frottis à 20 % (parallèlement, celle des polynucléaires neutrophiles arriverait à 3 %). L'intervalle de confiance irait de 155 à 277, soit une variation allant presque du simple au double. Dans ces conditions seulement, des examens successifs permettraient de suivre une évolution, dont il conviendrait tout de même de ne pas trop se hâter d'interpréter le sens.

5 - CONCLUSION

Les erreurs relatives expérimentales diffèrent peu de celles, théoriques, que l'on peut déduire de la loi binomiale (tableau III) : la méthode qui consiste à effectuer en double un certain nombre de prélèvements nous permet, non seulement de DÉTERMINER LA PRÉCISION DES MESURES EN PRATIQUE COURANTE, mais encore de vérifier périodiquement de façon systématique que cette précision est conservée.

L'adoption du comptage automatique nous paraît recommandable, non seulement pour la numération des éléments rouges, mais encore pour celle des blancs; toutefois, nous ne saurions trop insister sur la nécessité de traiter cet appareillage avec un soin particulier : diminuer le « bruit de fond » par l'emploi de solutions ayant subi plusieurs filtrations; mesurer quotidiennement ce bruit de fond avec la solution de dilution; étalonner l'appareil avec des dilutions de référence (on en trouve dans le commerce pour les hématies, il faut en établir par comptage au microscope pour les leucocytes); répéter fréquemment (environ deux fois par mois) les étalonnages.

Si la lecture des étalements sur lame révèle une microcytose, il va sans dire que la numération des hématies doit être refaite par méthode visuelle.

Nous avons déjà précisé les précautions à prendre pour l'établissement de la formule leucocytaire [5]; l'identification sur la lame de deux cent cinquante éléments nous paraît suffire en pratique courante.

Pour ce qui concerne, tant les résultats des numérations des éléments rouges ou blancs que le taux de polynucléaires, au voisinage des limites recommandées pour l'aptitude, la mise en observation ou l'inaptitude [2], il faut penser aux variations que provoquent inévitablement les erreurs expérimentales. Toutefois, à condition que le laboratoire travaille correctement, nous verrons bientôt que l'amplitude des oscillations dues aux variations physiologiques rend ces erreurs négligeables.

(Laboratoire d'analyses médicales créé auprès du service général de radioprotection d'Electricité de France. Directeur J.-M. CHINARDET).

M. DELPLA, D. MOULIN et B. GACHOT
 Service Général de Radioprotection
 Electricité de France - 73, Bd Haussmann
 Paris-VIII^e

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ministère des affaires sociales, décret n° 67-228 du 15 mars 1967 portant règlement d'administration publique relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants. *J.O.R.F.* (1967), 2754-2771.
- [2] Ministère des affaires sociales, circulaire du 3 juin 1957 relative aux recommandations générales visant à la protection contre les radiations ionisantes. *J.O.R.F.* (1957), 6825-6832.
- [3] DELPLA, M., NUSSBAUM, R. et FUNEL, P. — Les variations hématologiques provoquées par l'émotion. *Nouv. Rev. Franç. Hématologie*, 3 (1963), 241-250.
- [4] DELPLA, M., PERRIMOND, D., MOULIN, D. et LECONTE, J. — Comparaison des hémogrammes veineux et capillaire. A paraître.
- [5] DELPLA, M., PERRIMOND, D. et GACHOT, B. — Influence de l'épaisseur des frottis sur la formule leucocytaire. A paraître.
- [6] DELAPORTE, P.-J. — Etude statistique des erreurs. *Bull. Inst. Internat. Statistique*, 38 (1961), 387-410.
- [7] BŒUF, F. et VASSEREAU, A. — Recherche et expérimentation en agriculture. *Baillière et Fils, édit. Paris*, 2 (1960), 477-478.