

GUIDE DES BONNES PRATIQUES DES ANALYSES MEDICALES DANS LES ETABLISSEMENTS DE SOINS VETERINAIRES

Bien choisir les analyses à proposer
Obtenir des résultats de qualité



SOMMAIRE

1	GÉNÉRALITÉS MÉTHODES : SE FAMILIARISER AVEC LA PRATIQUE DES ANALYSES ET LA GESTION DES RÉSULTATS	
1.1	Glossaire	10
1.2	Analyseurs utilisables en ESV	13
1.3	Le contrôle de qualité	15
1.4	Les procédures, généralités ...	18
1.5	La formation des intervenants au laboratoire de l'ESV	20
1.6	Validation - Enregistrement - Traçabilité... des résultats - Responsabilité	22
1.7	Intervalles de référence	24
1.8	Interprétation des résultats d'analyse	27
2	EQUIPEMENT DE BASE DU LABORATOIRE DE L'ESV: UNE UTILISATION ADÉQUATE DES OUTILS	
2.1	MATÉRIEL DE PAILLASSE	29
A.	Le microscope	30
B.	Les centrifugeuses	32
C.	Le réfractomètre clinique	33
2.2	LES PETITS ANALYSEURS PORTABLES	36
2.4	LES TESTS RAPIDES À LECTURE VISUELLE	38
3	FICHES TECHNIQUES PAR « SPÉCIALITÉ » : RÉALISER EN PRATIQUE UN EXAMEN DE QUALITÉ	
3.1	HÉMATOLOGIE	41
A.	Les prélèvements sanguins pour l'hématologie	42
B.	Le frottis sanguin	45
C.	Le comptage des réticulocytes	50
D.	Exploration de la coagulation	52
E.	Groupage sanguin et Cross match	54
3.2	CYTOLOGIE	57
A.	Réaliser un prélèvement cytologique	58
B.	Réaliser un étalement cytologique	60
C.	Analyse des épanchements	63
D.	Analyse des lavages tracheo-bronchique et broncho-alvéolaire	67
E.	Analyse du liquide synovial	70
3.3	BIOCHIMIE	73
A.	Les prélèvements sanguins pour les analyses de biochimie	74
B.	L'évaluation endocrinienne	76

3.4	EXAMEN DES URINES	79
	A. Analyse d'urine de routine	80
	B. Examen du culot urinaire	81
3.5	COPROLOGIE :	87
	A. La coproscopie des herbivores domestiques (Ruminants-Equidés)	88
	B. La coproscopie chez les carnivores domestiques	93
	C. La coproscopie des NAC	96
3.6	DERMATOLOGIE : DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE	101
	A. Les dermatoses parasitaires	102
	B. Les dermatophyties	106
	C. Les levuroses	111
	D. Les examens dermatologiques chez les bovins et les équidés	113
3.7	INFECTIOLOGIE	117
	Introduction au dossier infectiologie	118
	A. Tests Rapides à Orientation Diagnostique (TROD)	119
	B. Externaliser en confiance ses analyses dans un laboratoire spécialisé	126
	C. Analyse bactériologique en laboratoire : l'existant et le futur	131
	D. La place de l'ESV dans l'examen bactériologique	137
	E. Analyse bactériologique du lait dans l'espèce bovine	142
	F. Antibiogrammes appliqués aux germes isolés de Mammites en ESV	147
	G. Les analyses sérologiques	151
	H. Les analyses PCR	154
4	QUELLE STRATÉGIE ANALYTIQUE POUR L'ESV ?	157
	A. Les analyses de laboratoire en ESV	158
	B. Mes besoins pour le chien et le chat	160
	C. Mes besoins en pratique équine	163
	D. Mes besoins pour les ruminants	168
	E. Mes besoins pour les NAC	172
5	GESTION DU LABORATOIRE D'ANALYSES DE L'ESV	175
	A. Equipement et organisation	176
	B. Tri et élimination des DASRI des analyses biologiques	179
	C. Gestion économique du laboratoire de l'ESV	185



GUIDE DES BONNES PRATIQUES DES ANALYSES MÉDICALES DANS LES ESV OBTENIR DES RÉSULTATS DE QUALITÉ

Qualitévet a initié en 2017 un projet de Guide de la qualité des analyses biologiques dans les établissements de soins vétérinaires (ESV). Ce travail est destiné à être consulté sur le site internet qui lui sera dédié, les fiches pouvant être téléchargées.

L'objectif est d'apporter aux utilisateurs, vétérinaires cliniciens et leurs collaborateurs impliqués dans le choix et la réalisation technique des prélèvements et des analyses biologiques pratiquées en ESV, des informations sur les points indispensables à la production de résultats fiables.

La Qualité est donc le thème central, le fil rouge de ce travail.

Le sommaire comporte une cinquantaine de fiches centrées sur la faisabilité et la qualité des analyses et non sur l'apport spécifique de la biologie clinique au diagnostic des maladies : elles ne concernent que les étapes pré-analytique et analytique jusqu'à la validation des résultats, en excluant d'une part le choix par le clinicien des analyses à réaliser et d'autre part l'interprétation des résultats.

Un autre aspect de notre travail est d'aider le vétérinaire à définir s'il est en capacité (matériel, formation, maîtrise des techniques analytiques ...) de réaliser, avec les équipes soignante et administrative de son ESV, telle analyse ou tel examen biologique avec une garantie de qualité suffisante et un réalisme économique de bon sens.

Importance du contexte

Aujourd'hui l'ESV est en première ligne pour réaliser des analyses de laboratoires. Cette activité est si diversifiée, les matériels si nombreux, qu'il fallait faire des choix :

- pour tenir compte du nombre et de la diversité des matériels proposés sur le marché, seule une approche généraliste est possible. Elle porte sur les points clefs et sur les questions à se poser avant d'acquérir un matériel ;
- la même approche est faite pour les Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) ;
- pour les outils généralement utilisés et les techniques les plus employées dans les ESV, un développement particulier est réalisé, en pré analytique et/ou en analytique, pour mettre en évidence les points clefs engageant la qualité.

Le réseau professionnel de laboratoires spécialisés vétérinaires, leur offre d'analyses, la technicité des méthodes analytiques proposées nous sont indispensables, en particulier en infectiologie, mais aussi en hématologie, biochimie, endocrinologie, immunologie, cytologie, anatomo- pathologie, etc. ; nous devons définir les bonnes pratiques de notre partenariat et de nos échanges.

Plusieurs types de fiches

Pour exposer la diversité de l'activité en biologie clinique vétérinaire, il fallait des approches adaptées :

- des fiches qui développent des notions indispensables à une approche qualitative de la biologie clinique dans les ESV: procédures, contrôle de qualité, formation, ... ou pour l'utilisation des résultats : intervalles de référence, interprétation... ;

- des fiches généralistes sur les systèmes analytiques: analyseurs, tests rapides ... ;
- des fiches plus développées pour une bonne utilisation des matériels d'usage courant (microscope, réfractomètre, centrifugeuse...);
- des fiches exposant la réalisation des techniques analytiques courantes en ESV, afin de révéler les points clefs indispensables à l'obtention de résultats de qualité : frottis sanguin, analyse des urines, cytologie, examens de laboratoire en dermatologie, examen coproscopique ;
- des fiches sur le pré-analytique : prélèvements et envoi de spécimens pour la bactériologie, les analyses PCR ou autres ; de leur bonne réalisation dépend la qualité des résultats obtenus du laboratoire partenaire.

En contrepoint, dans un dossier « Stratégie analytique pour mon ESV » sont présentés quatre témoignages (un par activité clinique principale) pour illustrer des expériences de « terrain » dont les lecteurs pourraient s'inspirer.

Un chapitre spécifique sur l'infectiologie

Compte tenu de son importance et de sa complexité nous avons consacré un dossier spécifique à l'infectiologie virale, bactérienne ou parasitaire. Cette partie a fait l'objet d'une convention avec la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) qui a initié et géré les plans Ecoantibio 1 et 2.

L'ensemble de l'ouvrage doit contribuer à la prise de conscience des critères de qualité à respecter dans l'étendue du domaine des analyses de laboratoire, pour le pré-analytique, l'analytique et l'utilisation des résultats (post-analytique).

REMERCIEMENTS DE QUALITÉVET

Aux membres du groupe de travail : Guy Hannotte (coordinateur), Samuel Boucher, Françoise Bussiéras, Pascal Fanuel, Marc Hasdenteufel, Christine Médaille, Jean François Rousselot, Olivier Salat ont apporté leur temps et contribué de façon bénévole à l'élaboration de cet ouvrage.

Pour leur participation essentielle, aux auteurs tous également bénévoles: Jean Pierre Braun, Catherine Trumel, Nathalie Bourgès-Abella et les nombreux experts qui ont contribué à la réalisation de cet ouvrage : Véronique Bachy, Corinne Bisbarre, Corine Boucraut-Baralon, Gilles Bourdoiseau, Philippe Camuset, Jacques Devos, Eric Guaguère, Laetitia Jaillardon, Nicolas Keck, Guillaume Lequeux, Samuel Sauvaget, Serge Vélu, pour leurs conseils avisés, à Patrick Bourdeau, Claude Beata et pour le choix des illustrations, à Aline Tonneau.

Une partie du guide est dédiée à l'infectiologie. Cette partie a fait l'objet en 2017 d'une convention avec le ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. Le financement de la DGAL reçu dans le cadre de cette convention a permis, en synergie avec Qualitévet, la parution de l'ouvrage.

LE CONSEIL D'ADMINISTRATION DE QUALITÉVET

QUALITEVET est composé des représentants des organisations professionnelles vétérinaires (OPV) : AVEF (Association Vétérinaire Équine Française), AFVAC (Association Française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie), CNOV (Conseil National de l'Ordre des Vétérinaires), les Ecoles nationales vétérinaires françaises (École nationale vétérinaire d'Alfort, École nationale vétérinaire de Toulouse, ONIRIS, VETAGROSUP), SNGTV (Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires), SNVECO (Syndicat national des vétérinaires conseils), SNVEL (Syndicat National des Vétérinaires d'Exercice Libéral), ZOOPSY (Association vétérinaire de zoo-psychiatrie).

1

GÉNÉRALITÉS ET MÉTHODES

Se familiariser avec la pratique des analyses
et la gestion des résultats

- 1.1 Glossaire - **JP. Braun**
- 1.2 Analyseurs utilisables en ESV - **JP. Braun**
- 1.3 Le contrôle de qualité - **JP. Braun**
- 1.4 Les procédures, généralités... - **JP. Braun**
- 1.5 La formation des intervenants au laboratoire de l'ESV - **JP. Braun et le GT**
- 1.6 Validation - Enregistrement - Traçabilité des résultats - Responsabilité - **JP. Braun**
- 1.7 Intervalles de référence - **JP. Braun**
- 1.8 Interprétation des résultats d'analyse - **JP. Braun**



En biologie médicale, il est important d'employer les bons termes et d'en connaître le sens.

C'est un facteur clef de qualité quand il s'agit de communiquer entre vétérinaires et biologistes, lorsqu'il faut comprendre et bien utiliser une technique analytique, le mode d'emploi d'un matériel ou d'un test, ou quand il faut interpréter un résultat.

Ce lexique, sans doute partiel, est complété par d'autres termes ou sigles spécifiques dans les fiches de ce guide.

Si certains termes paraissent peu utiles en pratique, ils trouvent néanmoins leur place dans ce glossaire, pour une compréhension globale

ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS CE GLOSSAIRE

Def : définition

Subst : autres possibilités

SI : Système International

Cf : voir, se reporter à

⊗ : termes à éviter

⊗ : termes à rejeter

⚠ : attention

VIM : vocabulaire international de métrologie (BIPM)

IFCC : International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

CLAIRANCE	Déf	La clairance d'une substance est le volume apparent d'une solution totalement épurée de cette substance par unité de temps.
CONCENTRATION	Déf	Nombre de moles ou masse de substance par unité de volume (de préférence le litre dans le SI).
	⊗	Niveau, Taux.
EXACTITUDE	Déf	Etroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie du mesurande (VIM).
	cf.	Fiche 1.3. Contrôle de qualité.
EXAMEN DE BIOLOGIE MÉDICALE	Déf	Acte médical qui concourt à la prévention, au dépistage, au diagnostic ou à l'évaluation du risque de survenue d'états pathologiques, à la décision et à la prise en charge thérapeutiques, à la détermination ou au suivi de l'état physiologique ou physiopathologique (...), hormis les actes d'anatomie et de cytologie pathologiques (Code de la santé publique, L. 6211-2).
	Subst	Test.

FIDÉLITÉ	Déf	Etroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées (VIM).
	Subst	Précision.
	cf.	Fiche 1.3. Contrôle de qualité.
INTERVALLE DE RÉFÉRENCE	Déf	L'intervalle de référence d'une variable, borné par deux limites de référence, comprend en général 95 % des valeurs mesurées chez des sujets en bonne santé sélectionnés en fonction de critères précisément définis (âge, sexe, conditions de vie, ...) (adapté de IFCC).
	⊗	Normes, valeurs normales.
	cf.	Fiche 1.7. Valeurs de référence.
MESURANDE	Déf	Grandeur que l'on veut mesurer (VIM) (très peu employé).
	Subst	Variable, Analyte.
	⊗	Paramètre, Constante (biologique).
ODDS (COTES)	Déf	Mode d'expression des probabilités. Si p est la probabilité d'un évènement X en %, Odds de X = $p / (1-p)$.
PRÉCISION	cf	Fidélité.
PROBABILITÉ PRÉ-TEST	Déf	Probabilité qu'un sujet soit atteint (non-atteint) d'une affection en fonction de l'examen clinique et/ou de la prévalence de l'affection, avant un examen de biologie médicale. Probabilité <i>a priori</i> .
RÉPÉTABILITÉ	Déf	Fidélité de mesure dans des conditions qui comprennent la même procédure opératoire, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps (d'après VIM).
	Subst	Variabilité intra-série.
REPRODUCTIBILITÉ	Déf	Fidélité de mesure dans des conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires (d'après VIM).
	Subst	Variabilité entre séries (dans un laboratoire ou un ESV donné).
SÉLECTIVITÉ	Déf	Aptitude d'un système de mesure, utilisant une procédure opératoire spécifiée, à fournir des résultats de mesure pour un mesurande, qui ne dépendent d'aucun autre constituant (d'après VIM).
	Subst	Spécificité analytique.

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE	Déf	Quotient de la variation de la mesure d'une variable par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée (d'après VIM)
	⊖	n'est pas synonyme de : limite de détection, limite de quantification, limite inférieure de la gamme de mesure.
SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUE	Déf	Probabilité que le résultat d'un examen de biologie médicale soit positif (à un seuil donné) si le sujet est atteint de l'affection ayant motivé l'analyse.
	cf.	Fiche 1.8. Interprétation des résultats.
SEUIL (LIMITE) DE DÉCISION	Déf	Valeur d'une variable en-deçà ou au-delà de laquelle un sujet est considéré comme atteint de l'affection ayant motivé la mesure de cette variable.
	△	Ne pas confondre avec limite de référence.
	cf.	Fiche 1.7. Valeurs de référence.
SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE		Probabilité que le résultat d'un examen de biologie médicale soit négatif (à un seuil donné) si le sujet n'est pas atteint de l'affection ayant motivé l'analyse.
	cf.	Fiche 1.8. Interprétation des résultats.
SPÉCIMEN	Déf	Partie d'un fluide corporel, de l'air expiré, des cheveux ou des tissus prélevés pour l'examen, l'étude ou l'analyse d'une ou de plusieurs quantités ou propriétés supposées s'appliquer à l'ensemble (discrete portion of a body fluid, breath, hair or tissue taken for examination, study or analysis of one or more quantities or properties assumed to apply for the whole [ISO 15189]).
	⊖	Prélèvement, échantillon.
VALEUR PRÉDICTIVE	Déf	Probabilité qu'un sujet soit atteint (non-atteint) de l'affection ayant motivé l'examen en fonction de son résultat et de la probabilité pré-test.
	cf.	Fiche 1.8. Interprétation des résultats.

ANALYSEURS UTILISABLES DANS LES ESV

Jean Pierre Braun

Cette fiche donne une information complète et synthétique sur les différents systèmes analytiques de biochimie, proposés aux ESV.

Le choix de ces systèmes, parfois simples en apparence, requiert une démarche d'information préalable, une réflexion sur leur adaptation aux besoins de l'ESV, et une formation technique à leur utilisation.

Pour les analyseurs multiparamétriques de biochimie ou les automates d'hématologie, compte tenu de leur importance et de leur coût, il faut aussi s'interroger sur un certain nombre de points et les valider avant leur acquisition :

- ◇ *S'agit-il d'un système fermé ou ouvert ? (voir ci-dessous)*
- ◇ *Pour quelles espèces est-il validé ?*
- ◇ *Le fabricant ou revendeur assure-t-il une maintenance ? pour combien de temps ?*
- ◇ *Le fabricant ou revendeur assure-t-il une formation technique ?*
- ◇ *Quelles sont les procédures de contrôle de qualité recommandées ?*
- ◇ *Conservation, péremption, disponibilité des réactifs ?*
- ◇ *etc*

Pour partager l'expérience personnelle de vétérinaires dans le choix d'équipements adaptés, le lecteur pourra se référer aux fiches 4. « Quelle stratégie analytique pour mon ESV ? ».

OBJECTIF

Comparer les performances, avantages, inconvénients des différents analyseurs à la disposition des ESV.

1. TYPES D'ÉQUIPEMENTS

- Bandelettes, cartouches et autres tests unitaires à lecture visuelle ; pour certains d'entre eux existent des lecteurs permettant une lecture non subjective des résultats.
- Petits analyseurs portables, le plus souvent « mono-paramétriques » ; ce sont le plus souvent des appareils de biologie humaine destinés à l'autocontrôle des patients, ou aux services d'urgence.
- Systèmes portables ou de paillasse « multiparamétriques » utilisant des réactifs stabilisés sous forme de cartouches, bandelettes, etc.
- Gros analyseurs « multiparamétriques », soit fermés utilisant exclusivement les réactifs du fabricant, soit ouverts pouvant utiliser des réactifs, le plus souvent liquides, provenant de divers fabricants.

2. AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
Bandelettes, cartouches	Rapides, faciles,	Majoritairement semi-quantitatifs. Subjectifs lorsque lecture visuelle. Souvent dénués d'imprimante ou de raccordement à un système informatique
Systèmes fermés mono ou multiparamétriques	Rapides Savoir-faire technique limité	Gamme limitée à l'offre du fabricant. Parfois dénués d'imprimante ou de raccordement à un système informatique.
Systèmes ouverts	Gamme ouverte très large	Savoir-faire technique nécessaire

3. FACTEURS SUSCEPTIBLES D'AFPECTER LA QUALITÉ DES ANALYSES

- Validation de l'analyse dans l'espèce cible et le spécimen utilisé (par ex., un glucomètre destiné à l'analyse de sang capillaire humain n'est pas validé pour mesurer la glycémie d'un spécimen de sang canin, encore moins de plasma).
- Stabilité et conservation des réactifs, des solutions de calibration et de contrôle.
- Expertise technique de l'utilisateur, qui peut être un facteur limitant lorsque des volumes doivent être mesurés avec des pipettes, ou bien lorsqu'une analyse n'est pas effectuée suffisamment souvent pour être complètement maîtrisée.
- Calibration et contrôle de qualité des systèmes fermés reposant sur les solutions des fabricants, parfois inadaptés à des spécimens animaux.

4. TRANSFÉRABILITÉ DES RÉSULTATS OBTENUS PAR DIFFÉRENTS ANALYSEURS

- Pas de règle générale : souvent bonne pour la plupart des variables de routine en biochimie et en hématologie ; inégale en enzymologie, endocrinologie.
- Les résultats obtenus sur sang total ne peuvent être valablement comparés à ceux obtenus sur sérum ou plasma.

- ✓ Le choix d'un analyseur repose sur les besoins de l'ESV et la maîtrise technique de ses utilisateurs.
- ✓ La qualité de ses résultats doit être documentée avant achat et contrôlée régulièrement lors de l'utilisation dans l'ESV.

DÉFINITION ET OBJECTIF

Le contrôle de qualité (CQ) est un ensemble de procédures visant à évaluer la qualité de tous les systèmes analytiques utilisés.

Dans les petites structures comme les ESV, le CQ est prioritairement « interne » (CQI), c'est-à-dire effectué à la discrétion de l'ESV et non par un organisme extérieur comme pour les laboratoires d'analyses médicales humains (LAM).

Le but principal est de s'assurer que les résultats obtenus avec des analyseurs sont aussi stables que possible au cours du temps ; secondairement, il peut servir à démontrer que les résultats utilisés pour un animal l'ont été dans de bonnes conditions d'utilisation des équipements.

1. ORGANISATION GÉNÉRALE D'UN CQ INTERNE

- Le CQI est fondé sur l'analyse périodique de solutions de contrôle du commerce fournies par les fabricants d'analyseurs ou les centrales d'achats ou des fournisseurs spécialisés.
- Leur composition est indiquée par le fabricant (en général, concentration moyenne et limites inférieure et supérieure acceptables pour chaque variable).

2. LIMITES DES SOLUTIONS DE CONTRÔLE DU COMMERCE

Les solutions sont des préparations complexes mélangeant des spécimens de plusieurs espèces pour la biochimie et la coagulation par exemple, ainsi que des particules pour l'hématologie.

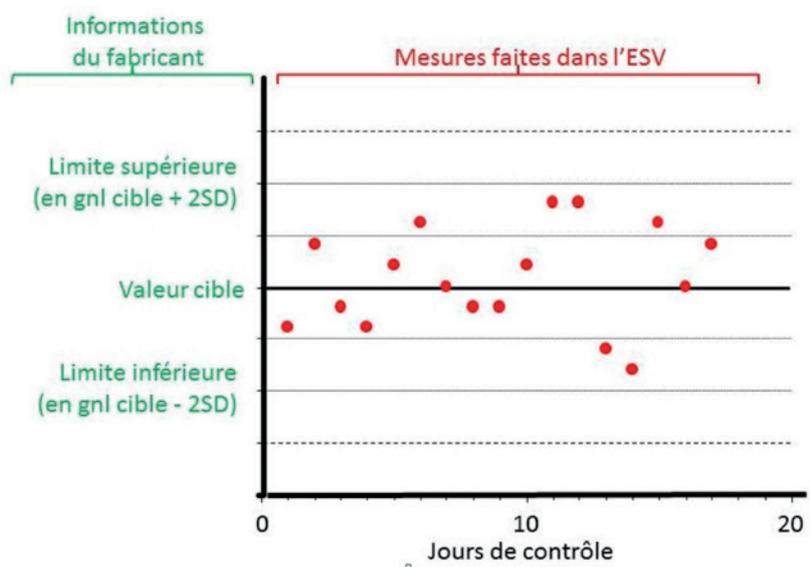
- Les solutions sont peu stables et doivent être conservées dans les conditions recommandées (souvent en réfrigération) pour des durées n'excédant pas la péremption indiquée.
- Lorsque les solutions doivent être reconstituées par addition d'eau distillée, notamment en biochimie, il est essentiel d'utiliser exactement le volume prescrit, donc une pipette volumétrique et en aucun cas une seringue.

3. CARACTÉRISTIQUES ÉVALUÉES DANS UN CQI

- **L'exactitude** : aptitude de la technique utilisée à donner un résultat aussi proche que possible de la valeur moyenne indiquée par le fabricant (valeur-cible).
- **La précision** : aptitude de la technique à donner des résultats aussi proches que possible les uns des autres lors de répétitions de l'analyse avec la même solution de contrôle.

4. MISE EN ŒUVRE PRATIQUE SIMPLIFIÉE

- La fréquence du CQI doit être aussi grande que possible mais rester adaptée à celle des analyses effectuées par l'ESV pour s'assurer que les résultats de l'analyseur correspondent aux indications du fabricant.
- Le CQI doit porter sur l'ensemble des analyseurs et toutes les analyses effectuées dans l'ESV
- Les résultats sont conservés, en général sous forme d'un graphique par variable : résultat en ordonnées pour chaque date (en abscisse) où une mesure a été faite.
- Pour mieux suivre l'évolution des résultats, il est utile de représenter, sous forme de lignes horizontales, la valeur-cible et les limites. Il faut également noter les changements de lot de solution de contrôle car la composition peut différer d'un lot à l'autre.



LEXIQUE: **gnl**: général **SD**: écart type

5. INTERPRÉTATION

- **Qualité satisfaisante :**
 - ◇ les résultats obtenus avec la solution de contrôle ne varient que peu d'un contrôle à l'autre, au voisinage et de part et d'autre de la ligne de la valeur-cible (cf. diagramme ci-dessus).
- **Signes d'alerte majeurs :**
 - ◇ Tous les résultats sont proches les uns des autres mais décalés par rapport à la ligne de la valeur-cible : **inexactitude constante**.
 - ◇ Les résultats dérivent progressivement soit en augmentant soit en diminuant : **dérive analytique**.
 - ◇ Les résultats sont en dehors des lignes des limites du fabricant : **inexactitude majeure**.

6. ACTIONS EN CAS D'ALERTE

- Vérifier la calibration de l'analyseur, en analysant la ou les solutions de calibration comme des spécimens.
- Vérifier la stabilité de la solution de contrôle (date, conditions de conservation), éventuellement utiliser un flacon neuf.
- Faire appel aux services du fournisseur de l'analyseur.

Un contrôle de qualité interne (CQI) utilisant des solutions de contrôle du commerce doit être fait régulièrement pour toutes les variables analysées et ses résultats archivés.

Pour :

- ✓ s'assurer que les analyseurs de l'ESV fournissent des résultats de bonne qualité.
- ✓ éventuellement, prouver de manière rétrospective que les résultats ont été obtenus dans de bonnes conditions.

Pour en savoir plus :

- *Sur Google : Diagramme de Levey-Jennings (Exactitude et Précision)*
- *Fiche 1.4.: Les procédures, généralités ... (modes opératoires, enregistrement, système documentaire)*

DÉFINITION ET OBJECTIF

Une procédure est « une manière spécifiée d'effectuer une activité ou un processus ».

Elle doit être documentée, c'est-à-dire rédigée, appliquée et mise à jour.

L'objectif est de mettre à disposition de tous les utilisateurs d'un système d'analyse une information complète leur permettant d'obtenir la même qualité de résultats.

1. PROCÉDURE, PROCESSUS ET MODE OPÉRATOIRE

- Une procédure décrit l'organisation générale, les règles, la méthode de travail, les différents acteurs, les instruments nécessaires pour effectuer une tâche sans entrer dans les détails (qui fait quoi, pourquoi, avec quoi ?).
- Un processus est l'ensemble des activités consécutives qui sont nécessaires à l'obtention du résultat (par exemple, pour effectuer une numération-formule sanguine chez un chien : pré-analytique, analytique et post-analytique).
- Un mode opératoire décrit le fonctionnement d'une étape du processus (par exemple, les instructions de la notice d'un analyseur).

2. DOCUMENTS

- La documentation exigée par l'assurance de qualité est extrêmement lourde et très au-delà des possibilités des petites structures, en revanche indispensable pour les laboratoires d'analyse.
- Le minimum pour un ESV doit ou devrait être :
 - ◇ de mettre à disposition de tous les utilisateurs d'un système d'analyse ou acteurs d'une des étapes du processus le mode opératoire concernant ce système ou cette étape, incluant le contrôle de qualité correspondant,
 - ◇ de s'assurer que les modes opératoires ont été intégralement lus et compris par tous les utilisateurs.

3. VÉRIFICATION

- Pour s'assurer de la permanence de la qualité de chaque opération, il faut :
 - ◇ former chaque utilisateur et vérifier que le mode opératoire est correctement effectué,
 - ◇ périodiquement, vérifier que le mode opératoire continue à être appliqué tel qu'il a été décrit.

4. RELEVÉ DES NON-CONFORMITÉS

- Si une étape quelconque n'est pas effectuée telle qu'elle est décrite dans un mode opératoire :
 - ◇ cela doit être rapporté par écrit dans un **registre de « non-conformité »**,
 - ◇ pour en tenir compte dans l'interprétation des résultats,
 - ◇ voire ne pas valider le résultat,
 - ◇ éventuellement pour la révision ou l'amélioration du mode opératoire concerné.

LA FORMATION DES INTERVENANTS AU LABORATOIRE DE L'ESV

Jean Pierre Braun & Groupe de travail

La formation des intervenants au laboratoire de l'ESV requiert une démarche volontariste du vétérinaire chef d'entreprise et au-delà de la profession toute entière.

La qualité des analyses réalisées sur des systèmes analytiques divers ou par des techniques variées, même s'il s'agit d'automates réputés fiables, dépend de manière importante du facteur humain et donc de sa qualification.

L'ensemble de ce guide a pour objet de contribuer à cet objectif.

DÉFINITION - OBJECTIFS

Les intervenants sont différents dans :

- Les laboratoires vétérinaires d'analyses (laboratoires départementaux d'analyses – LDA, ou laboratoires privés) placés sous la responsabilité le plus souvent d'un(e) vétérinaire compétent(e) en biologie et dans lesquels les analyses sont majoritairement effectuées par des technicien(ne)s de laboratoire diplômé(e)s.
- Les ESV où interviennent un ou plusieurs vétérinaires et des ASV. Ici, tous doivent avoir des compétences pour effectuer de manière satisfaisante la part du processus qu'ils effectuent. La qualité de cette tâche doit être périodiquement évaluée.

1. FORMATION DES SPÉCIALISTES EN BIOLOGIE MÉDICALE VÉTÉRINAIRE

- Actuellement, la seule formation est celle du Collège européen de biologie médicale vétérinaire (ECVCP) ou de son homologue nord-américain (ASVCP) qui ne porte que sur la biochimie, l'hématologie et la cytologie.
- Il existe d'autres formations diplômantes de spécialité : Microbiologie (Institut Pasteur), Parasitologie, Anato-pathologie....

2. FORMATION DES VÉTÉRINAIRES EN BIOLOGIE MÉDICALE VÉTÉRINAIRE

- Outre la formation initiale commune, il est recommandé de suivre une formation diplômante (CES hématologie et biochimie cliniques animales) et/ou des formations variées à la biologie médicale vétérinaire dispensées par les ENV, les associations professionnelles de formation continue (par ex le GEBM – Groupe d'étude en biologie médicale de l'AFVAC), les fabricants et distributeurs de matériel, etc.
- Ces formations ne couvrent que partiellement le champ des analyses faisables dans un ESV et ne sont pas toutes reconnues par le Comité de la formation continue vétérinaire (CFCV).
- Les livres de biologie médicale animale ou humaine, les Webinaires, les revues et autres sites Internet sont également consultables.

3. FORMATION DES ASV EN BIOLOGIE MÉDICALE VÉTÉRINAIRE

- Outre la formation initiale des ASV d'échelon 5 et la formation continue, proposées par APFORM, elle est le plus souvent faite dans l'ESV en fonction des moyens d'analyses de chacun, avec l'aide des fabricants ou distributeurs.
- Le rôle de l'ASV se limite à réaliser l'analyse, sous le contrôle du vétérinaire qui en interprète le résultat.

Dans un ESV,

- ✓ Toute personne ayant à réaliser une analyse doit avoir reçu une formation par quelqu'un maîtrisant l'analyse.
- ✓ Pour tout nouvel analyseur ou nouvelle analyse, le constructeur/fournisseur doit former l'ensemble des personnes utilisant la machine.
- ✓ Tout nouvel arrivant doit être formé par une personne de l'ESV ayant eu une formation ad hoc et utilisant régulièrement l'automate.
- ✓ Le suivi de la formation doit être documenté.
- ✓ A chaque mise à jour d'un automate, les utilisateurs doivent en être informés et l'avoir comprise.

VALIDATION - ENREGISTREMENT - TRAÇABILITÉ - MATÉRIALISATION DES RÉSULTATS - RESPONSABILITÉ

Jean Pierre Braun

OBJECTIF

S'assurer de la qualité de la phase post-analytique des analyses effectuées avant l'utilisation (ou le transfert) des résultats.

1. VALIDATION DES RÉSULTATS

Elle comprend deux étapes :

- **La validation analytique** qui consiste à s'assurer que les modes opératoires ont été respectés et que les contrôles de qualité ont donné satisfaction.
- **La validation biologique** pour vérifier que le résultat ne présente pas une aberration dans son contexte clinique et/ou des incohérences par rapport aux autres analyses effectuées.
Cette dernière étape ne peut être effectuée que par un vétérinaire qui valide le résultat.

2. ENREGISTREMENT – TRAÇABILITÉ – MATÉRIALISATION DES RÉSULTATS

- Tous les résultats des analyses doivent pouvoir être retrouvés, donc être, soit stockés de manière informatisée, soit imprimés et archivés avec le dossier de l'animal.
- Il doit également être possible de retrouver qui a effectué l'analyse, avec toutes les conditions de cette dernière, y compris du contrôle de qualité.

3. RESPONSABILITÉ

- La responsabilité du résultat est celle du vétérinaire qui l'a validé soit dans l'ESV soit dans un laboratoire extérieur.
- En revanche, la responsabilité de l'interprétation du résultat est celle du clinicien utilisateur de ce résultat.

La production d'un résultat par le laboratoire d'un ESV implique que son responsable garantisse que ce résultat a été obtenu dans des conditions permettant d'obtenir une bonne qualité du résultat et que ce même responsable puisse prouver que ces conditions ont été respectées.

Pour en savoir plus :

- *Fiche 1.4 : Les procédures, généralités...*

Une procédure simple, tel qu'un document support interne permettant « la commande » des résultats, l'environnement de l'analyse, l'enregistrement des résultats, la validation et l'édition des résultats est une aide matérielle précieuse pour l'organisation interne, pour la traçabilité, et pour la qualité.

INTERVALLES DE RÉFÉRENCE (IR)

ETABLISSEMENT - TRANSFERT - CHOIX D'UN INTERVALLE DE RÉFÉRENCE

Jean Pierre Braun

OBJECTIF

Les résultats d'analyses sont interprétés par comparaison :

- ◇ soit à des seuils de décision établis par des experts,
- ◇ soit à des intervalles de référence de population,
- ◇ soit, plus rarement, à des intervalles de référence individuels.

1. DÉFINITION

- L'intervalle de référence de population d'une variable comprend 95% des valeurs de cette variable chez des sujets en bonne santé.
- L'intervalle de référence individuel d'une variable comprend 95% des valeurs de cette variable chez le sujet concerné en bonne santé.

2. NE PAS CONFONDRE IR ET SEUIL DE DÉCISION

- **Un IR** décrit la variabilité d'un analyte chez 95% des sujets sains ; par conséquent, 5% des sujets sains ont des résultats en dehors de cet intervalle.
- **Un seuil de décision** est une valeur, en général déterminée par un comité d'experts, à partir de laquelle un résultat est considéré comme « anormal » ou pathologique.

3. PRINCIPAUX FACTEURS DE VARIATION D'UN INTERVALLE DE RÉFÉRENCE DE POPULATION ET CONSÉQUENCES PRATIQUES

- Les caractéristiques de la population : espèce, sexe, âge, conditions d'élevage, alimentation, etc.
 - ◇ L'IR ne s'applique qu'à des individus semblables à ceux qui ont servi à l'établir.
 - ◇ Un IR rapporté sans indications démographiques est difficilement utilisable.
- La technique de mesure de la variable.
L'IR obtenu avec une technique (ou un analyseur, ou un laboratoire extérieur) n'est pas transposable sans vérification à une autre
- La méthode de détermination des limites de l'intervalle.
Les IR de publications anciennes et des traités généraux ne contiennent pas ce type d'information.

4. IR DES ANALYSEURS DES ESV

- Les IR donnés par les fournisseurs n'ont en règle générale pas été établis ou validés conformément aux recommandations internationales. De plus, ils ne tiennent que rarement compte des partitions (âge, sexe, ...).
- Certains IR ont fait l'objet de publications validées et peuvent être obtenus auprès des fournisseurs.

5. IR DES LABORATOIRES PRESTATAIRES DE SERVICE

Ils ont, en principe, été établis ou validés conformément aux recommandations internationales et l'information correspondante peut leur être demandée.

6. IR DE LA LITTÉRATURE : QU'EN FAIRE ?

Ne pas adopter un IR si l'on ne dispose pas de la majorité (totalité) des informations citées au premier paragraphe du point 3.

7. PROCÉDURE PRATIQUE DE TRANSFERT D'IR DE LA LITTÉRATURE CONFORMÉMENT AUX RECOMMANDATIONS INTERNATIONALES POUR UNE UTILISATION DANS UN ESV

- Sélectionner l'intervalle de référence qui semble convenir.
 - Sélectionner 20 sujets en bonne santé et mesurer la variable dans les conditions de l'ESV :
 - ◇ si plus de 4 résultats sont en dehors des limites, l'IR ne peut être transféré et il faut en choisir un autre ou bien l'établir de novo ;
 - ◇ si au maximum 2 résultats sont en dehors des limites, l'IR peut être transféré ;
 - ◇ si 3 ou 4 résultats sont en dehors des limites, recommencer avec 20 autres sujets en bonne santé ;
- puis :**
- ◆ si au maximum 2 résultats sont en dehors des limites, l'IR peut être transféré ;
 - ◆ si plus de 2 résultats sont en dehors des limites, l'IR ne peut être transféré et il faut en choisir un autre ou l'établir *de novo*.

8. DÉTERMINATION DE NOVO D'UN IR DE POPULATION

- C'est une procédure longue, difficile et coûteuse qui n'est pas recommandée si l'on n'est pas familiarisé avec les recommandations.
- Cependant, une première approche est possible si l'on dispose de 40 résultats obtenus chez des sujets sains en s'aidant d'un logiciel gratuit :
 - Reference value advisor: <http://www.biostat.envt.fr/reference-value-advisor/>.

9. DÉTERMINATION DE NOVO D'UN IR INDIVIDUEL

- On ne dispose en général que de quelques résultats obtenus chez ce sujet à l'occasion de consultations de convenance, en l'absence de toute affection.
- Ils ne permettent pas un traitement statistique satisfaisant mais permettent d'observer la variabilité des analytes chez le sujet lui-même, qui est en général inférieure à celle d'un IR de population et permet un meilleur suivi clinique.

- ✓ Un intervalle de référence décrit les fluctuations d'une variable chez 95% des sujets sains alors qu'un seuil de décision permet de séparer sujets sains et malades.
- ✓ Les intervalles de référence utilisés dans un ESV doivent être établis ou validés avec l'analyseur de l'ESV pour les sujets soignés dans l'ESV.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ANALYSES

Jean Pierre Braun et Catherine Trumel

Le schéma initial établit les étapes de la démarche intellectuelle du vétérinaire qui procède à l'interprétation d'un résultat d'analyse. La seconde partie apporte les éléments de compréhension nécessaires.

PATIENT

Estimer si la suspicion clinique justifiant les analyses est forte, moyenne, faible, indéterminée.
Sélectionner les tests qui ont la plus grande efficacité pour confirmer ou infirmer la(les) hypothèse(s) diagnostique(s).

Estimer la probabilité prétest que le sujet soit atteint de l'affection pour laquelle les tests sont effectués.
Sélectionner les tests qui ont les plus fortes :
Sensibilité pour une valeur donnée de la variable, pourcentage des sujets malades (atteints de l'affection pour le diagnostic de laquelle le test est effectué) présentant un résultat « anormal »
Spécificité pour une valeur donnée de la variable, pourcentage des sujets non-malades, (non-atteints de l'affection pour le diagnostic de laquelle le test est effectué), présentant un résultat « normal »

PRÉLÈVEMENT ANALYSE RÉSULTAT

Vérifier :

- ◆ l'absence de possibles effets pré-analytiques (cf prélèvement) et analytiques (cf CQ)
- ◆ la cohérence clinique des résultats

Valider le ou les résultats

INTERPRÉTATION ETAPE 1

Décider si le résultat est « normal » ou « anormal »

En tenant compte de l'âge, du sexe, de la prise de médicaments, etc., positionner le résultat par rapport à :
un intervalle de référence de population intervalle dans lequel se trouvent 95% des valeurs observées chez des sujets en bonne santé de la même espèce
un intervalle de référence individuel marge de fluctuation de la variable chez le sujet avant l'affection justifiant le test
un seuil de décision valeur établie par un comité d'experts au-delà (en deçà) de laquelle le sujet est déclaré atteint de l'affection pour laquelle l'analyse a été effectuée

INTERPRÉTATION ETAPE 2

Décider si le sujet est atteint de l'affection pour le diagnostic de laquelle la ou les analyses a (ont) été effectuée(s), en fonction de la suspicion de départ et du résultat du test

Estimer les valeurs prédictives du résultat :
probabilité qu'un sujet présentant un résultat supérieur (inférieur) à une limite donnée soit malade (valeur prédictive positive, VPP) ou non-malade (valeur prédictive négative, VPN).

1. PRÉCAUTIONS D'UTILISATION DES LIMITES DE RÉFÉRENCE ET SEUILS DE DÉCISION.

- Les seuils de décision et IR sont souvent publiés sans que les techniques soient indiquées et ne sont pas obligatoirement transposables à tous les analyseurs. Bien souvent, ils ne tiennent pas compte des facteurs de variation non pathologiques de la variable, par exemple : âge, masse musculaire, etc.
- Les limites supérieure et inférieure de l'intervalle de référence de population laissent par définition 5 % des sujets en bonne santé en dehors de leurs limites. Plus on s'éloigne de ces limites, plus grande est la probabilité que la valeur ait été obtenue chez un sujet malade.
- Un intervalle de référence individuel est obtenu grâce à des analyses faites chez le sujet non-malade (visites de convenance, par exemple) ; il permet d'interpréter des différences plus faibles que l'IR de population.
- Interprétation de bilans : plus le nombre d'analyses effectuées est grand, plus est grande la probabilité d'observer un résultat hors de l'intervalle de référence chez un sujet non-malade (probabilité d'environ 40% pour un bilan de 10 variables indépendantes).

2. CARACTÉRISTIQUES DE LA SENSIBILITÉ ET DE LA SPÉCIFICITÉ DES TESTS BIOLOGIQUES

- Plus ces pourcentages sont élevés, plus la discrimination entre malade et non-malade est efficace.
- Lorsque la spécificité est égale à 100% pour un seuil donné de la variable, tous les sujets positifs sont malades (en revanche, certains malades peuvent aussi être négatifs).
- Lorsque la sensibilité est égale à 100%, tous les sujets négatifs sont non-malades (certains non-malades peuvent aussi être positifs).

3. VALEURS PRÉDICTIVES

- **Les valeurs prédictives** ne peuvent être estimées qu'en tenant compte de la probabilité *a priori* que le sujet soit malade ou non-malade (prévalence de l'affection en médecine collective, estimation du clinicien en médecine individuelle).
- **La valeur prédictive positive (VPP)** est d'autant plus élevée que la probabilité *a priori* que le sujet soit malade et la spécificité sont élevées.
- **La valeur prédictive négative (VPN)** est d'autant plus élevée que la probabilité *a priori* que le sujet soit malade est basse et la sensibilité est élevée.
- Les calculs des VP sont un peu difficiles ; il existe de petits logiciels gratuits permettant de les estimer en fonction des caractéristiques du test et de la probabilité *a priori* :
- par exemple : Predictive Value Advisor ; <http://www.biostat.envt.fr/ppvnpv/>.

2

EQUIPEMENT DE BASE DU LABORATOIRE DE L'ESV

Des outils à utiliser de façon adéquate

2.1 MATÉRIEL DE PAILLASSE :

- A. Le microscope - C. Trumel
- B. Les centrifugeuse - JP. Braun
- C. Le réfractomètre clinique - JP. Braun

2.2 LES PETITS ANALYSEURS PORTABLES - JP. Braun

2.4 LES TESTS RAPIDES À LECTURE VISUELLE - JP. Braun

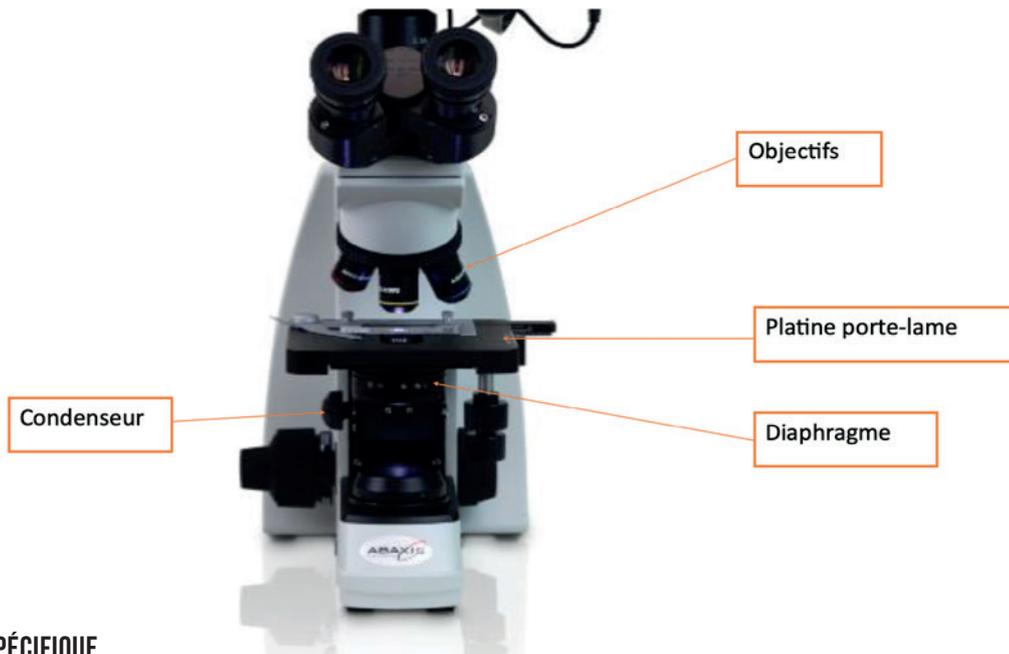


OBJECTIF

Savoir choisir et utiliser un microscope en fonction de ce que l'on a à regarder.

1. EQUIPEMENT D'UN MICROSCOPE OPTIQUE

- Tête binoculaire X 10, de diamètre variable (13 à 20 mm).
- Objectifs X 4, X 10, X 40, X 100.
- Objectif X 20 en option mais utile en hématologie et cytologie.
- L'objectif X 100 s'utilise avec de l'huile à immersion. Les différentes huiles ne sont pas miscibles ; choisir une seule huile.
- Préférer les microscopes ayant un condenseur à position variable.
- Préférer les microscopes vendus par des fabricants de microscopes ayant un service après-vente.
- Préférer les microscopes dont la lumière est froide et dans les bleus pour avoir une meilleure qualité d'image et une meilleure appréciation des couleurs des éléments observés.

**2. UTILISATION SPÉCIFIQUE**

- **Pour regarder un frottis sanguin ou une lame d'étalement cytologique :**
 - ◇ Monter le condenseur au maximum afin qu'il soit pratiquement au contact de la platine porte-lame.
 - ◇ Ouvrir le diaphragme au maximum.
 - ◇ Pour éviter un éblouissement trop important, diminuer l'intensité lumineuse par le rhéostat situé sur le bouton d'ouverture ou en général à proximité.
- **Pour regarder un prélèvement en suspension (culot urinaire, test d'agglutination sur lame, spermogramme) :**
 - ◇ Abaisser un peu le condenseur (position intermédiaire entre le minimum et le maximum).
 - ◇ Fermer le diaphragme au maximum ou presque.
 - ◇ Augmenter l'intensité lumineuse si nécessaire par le rhéostat.

3. LAMES À UTILISER

- Choisir des lames rodées industriellement pour éviter la poussière de verre qui rend la réalisation d'un étalement difficile par la présence de « grumeaux », et la lecture d'un culot urinaire délicate par la présence systématique de cristaux ... de verre artéfactuels.
- Choisir des lames dégraissées industriellement pour éviter la présence de gras sur les lames rendant les étalements de sang difficiles.
- Choisir des lames matées à une extrémité afin de pouvoir écrire au crayon de papier les informations sur le patient, la date de prélèvement et la nature du prélèvement. Seul le crayon de papier doit être utilisé car les feutres indélébiles ne le sont plus dans les bains de coloration.

4. POSITIONNEMENT DE LA LAME SUR LE MICROSCOPE ET OBSERVATION

- Tenir la lame à observer par la zone matée et positionner la lame dans l'espace prévu à cet effet sur la platine porte-lame systématiquement avec la main droite si vous êtes droitier et avec la main gauche si vous êtes gaucher. Cette préconisation a pour objectif d'être systématique et de gagner du temps.
- Faire la mise au point avec votre objectif X10, puis en fonction des besoins tourner la tourelle porte-objectifs sans abaisser la platine porte-lame et en ajustant simplement la mise au point par la vis micrométrique (système de mise au point fin).
- Pour l'objectif X 40, placer une lamelle fine sur votre lame à observer afin d'obtenir une netteté parfaite.
- Ne pas mettre d'huile en contact avec les objectifs (sauf objectif à immersion). En cas d'accident, utiliser un papier absorbant doux pour enlever le plus rapidement possible le surplus d'huile, puis si nécessaire, nettoyer l'objectif en utilisant un nettoyant spécifique vendu par le fabricant ou en utilisant un mélange 50 % d'éther et 50 % d'alcool incolore à 90 ou 95° (ne surtout pas utiliser d'alcool de couleur jaune).

5. ENTRETIEN DU MICROSCOPE

- Essuyer chaque soir l'objectif X 100 avec un papier absorbant. En cas d'utilisation intense, utiliser un nettoyant (cf paragraphe précédent).
- Recouvrir le microscope entre ses utilisations.

OBJECTIF

Fractionner et/ou séparer les constituants d'une suspension hétérogène pour :

- en déterminer les proportions relatives (ex. hématocrite),
- ou en préparer une fraction (ex. préparation d'un plasma ou d'un sérum, d'un culot urinaire),
- et/ou concentrer le spécimen (culot urinaire, liquide d'épanchement cavitaire ...).

1. TYPES D'ÉQUIPEMENTS DE ROUTINE

En fonction des besoins :

- Rotors horizontaux pour hématocrite.
- Rotors angulaires (ou oscillants) et vitesses variables pour préparer des sérums, plasmas, culots ...

2. VITESSE DE CENTRIFUGATION

Expression : en principe en g^* et non en tours/min ; l'accélération varie en fonction du rayon de centrifugation soit nombre de $g = 1,118 \times 10^{-5} \times \text{rayon (cm)} \times (\text{nb tours/min})^2$

- Vitesse modérée (environ 300 à 500 g pendant environ 5 min) pour préserver les éléments figurés (cellules sanguines, cylindres urinaires, etc.).
- Vitesse forte à très forte pour séparer le plus possible les phases solide et liquide (environ 3000 g pendant 5 à 10 min pour la préparation des plasmas ; 12 à 15000 g pendant 3 à 5 min pour l'hématocrite).

3. PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- Equilibrer les charges du rotor (moins important pour les centrifugeuses à microhématocrite) pour éviter d'endommager l'appareil.
- Nettoyer soigneusement la cuve et les godets ou le plateau.
- Ne jamais ouvrir le couvercle avant arrêt complet du rotor (en principe impossible avec les matériels les plus récents).

LEXIQUE

***g** : Valeur approximative de l'accélération de la pesanteur. Il exprime le rapport entre la force centrifuge et la pesanteur descendante, c'est à dire le poids

OBJECTIF

Utilisations en biologie médicale :

- Dosage des protéines sériques ou plasmatiques.
- Mesure de la densité urinaire (urines centrifugées en cas de turbidité).
- Evaluation de la concentration protéique des liquides d'épanchements.

1. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

- Mesure de l'indice de réfraction d'une solution et conversion empirique de cette valeur en un résultat de concentration de protéines ou de valeur de densité urinaire.
- L'indice de réfraction dépend de la totalité des molécules en solution (d'où le vocable anglais parfois utilisé de Total Solids) :
 - ◇ dans un sérum, un plasma ou un épanchement, le principal facteur de variation de l'indice de réfraction est la concentration protéique,
 - ◇ dans l'urine, c'est la quantité totale de molécules et ions en solution qui déterminent la densité.

2. AVANTAGES MAJEURS

- Résultat instantané avec un très faible volume de spécimen (1 goutte).
- Résultats bien corrélés avec l'osmométrie pour la densité urinaire (mais non avec les bandelettes dont les résultats sont le plus souvent inexacts) et avec la réaction du biuret pour les protéines.
- Pratiquement aucun effet de l'ictère (qui entraîne des résultats faussement abaissés de la mesure des protéines avec la technique du biuret)

3. FACTEURS DE VARIATION

- La température : son influence est faible ; de nombreux réfractomètres ont une compensation automatique de la température.
- La turbidité des solutions ou la présence d'hémoglobine qui rendent parfois aléatoire la lecture du résultat avec les appareils à lecture visuelle ; la bilirubine n'interfère pas.
- Dans un sérum ou un plasma, des concentrations élevées de petites molécules (urée, glucose par exemple) entraînent une légère erreur par excès.
- La conversion entre indice de réfraction et résultat de mesure (protéines, densité) étant empirique, les résultats donnés par les réfractomètres de différentes marques peuvent différer légèrement ou bien être inexacts dans certaines espèces.
Il en résulte qu'il est prudent de ne comparer que des résultats obtenus avec le même instrument.

4. LIMITES DU RÉFRACTOMÈTRE

- Pour l'urine, la limite supérieure de l'intervalle de mesure est 1,050 ; si les urines sont très concentrées, diluer au ½ avec de l'eau distillée, mesurer et multiplier les chiffres décimaux de l'échelle de lecture par 2.
- Pour les protéines des liquides d'épanchement, la mesure est semi-quantitative en-dessous d'environ 10 g/L mais permet de distinguer transsudat et exsudat.

PRÉCAUTION PRÉALABLE D'UTILISATION INDISPENSABLE

- ✓ Avant toute mesure (ou au moins fréquemment), vérifier la valeur 1,000 avec de l'eau distillée (ou à défaut de l'eau du robinet, mais jamais avec autre chose) pour éviter le risque d'erreur de mesure de la densité urinaire ou des protéines.
- ✓ Nettoyer régulièrement l'optique de l'appareil, exclusivement avec de l'eau et un chiffon doux (ne jamais utiliser d'eau de Javel, solvants, détergents, matériaux rugueux)

Objectifs : * Équipement constitutif du laboratoire indispensable et utilisé au quotidien	Équipement de base du laboratoire de l'ESV pour de nombreux examens au chevet de l'animal
Indication : * Matériel	<input checked="" type="checkbox"/> Indispensable <input type="checkbox"/> Utile <input checked="" type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic
Avantages : * Usage	<input checked="" type="checkbox"/> Facile <input type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients /Contraintes : * Utilisation	<input type="checkbox"/> Difficile <input checked="" type="checkbox"/> Longue (parfois, assez...) <input type="checkbox"/> Contraignante <input checked="" type="checkbox"/> Coût moyen (en temps passé ...)
Apport au diagnostic : * Important par les nombreux examens réalisables	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (paramétrage technique des appareils) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Faible	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Modéré	Matériel : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Élimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - lames, tubes capillaires, cônes de pipettage <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité :	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

OBJECTIFS

- Les glucomètres et autres analyseurs portables similaires sont de petits appareils destinés majoritairement à l'auto-contrôle de patients humains ou dérivés de ces appareils. Ils fonctionnent sur une goutte ou un très faible volume de sang total et peuvent être mono ou multiparamétriques.
- L'objectif de qualité est de vérifier que ces analyseurs donnent des résultats utilisables en biologie médicale animale et de tenir compte de leurs limites. Certains d'entre eux ont été validés dans une ou plusieurs espèces animales pour certains types de spécimens ; cela doit être documenté au cas par cas.

1. CARACTÉRISTIQUES DE CES ANALYSEURS

- Le spécimen prévu en biologie humaine est du sang total capillaire prélevé à la pulpe du doigt (exceptionnellement au talon en pédiatrie).
- Une conversion est effectuée par l'analyseur pour donner un équivalent de concentration plasmatique de l'analyte.
- Selon la valeur de l'hématocrite, il n'est donc pas anormal d'obtenir une valeur différente (faiblement) de la concentration mesurée dans un plasma.

2. CONTRÔLE DE QUALITÉ DES PETITS ANALYSEURS PORTABLES

- Les fabricants proposent des solutions de contrôle permettant de s'assurer de l'exactitude des mesures pour des spécimens humains. Cependant, ces contrôles ne sont pas adaptés aux spécimens animaux.
- On ne peut donc que vérifier le bon fonctionnement de l'analyseur sans préjuger de l'exactitude des mesures avec des spécimens animaux.

3. DIFFÉRENCE ENTRE RÉSULTATS SÉRIQUES OU PLASMATIQUES ET RÉSULTATS DES ANALYSEURS DU TYPE GLUCOMÈTRE

- La différence entre les deux types de mesures étant « normale », il ne faut jamais comparer les résultats obtenus avec les deux systèmes.
- D'éventuels suivis de patients (par ex. test d'hyperglycémie) ne peuvent être faits que sur les mêmes spécimens et le même analyseur.

- ✓ Vérifier périodiquement le bon fonctionnement à l'aide des solutions de contrôle des fabricants
- ✓ Ne pas alterner avec les résultats d'analyses habituelles pour le suivi d'un patient

Quelques applications :

- *Ces matériels sont utilisés comme équipement de paillasse du laboratoire de l'ESV ou outil embarqué en voiture en rurale.*
- *Les analyses proposées sont diverses : glycémie pour le chien et le chat, lactates et corps cétoniques chez les ruminants, SAA (Serum Amyloïd A) chez le cheval....*

Pour en savoir plus :

- *Dossier: Quelle stratégie analytique pour mon ESV, fiches 4.1 à.4.4*

DÉFINITION – OBJECTIFS

- Les tests rapides à lecture visuelle visent principalement à l'évaluation quantitative ou semi-quantitative de un ou plusieurs marqueurs sanguins ou urinaires dans un but de dépistage.
- Très simples à utiliser, ils donnent de bons résultats à condition de les utiliser dans les conditions recommandées par les fabricants.

1. CARACTÉRISTIQUES DES TESTS RAPIDES À LECTURE VISUELLE

- Ces tests ont :
 - ◇ plusieurs présentations : bandelettes, cartouches, etc ;
 - ◇ des méthodes diverses : colorimétrie, enzymologie, immunologie, etc ;
 - ◇ une zone de dépôt du spécimen dont le volume n'est en général pas contraignant ;
 - ◇ une zone de lecture (parfois confondue avec la zone de dépôt) à comparer visuellement à l'échelle de lecture donnée par le fabricant ;
 - ◇ pour éviter la variabilité de lecture des utilisateurs, certains sont couplés à des lecteurs spécifiques.
- Les résultats sont qualitatifs (par exemple, présence vs absence) ou au mieux semi-quantitatifs (les concentrations indiquées par les fabricants n'ont pas été validées pour des spécimens animaux à quelques exceptions près).

2. CONTRÔLE DE QUALITÉ DES TESTS RAPIDES À LECTURE VISUELLE

Même si les fabricants proposent des solutions de contrôle, il est rare qu'elles soient utilisées, ces contrôles n'étant pas superflus.

- Les principales précautions d'utilisation sont :
 - ◇ de respecter la date de péremption ;
 - ◇ de conserver les réactifs dans des conditionnements fermés (par exemple, toujours refermer les flacons de bandelettes urinaires) dans les conditions de température recommandées et de **respecter les délais de remise à température ambiante avant utilisation pour les réactifs conservés en réfrigération ou en congélation ;**
 - ◇ de suivre à la lettre les modes opératoires donnés par les fabricants.

Ces tests sont si simples à utiliser qu'il est impératif de le faire en respectant **toutes** les conditions d'utilisation recommandées par le fabricant.

pour en savoir plus

- *Dossier : Infectiologie, fiche 3.7. A Tests rapides à orientation diagnostique*
- *Dossier : Quelle Stratégie analytique pour mon ESV, fiches 4.1.à 4.4*

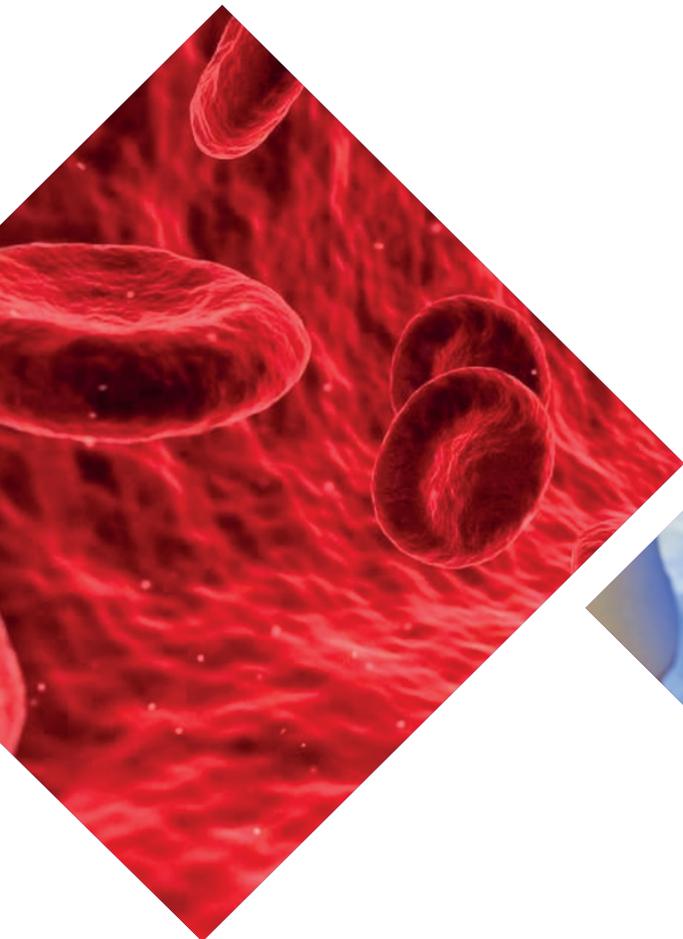
3.1

HÉMATOLOGIE

Réaliser en pratique un examen de qualité

Nous ne développons pas le fonctionnement particulier des analyseurs d'hématologie qui ne serait que la répétition imparfaite d'un mode d'emploi. Il est plus utile d'apporter au lecteur la description des techniques complémentaires réalisables en ESV.

- 3.1 A. Les prélèvements sanguins pour l'hématologie - C. Trumel
- B. Le frottis sanguin - N. Bourges-Abella
- C. Le comptage des réticulocytes - C. Trumel
- D. Exploration de la coagulation - C. Trumel
- E. Groupage sanguin et Cross match - C. Trumel



A. LES PRÉLÈVEMENTS SANGUINS POUR L'HÉMATOLOGIE

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Savoir réaliser, traiter, éventuellement envoyer un spécimen sanguin pour la réalisation d'un examen hématologique.

ESPÈCES CONCERNÉES : TOUTES

1. PRÉPARATION DU PATIENT

Lorsque cela est possible

- Réaliser les prises de sang sur un animal à jeun. En effet, la prise récente d'un repas peut entraîner, dans certaines espèces, l'apparition d'une lipémie postprandiale qui interfère notamment avec le dosage de l'hémoglobine.
- Éviter ou limiter au maximum le stress au moment ou dans les minutes précédant la prise de sang : la sécrétion de catécholamines puis de cortisol peut fortement modifier plusieurs analytes hématologiques, en particulier chez le chat, lymphocytose, thrombocytose, formation d'agrégats plaquettaires, augmentation de l'hématocrite par splénocontraction
- En cas d'anesthésie, de nombreuses variables sont modifiées dont l'hématocrite et la numération leucocytaire. Il est donc nécessaire de le préciser en cas d'envoi à un laboratoire. Si l'anesthésie est indispensable, réaliser le prélèvement aussi rapidement que possible.

2. CHOIX DU TUBE ET DU MATÉRIEL DE PRÉLÈVEMENT

- Un tube adapté à la taille de l'animal et au volume nécessaire pour les analyses prévues pour limiter au maximum le volume prélevé.
- Une seringue avec aiguille ou système sous vide ou système par écoulement capillaire.
- Une aiguille de diamètre assez grand et une dépression (si seringue) assez faible pour éviter l'hémolyse ; en cas de transfert d'une seringue vers un tube, retirer l'aiguille.
- Des anticoagulants : chez les mammifères, l'EDTA* (tube violet) ou le CTAD*, notamment chez le chat car il limite l'agrégation plaquettaire (tube bleu turquoise et jaune) et l'héparine pour les tortues et les corvidés (tube vert)

3. LE PRÉLÈVEMENT

- Réaliser une ponction franche du vaisseau puis remplir le tube le plus rapidement possible avec un flux le plus laminaire possible, en respectant au mieux le niveau de remplissage du tube.
- Le tube sera rempli au moins à moitié par rapport aux recommandations du fabricant.

4. RÉPARATION DU SPÉCIMEN

- Identifier clairement le tube afin d'éviter les erreurs.
- Respecter le volume de spécimen prévu par le fabricant : c'est essentiel pour les anticoagulants liquides (CTAD) ; un tube insuffisamment rempli peut entraîner des dilutions, et un tube trop rempli peut conduire à la formation de caillots.
- Pour un prélèvement sur EDTA, le tube doit être rempli au moins à moitié ; sinon, l'excès d'EDTA peut entraîner une hémolyse, une contraction des globules rouges et donc une sous-estimation du volume globulaire moyen (VGM*) et de l'hématocrite et une surestimation de la CCMH* par exemple.
- Homogénéiser le spécimen immédiatement en retournant le tube 8 à 10 fois par des mouvements lents et sans agitation excessive de façon à bien répartir la totalité de l'anticoagulant dans l'ensemble du sang collecté.
- Le délai avant analyse du spécimen sera aussi court que possible. Les numérations sont stables 24 à 48 heures quand le sang est conservé à + 4°C. Pour les index associés aux hématies et aux plaquettes, il est à noter que les cellules ont tendance à gonfler : le VGM et la CCMH sont alors faux (fausse macrocytose, surestimation de l'hématocrite et fausse hypochromie).

5. ANALYSE DU SPÉCIMEN DANS L'ESV

- Avant toute analyse, examiner le spécimen pour détecter (et noter) d'éventuelles anomalies (caillots, couleurs) et éventuellement faire un nouveau prélèvement.
- Retourner le tube 10 fois délicatement avant de réaliser le comptage et vérifier l'absence de caillot macroscopique.
- Suivre les recommandations du fabricant pour le passage dans l'automate
- En cas de conservation du spécimen pour une analyse différée, réaliser le frottis sanguin immédiatement pour préserver la morphologie cellulaire et éviter la formation d'artefacts liés au vieillissement cellulaire puis placer le tube de sang à 4°C. Le remettre doucement à température de la pièce avant réalisation du comptage.

6. TRAITEMENT DU SPÉCIMEN POUR UN ENVOI EN LABORATOIRE

- Vérifier l'absence de caillot macroscopique.
- Envoyer le tube de sang et un ou deux frottis sanguins réalisés rapidement après le prélèvement.
- Remplir la feuille de demande avec les commémoratifs adéquats et suivre les recommandations d'envoi en fonction du laboratoire.
- Envoyer l'ensemble bien identifié dans un emballage prévu à cet effet fourni par le laboratoire d'envoi et les lames dans un étui porte-lame également fourni.
- Ne pas envoyer dans un emballage contenant un spécimen avec du formol.
- Eviter un envoi si le spécimen est traité plus de 48h après réalisation de la prise de sang.
- **Ne jamais mettre le spécimen en contact avec un pack réfrigéré de température inférieure à 4°C ou dans un environnement où la température dépasse 30°C**

- ✓ Prélever le sang de préférence chez un sujet préparé et calme.
- ✓ Choisir des tubes d'un volume adapté au volume de sang collecté en respectant le volume de spécimen prévu par le fabricant.
- ✓ Examiner les tubes avant analyse et noter les anomalies éventuelles.

LEXIQUE

***EDTA** : éthylènediaminetétraacétate

***CTAD** : citrate théophylline adénosine dipyridamole

***VGM** : volume globulaire moyen

***CCMH** : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

B. LE FROTTIS SANGUIN

Nathalie Bourges-Abella



OBJECTIFS

Préparer un frottis sanguin de qualité pour :

- Apprécier l'organisation (rouleaux et agglutinats d'hématies, agrégats plaquettaires) et la richesse/pauvreté (évaluation semi-quantitative) des différentes populations sanguines.
- Réaliser une analyse morphologique qualitative des éléments figurés.
- Vérifier ou établir la formule leucocytaire.
- Apprécier les anomalies morphologiques des différentes populations sanguines.
- Identifier des agents infectieux.
- Mettre en évidence des cellules néoplasiques.
- Valider les résultats chiffrés donnés par les analyseurs d'hématologie..

ESPÈCES CONCERNÉES : TOUTES, AVEC LEURS PARTICULARITÉS PHYSIOLOGIQUES.

1. MATÉRIEL

- SANG : veineux, prélevé sur tube EDTA* (bouchon violet ou rouge) ou CTAD* (bouchon bleu et jaune).
- LAMES DE VERRE
 - ◇ une lame porte-objet lavée, dégraissée et rodée industriellement et si possible avec une zone matée permettant l'identification précise du spécimen,
 - ◇ une lame rodée à bord biseauté de largeur inférieure si possible à celle de la lame porte-objet.
- PIPETTE PASTEUR À USAGE UNIQUE ou AUTRE MOYEN PERMETTANT DE DÉPOSER UNE GOUTTE DE SANG STANDARDISÉE DE PETITE TAILLE (environ 1 à 2 mm de diamètre).
- COLORANTS : colorants rapides (kits du commerce) ou May-Grünwald et Giemsa ou autre colorant de type Romanowski.

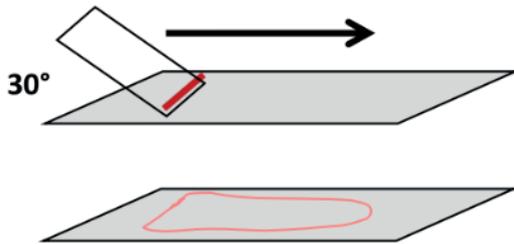
2. RÉALISATION DU FROTTIS

Les altérations morphologiques étant précoces, le frottis doit être réalisé dès que possible après la ponction sanguine.

- Homogénéiser le tube de sang par une dizaine de retournements successifs avant de prélever et de déposer une goutte de sang de petite taille à l'extrémité de la lame porte-objet.
Faire glisser une lame rodée au contact de la goutte de sang en formant un angle d'environ 20 à 30° avec la lame porte-objet.



- Laisser le sang se répartir sur toute la largeur de la lame rodée.
- Glisser la lame rodée d'un mouvement ferme, régulier ET LENT.



Étalement :

- Ni trop rapide: frottis court et épais
- Ni trop lent: frottis trop long qui déborde de la lame porte-objet

Le frottis doit être contenu **en totalité** sur la lame ; ses différentes régions (tête, corps et queue) ne doivent pas toucher les extrémités de la lame porte-objet.

- **Suite à l'étalement, sécher immédiatement le frottis par agitation énergique. Si le frottis doit être expédié à un laboratoire, ne pas le colorer.**
- La vitesse d'étalement et l'angle formé entre la lame rodée et la lame du frottis doivent être modifiés en fonction de l'hématocrite : lors d'anémie sévère, la vitesse d'étalement doit être plus rapide ou l'angle formé plus important afin d'éviter que l'étalement ne sorte de la lame ; lors de polyglobulie, la vitesse d'étalement doit être ralentie ou l'angle formé plus petit afin d'éviter que le frottis ne soit pas trop court lame porte-objet

IMPORTANT ! ARTEFACTS DE RÉALISATION

Un frottis mal séché peut faire apparaître des altérations de tous les globules rouges (échinocyte, torocyte, cellule cible) d'une zone donnée à la différence d'une poikilocytose vraie qui ne touche que quelques globules rouges répartis sur l'ensemble de l'étalement.

3. COLORATION DU FROTTIS

Coloration rapide

Ce type de coloration permet une analyse morphologique des cellules sanguines, souvent suffisante, et a l'énorme avantage d'être simple et rapide d'utilisation. Les procédures de coloration peuvent varier selon le kit employé ; il est donc nécessaire de respecter les recommandations du fabricant.

Artefacts de coloration

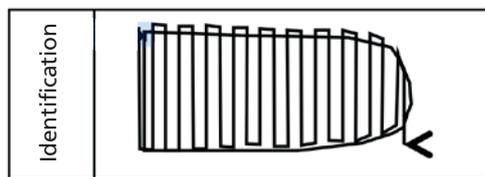
Des dépôts de colorants peuvent se former notamment à la périphérie des globules rouges ou à leur surface. Ces dépôts, de taille hétérogène, apparaissent réfringents en faisant varier la mise au point du microscope et se différencient ainsi de *Mycoplasma haemofelis* ou *M. Haemominutum*.

Pour éviter les dépôts : fermer les flacons après utilisation car les colorants s'évaporent, utiliser de petits flacons (type flacon urinaire) afin de changer régulièrement les solutions, filtrer les colorants.

4. EXAMEN DU FROTTIS

Toujours en deux temps et dans cet ordre :

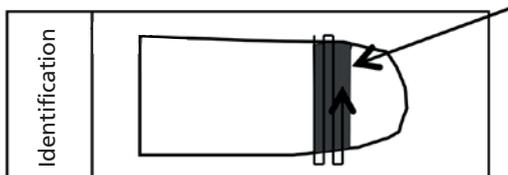
- **Le frottis est d'abord observé au faible grossissement** (x100 ou x200 avec des oculaires x10 et des objectifs x10 ou x20).
 - ◇ Il est nécessaire de réaliser un balayage de l'ensemble de la lame en réalisant des créneaux serrés en partant de la goutte et en allant jusqu'à l'extrémité de la queue du frottis.
 - ◇ Cette étape permet : d'apprécier la répartition des cellules sanguines, de détecter l'éventuelle présence anormale d'agrégats plaquettaires voire leucocytaires, d'apprécier la richesse en leucocytes (normalement plus nombreux sur les bords et en queue de frottis) et d'évaluer la richesse en globules rouges.
 - ◇ Le faible grossissement permet également l'observation d'éléments de grande taille (microfilaires, ...).
- **Le frottis est ensuite examiné au fort grossissement** (objectif x100 à immersion) en fin de corps de frottis (schéma ci-dessus).
 - ◇ Cette zone est située dans le dernier tiers du frottis lorsque l'hématocrite est normal mais peut être située dans des zones différentes si l'hématocrite est anormal. Pour l'identifier, il suffit de repérer la zone où les globules rouges sont les uns à côté des autres, ne se chevauchent pas mais ne sont pas non plus trop espacés les uns des autres.
 - ◇ Cette répartition est idéale pour confirmer la formule leucocytaire et apprécier la morphologie cellulaire.
 - ◇ La formule leucocytaire peut être réalisée en comptant 100 globules blancs dans la zone d'observation, par balayage en créneaux, afin de ne pas compter plusieurs fois le même leucocyte. Pour faciliter l'exactitude des calculs différentiels de leucocytes, il est conseillé d'utiliser un compteur électrique ou d'utiliser une application gratuite de numération de cellules sanguines pour smartphone.



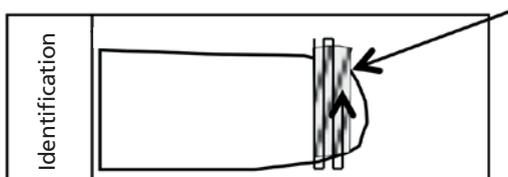
Tête corps queue
Régions d'un frottis sanguin

Faible grossissement :

Balayage systématique, en créneaux, d'un bord du frottis à l'autre, sur l'ensemble de la lame en partant de la goutte jusqu'à l'extrémité de la queue du frottis.



Zone d'observation (hachurée) de la morphologie des cellules sanguines au **fort grossissement (x1000)** : l'ensemble des cellules est dispersé de façon homogène, notamment les globules rouges sont équidistants les uns des autres, non chevauchants



En situation de leucopénie, compter par petits créneaux sur les bords du frottis.
Si la leucopénie est sévère, on ne compte pas toujours les cellules mais on regarde quelle(s) population(s) semble(nt) prédominer.

REMARQUE

Chez les ruminants les frottis sanguins sont rarement effectués. Ils ne servent quasi exclusivement qu'à la détection des hémoparasites, *Babesia*, *Anaplasma* et *Mycoplasma wenyonii*

- ✓ Réaliser le frottis sanguin le plus rapidement possible après la ponction sanguine.
- ✓ Homogénéiser le tube de sang veineux avant de prélever une goutte de sang nécessaire à la réalisation du frottis.
- ✓ Après son étalement, sécher immédiatement le frottis par agitation énergique.
- ✓ Examiner le frottis sanguin au microscope en deux temps (moyen et fort grossissements)

LEXIQUE

***EDTA** : éthylènediaminetétraacétate

***CTAD** : citrate théophylline adénosine dipyridamole

B. EN PRATIQUE

LE FROTTIS SANGUIN

Objectifs : * Permettre par lecture au microscope	* La cytologie du sang * Une formule leucocytaire * La recherche des parasites du sang
Indication : * Examen fréquent et complémentaire des résultats d'analyseur	<input checked="" type="checkbox"/> Indispensable <input type="checkbox"/> Utile <input checked="" type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic
Avantages : * Utilisation	<input checked="" type="checkbox"/> Facile <input type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients /Contraintes : * Technique	<input type="checkbox"/> Difficile <input checked="" type="checkbox"/> Longue (pour une formule complète) <input type="checkbox"/> Contraignante <input checked="" type="checkbox"/> Coût moyen (en temps passé...)
Apport au diagnostic : Indispensable	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Moyen	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Modéré	Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Elimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - lames, colorants, mat. Pipetage <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité :	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

C. LE COMPTAGE DES RÉTICULOCYTES

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Réaliser en pratique un comptage des réticulocytes.

Sont décrites dans cette fiche : les méthodes de réalisation, le comptage et l'interprétation

ESPÈCES CONCERNÉES : TOUTES

1. LES MÉTHODES DE COMPTAGE DES RÉTICULOCYTES DISPONIBLES

- **Méthodes automatisées**

Automates d'hématologie utilisant la cytométrie en flux. Attention! La mention IDR signifie : index de distribution des rouges et non pas index de réticulocytose ; cet index renseigne sur l'anisocytose des hématies.

- **Méthodes manuelles**

- ◇ Bleu de crésyl brillant.
- ◇ New methylene blue.
- ◇ Test Simplet : lame pré-colorée.

2. PROCÉDURE MANUELLE DU COMPTAGE DES RÉTICULOCYTES

Avec une solution de New Methylene Blue ou de Bleu de Crésyl brillant

- MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- ◇ Solution de New Methylene Blue ou solution de Bleu de Crésyl brillant.
- ◇ Tubes ou micro-tubes sans anticoagulant.
- ◇ Pipettes.

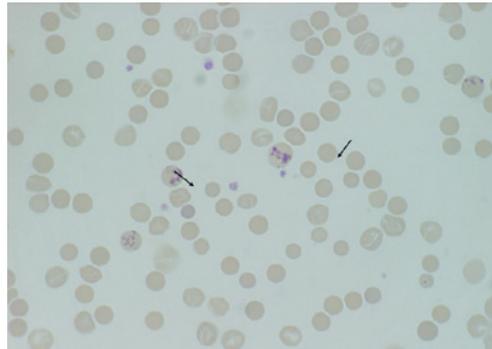
- MÉTHODE DE RÉALISATION

- ◇ **Incubation**

- ◇ prendre un tube ou un micro-tube,
- ◇ introduire 1 volume (3 gouttes par exemple) de solution de New Methylene Blue ou de Bleu de crésyl brillant dans le tube,
- ◇ ajouter le même volume de sang prélevé sur EDTA,
- ◇ homogénéiser soigneusement,
- ◇ laisser incuber 30 minutes à température ambiante,
- ◇ réaliser un frottis en déposant une goutte sur une lame porte-objet,
- ◇ sécher le frottis par agitation à l'air,
- ◇ procéder au comptage à l'aide d'un microscope

◇ **Comptage au microscope**

- ◆ Choisir une zone dans laquelle les hématies sont bien étalées, ne se chevauchent pas et/ou leur densité est homogène,
- ◆ effectuer ensuite la numération à l'objectif x 100 (huile à immersion). Les réticulocytes se distinguent des hématies matures par leur substance granulo-filamenteuse colorée en bleu foncé/violet,
- ◆ seuls les réticulocytes agrégés caractérisés par la présence de filaments bleu foncé ou de plus de 9 grains bleus sont pris en compte,
- ◆ compter les hématies sur des champs consécutifs et en parallèle les réticulocytes rencontrés jusqu'à avoir un total de 1000 hématies.



Réticulocytes agrégés
Frottis sanguin de chat coloré au Bleu
de Crésyl brillant
Objectif x100

3. L'INTERPRÉTATION

- **Le taux de réticulocytes s'exprime en %** (nombre de réticulocytes pour 1000 hématies comptées /10). On peut calculer la numération des réticulocytes en multipliant le % de réticulocytes avec la numération des hématies. Cependant, le nombre de réticulocytes devrait être d'autant plus important que l'hématocrite est bas si la moelle osseuse réagit normalement. Pour cette raison, on peut calculer :

$$\text{Taux corrigé de réticulocytes (\%)} = \frac{\% \text{ de réticulocytes} \times \text{Hématocrite du patient}}{\text{Hématocrite normal de l'espèce}}$$

Ht normal (en%) : Chien : 45
 Chat : 37

- Enfin, **l'interprétation peut se faire selon le tableau ci-dessous** en fonction du pourcentage, de la numération ou du taux corrigé en comparant les résultats obtenus pour un patient avec les seuils d'expert arbitrairement déterminés mentionnés dans le tableau **ou** en fonction des intervalles de référence déterminés pour chaque analyseur.

Interprétation		Chien	Chat
Taux de réticulocytes (%)	Normal	0 - 1,5	0,4
	Anémie peu régénérative	1,5 - 4	0,5 - 2
	Anémie modérément régénérative	5 - 20	3 - 4
	Anémie fortement régénérative	21 - 50	> 5
Nombre de réticulocytes (10³ / µl) Calculé à partir de la numération globale	Normal	< 60 - 80	< 15 - 42
	Anémie peu régénérative	80 - 150	42 - 70
	Anémie modérément régénérative	150 - 300	70 - 100
	Anémie fortement régénérative	> 500	> 200
Taux de réticulocytes (%)	Normal	< 1	< 0,4
	Anémie régénérative	> 1	> 0,4

D. EXPLORATION DE LA COAGULATION

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Savoir réaliser un prélèvement sanguin, le traiter dans l'ESV ou l'envoyer à un laboratoire d'analyses pour un bilan d'hémostase.

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL

1. LE PRÉLÈVEMENT

- **Le matériel**

- ◇ Anticoagulant : tubes au citrate de Sodium à 3,2%
- ◇ Seringue avec aiguille ou système sous vide ou système par écoulement capillaire

- **Réalisation du prélèvement**

- ◇ Réaliser une ponction franche du vaisseau puis remplir le tube le plus rapidement possible avec un flux le plus laminaire possible ; il est préférable de remplir le tube citraté en premier.
- ◇ Respecter scrupuleusement le volume de remplissage du tube. Un tube doit être rempli en respectant le rapport 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang. Si le tube n'est pas assez ou trop rempli, les temps d'hémostase peuvent être faussement raccourcis ou allongés.
- ◇ En cas de nécessité de réalisation de prélèvements de volume inférieur aux tubes disponibles, il suffit de prélever la quantité de citrate nécessaire pour respecter le rapport 1 pour 9 en fonction du volume minimum demandé par l'automate disponible ou le laboratoire.
Par exemple, pour prélever 1 ml de sang citraté, il suffit d'aspirer dans une seringue 0.1 ml de citrate provenant d'un tube citraté et de compléter par 0.9 ml de sang tout en respectant la procédure mentionnée dans les points précédents.
- ◇ Après réalisation du prélèvement, retourner le tube délicatement 10 fois et vérifier l'absence de caillot macroscopique.

2. TRAITEMENT DU SPÉCIMEN

- **Réalisation d'un bilan d'hémostase dans le laboratoire de l'ESV**

- ◇ Matériel d'analyses : un certain nombre d'automates d'analyses de coagulation sont disponibles sur le marché.
Ils utilisent des réactifs prêts à l'emploi, limités en général au temps de Quick (TQ) et au temps de céphaline activée (TCA).

Il est conseillé de s'informer sur la validation de ces dispositifs d'analyses (Cf fiches n° 2.2. Petits analyseurs portables et 3.7.A. Tests rapides à orientation diagnostique - TRODS).

- ◇ Analyses : elles sont réalisées le plus souvent sur sang total ; il convient de suivre précisément les recommandations du fabricant pour le passage dans l'automate.

- **Conservation d'un spécimen pour la réalisation des tests d'hémostase en différé**

- ◇ Le sang total doit être centrifugé (pendant 10 à 15 minutes à 1500 g soit 3500 à 4000 tours par minute) dans l'heure suivant le prélèvement.
- ◇ Le plasma doit être conservé à 4°C jusque réalisation des tests si ceux-ci sont réalisés dans les 48h.
- ◇ Si les tests ne peuvent être réalisés dans les 48 heures suivant la centrifugation, le plasma doit être congelé à -20°C dans l'attente de son expédition.

- **Traitement du prélèvement pour un envoi en laboratoire**

- ◇ Envoyer le tube de plasma citraté dans un emballage prévu à cet effet fourni par le laboratoire d'envoi, avec un pack réfrigéré de température inférieure à 4°C.
- ◇ Remplir la feuille de demande avec les commémoratifs adéquats et suivre les recommandations d'envoi en fonction du laboratoire.

Les tests réalisés sur les tubes citrates (Chiens, chats, chevaux, ...)

- TCA ou aPTT : temps de céphaline activé ou activated Partial Thromboplastin time.
- TQ ou PT : temps de Quick ou temps de Prothrombine ou Prothrombin time.
- TT : temps de thrombine.
- Fibrinogène par méthode chronométrique.
- Antithrombine III.
- Protéine C
- PDF (produit de dégradation de la fibrine) et D-Dimères
- Recherche de déficit en facteurs VIII, IX, ...

E. GROUPE SANGUIN ET CROSS-MATCH

Catherine Trumel



OBJECTIFS

- Savoir quand et comment réaliser un groupage sanguin
- Savoir quand et comment réaliser un cross-match

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL, BOVIN

1. RAPPELS DES GROUPES SANGUINS

1.1. LE CHAT

Type A, B, AB avec une transmission autosomale dominant : A > AB > B et type MIK.

- Les chats du groupe B ont des anticorps anti-A très fortement agglutinants et hémolytiques ce qui crée des réactions transfusionnelles létales si le chat donneur est A (durée de vie de hématies : 1h).
- Environ 40% des chats A ont des anticorps anti-B « faibles » qui entraînent une durée de vie des hématies plus courte (72h) si le chat donneur est B.
- De plus, les chats AB ne possèdent pas d'allo-anticorps anti-A ou anti-B mais ne doivent pas recevoir de sang du groupe B car ils expriment le phénotype A.
- Ceci démontre l'importance de connaître le groupe sanguin d'un chat avant de le transfuser ou avant de mettre un couple de race à la reproduction pour les races à risques.

1.2. LE CHIEN

Type DEA 1, 3, 4, 5, 6, 7, DAL et Kaï 1 & 2.

- Généralement le seul pris en compte est le DEA 1 car les anticorps anti-DEA 1 sont fortement hémolytiques. Les chiens n'ont pas d'allo-anticorps naturels.

1.3. LE CHEVAL

Type A, C, D, K, P, Q, U.

- Généralement les groupes pris en compte sont Aa, Ca et Qa.
- Des allo-anticorps sont peu fréquemment observés notamment pour les groupes Aa nég et Qa nég (10 % des cas). Les accidents transfusionnels peuvent être observés pour les chevaux Aa.
- Des isoérythrolyses néonatales peuvent également être rencontrées pour les juments de groupes Aa nég et Qa nég. Les chevaux Ca nég ayant des allo-anticorps anti Ca seraient protégés contre les isoérythrolyses néonatales.

1.4. LES BOVINS

11 groupes sanguins (dont A, B, C, F, J, L, M, S, Z, R').

- Il existe un seul anticorps naturel, l'anti J. Hormis celui-ci, les anticorps ne peuvent être produits qu'après allo-immunisation.
- En théorie, les anticorps produits sont hémolytiques. En pratique, les accidents post-transfusionnels n'apparaissent que lors de transfusions répétées à au moins une semaine d'intervalle. Les signes observés sont la plupart du temps bénins à modérés. Les transfusions uniques sont sans danger.

2. GROUPAGE SANGUIN

- **La technique donnant les meilleurs résultats en pratique dans un ESV est l'immunochromatographie.** Elle permet de mettre en évidence des antigènes présents sur la membrane de l'hématie et donc de déterminer le groupe sanguin.
- Ce sont des tests rapides, réalisables au chevet de l'animal. Il est nécessaire de suivre précisément les indications du fabricant.
- ***Il est conseillé de s'informer sur la validation de ces dispositifs d'analyses (Cf fiches n° 2.2. Petits analyseurs portables et 3.7.A. Tests rapides à orientation diagnostique - TRODS).***
- Il est important de (toujours) réaliser un groupage avant la réalisation d'une transfusion chez le chien et le chat sur le donneur et le receveur.

3. CROSS-MATCH

- **Le but est de connaître la compatibilité entre le sang du donneur et celui du receveur.**
- Les cross matches doivent être réalisés avant toute transfusion chez le cheval, si possible chez le chat et avant la deuxième transfusion chez le chien.

3.1. MATÉRIEL NÉCESSAIRE POUR LE TEST

- Tubes : 1 Tube EDTA pour le sang du donneur et 1 tube sec pour le sang du receveur (au minimum 2ml pour obtenir le sérum)
- Matériel de prélèvement : seringue avec aiguille ou système sous vide ou système par écoulement capillaire.
- Ampoule de 50 mL de NaCl 0.9%, 10 pipettes pasteur, 6 tubes et des lames de microscope.

3.2. TRAITEMENT DES SPÉCIMENS

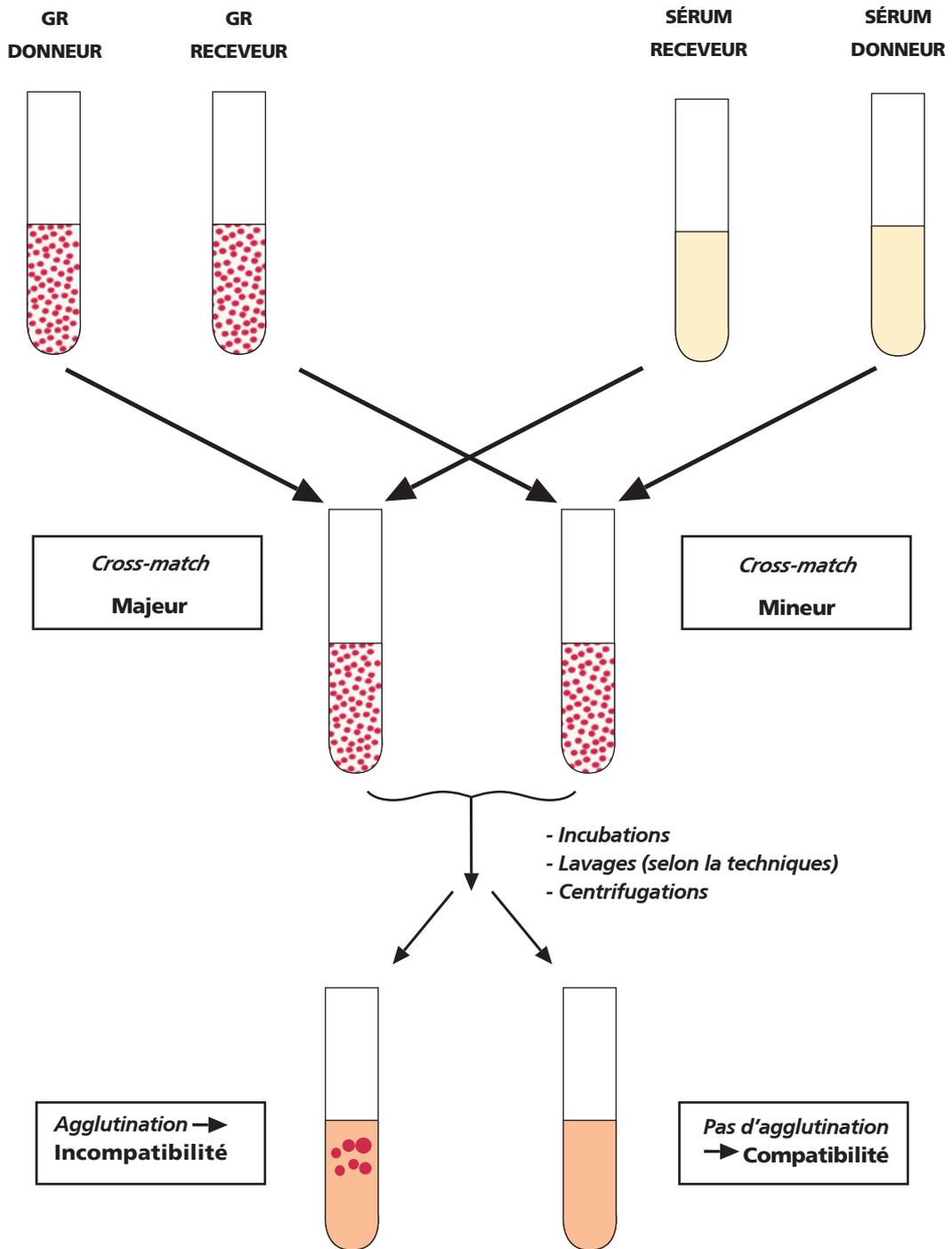
- Centrifuger le tube EDTA à 1300 g ou 3500 à 4000 tours/minute pendant 5 minutes et laisser décanter le tube sec.
- Prélever le plasma du tube EDTA et le conserver dans un tube.
- Lavage des globules rouges (GR) du donneur: prélever deux gouttes de GR du tube EDTA du donneur et les mettre dans un tube. Remplir le tube avec de la solution saline (NaCl à 0,9%), mélanger manuellement puis centrifuger pendant 5 minutes à 1300 g. Prélever le surnageant puis recommencer 3 fois la procédure.

3.3. TEST D'AGGLUTINATION RAPIDE

- Déposer 1 goutte des globules rouges lavés du donneur et 2 gouttes du sérum du receveur sur une lame et mélanger en faisant de petits mouvements circulaires.
- Regarder la présence ou l'absence d'agglutinats macroscopiquement puis au microscope.

3.4. TEST COMPLET

- **Cross match majeur** 1 goutte de globules rouges du donneur + 2 gouttes du sérum du receveur.
- **Cross match mineur** 1 goutte de globules rouges du receveur + 2 gouttes du sérum du donneur
- Incuber à 15-37°C puis centrifuger pendant 15 secondes et regarder les signes macroscopiques et microscopiques d'hémolyse et d'agglutination.
- Remarque : seul le test majeur est nécessaire
- Il existe également des tests rapides réalisables au chevet de l'animal, disponibles dans le commerce. Il suffit alors de suivre les indications du fabricant même si le principe reste le même.

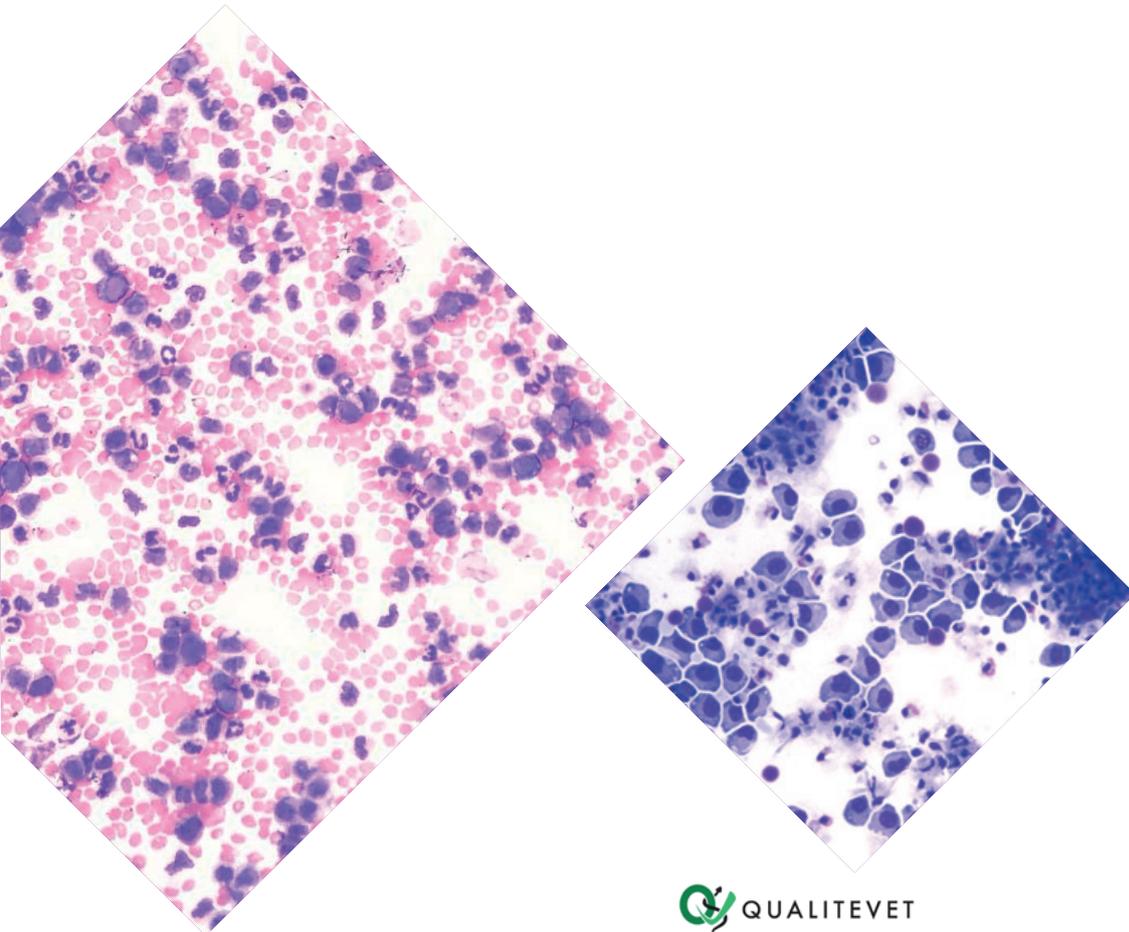


3.2

CYTOLOGIE

Réaliser un examen de qualité

- 3.2 A. Réaliser un prélèvement cytologique - C. Trumel
- B. Réaliser un étalement cytologique - C. Trumel
- C. Analyse des épanchements - C. Trumel
- D. Analyse des lavages trachéo-bronchique et broncho-alvéolaire - C. Trumel
- E. Analyse du liquide synovial - C. Trumel



A. RÉALISER UN PRÉLÈVEMENT CYTOLOGIQUE

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Réaliser un prélèvement cytologique de qualité

- Choisir le matériel de ponction
- Préparer le site de ponction
- Technique de prélèvement

ESPÈCES CONCERNÉES : TOUTES

1. CHOISIR LE MATÉRIEL DE PONCTION

- Ponctions à l'aiguille fine : aiguilles de 20 à 25 G et seringues de 3 à 5 ml.
- Lésions ulcératives : des cytobrosses non stériles peuvent être utilisées.
- Ponctions écho-guidées intra-cavitaires : une sonde microconvexe d'échographie et une aiguille de 23 à 27 G montée sur une seringue de 5 ml sont recommandées.

2. PRÉPARATION DU SITE

- Lors de la réalisation d'examens microbiologiques ou de la ponction d'une cavité corporelle (péritonéale ou thoracique, articulation), la zone concernée doit être préparée chirurgicalement.
- Dans les autres cas, une simple désinfection du site suffit, la tonte n'étant pas nécessaire.
- Si le prélèvement est réalisé sous contrôle échoguidé, le gel échographique ne doit pas être utilisé et l'alcool sera choisi comme agent de contact.

3. TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT

- **Cytoponction de masse avec ou sans aspiration**

◇ **Technique par aspiration**

Cette méthode est préférée dans le cas de lésions fermes et infiltrantes.

- ◇ La masse est maintenue fermement dans une main, l'aiguille montée sur la seringue tenue par l'autre main est alors introduite tangentiellement à la surface de la masse et une pression négative est exercée en tirant le piston.
- ◇ L'aiguille est redirigée plusieurs fois dans la masse en gardant la pression négative sans que la pointe de l'aiguille sorte de la masse. Si la pression exercée est trop forte ou trop prolongée, des vaisseaux sanguins peuvent se rompre et le spécimen être contaminé par du sang périphérique.
- ◇ Après avoir prélevé différentes zones de la masse, la seringue est relâchée et l'aiguille retirée.

◇ **La technique par carottage**

Cette méthode est préférée dans le cas de lésions fortement vascularisées et de structures lymphoïdes.

- ◇ La méthode par carottage sans aspiration permet d'obtenir des spécimens de qualité égale, voire meilleure, comparativement à la technique d'aspiration standard car souvent moins hémodilués et donc plus riches.
- ◇ La procédure est presque la même, si ce n'est qu'aucune pression négative n'est exercée sur le piston. Un peu d'air est aspiré dans la seringue avant de procéder au prélèvement.
- ◇ La ponction peut également se faire avec l'aiguille démontée, en la tenant directement entre ses doigts.

• **Cytobrossage**

Pour les lésions ulcéraives ou situées sur des muqueuses, une cytobrosse peut être utilisée après avoir énergiquement nettoyé la zone à prélever. La cytobrosse est alors roulée sur la lésion, une ou deux fois, dans la région la plus *profonde de l'ulcère*.

Pour en savoir plus :

Fiche 3.2.B. : Réaliser un étalement cytologique

B. RÉALISER UN ÉTALEMENT CYTOLOGIQUE

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Réaliser un étalement cytologique de qualité pour lecture au sein de l'ESV ou pour envoi à un laboratoire

ESPÈCES CONCERNÉES : TOUTES

1. LE CHOIX DES LAMES

- **Choisir de 3 à 6 lames**
 - ◇ matées à l'extrémité pour y écrire au crayon à papier le nom du patient, le site de spécimens, la date,
 - ◇ dégraissées,
 - ◇ rodées.

2. PRÉPARATION DES LAMES

- **Pour les ponctions de masses ou d'organe**
 - ◇ **Les étalements de prélèvements obtenus à partir d'aspiration ou de carottage de masses tissulaires peuvent être préparés par écrasement doux.**
 - ◇ Un peu de matériel est déposé sur la lame en poussant délicatement le piston de la seringue montée et contenant de l'air. Il est important de ne pas vaporiser le spécimen contenu dans l'aiguille.
 - ◇ Ce dépôt est réalisé à environ 0,5 cm du côté maté de la lame.
 - ◇ Une seconde lame est placée sur la première, perpendiculairement ou parallèlement à celle-ci.
 - ◇ Le matériel est alors comprimé doucement, mais fermement entre les deux lames. La seconde lame est glissée le long de la première, dans un mouvement continu et délicat.
 - ◇ Une lame correctement préparée est caractérisée par un étalement monocouche de forme oblongue (cf schéma).
 - ◇ Un matériel déposé en excès donne un étalement trop épais illisible.
 - ◇ Si la pression exercée est trop forte, un nombre important de cellules risquent d'être rompues, rendant ainsi le frottis également illisible.
- **Pour les cytobrossages**
 - ◇ **La cytobrosse est apposée sur la lame, puis roulée tout le long de celle-ci et sur l'ensemble de sa largeur par deux ou trois passages juxtaposés, et toujours dans le même sens.**
- **Pour les prélèvements liquides**
 - ◇ **Se référer à la fiche n° 31 B : Le frottis sanguin.**

3. FIXATION DU SPÉCIMEN SUR LES LAMES

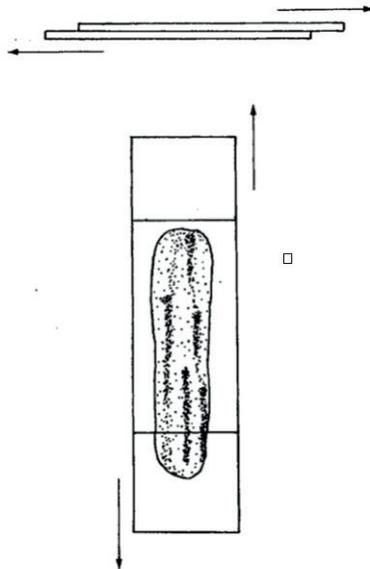
- Pour les prélèvements classiques, la fixation se fait par agitation des lames à l'air. Aucune laque cytofixatrice ne doit être utilisée.

4. COLORATION

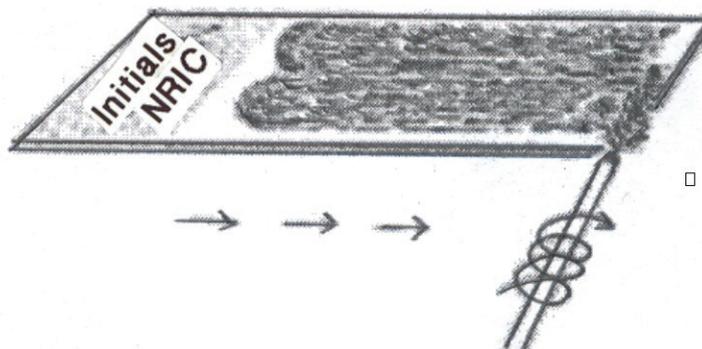
- En cas d'envoi de la lame de cytologie à un laboratoire, les lames préparées sont envoyées non colorées.
- En cas de lecture au sein de la structure, une coloration rapide peut être utilisée.
- Une coloration de type May-Grunwald Giemsa sera préférée, notamment, dans le cadre des processus néoplasiques.

5. SCHEMAS

- **Réalisation d'un étalement à partir d'un spécimen cytologique obtenu par ponction avec ou sans aspiration**



- **Réalisation d'un étalement à partir d'un prélèvement réalisé par cytobrossage**



B. EN PRATIQUE

LA CYTOLOGIE

Objectifs : * Obtenir et traiter un spécimen, coloré sur lame pour une lecture au microscope et :	* Identifier la composition cellulaire * Contribuer au diagnostic lésionnel
Indication : * Examen simple	<input type="checkbox"/> Indispensable <input checked="" type="checkbox"/> Très utile <input type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic
Avantages : * Utilisation	<input checked="" type="checkbox"/> Facile <input type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients /Contraintes : * Technique	<input type="checkbox"/> Difficile <input checked="" type="checkbox"/> Longue (lecture par le vétérinaire) <input type="checkbox"/> Contraignante <input checked="" type="checkbox"/> Coût moyen (en temps passé...)
Apport au diagnostic : Indispensable	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Assez élevé	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Modéré	Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Elimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - échantillons, pièces d'examen, lames, colorants, matériel de prélèvement <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité : * Parfois risque infectieux du spécimen	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

C. ANALYSE DES ÉPANCHEMENTS

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Réaliser l'analyse d'un épanchement au chevet du malade avec l'envoi éventuel d'une lame cytologique à un laboratoire d'analyses.

Il est important de respecter les étapes de l'analyse :

- Aspect macroscopique.
- Analyse quantitative des constituants cellulaires par un automate d'hématologie +/- micro-hématocrite.
- Analyses chimiques par réfractométrie et automate de biochimie.
- Analyse qualitative par l'examen cytologique.
- Conditions d'envoi à un laboratoire.

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL.

1. MODE D'OBTENTION DE L'ÉPANCHEMENT ET CHOIX DU CONTENANT

Les épanchements sont prélevés dans les conditions d'asepsie requises si possible sous contrôle écho-guidé et le spécimen placé dans un tube EDTA et un tube sec stérile.

2. ASPECT MACROSCOPIQUE

En fonction de l'aspect macroscopique, certaines analyses devront être réalisées en priorité (cf tableau)

3. ANALYSE QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES PAR UN ANALYSEUR D'HÉMATOLOGIE

- A partir du tube EDTA, une analyse quantitative des constituants cellulaires doit être effectuée après retournement du tube 10 fois comme pour la réalisation d'un hémogramme. Il est important de respecter les recommandations du fabricant
- Certains analyseurs sont programmés pour l'analyse des épanchements et le programme « épanchement » doit alors être sélectionné dans le menu. Dans le cas contraire, il faut choisir le programme correspondant à l'espèce dont provient l'épanchement.
- Il n'est pas recommandé de réaliser l'analyse si des caillots sont observés car cela risquerait de boucher l'automate et de donner des résultats erronés.
- Seule la numération leucocytaire et l'hématocrite (Ht) sont à prendre en considération.
- Le micro-hématocrite manuel sera plus précis que celui donné par l'automate d'hématologie.
- Si l'épanchement est rouge sang, il devra être comparé au micro-hématocrite veineux.

4. ANALYSES CHIMIQUES PAR RÉFRACTOMÉTRIE ET AUTOMATE DE BIOCHIMIE

- Le tube EDTA rempli au moins à moitié est centrifugé à 2000 tours/minutes (500 g) pendant 5 minutes. La concentration en protéines est mesurée à partir d'une goutte de surnageant à l'aide d'un réfractomètre (cf. fiche réfractomètre).
- Le tube sec est centrifugé à forte vitesse (3000 à 4000 tours/minutes soit 2000 g pendant 5 minutes) et le surnageant est utilisé pour faire toutes les analyses biochimiques nécessaires en fonction du type d'épanchement (cf tableau).
- Les analyses doivent être réalisées en parallèle sur le sérum ou le plasma du patient pour interprétation.

5. ANALYSE QUALITATIVE PAR L'EXAMEN CYTOLOGIQUE

- Le traitement de l'épanchement et la réalisation des lames cytologiques doivent être effectués le plus rapidement possible après le prélèvement.
- Une goutte du tube EDTA est placée sur une lame et étalée comme un frottis sanguin (cf. fiche frottis sanguin). Il est nécessaire de réaliser deux lames en cas d'envoi à un laboratoire.
- Après centrifugation du tube EDTA, le surnageant est aspiré en prenant soin de laisser quelques gouttes au fond du tube.
- Le culot et les quelques gouttes de surnageant sont homogénéisés doucement et une goutte est placée sur une lame puis étalée comme un frottis sanguin (cf. fiche frottis sanguin).
- Une fois réalisées, les lames sont séchées et seules les lames lues au chevet du malade sont colorées selon la procédure préconisée par le fabricant des kits de colorant.
- Les lames envoyées au laboratoire sont placées dans un portoir porte lame à l'abri de la lumière, de l'air et du formol

6. CONDITIONS D'ENVOI À UN LABORATOIRE

- En cas de suspicion de processus septique, un tube sec stérile doit être envoyé pour analyse bactériologique (cf. fiche bactériologie).
- En cas de difficulté d'interprétation de la lame de cytologie, les lames préparées et non colorées, le liquide d'épanchement sur EDTA, l'ensemble des résultats d'analyse de l'épanchement (concentration en protéines, cellularité voire analyses biochimiques autres) et les commémoratifs précis du patient doivent être envoyés à un laboratoire de biologie vétérinaire dans un paquet ne contenant pas de formol.

L'observation microscopique du liquide d'épanchement.

Elle est réalisée diaphragme ouvert

et condenseur relevé. (Objectifs x40 et x100 de préférence à l'objectif x10)

cf fiche 3.1. B. Le frottis sanguin

1. A l'objectif x 10

- Examiner l'ensemble des deux lames, afin d'apprécier la cellularité totale.
- Choisir sa zone de lecture si la lame n'est pas homogène.
- Identifier les différents types cellulaires présents (cellules inflammatoires, cellules mésothéliales, cellules autres).

2. A l'objectif x 40 ou x 100

- **Réaliser une formule leucocytaire sur 100 cellules en les répartissant dans les catégories suivantes :**
 - ◆ Granulocytes neutrophiles (GNN)
 - ◆ Lymphocytes
 - ◆ Monocytes-macrophages
 - ◆ Granulocytes éosinophiles
 - ◆ Mastocytes.
- **Selon la formule, la concentration en protéines et la cellularité, l'épanchement est ensuite classé (cf tableau).**

3. Aux objectifs x 40 et x 100

- Examiner le fond de frottis (fond protéique/nécrotique/propre/...)
- Identifier les différentes populations cellulaires présentes et rechercher des agents infectieux.
- **Si des cellules autres qu'inflammatoires sont observées, l'envoi d'une lame au laboratoire est conseillé. On pourra évaluer le degré d'atypie cytonucléaire selon les critères morphologiques suivants :**
 - ◆ Anisocaryose,
 - ◆ Anisocytose,
 - ◆ Plurinucléation,
 - ◆ Plurinucléolation,
 - ◆ Anisocaryose intracellulaire,
 - ◆ Gigantisme nucléaire ou nucléolaire,
 - ◆ Irrégularité nucléaire ou nucléolaire,
 - ◆ Hyperchromatisme.

TABLEAU DE CLASSIFICATION D'UN ÉPANCHEMENT

	Aspect	Concentration en protéines (g/L)	Cellularité (cellules/ µl)	Type cellulaire	Particularité
Transsudat pur	Eau de roche	< 15	< 3000	Cellules Mésothéliales Macrophages Lymphocytes et GNN	Faible cellularité Eau de roche
Transsudat modifié	Séro-hémorragique	> 25	< 3000	Cellules Mésothéliales Macrophages Lymphocytes et GNN	Souvent riche en neutrophiles notamment si cardiogénique (NT-pro-BNP > 322 pmol/L)
Exsudat non septique	Opaque, grisâtre, rougeâtre, marron, flammèches, épais		> 3000 ou 5000	GNN ou GNE majoritaires, exceptionnellement macrophages	Non dégénérés le plus souvent
Exsudat septique	Parfois odeur nauséabonde		> 3000 ou 5000	GNN	Dégénérés le plus souvent
Epanchement cancéreux	Variable	Variable	Variable	Cellules cancéreuses +/- associées à d'autres cellules	Population variable (cellules rondes ou jointives) avec atypies
PIF	Jaune, visqueux	> 40	< 6000	GNN ou macrophages majoritaires	Trame ponctuée foncée Alb / Glob < 0.5
Chylothorax	Lait fraise			Petits lymphocytes puis GNN et macrophages spumeux	TG ép / TG pl > 1 Chol ép / TG ép < 1 [trigly] ép > 1g / L
Hémopéritoine	Rouge sang			Hématies, érythrophagocytose, sidérophages, absence plaquettes (si arrêt de l'hémorragie)	Ht ép - Ht sang (si récent)
Cholépéritoine	Vert - marron			GNN , Macrophages avec pigments biliaires brun-verdâtres ± septique	Bili ép > Bili sang Acides biliaires
Uropéritoine	Séro-hémorragique	< 20	< 1500 mais parfois >1500	GNN, Macrophages	Créat ép / Créat sang > 1,2 ou 2 K ⁺ ép / K ⁺ sang > 1,4

D. ANALYSE DES LAVAGES TRACHÉO-BRONCHIQUE ET BRONCHO-ALVÉOLAIRE

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Réaliser une analyse de lavage trachéo-bronchique et broncho-alvéolaire au chevet du malade et un envoi éventuel d'une lame cytologique à un laboratoire d'analyses.

Il est important de respecter les étapes de l'analyse :

- Aspect macroscopique
- Analyse quantitative des constituants cellulaires par un automate d'hématologie
- Analyse qualitative par l'examen cytologique
- Conditions d'envoi à un laboratoire

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL

1. MODE D'OBTENTION DES LAVAGES TRACHÉO-BRONCHIQUES ET BRONCHO-ALVÉOLAIRES ET CHOIX DU CONTENANT

Les lavages sont réalisés avec du sérum physiologique en quantité définie puis sont prélevés si possible sous contrôle endoscopique ou à l'aveugle par voie endo-trachéale ou trans-trachéale et placés dans un tube EDTA et un tube sec stérile.

2. ASPECT MACROSCOPIQUE

L'aspect du liquide doit être noté sur la fiche du patient, notamment en cas d'envoi.

3. ANALYSE QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES PAR UN ANALYSEUR D'HÉMATOLOGIE

- A partir du tube EDTA, une analyse quantitative des constituants cellulaires peut être effectuée par un automate d'hématologie, après retournement du tube 10 fois comme pour la réalisation d'un hémogramme. Il est important de bien respecter les recommandations du fabricant.
- Certains analyseurs sont programmés pour l'analyse de liquide autre que du sang et ce programme doit alors être sélectionné dans le menu. Dans le cas contraire, il faut choisir le programme correspondant à l'espèce dont provient l'épanchement.
- Il n'est pas recommandé de réaliser l'analyse si le prélèvement est épais et muco-purulent car cela risquerait de boucher l'automate et de donner des résultats erronés.
- Seule la numération leucocytaire est à prendre en considération. Ce résultat quoi qu'il en soit reste sujet à caution du fait de la faible standardisation de la réalisation des lavages.

4. ANALYSE QUALITATIVE PAR L'EXAMEN CYTOLOGIQUE

- Le traitement des lavages et la réalisation des lames cytologiques doivent être effectués dans les 30 à 60 minutes après prélèvement.

- Si une phase muqueuse ou épaisse est observée macroscopiquement dans le tube EDTA, une goutte provenant de cette phase est placée sur une lame et étalée par écrasement doux et étirement (cf. schéma). Il est nécessaire de réaliser plusieurs lames en cas d'envoi à un laboratoire.
- Après centrifugation du tube EDTA, le surnageant est aspiré en prenant soin de laisser quelques gouttes au fond du tube. Le culot et les quelques gouttes de surnageant sont homogénéisés doucement et une goutte est placée sur une lame puis étalée comme un frottis sanguin
- Une fois réalisées, les lames sont séchées (si le prélèvement est épais, utiliser un sèche-cheveux sans chauffage) et seules les lames lues au chevet du malade sont colorées selon la procédure préconisée par le fabricant des kits de colorant.
- Les lames envoyées au laboratoire sont placées dans un portoir porte lame à l'abri de la lumière, de l'air et du formol.

5. CONDITIONS D'ENVOI À UN LABORATOIRE

- En cas de suspicion de processus septique, un tube sec stérile (ou des milieux de transport appropriés) doit être envoyé pour analyse bactériologique (cf. fiche bactériologie).
- En cas de difficulté d'interprétation de la lame de cytologie, les lames préparées et non colorées, le liquide de lavage sur EDTA, les résultats d'analyse (cellularité) et les commémoratifs précis du patient avec notamment le résultat des radiographies et éventuellement du scanner seront envoyés à un laboratoire de biologie vétérinaire dans un paquet ne contenant pas de formol.

L'observation microscopique des lames de lavage

Elle est réalisée le diaphragme ouvert et le condenseur relevé. (Objectifs x 40 et x 100 de préférence à l'objectif x 10) cf fiche 3.1. B. Le frottis sanguin

1. A l'objectif x 10 :

- Examiner l'ensemble des deux lames, afin d'apprécier la cellularité totale.
- Choisir sa zone de lecture si la lame n'est pas homogène.
- Identifier les différents types cellulaires présents (cellules inflammatoires, trachéo-bronchiques, cellules oro-pharyngées, agent parasitaire).

2. À l'objectif x 40 ou x 100

- Réaliser une formule leucocytaire sur 400 cellules en les répartissant dans les catégories suivantes :
 - ◆ Granulocytes neutrophiles
 - ◆ Lymphocytes
 - ◆ Macrophages
 - ◆ Granulocytes éosinophiles
 - ◆ Mastocytes.
- Selon la cellularité, le pourcentage de neutrophiles et d'éosinophiles, en fonction de la provenance du lavage (trachéo-bronchique versus broncho-alvéolaire) et de l'espèce, le lavage sera normal ou anormal (cf. tableau).

3. Aux objectifs x 40 et x 100

- examiner le fond de frottis (fond protéique/nécrotique/propre/...)
- Identifier les différentes populations cellulaires présentes et rechercher des agents infectieux.

Schéma : Réalisation d'un étalement à partir d'une goutte issue de lavage épais

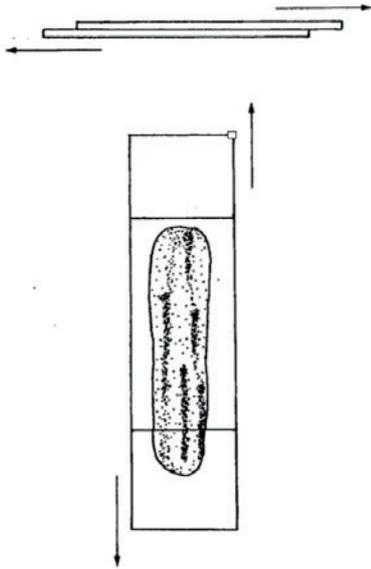


Tableau : Cellularité des lavages trachéo-bronchiques (LTB) et broncho-alvéolaires (LBA) des animaux sains.

ANIMAUX SAINS	CHIEN	CHAT	CHEVAL	
	LBA-LTB	LBA-LTB	LBA	LTB
Cellularité (/ μ l)	< 500	< 400	< 530	
Neutrophiles (%)	< 5	< 6	< 5	< 50
Eosinophiles (%)	< 5	< 25	< 1	< 2
Mastocytes (%)	< 2	< 2	< 2	< 1
Macrophages (%)	70 - 80	70 - 80	40 - 80	40 - 80
Lymphocytes (%)	6 - 14	< 5	30 - 60	< 10

E. ANALYSE DU LIQUIDE SYNOVIAL

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Réaliser une analyse de liquide synovial au chevet du malade et envoi éventuel d'une lame cytologique à un laboratoire d'analyses.

Il est important de respecter les étapes de l'analyse :

- Aspect macroscopique
- Analyse quantitative des constituants cellulaires par un automate d'hématologie
- Analyses chimiques par réfractométrie
- Analyse semi-quantitative et qualitative par l'examen cytologique
- Conditions d'envoi à un laboratoire

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL

1. MODE D'OBTENTION DE LIQUIDE SYNOVIAL ET CHOIX DU CONTENANT

La technique de ponction, réalisée dans les conditions d'asepsie requises, peut être retrouvée dans des ouvrages de référence et varie en fonction de l'articulation. Le liquide synovial une fois obtenu doit être placé dans un tube EDTA s'il y en a suffisamment. Si une ou deux gouttes seulement sont prélevées, réaliser les analyses directement avec le contenu de l'aiguille.

2. ASPECT MACROSCOPIQUE

L'aspect du liquide doit être noté sur la fiche du patient notamment en cas d'envoi à un laboratoire.

3. ANALYSE QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES PAR UN ANALYSEUR D'HÉMATOLOGIE

- A partir du tube EDTA, une analyse quantitative des constituants cellulaires peut être effectuée par un automate d'hématologie après retournement du tube 10 fois comme pour la réalisation d'un hémogramme. Il est important de bien respecter les recommandations du fabricant.
- Certains analyseurs sont programmés pour l'analyse de liquide autre que du sang et ce programme doit alors être sélectionné dans le menu. Dans le cas contraire, il faut choisir le programme correspondant à l'espèce dont provient l'épanchement.
- Il n'est pas recommandé de réaliser l'analyse si le prélèvement contient des éléments solides en suspension car cela risquerait de boucher l'automate et de donner des résultats erronés.
- Seule la numération leucocytaire est à prendre en considération.

4. ANALYSES CHIMIQUES PAR RÉFRACTOMÉTRIE

Si le liquide synovial est limpide, une goutte de liquide synovial est placée directement sur le réfractomètre. Si le liquide est opaque, il doit être centrifugé. La concentration en protéines est alors mesurée à partir d'une goutte de surnageant à l'aide d'un réfractomètre (cf. fiche réfractomètre).

5. ANALYSE QUALITATIVE PAR L'EXAMEN CYTOLOGIQUE

- Le traitement du liquide synovial et la réalisation des lames cytologiques doivent être réalisés rapidement après prélèvement.
- Si une seule goutte est disponible, la placer directement sur une lame et l'étaler par écrasement doux et étirement (cf. schéma). Il est nécessaire de réaliser plusieurs lames en cas d'envoi à un laboratoire.
- Si du liquide a pu être placé dans un tube EDTA, réaliser un étalement de la même façon que décrit précédemment.
- Une fois réalisées, les lames sont séchées (si le prélèvement est épais, utiliser un sèche-cheveux sans chauffage) et seules les lames lues au chevet du malade sont colorées selon la procédure préconisée par le fabricant des kits de colorant.
- Les lames envoyées au laboratoire sont placées dans un portoir porte lame à l'abri de la lumière, de l'air et du formol.

6. CONDITIONS D'ENVOI À UN LABORATOIRE

- En cas de suspicion de processus septique, un tube sec stérile doit être envoyé pour analyse bactériologique (cf. fiche bactériologie).
- En cas de difficulté d'interprétation de la lame de cytologie, les lames préparées et non colorées, le liquide synovial sur EDTA, les résultats d'analyse (cellularité) et les commémoratifs précis du patient avec notamment le résultat des radiographies et éventuellement du scanner doivent être envoyés à un laboratoire de biologie vétérinaire dans un paquet ne contenant pas de formol.

L'Observation microscopique des lames du liquide synovial

Elle est réalisée le diaphragme ouvert et le condenseur relevé (Objectifs x 40 et x 100 de préférence à l'objectif x 10) cf fiche 3.1. B. Le frottis sanguin

1. A l'objectif x 10 :

- Examiner l'ensemble des deux lames, afin d'apprécier la cellularité totale.
- Choisir sa zone de lecture si la lame n'est pas homogène.
- Identifier les différents types cellulaires présents (cellules inflammatoires, synoviocytes).
- Si le comptage automatique n'a pu être réalisé, faire un comptage semi-quantitatif en comptant le nombre moyen de cellules par champ sur 10 champs puis en multipliant par 100 pour avoir une évaluation approximative de la cellularité par microlitre.

2. À l'objectif x 40:

- Réaliser une formule leucocytaire sur 100 cellules en les répartissant dans les catégories suivantes:
 - ◆ Granulocytes neutrophiles
 - ◆ Cellules mononucléées (Lymphocytes et Macrophages)
 - ◆ Granulocytes éosinophiles
- Selon la cellularité, le pourcentage de neutrophiles et de cellules mononucléées et selon l'espèce, le liquide synovial sera normal ou anormal (cf. tableau).

3. A l'objectif x 40 et x 100 :

- Examiner le fond de frottis (trame ponctuée présente ou non.)
- Identifier les différentes populations cellulaires présentes, les cellules anormales témoignant d'un mécanisme dysimmunitaire (cellules de Hargraves, ragocytes) et rechercher des agents infectieux.

Schéma: Réalisation d'un étalement à partir d'une goutte épaisse de synovie

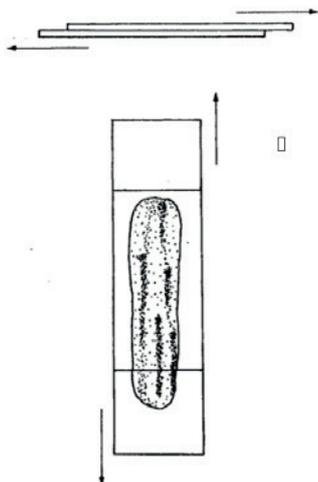


Tableau : Caractères physiques et cellularité de la synovie d'animaux sains

ANIMAUX SAINS	CHIEN	CHAT	CHEVAL
Aspect macroscopique	Incolore	Incolore	Incolore à jaune clair
Viscosité (test du fil)	> 2 cm	> 2 cm	> 2,5 cm
Protéines (g/L)	15 - 30	15 - 30	< 20
Cellularité (/ µl)	< 3000	< 1000	< 1000
Neutrophiles (%)	< 5	< 5	< 10
Eosinophiles (%)	0	0	< 1
Cellules mononucléées (Lymphocytes + macrophages) (%)	> 95	> 95	> 95

3.3

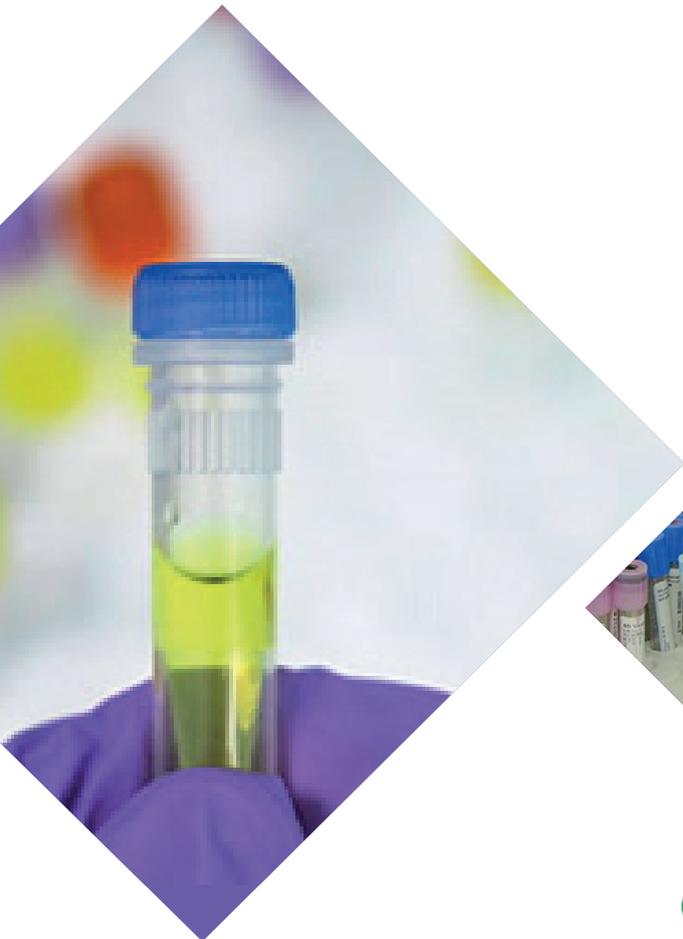
BIOCHIMIE

Réaliser un examen de qualité

La biochimie est surtout affaire d'analyseur. Il est inutile de développer davantage que les règles générales précédemment décrites, chaque système analytique disposant de son propre mode d'emploi.

Un focus sur les prélèvements et sur une discipline particulière, l'endocrinologie, nous a paru plus utile.

- 3.3 A.** Les prélèvements sanguins pour les analyses de biochimie - **JP. Braun , C. Trumel**
- B.** L'évaluation endocrinienne - **L. Jaillardon**



A. LES PRÉLÈVEMENTS SANGUINS POUR LES ANALYSES DE BIOCHIMIE

Jean Pierre Braun et Catherine Trumel



OBJECTIFS

- S'assurer qu'aucune altération du spécimen n'intervienne pendant la phase préanalytique. Les facteurs de variation sont très nombreux et ont des effets variables selon les analytes et les analyseurs.
- Obtenir un prélèvement de qualité en vue d'une analyse de biochimie plasmatique ou sérique.

ESPÈCES CONCERNÉES : TOUTES

1. PRÉPARATION DU PATIENT

Lorsque cela est possible :

- Réaliser les prises de sang sur un animal à jeun pour le chien et le chat. En effet, la prise récente d'un repas peut entraîner, d'une part, l'apparition d'une lipémie postprandiale (qui disparaît 7 à 12 h après le repas), et, d'autre part, une augmentation plus ou moins importante de la concentration de certains analytes sanguins (exemple : urée, ammoniac, glucose, etc).
- Eviter ou limiter au maximum le stress au moment ou dans les minutes précédant la prise de sang : la sécrétion de catécholamines puis de cortisol peut fortement augmenter la glycémie, ainsi que modifier plusieurs variables, en particulier le glucose ou les lactates chez le chat.

2. CHOIX DU TUBE ET DU MATÉRIEL DE PRÉLÈVEMENT

- Un tube adapté à la taille de l'animal et au volume nécessaire pour les analyses prévues pour limiter au maximum le volume prélevé.
- Une aiguille de diamètre assez grand et une dépression (si seringue) assez faible pour éviter l'hémolyse ; en cas de transfert d'une seringue vers un tube, retirer l'aiguille.
- Un tube sans anticoagulant pour la préparation d'un sérum (tube à bouchon rouge brique).

NB :

- Sauf exception, l'anticoagulant préféré est l'héparine et ses sels (tube à bouchon vert).
- Le plus souvent, les résultats sont très voisins entre sérum et plasma mais parfois non interchangeables, par exemple pour l'électrophorèse des protéines sériques ; les accélérateurs de coagulation et les gels séparateurs sont dénués d'effets sur les analyses de routine. Les gels séparateurs ne doivent pas être utilisés pour les dosages médicamenteux.

3. PRÉPARATION DU SPÉCIMEN

- Identifier clairement les tubes afin d'éviter les erreurs.
- Respecter les volumes prévus par les fabricants, même si cela est peu important pour l'héparine.

- Homogénéiser le spécimen immédiatement en retournant le tube 8 à 10 fois par des mouvements lents et sans agitation excessive de façon à bien répartir la totalité de l'anticoagulant dans l'ensemble du sang collecté. Cette étape d'homogénéisation n'est pas nécessaire si le sang est récolté sur tube sec.
- Centrifuger les tubes pendant 10 à 15 min à environ 2000 g dans l'heure suivant le prélèvement et séparer le sérum ou le plasma dans un tube sec.

NB : le délai avant analyse du spécimen sera aussi court que possible ; la stabilité des analytes est variable en fonction des conditions de conservation; en réfrigération, la plupart des analytes sont stables quelques heures. Quelques exceptions toutefois comme l'ammoniac ou les gaz sanguin qui doivent être analysés IMMEDIATEMENT après le prélèvement.

4. ANALYSE DU SPÉCIMEN

- Avant toute analyse, examiner le spécimen pour détecter (et noter) d'éventuelles anomalies (caillots, couleurs, ...) et éventuellement faire un nouveau prélèvement.
- Pour les spécimens réfrigérés et surtout décongelés, il est nécessaire de les homogénéiser par plusieurs retournements et de les remettre à température ambiante avant analyse.
Attention ! Avec les tubes coniques de type Eppendorf, l'agitation doit être vigoureuse pour atteindre la portion de spécimen située dans la pointe du cône.
- Quelle que soit l'analyse, s'assurer de suivre les modes opératoires de l'ESV* ou ceux du laboratoire auquel le spécimen est adressé.

- ✓ Prélever le sang de préférence chez un sujet préparé, calme.
- ✓ Choisir des tubes d'un volume adapté au volume de sang collecté.
- ✓ Examiner les tubes avant analyse et noter les anomalies éventuelles.

B. L'ÉVALUATION ENDOCRINIENNE

Laetitia Jaillardon



L'endocrinologie est une discipline majeure et complexe de la pathologie clinique. L'auteur apporte dans cette fiche les informations nécessaires à la compréhension des facteurs de qualité des résultats d'analyse.

Le clinicien va recourir le plus souvent aux services d'un laboratoire spécialisé avec lequel il pourra échanger pour interpréter les résultats obtenus. Il est aussi proposé aux ESV une offre technique en analyseurs dont le choix dépendra de la satisfaction à des pré-requis indispensables.

OBJECTIFS

- Réaliser des dosages hormonaux en laboratoires vétérinaires spécialisés et en établissements de soins.
- Etablir le diagnostic des dysendocrinies dues aux lésions ou aux perturbations fonctionnelles des tissus endocriniens.

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL

1. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

- **Hormone** : c'est une molécule présente en **très faible quantité** dans le sang (10^{-9} à 10^{-12} mole/L, soit 10^4 à 10^7 fois moins que les analytes biochimiques classiques)
- **Principe des dosages hormonaux** : ce sont des **dosages immunologiques** ; on utilise des anticorps pour la reconnaissance d'un épitope d'une molécule antigène qui est l'hormone à doser.
 - ◇ Nécessité du recours à un marqueur puissant pour révéler la liaison anticorps/hormone : radioactivité ou enzymes produisant un signal (coloration, luminescence ou fluorescence).
 - ◇ Mesure du niveau du signal : proportionnel (dosages « sandwich » par fixation à 2 anticorps) ou inversement proportionnel (dosages par compétition/ analogue hormonal) à la concentration de l'hormone dans l'échantillon.

2. PRÉCAUTIONS ET PRINCIPALES CAUSES D'ERREUR

Les principales difficultés techniques sont liées au principe même des dosages immunologiques, à savoir **la qualité de la liaison antigène (hormone)-anticorps**.

- Nécessité de disposer d'un **anticorps capable de reconnaître l'hormone** (l'antigène) et seulement cette hormone (autres molécules apparentées, naturelles ou médicaments), de reconnaître une ou plusieurs parties (épitopes) spécifiques de l'hormone considérée.
- Nécessité de disposer d'un **anticorps qui ait une grande affinité pour l'hormone** pour s'y fixer intensément dans un milieu complexe qui peut varier avec les espèces et/ou les maladies : c'est « **l'effet matrice** », défini par la complexité du milieu dans lequel se situe l'hormone à doser, composé de nombreuses molécules pouvant interférer avec le dosage, à des degrés inconnus. L'affinité de l'anticorps pour l'hormone doit être suffisante par rapport à celle avec d'autres protéines (protéines transporteuses ou inflammatoires ou de la coagulation, auto-anticorps (ex dans l'hypothyroïdie).
- **Le type de marquage n'est en aucun cas le garant de la qualité**, il doit seulement être validé pour la révélation correcte de la ou des liaisons anticorps-antigène mises en jeu.

- **Les valeurs de référence ne sont pas universelles**, car elles sont relatives à la fixation de l'anticorps sur l'antigène sur des échantillons témoins dont la mesure quantitative exacte est inconnue. Elles peuvent varier sensiblement suivant l'espèce (effet matrice), la nature (voire le lot) de la trousse de dosage utilisée et ses conditions d'utilisation (durée et température d'incubation par exemple). Elles doivent être publiées et tenues à jour par le laboratoire qui effectue les analyses ou produit les analyseurs.
- **La précision** des résultats (pour les raisons précédemment décrites) est faible et peut sensiblement varier en fonction des conditions techniques et de la composition de la matrice (en particulier en cas de maladie) et se situe généralement entre 15% à 20% même si l'affichage des constructeurs d'automates ou les producteurs de trousses affichent souvent de meilleures performances).
- **Sécrétion pulsatile et rythme circadien** : il peut exister des fluctuations majeures des valeurs sanguines. Plusieurs prélèvements répartis dans la journée en fonction des connaissances physiologiques sont idéaux (T4, insuline).
Quand cela est possible éthiquement, on peut avoir recours à des tests dynamiques de freinage ou de stimulation par des facteurs physiologiques ou pharmacologiques connus (administration de glucose pour l'insuline, de tétracosactide d'ACTH ou de dexaméthasone pour le cortisol par exemple).
- **Étape pré-pré-analytique :**
 - ◇ **Effet du stress** : de nombreuses sécrétions hormonales sont déclenchées par le stress (Cortisol, T4, prolactine, catécholamines) et ont des effets sur d'autres facteurs hormonaux. Donc l'intervention vétérinaire peut avoir un effet direct sur les valeurs hormonales mesurées.
 - ◇ **Choix raisonné des analyses dans le contexte du patient** : risque de mettre en évidence un déséquilibre hormonal secondaire à une maladie primaire non diagnostiquée ou de ne pas confirmer une dysendocrinie sur une mesure statique ou un test dynamique inapproprié.
- **Étape pré-analytique :**
 - ◇ Facteurs liés à l'**obtention du spécimen** : choix du tube et préparation du spécimen, identification et stockage.
 - ◇ Facteurs liés à l'**animal** : statut physiologique (statut reproducteur, diète et prise alimentaire) et pathologique, traitements.
 - ◇ **Conditions de transport, de stockage, cycle congélation/recongélation** : risque particulièrement accru de détruire ou d'activer les protéines entraînant une modification de l'effet matrice ou une altération de la quantité d'hormones présentes.
- **Étape analytique :**
 - ◇ En absence de standardisation des mesures, la **validation des trousses par espèce** est indispensable par des équipes scientifiques reconnues et les allégations des fabricants ne peuvent être suffisantes.
 - ◇ La fiabilité d'un test est garantie par son usage dans les conditions optimales d'utilisation. **Contrôle qualité continu** (interne et externe) indispensable.
- **Étape post-analytique** : il n'existe pas toujours de consensus sur les unités.
- **Étape post-post-analytique** : interprétation des résultats dans le contexte anamnestique, clinique et biologique complexe : une collaboration étroite avec un vétérinaire spécialiste en pathologie clinique est souvent nécessaire pour discuter des résultats

LES DOSAGES HORMONAUX EN ESV

- Toutes les propriétés, principes et règles générales énoncées sont transposables aux analyseurs d'endocrinologie de paillasse commercialisés et utilisés dans les ESV.
- Le bon usage de ces analyseurs passe par des règles indispensables qu'il faut discuter en amont de l'achat avec les constructeurs et qu'il est indispensable de suivre en aval.
- Partant du pré requis que les analyseurs commercialisés ont été validés au préalable, 3 grands principes sont indispensables à respecter :
 - ◇ Préalablement à l'achat, s'assurer auprès du fabricant que l'analyseur a été validé pour les variables d'intérêt dans les espèces cibles et demander les documents attestant de cette validation.
 - ◇ Contrôle qualité (interne et externe) continu : s'assurer que le constructeur prévoit ces contrôles et inclure leur coût lors de l'investissement.
 - ◇ La phase pré-analytique est primordiale pour la fiabilité des résultats : les personnes réalisant les prélèvements et les analyses doivent être formées à l'utilisation des analyseurs mais surtout sensibilisées à l'importance de cette phase dans l'interprétation des résultats (importance de la mise à jeun avant les analyses, effet du stress sur les sécrétions hormonales, caractéristiques du prélèvement i.e hémolyse, lipémie, importance de l'homogénéisation et du pipetage des échantillons...)
 - ◇ La réalisation justifiée des analyses et l'interprétation des résultats de ces analyses dans le contexte du patient.

Pour en savoir plus

Fiche 3.3. A. : Les prélèvements sanguins pour les analyses de biochimie

3.4

L'EXAMEN DES URINES

La banalisation de cet examen, indispensable dans la pratique du laboratoire, ou le manque de rigueur sont la source de défauts de qualité fréquents.

- 3.4 A. Analyse d'urine de routine - JP. Braun
- B. Examen du culot urinaire - C. Trumel



A. ANALYSE D'URINE DE ROUTINE

Jean Pierre Braun



OBJECTIFS

Réaliser une analyse d'urine de routine

- Aspect macroscopique
- Analyse physico-chimique par bandelette et réfractomètre
- Analyse cytologique. L'analyse cytologique des urines est envisagée dans une fiche spécifique nommée « culot urinaire ».

L'examen bactériologique n'entre pas dans l'objet de cette fiche.

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL

1. MODE D'OBTENTION DES URINES

Les urines peuvent être prélevées par miction naturelle ou par cystocentèse. Lors de prélèvement d'acte thérapeutique, en cas d'obstruction urétrale, par exemple, les urines peuvent être obtenues lors du cathétérisme urétral.

2. CHOIX DU CONTENANT

Les urines doivent être placées dans un récipient ne contenant ni anticoagulant, ni activateur de coagulation, ni conservateur. Lors de miction spontanée, le recueil peut se faire dans des barquettes type alimentaire à usage unique. Lors de prélèvement par cystocentèse, les urines sont recueillies dans une seringue.

Il est ensuite recommandé de les transférer pour leur conservation ou la réalisation d'un culot urinaire dans des tubes type Eppendorf par exemple.

L'analyse sera faite dans les plus brefs délais.

3. OBSERVATION MACROSCOPIQUE (TURBIDITÉ, COULEUR)

L'examen macroscopique des urines est la première étape pour observer la couleur et la limpidité des urines. En effet, si les urines sont jaunes et limpides voire légèrement troubles, il n'est pas nécessaire de centrifuger préalablement les urines pour mesurer la densité ou analyser avec une bandelette urinaire.

Par contre, si la couleur est modifiée ou si les urines sont très troubles, une centrifugation est nécessaire et le surnageant est utilisé pour ces analyses. La centrifugation est faite à 500 g pendant 5 minutes, si la centrifugeuse le permet.

4. DENSITÉ URINAIRE (USG URINE SPECIFIC GRAVITY, EN ANGLAIS)

La densité urinaire doit être mesurée à l'aide d'un réfractomètre (cf. Fiche 2.1. C. Le réfractomètre). La bandelette urinaire ne doit jamais être utilisée pour cette évaluation.

5. UTILISATION D'UNE BANDELETTE URINAIRE

Avant toute utilisation de la bandelette urinaire, il est nécessaire de vérifier que les bandelettes ne sont pas périmées, qu'elles ont été conservées correctement (notamment dans des flacons rebouchés) et que les plages réactives ne sont pas déjà positives. Les urines doivent être à température ambiante et non à 4°C.

Le mode d'emploi des bandelettes a été prévu pour les besoins de la biologie humaine, où il est facile de recueillir un volume notable d'urine. Elles sont exclusivement manipulées par l'extrémité libre, sans toucher les plages réactives. Les bandelettes sont trempées (mais non « lavées ») brièvement dans l'urine non centrifugée et égouttées en tapotant sur le bord du flacon d'urine ou en posant la bandelette perpendiculairement sur une feuille de papier absorbant (jamais en se servant du papier absorbant comme d'un buvard).

Dans les petites espèces, le volume d'urine collecté est souvent insuffisant pour immerger une bandelette : dans ce cas, on dépose rapidement (pour pouvoir respecter ensuite les délais de lecture recommandés) une goutte sur chaque plage réactive ou on « arrose » la bandelette avec la seringue ou la pipette dans laquelle l'urine a été recueillie, et on égoutte ensuite comme précédemment.

Le développement de la réaction dans le support se traduit par l'apparition en une demie à deux minutes, en fonction des plages réactives et des marques, d'une coloration plus ou moins intense, qui est comparée à une gamme fournie par le fabricant et évaluée par un système semi-quantitatif du type : normal/négatif, +, ++, +++.

Des lecteurs automatiques peuvent effectuer une lecture des bandelettes (pour éviter le caractère subjectif de la comparaison des couleurs observées à la gamme du fabricant ou aider l'opérateur) et fournir des résultats chiffrés et imprimés.

LE 5.1. LE PH URINAIRE

Il est évalué par des bandelettes réactives à une unité près. Sa signification diagnostique est très limitée, mais il est important de le connaître car certaines autres plages de la bandelette utilisent des changements de couleur d'indicateurs de pH et peuvent donc donner des résultats erronés lorsque le pH s'écarte notablement de 7.

Il existe aussi des papiers pH spéciaux permettant une mesure par tranche de 0,3 unité mais l'utilité clinique de cette précision n'a pas été établie.

5.2. LE GLUCOSE

C'est un constituant « anormal » de l'urine, qui peut être observé, en dehors de maladies, après des repas riches en glucose (ou en glucides rapidement digérés et absorbés), lors de stress chez le chat.

Des faux positifs sont observés si la bandelette ou les urines ou le contenant des urines sont contaminés par de l'eau oxygénée, de l'eau de javel ou certains détergents.

Des faux négatifs sont observés lors de traitement du patient avec de la vitamine C, lors d'urines très concentrées, lors de forte cétonurie et bilirubinurie, lors de bactériurie, lorsque des urines conservées à 4°C n'ont pas été remises à température ambiante avant analyse.

5.3. LES CORPS CÉTONIQUES

(acétone, 3-hydroxybutyrate ou β -hydroxybutyrate, acétoacétate).

Ils sont éliminés dans l'urine en très faibles quantités, non détectées par les bandelettes. La réaction d'identification des corps cétoniques urinaires est la réaction de Legal (nitroprussiate de sodium) qui ne réagit qu'avec l'acétone et l'acétoacétate.

Des faux positifs sont observés lors d'urines très concentrées à pH acide, lors de pigmenturie.

Des faux négatifs sont observés lorsque le prélèvement est vieux.

5.4. LES PROTÉINES

Les protéines de masse moléculaire < 68000 sont filtrées par le filtre glomérulaire. Celles-ci sont réabsorbées en presque totalité dans le tubule, de telle sorte que la protéinurie est très faible chez un sujet sain (en général, $< 0,1$ à $0,5$ g/L), et en pratique indétectable par les bandelettes : de ce fait, les protéines sont considérées comme des constituants « anormaux » des urines. Il n'est cependant pas rare de détecter des protéines dans les urines concentrées.

En routine, la détection d'une protéinurie est fondée sur l'utilisation des bandelettes réactives :

- dont la limite de détection basse est environ de $0,2$ g/L,
- qui détectent mieux l'albumine que les globulines,
- qui donnent parfois des faux positifs dans les urines alcalines ($\text{pH} \geq 8$) ou lorsque le récipient est contaminé par de la chlorhexidine, des ammoniums quaternaires,
- dont les indications quantitatives sont trop imprécises dans les urines animales pour se substituer à une détermination quantitative : les indications sont tout au plus semi-quantitatives.

Il est donc essentiel de ne pas conclure après un seul dépistage positif et essentiel de confirmer le caractère permanent de la protéinurie.

Une protéinurie permanente est toujours une situation grave qui nécessite une confirmation par détermination du RPCU (rapport Protéines / Créatinine Urinaires). En outre, la quantité mesurée est à corrélérer avec le mode de recueil.

5.5. ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE

La présence de sang ou d'hémoglobine dans l'urine est « anormale ». La détection de l'hémoglobine est fondée sur l'activité peroxydasique de l'hème. Cette réaction n'est donc pas spécifique de l'hémoglobine ou du sang : elle détecte toutes les hémoprotéines, dont la myoglobine.

Elle ne permet de conclure sans ambiguïté que dans la mesure où elle est négative. En cas de positivité, il est nécessaire de distinguer hématurie, hémoglobinurie, et myoglobinurie.

La limite de détection est très basse : $0,15$ mg d'hémoglobine libre/L ou 5 hématies/ μL .

Des faux positifs sont observés lors d'urines très concentrées à pH acide, lors de pigmenturie.

Des faux négatifs sont observés lorsque le prélèvement est vieux.

5.6. LA BILIRUBINE

C'est le catabolite de l'hème de toutes les hémoprotéines. Chez un sujet en bonne santé, la bilirubinurie est pratiquement nulle. Chez le chien, une conjugaison limitée de la bilirubine a lieu dans le rein et il est donc « normal » de trouver de faibles quantités de bilirubine dans l'urine (« traces » à « + »).

Des faux positifs sont observés lors de traitements avec des AINS, lors de présence d'indican (dérivé du tryptophane) car la détection par bandelette réactive repose sur une réaction colorée qui n'est pas spécifique de la bilirubine.
Des faux négatifs sont observés lors de traitement par la vitamine C, lors de conservation des urines à la lumière car la bilirubine est instable à la lumière.

5.7. LES LEUCOCYTES

Ils sont rares dans les urines des sujets sains. La détection des leucocytes à l'aide de bandelettes urinaires est fondée sur la mise en évidence d'une estérase des leucocytes.

Malheureusement, cette réaction présente un nombre élevé de faux positifs chez le chat et de faux négatifs chez le chien. Il ne faut pas tenir compte des résultats de cette plage réactive.

5.8. LES NITRITES

L'urine peut contenir de faibles quantités de nitrates chez les sujets qui ingèrent des végétaux. Dans la vessie d'un sujet sain, les nitrates restent stables. En revanche, lors de contamination bactérienne, certains micro-organismes (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, etc.) peuvent réduire les nitrates en nitrites, à condition que l'urine ait séjourné suffisamment longtemps dans la vessie (quelques heures).

La présence de nitrites dans l'urine permet donc de conclure à une infection urinaire, mais l'absence de nitrites ne permet pas de conclure l'inverse.

5.9. L'UROBILINOGENÈ

C'est un produit de réduction de la bilirubine par la flore digestive normalement observé en faibles quantités dans l'urine des sujets en bonne santé.

Cette plage réactive n'a pas d'intérêt diagnostique en médecine vétérinaire.

6. ENREGISTREMENT DES RÉSULTATS

Les lecteurs de bandelettes sont en général couplés à des imprimantes et peuvent être reliés au système informatique de l'ESV*.

Pour toutes les observations visuelles, il est nécessaire de les noter ou de les enregistrer.

Dans tous les cas, la personne ayant fait l'analyse doit la valider.

Pour en savoir plus :

Fiche 3.4. B. Examen du culot urinaire

B. EXAMEN DU CULOT URINAIRE

Catherine Trumel



OBJECTIFS

Réaliser une analyse du culot (sédiment) urinaire :

- réalisation technique,
- lecture du culot urinaire et quantification des éléments figurés (hématies, leucocytes, cellules épithéliales, cristaux, cylindres, bactéries, spermatozoïdes).
- lecture du culot urinaire coloré pour la reconnaissance fine des cellules, des bactéries et parasites.

ESPÈCES CONCERNÉES CHIEN, CHAT.

1. RÉALISATION TECHNIQUE DU CULOT URINAIRE ENTRE LAME ET LAMELLE ET COLORÉ

- Placer 5 ml ou 1 à 1.5 ml d'urine fraîche dans un tube.
- Centrifuger 5 minutes à 450 g (1500 à 2000 tour par minute) ou en position urine en fonction de la centrifugeuse dont on dispose.
- Retirer le surnageant par retournement du tube.
- Laisser environ 0,5 ml ou 0,1 ml d'urine sur le culot (selon la quantité initiale).
- Remettre l'urine et les éléments du culot en suspension même si aucun culot n'est visible à l'œil nu délicatement sans faire de bulle.
- Placer une goutte sur une lame puis déposer une lamelle en verre sur la goutte pour étaler le culot entre lame et lamelle.
- Placer une goutte à l'extrémité d'une lame et l'étaler comme un frottis sanguin, sécher en agitant à l'air ou en séchant au sèche-cheveux sans chaleur. Il faut que le culot étalé soit parfaitement sec avant coloration.
- Colorer la lame (colorants rapides sans utiliser le flacon 1 (alcool) ou May Grunwald Giemsa -MGG) pour préparer le culot coloré.

2. LECTURE DU CULOT URINAIRE ENTRE LAME ET LAMELLE

- Abaisser le condenseur du microscope et fermer le diaphragme.
- Placer la lame préparée sur la platine du microscope.
- Mettre l'objectif x 10 et faire la mise au point :
 - ◇ Parcourir l'ensemble de l'espace délimité par la lamelle afin d'apprécier la richesse en éléments figurés, de les reconnaître et d'évaluer leur répartition.
 - ◇ Compter les cylindres sur 10 champs ; faire une moyenne et multiplier par 100 afin d'obtenir une évaluation semi-quantitative des cylindres.
- Mettre l'objectif x 40 et faire la mise au point
 - ◇ compter les éléments figurés (cellules, cristaux) sur 10 champs ; faire une moyenne et multiplier par 400 afin d'obtenir une évaluation semi-quantitative des cellules.

Le culot urinaire entre lame et lamelle chez un animal sain (chien ou chat)

- ◆ Rares hématies (< 5 / champ à l'objectif 40)
- ◆ Rares leucocytes (< 3-5 / champ à l'objectif 40)
- ◆ Quelques cellules épithéliales (< 3 / champ à l'objectif 40)
- ◆ Rares cylindres (< 1-2 / champ ; hyalins ou granuleux à l'objectif 40)
- ◆ Rares cristaux de PAM, oxalate, (bilirubine chez le chien si pas plus de 1+ à la bandelette)
- ◆ Spermatozoïdes chez le mâle entier
- ◆ Globules gras (chez le chat et les chiens stérilisés)

3. LECTURE DU CULOT COLORÉ

- Monter le condenseur du microscope jusqu'à sa position la plus haute contre la platine et ouvrir le diaphragme jusqu'à obtenir une luminosité maximale.
- Placer la lame préparée sur la platine du microscope.
- Mettre l'objectif x10 et faire la mise au point.
- Parcourir l'ensemble de la lame et identifier les éléments figurés aux objectifs x 40 et x 100.

Le culot urinaire coloré entre lame et lamelle chez un animal sain (chien ou chat)

- ◆ Rares éléments figurés (très peu de cellules et pas de bactérie)

B. EN PRATIQUE

L'EXAMEN DES URINES

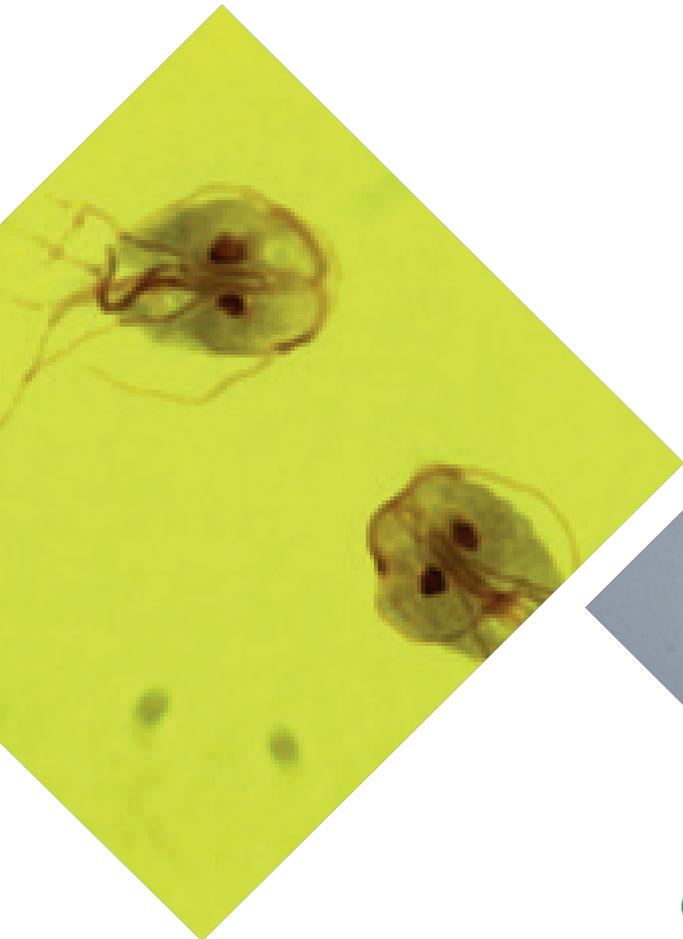
Objectifs : * Permettre par utilisation d'une bandelette réactive, d'un réfractomètre, d'une centrifugeuse et d'un microscope	* l'examen biochimique des urines * la densité urinaire * la composition du sédiment urinaire
Indication : * Examen fréquent pour de nombreuses affections générales, rénales ou uro génitales	<input checked="" type="checkbox"/> Indispensable <input type="checkbox"/> Utile <input checked="" type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic
Avantages : * Examen biochimique et densité urinaire	<input checked="" type="checkbox"/> Facile <input checked="" type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input checked="" type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients /Contraintes : * Examen du sédiment urinaire	<input type="checkbox"/> Difficile <input checked="" type="checkbox"/> Long (réalisé par le vétérinaire) <input type="checkbox"/> Contraignante <input checked="" type="checkbox"/> Coût moyen (en temps passé...)
Apport au diagnostic : Indispensable	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Bas à moyen	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Bas à modéré selon l'examen	Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Elimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - tubes, échantillons, réactifs, lames, mat. de pipetage et matériel de prélèvement <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité : * Pour les urines infectées par des bactéries pathogènes	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

3.5

COPROLOGIE

Réaliser un examen de qualité

- 3.5 A. La coproscopie des herbivores domestiques (Ruminants-Equidés) - Ph. Camuset
- B. La coproscopie chez les carnivores domestiques - G. Bourdoiseau
- C. La coproscopie des NAC - S. Sauvaget



A. COPROSCOPIE DES HERBIVORES DOMESTIQUES

Philippe Camuset



Cet examen est essentiel dans la pratique vétérinaire des ruminants et des équidés, et trouve toute sa place dans les analyses réalisées en ESV.

La technique analytique paraît simple ; elle nécessite cependant rigueur et apprentissage.

Cette fiche apporte la description de la technique préconisée par l'auteur ainsi que les points clefs d'une pratique de qualité dans toutes les étapes pré-analytique, analytique et post-analytique.

De nombreux pièges existent; il nous a semblé intéressant de placer dans un encadré la mise en garde de Serge Velu reprise de sa fiche 3.7.2. « Externaliser ses analyses en confiance dans un laboratoire spécialisé ».

Pour compléter ses connaissances et aider à la mise en place de la coproscopie, le lecteur pourra consulter les ouvrages recommandés par l'auteur.

OBJECTIF - UTILISATIONS - INDICATIONS PRINCIPALES

BOVINS

La mise en œuvre d'examens coproscopiques chez les bovins est justifiée dans deux cas :

- Lors d'un épisode clinique ou d'affections sub cliniques pouvant être reliés à une infestation parasitaire :
 - ◇ diarrhée (parasitisme digestif [coccidies, strongyloses gastro-intestinales, ascaridose, paramphistomose]),
 - ◇ affection pulmonaire (dictyocaulose),
 - ◇ retard de croissance (parasitisme digestif [coccidies, strongyloses gastro-intestinales, ascaridose], hépatique [Grande et petite douve]).
- Dans ce cadre, il s'agit essentiellement de coproscopies individuelles.
- Dans le cadre de procédures Qualité, dans le but de « traiter aussi souvent que nécessaire mais aussi peu que possible ». Dans ce cas, des coproscopies de mélange peuvent être envisagées en complément ou non de coproscopies individuelles.

PETITS RUMINANTS

Les mêmes principes qu'énoncés ci-dessus chez les bovins sont applicables mais avec une orientation zootechnique plus fréquente ainsi que, de façon privilégiée, dans le cadre de protocoles de gestion intégrée du parasitisme digestif.

Dans ce cas, les coproscopies de mélange dans un concept de gestion raisonnée du parasitisme digestif d'un troupeau sont plus couramment utilisées et conseillées.

EQUIDÉS

Bien que la réalisation de coproscopies lors d'épisodes cliniques demeure pertinente, l'émergence de plus en plus fréquente de populations de nématodes résistants aux antiparasitaires (petits strongles, Parascaris) conduit à son utilisation incontournable dans 3 cas précis :

- la vermifugation sélective contre les strongles digestifs des chevaux adultes présentant des excréments supérieures à un seuil donné (en France, de façon consensuelle, plus de 200 opg),
- la détermination de la famille d'anthelminthiques la plus pertinente lors de la vermifugation du poulain au sevrage,
- la réalisation de tests de réduction d'excrétion fécale (FECRT – Fecal egg count reduction test) après traitement pour objectiver l'éventuelle présence de parasites résistants à la molécule utilisée.

Dans les grands effectifs, des coproscopies de mélange par lot peuvent être envisagées pour décider de la conduite à tenir en matière de mise en œuvre de traitements antiparasitaires au pré (Deberge 2013)

1. PHASE PRÉ-ANALYTIQUE : PRÉLÈVEMENT

1.1. BOVINS

Les prélèvements de fèces doivent être effectués de préférence par voie rectale, conditionnés dans des pots à prélèvements, identifiés et conservés sous couvert du froid. L'examen doit être mis en œuvre de préférence sous 24 heures sans rupture de la chaîne du froid.

1.2. PETITS RUMINANTS

Dans le cadre d'examens individuels, les modalités sont identiques à celles préconisées pour les bovins.

Dans le cadre de coproscopies de mélange, une vingtaine de fèces fraîches ramassées au sol peuvent être utilisées. La conservation et l'acheminement demeurent inchangés.

1.3. EQUIDÉS

Dans l'immense majorité des cas, dans ces espèces, hors cas cliniques, c'est le propriétaire ou le détenteur qui effectue le prélèvement. Celui-ci doit donc être fait à base de crottins frais déposés sur le pré ou la litière, conservés dans un gant en latex en absence d'air et au réfrigérateur. Dans ces conditions, l'analyse peut être effectuée dans un délai maximum d'une semaine.

2. MATÉRIEL D'ANALYSE

Le matériel nécessaire est le suivant :

- Pour la technique de Mc Master :
 - ◇ microscope de qualité pour un examen au grossissement 100
 - ◇ balance
 - ◇ mortier
 - ◇ verres à pied de 500 ml
 - ◇ lames de Mc Master
 - ◇ liquide de flottation d'une densité supérieure ou égale à 1,20
 - ◇ passoire à thé de diamètre 100 mm ou tamis de diamètre 10 cm et de maille 600 à 700 µm
 - ◇ tamis de diamètre 10 cm et de maille 200 µm

- Pour la technique rapide (Ovacheck ND, équivalent ou tube à essai) :
 - ◇ dispositif Ovacheck ND ou équivalent, ou tube à essai
 - ◇ microscope de qualité pour un examen au grossissement 100
 - ◇ lame et lamelle

- Pour la technique de Mc Kenna modifiée :
 - ◇ microscope de qualité pour un examen au grossissement 100
 - ◇ verre à pied de 500 ml
 - ◇ compresses chirurgicales
 - ◇ lame ou dispositif de lecture pouvant contenir le décantat obtenu

3. MÉTHODE ANALYTIQUE : PRINCIPE ET RÉALISATION DE LA TECHNIQUE

TROIS TECHNIQUES SONT COMMUNÉMENT UTILISÉES :

3.1. LA TECHNIQUE RAPIDE (OVACHECK ND OU ÉQUIVALENT)

Elle peut être réalisée avec des dispositifs dédiés (Ovachek par exemple) ou avec un tube à essai et une lamelle. Selon le liquide de flottation utilisé, les œufs de parasites mis en évidence sont différents. Ainsi des liquides peu denses (chlorure de sodium, sucrose, nitrite de sodium de densité inférieure à 1.30) ne permettent pas la mise en évidence d'œufs de trématodes mais, a contrario, préservent les œufs fragiles de Strongyloides. Cette méthode est plus rapide que la technique par décantation mais elle ne permet pas d'obtenir de résultats quantitatifs.

En pratique courante, seul le sulfate de zinc en solution saturée (densité supérieure à 1.4) permet la mise en évidence d'œufs de trématodes de zones humides (essentiellement les paramphistomes eu égard à la faible prolificité de *Fasciola hepatica*). Il faut toutefois noter que la mise en évidence d'œufs de *Fasciola hepatica* signe toujours une population parasitaire élevée.

3.2. COPROSCOPIE DE MC MASTER

Deux techniques sont utilisées, faisant chacune appel à la filtration :

- Une technique faisant appel à une double décantation pour laquelle 5 à 10 grammes de fèces sont utilisés pour chaque analyse. Après trituration en bol en céramique, deux filtrations et sédimentations sont effectuées, la première avec une passoire à thé ou un tamis de 640 µm (pendant 1h - 1h30 minimum), la seconde avec un tamis de 200 µm (pendant une demi-heure minimum). L'examen du produit de sédimentation en lame de Mc Master, après pesée de l'échantillon et mesure du volume restant, permet de calculer avec précision le niveau d'excrétion. Cette technique utilise 4 ml de liquide de flottation. La sensibilité est de l'ordre de 10 opg (œuf par gramme). Cette technique est un peu plus longue que la suivante mais elle est très sensible et consomme peu de sulfate de zinc qui est toxique pour l'environnement et doit être recyclé.
- Une technique faisant appel à une simple filtration sans décantation dans laquelle 1 gramme de fèces pour 49 ml de liquide de flottation (ou 5 grammes pour 70 ml) sont filtrés à travers des compresses et une passoire à thé. 1 ml est examiné en lame de Mc Master après homogénéisation pour une sensibilité de 15 à 50 opg.

Une technique d'une précision d'1 opg (Mini Flotac) développée en Italie et utilisée à l'école vétérinaire de Nantes (Oniris) sera bientôt disponible en cabinet vétérinaire. Elle demande toutefois un matériel spécifique.

3.3. COPROSCOPIE DE MC KENNA

Cette technique permet soit un diagnostic individuel soit un diagnostic de troupeau en prélevant un minimum de 5 animaux par lots touchés, plutôt des primipares et/ou des individus toussant depuis peu. La mise en œuvre du test se fait le plus tôt possible après la récolte et, quoiqu'il en soit, sans que le prélèvement ne soit exposé à la chaleur. La technique étant qualitative, les fèces ne sont pas pesées. Une cuillère à soupe bombée (30 à 50 grammes) de fèces est utilisée par animal. Jusqu'à cinq animaux peuvent être regroupés par examen, l'important étant de détecter l'infestation du troupeau et non de l'individu.

Les fèces sont regroupées dans deux compresses croisées, refermées en aumônière. Les coins noués de celle-ci permettent de la suspendre à un bâtonnet qui sera placé en travers du verre à pied. Ce dernier est rempli complètement d'eau. L'aumônière peut aussi être placée sur un tamis très fin.

La lecture se fait après un temps minimal de 8 heures sans excéder 48 heures. Au fond du verre à pied, se situe un dépôt au sein duquel se trouvent les éventuelles larves 1 de *Dicyocaulus* (ou *Muellerius* ou *Protostrongylus* chez les petits ruminants).

L'utilisation de deux compresses permet de limiter considérablement la présence de débris végétaux au sein du culot, ce qui facilite la lecture. Le surnageant est évacué avec précaution à l'aide d'une seringue de 50 ml jusqu'à ce qu'il ne reste qu'environ 10 ml en fond de verre à pied. Ces 10 ml sont récupérés et placés dans un réceptacle creux et examiné au microscope sur une lame à l'objectif 10 (grossissement 100).

4. CONTRÔLE DE QUALITÉ - FACTEURS DE VARIATION - PRÉCAUTION PRÉALABLE D'UTILISATION

En termes de contrôle de qualité, les principaux facteurs de variation sont de trois ordres :

- la conservation du prélèvement qui doit empêcher l'éclosion des œufs de strongles ou la mort des larves de strongles respiratoires,
- la pesée de la prise d'essai et la mesure du volume de sédimentation qui président à la précision quantitative du résultat obtenu,
- la compétence et l'habitude de lecture de l'opérateur.

5. POST ANALYTIQUE : RESTITUTION DES RÉSULTATS - VALIDATION

Si la préparation du prélèvement peut être confiée à une assistante ou un assistant vétérinaire, la lecture, en cabinet vétérinaire, doit impérativement être effectuée par un vétérinaire qui rédigera un compte rendu transmis au détenteur des animaux prélevés.

Ce compte rendu abordera le résultat de la coproscopie mais aussi la conduite à tenir en termes de mesures médicales et agronomiques à mettre en œuvre.

6. DANGERS D'UTILISATION DE CERTAINS RÉACTIFS, ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Le sulfate de zinc est un déchet toxique. Il doit être récupéré et éliminé par des circuits dédiés.

Il faudra veiller à l'absence de projection dans les yeux.

7. OFFRE D'ANALYSES EXTERNALISÉE

Lorsque les compétences techniques ne sont pas réunies dans une structure vétérinaire, les coproscopies pourront être confiées à un laboratoire spécialisé. Il faudra veiller à un envoi sous couvert du froid et à l'abri de l'air, et dans un délai le plus court possible (éviter le transit par voie postale en fin de semaine).

Il faut, par contre, avoir pleinement conscience que les larves de strongles respiratoires supportent très mal l'envoi postal et qu'il est préférable d'effectuer leur recherche directement au cabinet.

POUR EN SAVOIR PLUS :

1 : Beugnet F., Polack B., Dang H. Atlas de coproscopie, éd. Kalianxis, 277 p.

2 : Deberge E. La vermifugation sélective chez les équidés. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil ; 2013.

3 : Dorchies Ph., Duncan J., Losson B. Alzieu J-P. Vade mecum de Parasitologie clinique des bovins. Editions

Medcom. www.medcom.fr ; 341p

LIMITES DE LA COPROLOGIE PARASITAIRE PAR TECHNIQUE DE FLOTTATION

Auteur **Serge Vélú**

- **Dues à la technique elle-même :**

- ◇ *la densité du liquide de flottation est à adapter à la densité des éléments parasites à observer,*
- ◇ *les protozoaires meurent dans le milieu : il faut réaliser un examen direct des fèces,*
- ◇ *certains éléments éclatent ou sont déformés dans le milieu,*
- ◇ *le respect du temps de flottation est indispensable,*
- ◇ *certains parasites à peine visibles (ex : cryptosporidies, kystes de giardia) nécessitent d'autres techniques,*
- ◇ *pour les trichures par ex, les œufs sont en surface des matières ; l'homogénéisation est essentielle.*

- **Dues à la biologie des parasites :**

- ◇ *parasites ne signifie pas maladie parasitaire – d'où utilisation de techniques quantitatives d'interprétation parfois hasardeuse,*
- ◇ *fluctuation de la ponte en fonction de l'heure – de la saison (spring rise chez le mouton) – de l'hôte (âge- physiologie – ex début de lactation (brebis et truie) - ou immunité) – parfois facteur 1000 d'une crotte à l'autre (prouvé chez le lapin),*
- ◇ *variation du nombre en fonction de la consistance des fèces,*
- ◇ *notion de période pré-patente : seuls les vers adultes pondent – seuls les ookystes coccidiens sont émis dans les fèces. (18 à 21 j pour E.bovis et 16 à 18 j pour E.zuernii),*
- ◇ *le pic d'excrétion peut être court : 1 ou 2 j pour E.bovis et E.zuernii,*
- ◇ *c'est parfois la phase larvaire ou intracellulaire qui est pathogène (oestertagiose de type 2 - oesophagostomose larvaire – trichonémose hivernale, fasciolose aiguë, coccidiose ...).*

- **Dues à la technicité du manipulateur :**

- ◇ *faux parasites fréquents (pollens, fragments végétaux, œufs d'acariens) ou coprophagie,*
- ◇ *identification parfois difficile. Un micromètre est utile.*

- **Dues à la qualité du prélèvement :**

- ◇ *fraicheur des matières (mort des protozoaires, évolution des ookystes ou des œufs) (stabilisation possible),*
- ◇ *matières ramassées par terre colonisées par des larves d'Helminthes libres.*

LE TAENIASIS DU CHEVAL :

Marc Hasdenteufel

Compte tenu de l'irrégularité d'excrétion d'œufs de taenias ou de proglottis chargés d'œuf par les chevaux contaminés, la coproscopie reste un recours diagnostique très peu sensible. Le nombre de faux négatifs baisse si l'on procède à une coproscopie quotidienne pendant au moins cinq jours de suite. On peut aussi y recourir le lendemain d'un traitement.

Gilles Bourdoiseau

Chez les équidés, il faut privilégier la coproscopie quantitative, et toujours dans le contexte de l'anthelminthorésistance. Consulter le site de l'AVEF: cf §avis, AVIS 2022-1.

B. LA COPROSCOPIE CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

Gilles Bourdoiseau



L'examen coproscopique des carnivores domestiques a des indications cliniques fréquentes. Ces indications, la phase pré-analytique et la présentation des résultats sont décrites dans cette fiche avec les points méritant attention du clinicien.

Les principes de l'analyse coproscopique des carnivores domestiques sont développés dans l'encadré « Techniques de coproscopie réalisables en ESV ».

Pour en savoir plus : trois références sont proposées, deux ouvrages et le site de l'ESSCAP

OBJECTIF - UTILISATIONS - INDICATIONS PRINCIPALES

La mise en œuvre d'examens coproscopiques est justifiée dans 3 situations :

- **A la suite d'un examen** clinique motivé par des troubles digestifs ou respiratoires, un retard de croissance ou un mauvais état général, l'hypothèse de maladies parasitaires digestives ou respiratoires est envisagée : Exemples : ascaridoses, coccidioses, ankylostomidoses, angiostrongyloses, ...
L'examen coproscopique à réaliser est d'abord macroscopique puis microscopique individuel.
- Dans un contexte de **santé publique**, l'hypothèse d'un animal porteur asymptomatique source de parasites pour son entourage doit être confirmée / infirmée :
Exemples : toxocarose, teniasis échinococcique, coccidioses.
L'examen coproscopique à réaliser est macroscopique puis microscopique individuel.
- Dans le cadre d'un **élevage**, il peut être nécessaire de dresser un bilan parasitaire global à des fins de prophylaxie sanitaire et médicale avant la vente des animaux ; le recours à une coproscopie « de mélange » est possible.

ESPÈCES ANIMALES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, FURET

1. PHASE PRÉ-ANALYTIQUE

1.1. PRÉLÈVEMENT

- Chez **le chien**, le prélèvement par voie rectale est rarement réalisable. Il nécessite donc la récolte de fèces récemment émises, non ou peu souillées d'éléments extérieurs (terre, gravier, ...), rapidement ramassées et stockées dans un récipient en verre ou en plastique muni d'un couvercle.
- Un prélèvement quantitativement insuffisant doit être complété par les fèces émises dans les 24 à 48h suivantes ; c'est fréquemment le cas pour **le chat** qui doit être retenu dans un local adéquat ou une cage.
- Chez **le furet** : Voir Fiche 3.5.C « Coproscopie des NAC ».
- Pour ces manipulations, **le port de gants jetables** est vivement recommandé, suivi d'un **lavage obligatoire des mains**.

1.2. LE SPÉCIMEN DOIT ÊTRE :

- **identifié** : par un numéro renvoyant au dossier clinique ou au document d'enregistrement de l'animal ou de l'élevage ; ou par une étiquette autocollante avec le numéro et la date du prélèvement ;
- **conservé** par le froid (+4°C), soit dans un réfrigérateur réservé aux prélèvements souillés, soit dans le réfrigérateur destiné à tous les prélèvements mais en y réservant et identifiant une zone particulière distincte des prélèvements « non souillés » ;
- puis **traité rapidement** - idéalement dans les 24h au plus qui suivent l'émission des fèces analysées - à des fins de diagnose en veillant, si possible, à **conserver une fraction du spécimen** afin que celui-ci puisse être de nouveau traité — en cas de résultats douteux ou ne correspondant pas aux hypothèses diagnostiques initialement envisagées — à des fins de confirmation par une tierce personne ou selon une autre méthode ;
- **le recours à un autre laboratoire ou ESV** (centre hospitalier public type école ou privé) est possible à la condition que les informations liées au prélèvement soient transmises et que la chaîne du froid soit respectée ;
- **la durée de la conservation post-analyse du spécimen** doit être définie par le praticien (8-10j ?) ; au terme de cette période, le prélèvement doit être éliminé selon les procédures inhérentes aux **déchets biologiques**.

2. PHASE ANALYTIQUE

- **Se référer à l'encadré « Les techniques de coproscopie réalisables en ESV »**
- **La coproscopie quantitative** ne présente pas d'intérêt chez les carnivores. La discussion comparée des diverses techniques ne relève pas de la démarche qualité.
- La présence d'un oeuf ou d'un kyste n'est pas synonyme de maladie: faux + par souillure du prélèvement.

3. PHASE POST-ANALYTIQUE : RÉSULTAT

3.1. LE COMPTE-RENDU DE L'ANALYSE OU « RÉSULTAT » DOIT OBLIGATOIREMENT COMPORTER :

- l'identification de l'animal concerné : espèce, race, sexe, âge, numéro d'identification électronique ; ou celui de l'élevage ;
- la méthode utilisée,
- la date,
- le résultat proprement-dit, c'est-à-dire :
 - ◇ le nom des espèces parasites identifiées,
 - ◇ à défaut : celui du genre ou de la famille,
- la signature du confrère certifiant le résultat, éventuellement le tampon de l'ESV,
- la poursuite de la démarche doit aboutir à une information au propriétaire, éventuellement une consultation de l'animal et la prescription d'un traitement.
- un double de cette feuille (ou numérique) doit être archivé.

3.2. LA FEUILLE DE RÉSULTAT NE DOIT JAMAIS COMPORTER :

- le nom de la maladie parasitaire correspondante,
- et surtout son traitement.
- le caractère zoonotique éventuel ; celui-ci doit en effet être expliqué au propriétaire à la faveur d'un entretien si possible en-tête-à-tête plutôt que téléphonique : mode de contamination, tableau et gravité cliniques, recommandations pour une éventuelle consultation auprès d'un médecin...

Références bibliographiques :

- Un ouvrage très bien fait, synthétique avec photos des parasites et formes de dissémination, explication des techniques pratiques. Je le conseille fortement comme manuel de base pour mettre en œuvre les techniques et effectuer les premières diagnostics.
 - ◆ « **Manuel de parasitologie vétérinaire du chien et du chat** ». **Genchi M, Traldi G, Genchi C. traduction et adaptation : M. Cervone. Ed. Med'Com, 2017, 132pp.** Guide de présentation des techniques et photos des parasites et formes de dissémination.
- «Textbook of clinical parasitology in dogs and cats» édité par Boehringer
- Les guides [esccap.fr](http://www.esccap.fr) peuvent également aider le vétérinaire :
 - ◆ **Site <http://www.esccap.fr> espace vétérinaire : Lutte contre les helminthes du chien et du chat. Guide n°5 : protozoaires parasites digestifs du chien et du chat.**

LES TECHNIQUES DE COPROSCOPIE RÉALISABLES EN ESV

La coproscopie parasitaire chez les carnivores domestiques est **qualitative, macroscopique et microscopique**. Le but est d'observer, de concentrer et d'identifier les formes de dissémination parasitaires, d'où 3 étapes :

- **l'observation macroscopique est utile :**
 - ◇ Pour l'observation de parasites expulsés (« ascaris ») ou de formes de dissémination parasites (segments de Dipylidium par exemple).
 - ◆ Certains segments de cestodes peuvent être de taille réduite (quelques mm de longueur) et doivent alors être considérés comme d'éventuels segments d'échinocoques peu pathogènes pour le carnivore mais très **dangereux car zoonotiques**.
 - ◇ Cette situation à elle seule justifie **deux règles d'hygiène et de sécurité obligatoires** pour le praticien et les ASV : **le lavage des mains avant et après l'examen et la manipulation, le port de gants jetables**.
- **la concentration des éléments de dissémination pour une observation microscopique :**
 - ◇ **par flottation dans un liquide de haute densité (solution saline)** : les formes parasites étant alors « légères » flottent en surface. La sensibilité peut être augmentée par une centrifugation, la lamelle étant posée sur l'extrémité supérieure du tube en contact avec la solution: ne pas ménager un espace libre entre la surface du liquide et la face inférieure de la lamelle au risque d'avoir un résultat faux négatif. Recueillir la lamelle, la poser sur une lame et observer au microscope,
 - ◇ **par sédimentation dans de l'eau** : laisser sédimenter, éliminer le surnageant, procéder de nouveau à la même opération. L'avantage de cette technique est sa simplicité ; des éléments non parasites (débris alimentaires, gras...) peuvent malheureusement gêner la lecture,
 - ◇ **selon la technique de BAERMANN** visant à concentrer et observer des larves de nématodes (en particulier Angiostrongylus vasorum) :
 - ◆ disposer les fèces dans un entonnoir en verre fixé sur un portoir et dont l'extrémité distale est munie d'un tube en caoutchouc. Le principe est de concentrer les larves par la sédimentation et leur hydrotropisme de sorte qu'après quelques heures elles peuvent être recueillies dans la partie distale du tube,
 - ◆ recueillir les premières gouttes sur une lame. Observer.

C. LA COPROSCOPIE DES NAC

Samuel Sauvaget



La coproscopie des NAC est une discipline complexe du fait de la diversité des espèces, de l'importance des parasitoses digestives et respiratoires pour certaines d'entre elles, du contexte d'élevage où vit un animal ou dont il provient.

Pour des résultats de qualité le clinicien devra porter toute son attention au prélèvement puis à l'analyse elle-même lorsqu'elle est pratiquée dans l'ESV.

L'utilisation d'ouvrages de référence facilitera la diagnose des parasites ou de leurs œufs puis la pratique de l'analyse.

OBJECTIF - UTILISATIONS - INDICATIONS PRINCIPALES

La mise en œuvre d'examens coproscopiques est justifiée dans 3 situations :

- **A la suite d'un examen clinique** motivé par des troubles digestifs ou respiratoires, un retard de croissance ou un mauvais état général, ..., l'hypothèse de maladies parasitaires digestives ou respiratoires est envisagée :
Exemples : coccidioses, oxyurose, infestation par flagellés...
L'examen coproscopique à réaliser est d'abord macroscopique puis microscopique individuel.
- **Dans un contexte de santé publique**, l'hypothèse d'un animal porteur asymptomatique source de parasites pour son entourage doit être confirmée / infirmée (exemples : giardiose, cryptosporidiose...)
L'examen coproscopique à réaliser est macroscopique puis microscopique individuel.
- **Dans le cadre d'un élevage**, il peut être nécessaire de dresser un bilan parasitaire global à des fins de prophylaxie sanitaire et médicale avant la vente des animaux ; le recours à une coproscopie « de mélange » peut être utilisée.

ESPÈCES ANIMALES CONCERNÉES

- Petits mammifères herbivores de compagnie
- Oiseaux de cage et de volières, volailles d'ornement
- Reptiles

1. PHASE PRÉ-ANALYTIQUE :

1.1. PRÉLÈVEMENT

- **Chez les NAC**, le prélèvement par voie rectale est rarement réalisable. Il nécessite donc la récolte de fèces récemment émises, non ou peu souillées d'éléments extérieurs (terre, gravier, ...), rapidement ramassées et stockées dans un récipient en verre ou en plastique muni d'un couvercle.
La réalisation de ces prélèvements est plus ou moins simple en fonction du mode de vie de l'animal (lapins ou tortues vivant en extérieur par exemple). Un confinement de l'animal peut être nécessaire pendant 24 à 48 heures afin de prélever des fèces récentes.
- Chez les oiseaux de cage et de volière, le recueil de fientes fraîchement émises au fond de la cage est

généralement facile, d'autant qu'elles seront généralement émises en consultation au moment de l'examen clinique. Chez les reptiles vivant en terrarium, prévenir le propriétaire au moment de la prise de rendez-vous de prélever des fèces récemment émises, certaines espèces n'émettant des selles que peu fréquemment (serpents de grande taille notamment).

- Le furet peut facilement émettre des selles en consultation ; il suffit de le laisser se promener dans la salle de consultation en attendant qu'il les fasse. Sinon on le gardera en cage d'hospitalisation en attendant que la nature fasse son œuvre.
- Pour ces manipulations, le port de gants jetables est vivement recommandé, suivi d'un lavage obligatoire des mains.

1.2. LE SPÉCIMEN DOIT ÊTRE :

- **identifié** : par un numéro renvoyant au dossier clinique ou au document d'enregistrement de l'animal ou de l'élevage ; ou par une étiquette autocollante avec le numéro et la date du prélèvement ;
- **conservé** par le froid (+4°C), soit dans un réfrigérateur réservé aux prélèvements souillés, soit dans le réfrigérateur destiné à tous les prélèvements mais en y réservant et identifiant une zone particulière distincte des prélèvements « non souillés » ;
- puis **traité rapidement** - idéalement dans les 24h au plus qui suivent l'émission des fèces analysées - à des fins de diagnose en veillant, si possible, à **conserver une fraction du spécimen** afin que celui-ci puisse être de nouveau traité — en cas de résultats douteux ou ne correspondant pas aux hypothèses diagnostiques initialement envisagées — à des fins de confirmation par une tierce personne ou selon une autre méthode ;
- **le recours à un autre laboratoire ou ESV** (centre hospitalier public type école ou privé) est possible à la condition que les informations liées au prélèvement soient transmises et que la chaîne du froid soit respectée ;
- **la durée de la conservation** post-analyse du spécimen doit être définie par le praticien (8-10j ?) ; au terme de cette période, le prélèvement doit être éliminé selon les procédures inhérentes aux **déchets biologiques**.

2. PHASE ANALYTIQUE

2.1. ÉTALEMENT FRAIS DE FÈGES ENTRE LAME ET LAMELLES

Méthode pertinente pour observer la présence de flagellés notamment chez les tortues qui sont régulièrement infestées ou de vers de petite taille. Un échantillon de fèces fraîchement émises est posé sur une lame et recouvert d'une ou deux gouttes d'eau. La lamelle est appliquée par-dessus en étalant le contenu. L'observation microscopique est réalisée instantanément au faible grossissement (observation des micro-organismes flagellés qui se déplacent dans le champ).

2.2. MÉTHODE DE FLOTTATION

Des kits rapides existent (Ex : Ovachek) et sont adaptées à la pratique des ESV. Le comptage des oeufs passe par l'utilisation d'une cellule de Mc Master. La technique générale de flottation est reprise dans le schéma suivant :



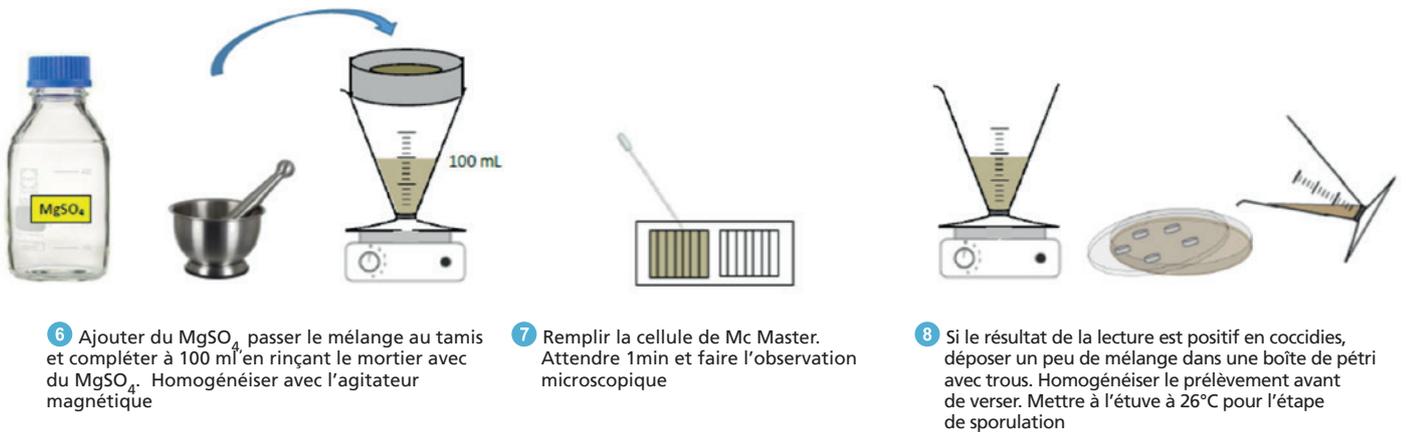
1 Peser 10 g d'excréta préalablement mélangés

2 Ajouter 50 ml d'eau

3 Laisser en contact quelques temps (surtout si les excréta sont durs)

4 Mixer avec le mixeur girafe

5 Après homogénéisation, prélever 40g de mélange avec une louche.



6 Ajouter du $MgSO_4$, passer le mélange au tamis et compléter à 100 ml en rinçant le mortier avec du $MgSO_4$. Homogénéiser avec l'agitateur magnétique

7 Remplir la cellule de Mc Master. Attendre 1min et faire l'observation microscopique

8 Si le résultat de la lecture est positif en coccidies, déposer un peu de mélange dans une boîte de pétri avec trous. Homogénéiser le prélèvement avant de verser. Mettre à l'étuve à 26°C pour l'étape de sporulation

Le nombre d'œufs par gramme est obtenu par le calcul suivant : Nombre d'œufs présents dans une chambre de cellules (6 colonnes)x100

Pour les coccidies, l'étape de diagnose d'espèce après sporulation est possible mais réservée à du personnel formé en laboratoire spécialisé. Cette étape reste indispensable pour évaluer la gravité de l'infestation, fonction du dénombrement et de l'espèce de coccidies concernée.

3. PHASE POST-ANALYTIQUE : RÉSULTAT

3.1. LE COMPTE-RENDU DE L'ANALYSE OU « RÉSULTAT » DOIT OBLIGATOIREMENT COMPORTER :

- l'identification de l'animal concerné : espèce, race, sexe, âge, numéro d'identification électronique ; ou celui de l'élevage,
- la méthode utilisée,
- la date,
- le résultat proprement-dit, c'est-à-dire : le(s) nom(s) des espèces parasites identifiées, ou à défaut : celui du genre ou de la famille,
- la quantité rapportée au gramme (gr) de fèces si a été effectuée une coproscopie quantitative ,
- la signature du confrère certifiant le résultat, éventuellement le tampon de l'ESV,
- la poursuite de la démarche doit aboutir à une information au propriétaire, éventuellement une consultation de l'animal et la prescription d'un traitement,
- un double de cette feuille (ou numérique) doit être archivé.

3.2. LA FEUILLE DE RÉSULTAT NE DOIT JAMAIS COMPORTER :

- le nom de la maladie parasitaire correspondante, ni surtout son traitement,
- le caractère zoonotique éventuel ; celui-ci doit en effet être expliqué au propriétaire à la faveur d'un entretien si possible en tête-à-tête plutôt que téléphonique : mode de contamination, tableau et gravité cliniques, recommandations pour une éventuelle consultation auprès d'un médecin.....

A.B.C. EN PRATIQUE

LA COPROSCOPIE

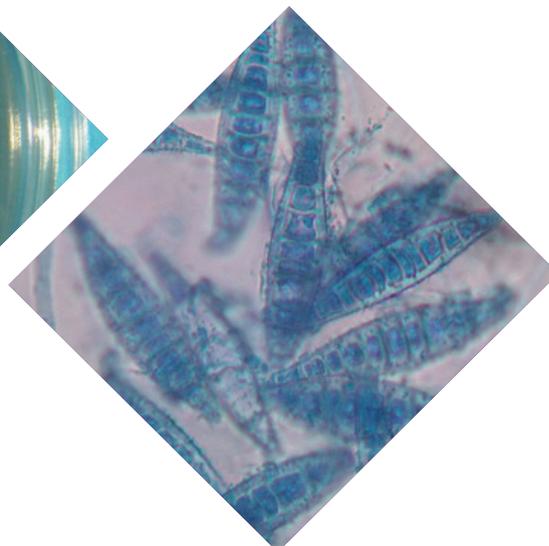
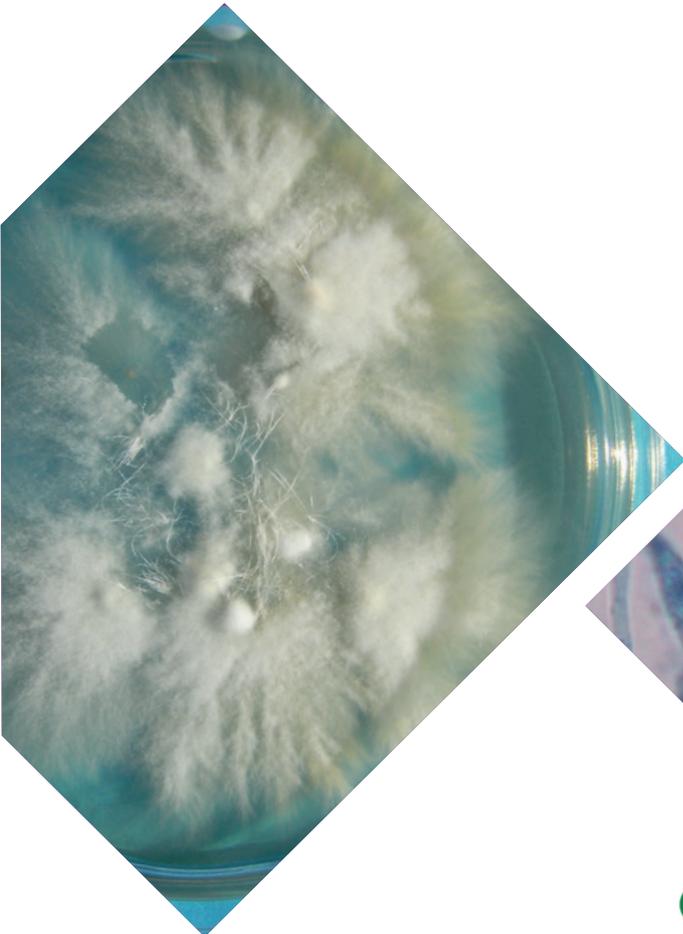
<p>Objectifs :</p> <ul style="list-style-type: none"> * Permettre après préparation d'un échantillon de fèces puis lecture au microscope : 	<ul style="list-style-type: none"> * d'identifier les œufs / larves/ adultes * de les dénombrer éventuellement * pour un diagnostic d'infection parasitaire d'un individu / troupeau
<p>Indications :</p> <ul style="list-style-type: none"> * Examen fréquent / important * En élevage (bilan parasitaire troupeau) * En cas d'affection digestive individuelle * Pour le dépistage (zoonoses) 	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Indispensable <input type="checkbox"/> Utile <input type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic
<p>Avantages :</p> <ul style="list-style-type: none"> * Examen direct * Technique de flottation * Technique de sédimentation 	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Facile <input type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input checked="" type="checkbox"/> Faible coût
<p>Inconvénients /Contraintes :</p> <ul style="list-style-type: none"> * Ensemble de techniques nécessitant un apprentissage pour une diagnose sûre 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Difficile <input checked="" type="checkbox"/> Long (assez) <input checked="" type="checkbox"/> Contraignant <input checked="" type="checkbox"/> Coût moyen (en temps passé...)
<p>Apport au diagnostic : Indispensable</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
<p>Contrôle qualité : Oui</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
<p>Niveau de technicité requis : Assez élevé</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
<p>Coûts des examens :</p> <ul style="list-style-type: none"> * Modéré pour les méthodes manuelles traditionnelles * Plus élevé avec milieu prêt à l'emploi 	<p>Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé</p> <p>Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input checked="" type="checkbox"/> Elevé</p> <p>Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé</p>
<p>Elimination des déchets avec les DASRI :</p>	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Oui - lames, milieux de préparation des échantillons, mat. pipetage <input type="checkbox"/> Non
<p>Hygiène et sécurité :</p> <ul style="list-style-type: none"> * Préparation de fèces, risque de zoonose, risque toxique (sulfate de Zinc) 	<ul style="list-style-type: none"> * Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

3.6

DERMATOLOGIE

Réaliser un diagnostic de laboratoire de qualité

- 3.6 A. Les dermatoses parasitaires - E. Guaguère
- B. Les dermatophyties - E. Guaguère
- C. Les levuroses - E. Guaguère
- D. Les examens dermatologiques chez les bovins et les équidés - J. Devos



A. PRINCIPALES METHODES DE MISE EN EVIDENCE DES ECTOPARASITES

Eric Guaguère



OBJECTIF - INDICATIONS - MÉTHODES

◆ Le diagnostic expérimental des ectoparasitoses fait appel à des examens réalisés par le praticien.

Il exige de connaître les diverses méthodes de mise en évidence, d'en apprécier les valeurs relatives et d'acquérir une bonne compétence (réalisation, prélèvement et analyses).

Ces examens sont nécessairement chronophages : un raclage effectué «à tout hasard» pour rechercher «des parasites», regardé hâtivement, a toutes chances de se révéler négatif (Patrick Bourdeau).

◆ Le diagnostic d'une dermatose parasitaire passe par cinq étapes successives permettant le diagnostic parasitologique :

- la suspicion clinique établie à partir de données épidémiologiques et cliniques,
- la réalisation de prélèvements de qualité, destinés soit à un examen immédiat, soit à l'envoi à un laboratoire spécialisé,
- la mise en évidence des parasites (différents stades évolutifs, excréments, ...) obtenue par une recherche rigoureuse et souvent longue,
- l'identification précise du parasite,
- l'interprétation des résultats des examens, que ceux-ci soient positifs ou négatifs

ESPÈCES ANIMALES CONCERNÉES : CARNIVORES DOMESTIQUES, RONGEURS ET LAGOMORPHES

1. ECTOPARASITES MACROSCOPIQUES

- L'examen macroscopique direct de la peau et des poils permet de mettre en évidence un certain nombre d'acariens et d'insectes qui sont recherchés sur l'ensemble du revêtement cutané mais également dans des localisations préférentielles (exemple des puces chez le chien et le chat à rechercher sur et sous le cou et en région périnéale et sous-caudale).
Cette recherche s'effectue à l'œil nu, à l'aide d'une loupe mais également à l'aide d'un peigne métallique à dents serrés (peigne à puces ou à poux).
- La récolte des parasites est suivie de leur identification au microscope.
- Les ectoparasites macroscopiques sont essentiellement les tiques, les puces et les poux.
- Les larves de *Neotrombicula* sp. (points orangés) et les cheyletielles (aspect de «squames» blanchâtres mobiles de 0,5 mm environ) sont plus facilement observés à la loupe.
- Les agents de myiases exotiques ne sont que rarement observés par le praticien (animaux de retour de divers pays ou territoires d'Outre-mer en zone tropicale). La plupart du temps, les myiases observées en France métropolitaine sont des «myiases des plaies» dues à des larves de diptères parasites facultatifs. Les «asticots» sont prélevés délicatement à la pince pour identification.

2. ECTOPARASITES MICROSCOPIQUES

La mise en évidence des ectoparasites microscopiques nécessite diverses méthodes de prélèvement à adapter selon les parasites à rechercher.

2.1. PRÉLÈVEMENTS

LES RACLAGES CUTANÉS

Des squames et autres débris cutanés sont récoltés par raclage, à l'aide d'une lame de scalpel mousse ou d'un bistouri, de la surface de lésions cutanées.

Les poils sont coupés au préalable afin d'améliorer la qualité du prélèvement. Une goutte d'huile minérale ou de lactophénol (produit éclaircissant) est déposée sur la lame. L'avantage principal de l'huile minérale est de faciliter le repérage des parasites qui demeurent vivants (et donc bougent) alors que le lactophénol éclaircit certes la préparation mais tue les parasites.

Les zones à prélever sont la périphérie des lésions, en évitant les zones croûteuses et les zones privilégiées (exemple : dédoublement de l'oreillon, région des coudes pour la recherche des sarcoptes chez le chien).

Un pli de peau est formé et tenu entre le pouce et l'index.

Le raclage est vigoureux, toujours dans le même sens et perpendiculairement au pli de peau, jusqu' à la rosée sanguine (surtout pour la recherche des parasites intra-épidermiques (*Sarcoptes sp.*) et folliculaires (*Demodex sp.*). Chaque raclage est réalisé sur une surface de 2 à 3 centimètres carrés. Le pli de peau est pressé lorsqu'on essaie de trouver les Demodex présents dans les follicules pileux. Plusieurs raclages sont souvent nécessaires.

Cette technique permet d'observer les acariens, agents des gales, les cheyletielles, les demodex, éventuellement les otodectes (extension cutanée), les larves de *Neotrombicula autumnalis* (aoûtats), les poux et leurs lentes.

TECHNIQUE DE LA « CELLOPHANE ADHÉSIVE » OU « SCOTCH TEST »

Le principe est la mise en évidence d'éléments parasitaires présents à la surface de la peau ou à la base du pelage en les collant sur un substrat adhésif.

Les poils sont éventuellement coupés aux ciseaux (ou simplement écartés).

Un fragment de ruban adhésif transparent (type « cristal») est appliqué sur les lésions et collé ensuite sur une lame pour examen microscopique.

L'examen se fait directement au microscope sans coloration.

Cette technique est indiquée pour rechercher les acariens de fourrure (cheyletielles par exemple) et les acariens pilicoles chez les rongeurs et lagomorphes. Elle nécessite une observation rapide car les éléments parasitaires se conservent mal.

TECHNIQUE DU BROSSAGE OU DU PEIGNAGE

Cette technique concerne surtout les animaux de petite taille.

L'animal est placé debout ou couché (décubitus latéral) sur une feuille de papier blanc et est brossé ou peigné énergiquement à rebrousse-poil.

Les squames et les poils entraînés sur le papier par le brossage ou le peignage sont récoltés et examinés à la loupe binoculaire ou au microscope.

Cette technique est indiquée pour rechercher les acariens de fourrure (cheyletielles par exemple), les acariens pilicoles chez les rongeurs et lagomorphes, les puces et les poux.

2.2. EXAMEN DES POILS

Cette technique consiste en une épilation des poils dans les zones lésionnelles en même temps que la peau est pressée en vue de raclages cutanés.

Les poils sont ensuite examinés au microscope dans de l'huile minérale ou du lactophénol.

Les indications sont la recherche de demodex à la racine des poils dans des zones où les raclages sont délicats (espaces interdigités, paupières), d'acariens pilicoles (chez les rongeurs et les lagomorphes) ou encore d'œufs de poux ou de cheyletielles.

2.3. EXAMEN MICROSCOPIQUE

Le produit de raclage abondant est déposé sur une lame pour examen microscopique sur laquelle a été déposée au préalable une goutte de lactophénol ou d'huile minérale. Il convient d'homogénéiser le spécimen obtenu, car les parasites sont souvent emprisonnés dans le matériel kératinisé et les poils.

Une lamelle est déposée sur le spécimen (pression modérée pour étaler le prélèvement).

La lame est examinée à faibles grossissements 4x10 ou 10x10 pour le balayage systématique de la lamelle; 10x10 ou 40x10 pour l'identification précise des éléments parasitaires repérés.

L'éclairage est important, il doit être modéré pour les faibles grossissements et augmenter progressivement pour des grossissements supérieurs.

2.4. MÉTHODES ANNEXES DE MISE EN ÉVIDENCE DES ECTOPARASITES

Les biopsies cutanées ne constituent pas la méthode de choix pour le diagnostic des ectoparasitoses, à l'exception peut-être de certaines formes de démodécie canine ou de straelensiose chez le chien.

3. ENVOI AU LABORATOIRE

La mise en évidence de parasites inhabituels peut conduire le praticien à envoyer au laboratoire des spécimens pour une identification de parasites. Les spécimens doivent être accompagnés d'informations détaillées sur l'origine, le mode de vie, les lésions observées et le lieu des prélèvements.

3.1. ACARIENS MICROSCOPIQUES

L'envoi de produits de raclages abondants et de croûtes se fait dans l'alcool à 70°. Les examens microscopiques entre lame et lamelle peuvent être lutés avec du vernis à ongle. Les lames sont ensuite disposées dans des boîtes prévues à cet effet. L'acheminement doit être rapide.

3.2. TIQUES, PUGES, POUX, DERMANYSESSES

L'envoi des parasites se fait dans un flacon d'alcool à 70°.

Les tiques peuvent être envoyées vivantes dans un flacon bien fermé.

3.3. LARVES DE DIPTÈRES

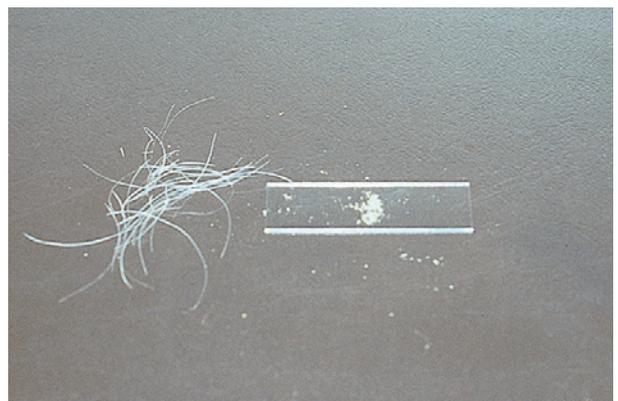
Les larves de diptères sont prélevées délicatement à la pince. Il est utile d'envoyer les larves vivantes dans un pot plastique (type flacon pour coproscopie) dont le couvercle est perforé (échanges gazeux) et contenant un coton légèrement humecté qui permettra d'éviter la dessiccation des larves.

A partir de ces larves, le laboratoire pourra réaliser les préparations nécessaires ou bien tenter d'obtenir des mouches adultes souvent plus aisées à identifier. D'autres larves peuvent être envoyées dans l'alcool à 70°.

POUR EN SAVOIR PLUS :

www.esccap.fr

www.alizarine.vetagro-sup.fr



LÉGENDES

- 1 : Raclage cutané : un pli de peau est formé entre le pouce et l'index, le raclage se fait dans le même sens, perpendiculairement au pli de peau
- 2 : Test à la cellophane adhésive : application d'un ruban adhésif appuyé sur la peau
- 3 : Brossage : les débris cutanés sont récoltés sur une grande feuille de papier blanc après un brossage minutieux
- 4 : Brossage : les débris cutanés récoltés par brossage sont montés entre lame et lamelle dans de l'huile minérale ou du lactophénol

PHOTOS - E Guaguère

B. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DES DERMATOPHYTIES

Eric Guaguère



OBJECTIF - INDICATIONS - MÉTHODES

Les dermatophyties tiennent une place de choix en dermatologie des carnivores, des équidés, des ruminants et des petits mammifères de compagnie par leur fréquence et leur gravité potentielle.

Devant l'importance de certaines d'entre elles en tant que zoonose, le vétérinaire doit connaître les diverses possibilités du diagnostic de laboratoire.

Le diagnostic expérimental de dermatophytie repose sur :

- ◆ l'examen à la lumière de Wood,
- ◆ l'examen direct de poils et de squames,
- ◆ la mise en culture,
- ◆ la biopsie cutanée.

ESPÈCES ANIMALES CONCERNÉES : TOUTES

LE DIAGNOSTIC D'UNE DERMATOSE PASSE PAR CINQ ÉTAPES SUCCESSIVES PERMETTANT LE DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE :

1. L'EXAMEN A LA LUMIERE DE WOOD

Très utile, la lampe à ultraviolets de WOOD (radiations de ≈ 350 nm) ne permet que la mise en évidence de *Microsporum canis*. Cet examen montre une fluorescence verdâtre, caractéristique de l'excitation de certains pigments (ptéridine) contenus dans les spores de certains dermatophytes. Les poils fluorescents sont recueillis pour les examens directs et les cultures.

Cet examen, long et minutieux, est effectué dans l'obscurité complète, après un chauffage préalable de la lampe au moins pendant 5 minutes. De plus, il faut se méfier des fausses fluorescences faisant suite à l'application de certains topiques ou de la coloration bleuâtre de squames ou jaunâtre d'exsudats.

2. L'EXAMEN DIRECT DE POILS ET DE SQUAMES

L'examen direct de poils et de squames vise à mettre en évidence les arthrospores et à caractériser le type d'envahissement pileux, le plus souvent endo-ectothrix.

2.1. TECHNIQUE

Les poils sont prélevés à la pince, à la périphérie des lésions (éventuellement sous la lumière de Wood pour les teignes à *Microsporum canis*). Il est cependant nettement plus efficace de racler à la surface du tégument à l'aide d'un scalpel moussé enduit de chloral-lactophénol.

Poils et squames sont montés entre lame et lamelle dans du lactophénol et observés au microscope (G X 100 ou 300, fortement diaphragmé). Parfois, il est nécessaire de laisser éclaircir le prélèvement dans le lactophénol pendant 20 à 30 minutes.

2.2. RÉSULTATS

L'observation des spores réfringentes permet d'aboutir au diagnostic de dermatophytie, leur absence à l'examen direct ne l'excluant pas néanmoins. Le type de l'infestation pileaire endo-ectothrix est commune à de nombreuses espèces de dermatophytes. L'identification spécifique nécessite toujours la mise en culture.

3. LA CULTURE FONGIQUE

La culture fongique est indiquée :

- lors d'examen direct négatif.
- lors de recherche d'une identification spécifique.
- lors de teigne occulte du chat (technique de la moquette).
- en présence de gaine de spores entourant le poil et de filaments mycéliens intracapillaires.

3.1. MILIEUX DE CULTURE

Gélose Sabouraud + Chloramphénicol 0,5% + Actidione 0,5 %

L'actidione (cycloheximide) inhibe le développement d'une partie des champignons saprophytes. Lors de suspicion de teigne trichophytique, il est bon pour certains dermatophytes d'utiliser un milieu enrichi en vitamines (0,5 % d'extrait de levures).

Dermatophyte - Test Médium (D.T.M.)

D'un emploi très commode, ce milieu est un Milieu de Sabouraud, additionné de Rouge phénol, qui vire précocement en 3 à 10 jours, ce qui permet une suspicion diagnostique rapide. Le principe est le virage précoce qui accompagne la pousse du dermatophyte qui produit des métabolites alcalins, entraînant le virage du milieu en rouge. Il existe par ailleurs, des virages tardifs au bout de 2-4 semaines en rapport avec la pousse de champignons saprophytes (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*) ou de bactéries.

Le Dermatophyte-Test-Médium nécessite cependant l'examen microscopique et de la culture pour une vérification spécifique.

EN PRATIQUE

Il existe cependant de nombreuses limites parmi lesquelles la vitesse de virage dépend de la croissance, donc de la température comme de la culture ; Il existe d'assez nombreux champignons faisant virer rapidement ces milieux (7 – 10 jours) ; lorsque l'on utilise de petits DTM, les dermatophytes peuvent être masqués par la croissance rapide de contaminants rendant le virage non interprétable.

De ce fait, tant la sensibilité que la spécificité dépendent grandement des conditions d'utilisation, le virage en lui-même n'ayant rien de spécifique aux dermatophytes. Ces dispositifs rentrent donc davantage dans le cadre des examens d'orientation.

Milieux divers

Il existe par ailleurs d'autres milieux de culture, notamment des milieux mixtes (Derm Duet N.D.) comprenant d'une part, un milieu de Sabouraud et d'autre part, un milieu D.T.M. Ce milieu double permet un virage précoce en 3-10 jours (suspicion diagnostique de dermatophytie) et une pousse plus lente en 3 semaines avec une fructification meilleure du dermatophyte.

3.2. ENSEMENCEMENT

PRÉLÈVEMENT

La lésion à prélever est désinfectée à l'alcool à 70° (éponge imbibée pendant 30 secondes), l'alcool élimine la majorité des contaminants sans nuire aux dermatophytes.

Le prélèvement est effectué depuis la périphérie vers le centre de la lésion (poils cassés, squames...).

Lors de teigne occulte chez le chat, l'animal est brossé avec un carré de moquette stérile pour recueillir les spores.

Le carré de moquette est ensuite appliqué sur un milieu de culture, coulé de préférence en boîte de Pétri.

Pour l'envoi à un laboratoire, il convient d'adresser les poils et squames dans une pochette de cellophane et le carré de moquette, enveloppé dans un papier d'aluminium. D'une manière générale, le mieux est d'appliquer les recommandations proposées par le laboratoire.

TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

Diverses techniques d'ensemencement sont possibles, le plus important est de bien maîtriser sa technique et de l'effectuer stérilement :

- ◆ Technique à l'anse de platine, stérilisée dans la flamme du bec Bunsen, après et avant chaque usage.
- ◆ Technique à la pince mousse, stérilisée à l'autoclave en même temps que la trousse à prélèvement (ciseaux à iridectomie, lames de bistouri...).
- ◆ Les différents spécimens (poils, squames) sont implantés en divers endroits du milieu, notamment à la périphérie. La pousse des dermatophytes se faisant en milieu aérobie, les bouchons des tubes ne devront pas être totalement fermés.

3.3. INCUBATION

Le délai de croissance pour identification des colonies est extrêmement variable (3 à 30 jours selon l'espèce et surtout la température). C'est pourquoi, seule une incubation contrôlée à 27°C permet d'obtenir une réponse dans un délai satisfaisant de moins de deux semaines.

En laboratoire, ces délais peuvent être réduits à 2-9 jours seulement. Les cultures seront examinées quotidiennement et conservées pendant 1 mois.

3.4. IDENTIFICATION DU DERMATOPHYTE

L'identification du dermatophyte passe par les examens macroscopique et microscopique de la culture. L'identification est importante car elle renseigne parfois sur l'origine du dermatophyte, les risques de contagion aux animaux et à l'homme, la difficulté d'un traitement curatif efficace.

EXAMEN MACROSCOPIQUE

Chaque dermatophyte possède un aspect macroscopique typique, permettant son identification. Bien que l'aspect puisse varier d'une souche à l'autre, il existe des caractères constants permettant la détermination de l'espèce. Parmi ces critères importants, citons la forme, le relief, l'aspect, la couleur et la pigmentation au recto.

Si ces critères sont appréciables sur le milieu classique de Sabouraud, ils ne sont pas visibles sur les milieux D.T.M. sur lesquels tous les dermatophytes ont sensiblement le même aspect (culture étoilée blanchâtre). Cependant, la morphologie est très variable et peut être modifiée par de nombreux facteurs.

Sur le Milieu de Sabouraud, les aspects macroscopiques des principaux dermatophytes sont :

- ◆ **MICROSPORUM CANIS**
Couleur: recto: jaune orangé (chamois); verso: jaune orange, mais moins nette.
Aspect: duveteux. Relief: plan.

- ◆ **MICROSPORUM GYPSEUM**
Couleur : recto : beige très clair (café au lait clair) ; verso : beige
Aspect : poudreux, granuleux. Relief : plan.

- ◆ **MICROSPORUM PERSICOLOR**
Couleur : recto : pêche, parfois rosâtre, devenant chamois en vieillissant, lie de vin (sur milieu de conservation) ; verso jaune à jaune brun
Aspect : poudreux. Relief : plan

- ◆ **TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES**
Couleur : recto : crème (très rarement plus foncé), verso : crème à brun foncé
Aspect : poudreux à granuleux plus que duveteux. Relief : plan.

EXAMEN MICROSCOPIQUE

L'identification du dermatophyte nécessite l'examen microscopique de la culture. Pour ce, un fragment de culture est prélevé au centre de la colonie (région la plus riche en organes de fructifications), par la méthode du drapeau de Roth (bande de Scotch montée sur une pince hémostatique appliquée au centre de la lésion). Ce fragment de culture est observé au microscope (G x 100 et 400) entre lame et lamelle, dans du lactophénol, du bleu Coton ou du bleu lactique.

En culture, la morphologie des dermatophytes est beaucoup plus variée qu'in vivo et permet de mettre en évidence :

- des filaments mycéliens
- des organes de fructification : macroconidies et microconidies
- des organes d'ornementation : vrilles

L'identification spécifique porte essentiellement sur les macroconidies et les éventuels organes d'ornementation.

Il peut arriver dès le premier isolement, mais le plus souvent après repiquage, que la culture subisse un pléomorphisme c'est-à-dire, une transformation irréversible de la culture en filaments stériles, sans organe de fructification et d'ornementation. Lors de pléomorphisme, l'identification spécifique est donc impossible

4. LES BIOPSIES CUTANÉES

La biopsie cutanée peut constituer un examen complémentaire utile pour orienter un diagnostic différentiel de dermatophytie. Cette biopsie est réalisée à l'aide d'un trépan à biopsie (type biopsy punch de diamètre 6 mm) au centre de la lésion.

Si la coloration à l'Hémalum Eosine met souvent en évidence les éléments fongiques (coloration violette), l'Acide Périodique de Schiff (PAS) colore plus spécifiquement les spores et les filaments en rose ou rouge.

Lors d'infestation par *Microsporum persicolor*, l'image histopathologique est différente, puisqu'aucun envahissement pileux n'a été décrit pour ce dermatophyte. Les filaments mycéliens sont présents dans la kératine qui comble le follicule alopecique.

Par ailleurs, la biopsie cutanée montre lors dermatophytie, le plus souvent une dermatite périvasculaire hyperplasique ou spongiotique, sauf lors de kérions, dans lesquels seront observées des lésions de folliculite, de périfolliculite et de furonculose.

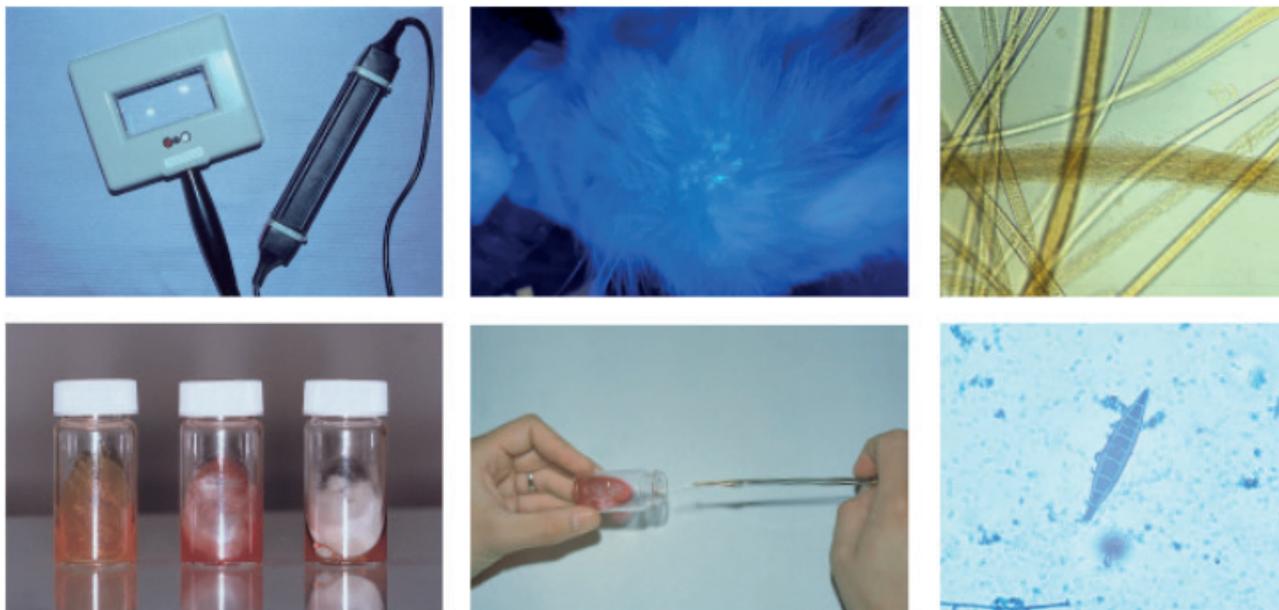
L'histopathologie trouve principalement son intérêt dans le diagnostic des mycétomes dermatophytiques.

POUR EN SAVOIR PLUS :

www.esccap.fr

www.alizarine.vetagro-sup.fr

ILLUSTRATIONS - Diagnostic des dermatophyties



LÉGENDES

1 : Lampe de Wood avec loupe

2 : Examen à la lampe de Wood : fluorescence verdâtre de lésions de dermatophyties à *Microsporum canis*

3 : Examen de poils teigneux dans du lactophénol : noter l'envahissement ectothrix d'un poil, comparativement avec des poils sains (x250)

4 : Cultures fongiques sur Dermatophyte-Test-Medium (DTM) : la croissance de colonies fongiques est révélée par le virage du jaune au rouge du milieu (à gauche : milieu resté stérile, au centre culture de 10 jours de *Microsporum canis*, à droite : contaminants fongiques)

5 : Méthode du drapeau de Roth : récupération d'un fragment de culture au centre de la colonie à l'aide d'un morceau de ruban adhésif

6 : Macroconidie de *Microsporum canis* en forme de fuseau à paroi épaisse, échinulée et constituée de nombreuses logettes (coloration au bleu lactique, x100)

PHOTOS E.Guaguère

Eric Guaguère



OBJECTIF - INDICATIONS - MÉTHODES

- ◆ **Les levuroses sont des maladies systémiques ou des affections cutanées ou cutanéomuqueuses dont l'agent responsable est un champignon unicellulaire (levure).**

Sur la peau, les levures sont responsables de lésions variées, érythémateuses, squamo-croûteuses, parfois nodulaires, ulcérées. Elles accompagnent volontiers des dermatites allergiques anciennes chez le chien et le chat et des états d'immunodéficits (virus immunodéficients chez le chat).

Certaines levuroses (cryptococcose, sporothricose) sont des anthroponoses graves.

En Europe, chez les carnivores, les agents responsables des levuroses cutanées sont principalement *Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. Sont identifiées beaucoup plus rarement *Sporothrix schenckii*, *Rhodotorula* sp. *Histoplasma capsulatum*.

- ◆ **Seules, les deux premières espèces font l'objet de cette présentation.**

ESPÈCES ANIMALES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT

1. MALASSEZIA PACHYDERMATIS

LOCALISATION

Malassezia pachydermatis est une levure lipophile fréquemment isolée du conduit auditif externe chez les carnivores et de la peau.

PRÉLÈVEMENTS

Lors d'otite externe érythémato-cérumineuse, le cérumen est prélevé à l'aide d'un écouvillon et ensuite étalé sur une lame. Lors de lésions cutanées, un test à la cellophane adhésive (Scotch test) permet de recueillir les levures situées au sein de la couche cornée.

Des biopsies cutanées peuvent être éventuellement effectuées mais ne constituent pas l'examen complémentaire de choix.

EXAMEN DIRECT

Les lames ou les « scotch » sont colorés par une méthode rapide (Diff-Quick, RAL). L'observation microscopique se fait à un grossissement de 40x10. Il est important d'apprécier le nombre de levures par champ microscopique. Un nombre de 3 à 5 levures par champ est considéré comme pathologique. Dans tous les cas, il convient de corréler le nombre de levures observées au contexte clinique.

Cette observation microscopique montre la présence de cellules ovales ou allongées de 3 à 5 µm de diamètre, au bourgeonnement typique en « bouteille de Perrier » (attache épaisse de la levure-fille).

CULTURE

La culture fongique n'a aucun intérêt en pratique quotidienne.

BIOPSIES CUTANÉES

L'examen histopathologique de biopsies cutanée (coloration au PAS) peut observer la colonisation des couches superficielles de l'épiderme par *Malassezia pachydermatis*. Mais cette technique d'identification a beaucoup de faux négatifs car les levures se localisant superficiellement se détachent souvent de la biopsie. Les faux négatifs sont évalués à 30% en moyenne.

2. CANDIDA ALBICANS

LOCALISATION

La présence sur la peau de *Candida albicans* est toujours pathologique. Chez le chien, son développement semble être favorisé par certains états pathologiques (immunodépression associée à une parvovirose, diabète sucré...).

Candida albicans colonise également les plis cutanés, les espaces interdigités, les lèvres, l'anus, la vulve, le conduit auditif et la cavité buccale.

PRÉLÈVEMENTS

Les principaux prélèvements sont le raclage de l'enduit blanchâtre superficiel, l'écouvillonnage stérile (culture), un calque par apposition et dans de rares cas, des biopsies cutanées.

EXAMEN DIRECT

Les lames sont colorées par une méthode rapide (Diff-Quick, RAL).

L'observation microscopique se fait à un grossissement de 40x10, puis à 100x10. Elle montre la présence de levures bourgeonnantes, souvent associées à un pseudo-mycélium.

CULTURE

La culture est effectuée à partir d'un écouvillon et permet d'identifier le genre *Candida*.

La technique d'identification classique de *Candida albicans* se fait par le test de filamentation en sérum (3 heures à 37°C présence de tubes germinatifs uniquement dans l'espèce *Candida albicans*).

Cette identification se fait rarement dans le cadre du laboratoire du praticien.

BIOPSIES CUTANÉES

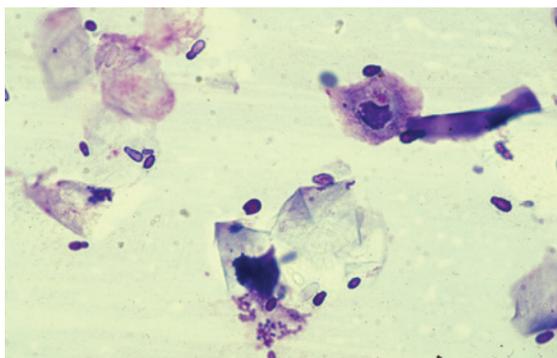
L'examen histopathologique de biopsies cutanées (PAS) permet de révéler la présence de la forme levure mais surtout d'un pseudomycélium de *Candida albicans*.

POUR EN SAVOIR PLUS :

www.esccap.fr

www.alizarine.vetagro-sup.fr

ILLUSTRATIONS - Diagnostic des levures



LÉGENDES

1 : Nombreuses levures, *Malassezia pachydermatis* (libres et au sein de cornéocytes), associées à quelques cocci sur un calque cutané (scotch test) d'une lésion cutanée érythémateuse chez un West Highland white terrier atteint de dermatite atopique surinfectée (coloration RAL, x1000)

PHOTOS - E Guaguère

Jacques Devos



OBJECTIF - UTILISATIONS – INDICATIONS PRINCIPALES

Chez les bovins et les équins, les affections cutanées les plus fréquentes sont parasitaires : teigne, phtirioses et gales.

La teigne, due à la multiplication au niveau de la peau de champignons appartenant aux genres *Microsporium* et *Trichophyton*, est aisément diagnostiquée cliniquement dans la majorité des cas. Cette fiche se concentre essentiellement sur le diagnostic de laboratoire des phtirioses et gales.

L'identification de l'agent incriminé permet d'adapter le traitement mais également d'expliquer certains échecs de traitements.

1. PHASE PRÉ-ANALYTIQUE : PRÉLÈVEMENT

Se munir d'un peigne à puces, d'un couteau émoussé ou d'une cuillère à soupe dont le bord a été légèrement affuté, de pots à prélèvement de 140 ml.

Pour la recherche de poux, à l'aide du peigne à puces, gratter en périphérie des zones de léchage ou des zones squameuses. Récouter les poils et les squames dans un pot à prélèvement.

Pour la recherche d'acariens de la gale, gratter les croûtes en périphérie des lésions jusqu'à la rosée sanguine. Récouter ces croûtes dans le pot à prélèvement.

Pour la confirmation de la teigne, prélever des poils avec leur bulbe en périphérie de lésion. Identifier les pots.

2. MATÉRIEL D'ANALYSE

Le laboratoire doit disposer d'une loupe binoculaire ou stéréomicroscope, d'un microscope, de boîtes de Pétri et de lames porte-objet. Les seuls réactifs nécessaires sont la potasse caustique (KOH), disponible en pharmacie, et le lactophénol d'Amann, disponible en centrale d'achats.

Prévoir des fiches avec les clés d'identification.

3. MÉTHODE ANALYTIQUE : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT / RÉALISATION DE LA TECHNIQUE

PHTIRIOSES :

Les poils sont examinés à la loupe au faible grossissement. Les poux adultes sont facilement repérés vu leur taille. S'ils sont peu nombreux ou immatures, leurs mouvements attirent l'œil, et leur présence est confirmée en zoomant.

Examiner la forme générale, la tête et les pattes pour identifier l'espèce. Dans certains cas, seule la mise en évidence de lentes collées sur les poils confirme la présence de poux sans pouvoir toutefois identifier l'espèce.

GALES :

Les croûtes sont également examinées au faible grossissement, en les étalant à l'aide de pincettes à disséquer. Les acariens vivants sont ainsi repérés.

Si cet examen direct est négatif, préparer une solution de potasse à 10% (en veillant bien à mettre les pastilles de KOH dans l'eau et non l'inverse : la réaction est exothermique !), verser la solution sur le spécimen, placer à l'étuve (environ 30°) pendant 20 minutes. Après digestion des croûtes, éliminer le surnageant, centrifuger brièvement, récupérer le culot et le placer sur une lame porte-objet pour examen au microscope (objectif 4).

TEIGNE :

Les bulbes des poils sont éclaircis avec une goutte de lactophénol pour mettre en évidence les spores de dermatophytes.

Les poils peuvent être envoyés au laboratoire pour mise en culture (technique plus sensible et plus spécifique mais avec un délai de réponse de 3 semaines).

4. CONTRÔLE DE QUALITÉ - FACTEURS DE VARIATION - PRÉCAUTION PRÉALABLE D'UTILISATION (VALIDATION/REJET)

Les spécimens peuvent être pauvres en parasites, particulièrement en début d'évolution de la maladie. Ne pas hésiter à multiplier les prélèvements (plusieurs animaux, plusieurs localisations, ...).

La présence d'un seul parasite, ou d'un œuf ou d'une larve, suffit à confirmer le diagnostic.

5. POST ANALYTIQUE : RESTITUTION DES RÉSULTATS - VALIDATION ET INTERPRÉTATION : DIFFICULTÉS ET BIAIS – SPÉCIFICITÉ/SENSIBILITÉ

Sur le compte-rendu d'analyse, indiquer l'espèce lorsqu'elle était identifiable. Prendre des photos : aspect pédagogique pour le client et utile en cas de référé ou déclaration en pharmacovigilance.

Avec un minimum d'entraînement, l'identification des espèces n'est pas compliquée. Par contre, les spécimens peuvent être pauvres en parasites.

6. DANGERS D'UTILISATION DE CERTAINS RÉACTIFS, ÉLIMINATION DES DÉCHETS

La potasse est très caustique. Manipuler les pastilles à l'aide d'une pince. Ne jamais mettre l'eau sur les pastilles : réaction très fortement exothermique pouvant causer des brûlures graves.

Le lactophénol est toxique : éviter tout contact avec la peau ou les yeux, ingestion ou inhalation.



LÉGENDES

- 1 : Examen d'échantillons de poils avec des poux au stéréomicroscope et visualisation écran
- 2 : Chorioptes bovis après éclaircissement au lactophéno
- 3 : Nombreux poux Haematopinus eurysternus (bovins) visualisés au stéréomicroscope

PHOTOS J.Devos

POUR EN SAVOIR PLUS :

Bulletin des GTV 2007 - Hors Série «Parasitisme des bovins»

Phtirioses en élevage bovin laitier : enquête épidémiologique dans les Monts du Lyonnais, Bulletin des GTV 2018 n° 91 : page 71 à 78 : fiches d'identification en fin d'article

Vademecum de parasitologie clinique des bovins. Editions Med'Com 2012.

LES EXAMENS DE LABORATOIRE EN DERMATOLOGIE

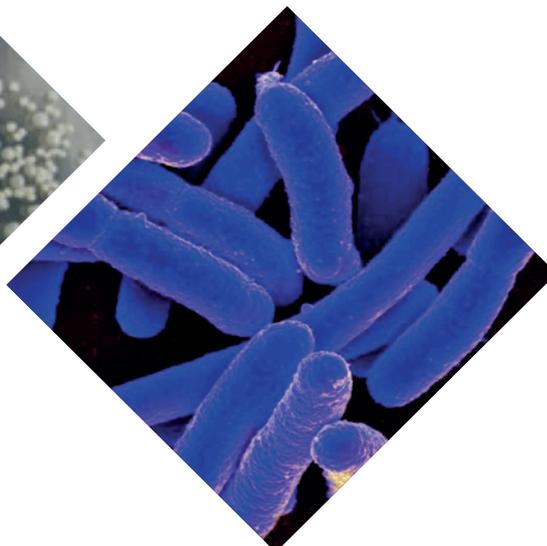
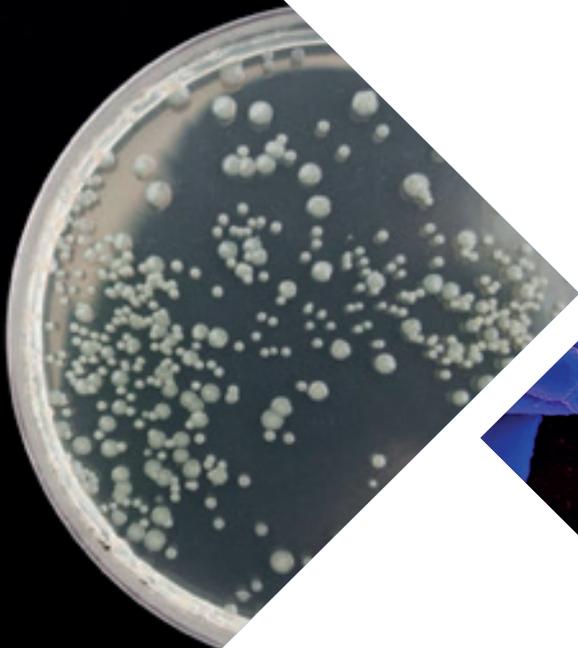
<p>Objectifs :</p> <p>* Examen direct ou microscopique d'un prélèvement cutané ou d'une culture obtenue à partir de celui-ci.</p>	<p>Il permet d'identifier :</p> <p>* les œufs / larves / adultes d'ectoparasites</p> <p>* les dermatophytes</p> <p>* les levures</p>
<p>Indication : examen important</p> <p>* lors des affections dermatologiques individuelles ou collectives (en élevage)</p> <p>* en cas de risque de zoonose (teigne)</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Indispensable</p> <p><input type="checkbox"/> Utile</p> <p><input type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic</p>
<p>Avantages :</p> <p>* Ensemble de techniques manuelles assez simples</p>	<p><input type="checkbox"/> Facile</p> <p><input type="checkbox"/> Rapide</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Disponible</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Faible coût</p>
<p>Inconvénients /Contraintes :</p> <p>* Temps minimal de réalisation rendant l'examen :</p>	<p><input type="checkbox"/> Difficile</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Long (lecture de lames – cultures)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Contraignant</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Coût moyen (en temps passé ...)</p>
<p>Apport au diagnostic : Indispensable</p>	<p><input type="checkbox"/> Examen d'orientation</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation</p> <p>* Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +)</p> <p>* Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)</p>
<p>Contrôle qualité : Oui</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique)</p> <p><input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)</p>
<p>Niveau de technicité requis : Bon</p>	<p>* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)</p>
<p>Coûts des examens :</p> <p>* Modéré</p> <p>* Plus élevé avec des milieux de culture prêts à l'emploi</p>	<p>Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé</p> <p>Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input checked="" type="checkbox"/> Elevé</p> <p>Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé</p>
<p>Elimination des déchets avec les DASRI :</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Oui - lames, OPCT, milieux de culture, échantillons,</p> <p><input type="checkbox"/> Non</p>
<p>Hygiène et sécurité :</p> <p>* En particulier pour les dermatophytes : risque de zoonose</p>	<p>* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)</p>

3.7

INFECTIOLOGIE

Réaliser en pratique des examens de qualité

- 3.7** Introduction au dossier infectiologie
- A.** Tests Rapides à Orientation Diagnostique (TROD) - **C. Médaille**
 - B.** Externaliser en confiance ses analyses dans un laboratoire spécialisé - **S. Vélut**
 - C.** Analyse bactériologique en laboratoire : l'existant et le futur - **G. Lequeux**
 - D.** La place de l'ESV dans l'examen bactériologique - **N. Keck- V. Bachy**
 - E.** Analyse bactériologique du lait dans l'espèce bovine - **O. Salat**
 - F.** Antibiogrammes appliqués aux germes isolés de Mammmites en ESV - **O. Salat**
 - G.** Les analyses sérologiques - **V. Bachy**
 - H.** Les analyses PCR - **C. Boucraut**



INTRODUCTION AU DOSSIER INFECTIOLOGIE

L'ensemble de l'ouvrage doit contribuer à la prise de conscience des critères de qualité à respecter dans l'étendue du domaine des analyses de laboratoire, pour le pré-analytique, l'analytique et l'utilisation des résultats (post-analytique).

Compte tenu de son importance et de sa complexité nous avons consacré un dossier spécifique à l'infectiologie virale, bactérienne ou parasitaire.

L'infectiologie et en particulier la bactériologie ont fait l'objet de débats importants ; c'est un domaine dans lequel le partenariat avec les laboratoires de biologie vétérinaire est indispensable et doit être précisé.

Sont exposées en contrepoint les limites des ESV (pour insuffisance de moyens et de capacité technique) ne leur permettant souvent pas de remplir les conditions nécessaires à l'obtention de résultats suffisamment fiables. Il existe également un risque sanitaire de biosécurité lié à la diffusion des germes lors de leur mise en culture.

Les tests rapides sont une aide au clinicien en infectiologie, au chevet de l'animal ; si la proposition commerciale est conséquente, la validation technique et scientifique des tests reste en général très insuffisante (Groupe de travail Tests rapides en infectiologie du RFSA).

L'offre des laboratoires de biologie vétérinaire en biologie moléculaire (analyses PCR) et en sérologie est d'un apport indispensable au clinicien.

En bactériologie, la complexité technique des méthodes conventionnelles, les limites des méthodes analytiques alternatives proposées aux ESV pour l'identification des germes et la connaissance de leur sensibilité aux antibiotiques, le risque de contamination accidentelle de l'environnement, en font, sauf exception, un domaine réservé aux laboratoires de biologie vétérinaire.

La norme réglementaire NF U47-107 qui décrit les procédures de la réalisation d'un antibiogramme par la méthode des disques pour l'utilisation des antibiotiques critiques, renforce cette position.

HUIT FICHES DE L'OUVRAGE SONT CONSACRÉES À L'INFECTIOLOGIE ;

TESTS RAPIDES

- Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) **Christine Médaille**

BACTÉRIOLOGIE

- Externaliser en confiance ses analyses dans un laboratoire spécialisé **Serge Velu**
- Analyse bactériologique : l'existant et le futur **Guillaume Lequeux**
- La place de l'ESV dans l'examen bactériologique **Nicolas Keck – Véronique Bachy**
- Analyse bactériologique du lait dans l'espèce bovine **Olivier Salat**
- Antibiogrammes appliqués aux germes isolés de mammites en ESV **Olivier Salat**

SÉROLOGIE

- Les analyses sérologiques **Véronique Bachy**

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

- Les analyses PCR **Corine Boucraut Baralon**

D'autres fiches de ce guide peuvent aussi traiter d'infectiologie : hématologie, coprologie, dermatologie pour la recherche et l'identification des parasites et germes du sang, du tube digestif, de la peau...

OBJECTIF - UTILISATIONS - INDICATIONS PRINCIPALES

Présentation générale des Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) dont le développement est considérable en infectiologie mais aussi pour les autres disciplines chez l'homme et chez l'animal.

Face aux propositions commerciales, une approche critique et raisonnée du choix et de l'utilisation de ces tests au sein de l'établissement de soins vétérinaires (ESV) est indispensable.

- Cette fiche apporte les bases de cette analyse critique.
- Les tests rapides trouvent leur place dans l'ESV même s'ils ne remplacent pas l'analyse de laboratoire de référence.
- Elle décrit les conditions de bonne utilisation :
 - ◇ lecture très attentive de la notice afin d'y trouver les critères d'utilisation indispensables,
 - ◇ respect strict de la conservation et de l'utilisation du produit,
 - ◇ parfaite connaissance de celui-ci,
 - ◇ prise en compte que la responsabilité de l'ESV dans l'exploitation de ces tests est engagée,
 - ◇ recherche du label CE de ces tests comme première approche de qualité (argument positif fiable quant à la qualité de fabrication),
 - ◇ utilisation au chevet du malade, dans une démarche de diagnostic clinique....
Donc une exploitation critique des résultats.

Le nombre de tests rapides utilisés dans un ESV restant relativement limité mais d'une utilisation assez fréquente, la connaissance approfondie de ces tests par le vétérinaire est possible et même indispensable.

1. TERMINOLOGIE

- tests médicaux car utilisés pour le dépistage, le diagnostic ou la prescription en santé animale ou humaine
- tests manuels car réalisables sans ou avec peu de matériel
- tests qualitatifs ou semi-quantitatifs *ie* résultat sous la forme « présence/absence », plus ou moins, avec une graduation, ou résultat chiffré
- tests rapides car obtenus en moins de 10 à 30 minutes (sauf exceptions)
- tests en principe conservables à température ambiante (préférable) au réfrigérateur ou au congélateur
- tests ne requérant pas de réactifs ou matériels autres que ceux commercialisés avec le test
- tests dits bio-technologiques car reposant sur des principes analytiques complexes mais miniaturisés

2. INTÉRÊTS D'UTILISATION EN SANTÉ PUBLIQUE ET EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

- tests d'urgence au chevet du malade face à une forte probabilité diagnostique individuelle
- tests de dépistage en zones où la maladie est présente avec une forte prévalence
- en médecine tropicale humaine, l'utilisation des tests rapides en bactériologie permet en zones peu médicalisées (sans laboratoires) la surveillance, le dépistage et parfois la confirmation de la présence ou de l'absence de maladies contagieuses comme le choléra, la peste ou la shigellose

- la lutte contre l'antibiorésistance passe par la distinction entre maladie bactérienne ou virale, diminuant ainsi le recours abusif à l'antibiothérapie
- diminution du temps de réponse du laboratoire et mise en œuvre précoce d'un traitement ciblé ou d'une vaccination et de mesures de nettoyage-désinfection
- responsabilisation et prise en charge par le patient ou le détenteur des maladies chroniques (auto-tests diabète)

3. SYNONYMIE ET DIFFÉRENCE EN BIOLOGIE MÉDICALE DES TR OU TDR (TEST RAPIDE)

- I. **TROD OU TORD** : test rapide d'orientation diagnostique appelé aussi « Doctor test » : tests utilisables en officine et médecine pour dépistage OU orientation diagnostique
- II. **AUTO-TESTS** : tests utilisables par le patient ou l'utilisateur
- III. **POCT** : point of care testing : conçus pour être effectués par du personnel non médical formé dans des structures d'urgence

4. PRINCIPES ANALYTIQUES POSSIBLES

- colorimétrie (bandelettes urinaires, bandelettes mesurant les corps cétoniques dans le lait ...)
- réaction antigène/anticorps : recherche d'Ag ou recherche d'Ac
 - ◇ immunofiltration ou agglutination (premiers tests)
- immunochromatographie sur membrane (ICT) (grippe) ou bandelette (tests diarrhée néonatale bovine) autres exemples : recherche de K88 (F4), K99 (F5), F41, F18 sur fèces, Recherche de *Clostridium perfringens* et toxine; recherche de *Clostridium difficile*
 - ◇ agglutination de particules de latex sensibilisées
 - ◇ immuno-enzymatique (ELISA en puits)
- biologie moléculaire
 - ◇ technologie PCR : extraction ADN puis amplification plus ou moins miniaturisée (ex : PCR automatisée Xpert pour la tuberculose)
 - ◇ bio-puces ; puces à ADN (pathologie cancéreuse, pathogènes environnementaux)
 - ◇ kit LAMP (amplification isotherme) (Loop mediated isothermal amplification) (déttection d'insectes parasites, paludisme) (tests en infectiologie équine (LABEO-ENALEES, MASTISENSOR))
 - ◇ kit RPA (Recombinase Polymerase Amplification) (peste petits ruminants)
 - ◇ test sur buvard recherche ARN (VIH et hépatites virales)

5. CHAMPS D'APPLICATION : EN INFECTIOLOGIE ET EN MALADIE MÉTABOLIQUE

- agents infectieux (maladies virales/bactériennes/parasitaires)
- choix ou non choix d'un traitement (sensibilité aux anti-infectieux)
- suivi des maladies chroniques (bandelette glycémie, urée)
- recherche d'atteintes sub-cliniques (corps cétoniques)
- dépistage précoce de certaines anomalies (dosage acides gras non estérifiés)

6. MATRICES

- spécimens biologiques sans traitement préalable (urines, sang total, sang capillaire, selles, salive, lait)
- échantillons traités (sérum, plasma)
- matrice permettant plusieurs analyses en même temps : tests monoplex, biplex ou multiplex

7. LÉGISLATION ET RESPONSABILITÉS

EN MÉDECINE HUMAINE :

- les TROD : arrêté du 1er août 2016 (liste exhaustive et limitative des TROD et des utilisateurs autorisés – « responsabilité du professionnel de santé autorisé engagée ;... éléments d'orientation diagnostique ne pouvant se substituer au diagnostic réalisé au moyen d'un examen de biologie médicale.. ; marquage C.E et assurance qualité..»)
- les autotests : recueil d'un signal biologique ou d'un test pour le seul usage de l'utilisateur (ex des lecteurs de glycémie, tests de grossesse, bandelettes urinaires, cholestérol, carence en fer...) ; certains sont marqués C.E et sont vendus en pharmacie et d'autres non marqués C.E sur internet. Pas de texte à propos de la responsabilité.
- Règlement européen 2017/746 relatif au DMDIV* (*cf lexique*)

EN SANTÉ ANIMALE :

- pas de réglementation de l'Union Européenne
- pas de réglementation française
- Groupe de Travail RFSA*

ATTENTION !

Les tests Multiplex sont rarement recommandés par l'OMS comme seule méthode de diagnostic ; la confrontation avec la clinique et une confirmation (si elle est disponible) par un test ciblé, sont indispensables.

PCR MULTIPLEX ET MÉDECINE HUMAINE (EXTRAIT DE LA REVUE MÉDICALE SUISSE)

Tests moléculaires Multiplex : les tests Multiplex sont des tests diagnostiques moléculaires rapides suivant une méthode d'amplification isotherme, permettant de détecter simultanément plusieurs agents (souvent infectieux). Il existe une offre de ce type de tests en médecine vétérinaire notamment équine et bovine.

Mais ces avantages ont aussi leurs inconvénients :

- tous les microorganismes détectés par la PCR Multiplex ne correspondent pas à des infections. Ainsi, plusieurs bactéries sont trouvées dans près d'un tiers des prélèvements effectués lors de pneumonie et dans 80 % des cas où un virus est détecté.
- De même, plusieurs agents potentiellement pathogènes peuvent être détectés dans 16 % des selles prélevées lors de diarrhées, notamment des *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (EHEC) dont le nombre de déclarations auprès des organismes de Santé publique augmente en parallèle. Cette augmentation est attribuée à un biais de détection lié à l'arrivée de la PCR Multiplex qui détecte des portages asymptomatiques plutôt qu'à une réelle variation épidémiologique.
- Le Multiplex ne recherche que les pathogènes prédéfinis par les amorces incluses, au risque de ne se satisfaire que de ce panel et de réduire le diagnostic différentiel.
- Le prix est à considérer.

Des tests vétérinaires sont déjà sur le marché (Infections respiratoires bovines, infections abortives...) et d'autres sont en développement : le vétérinaire devra s'approprier ce nouvel outil en considérant ses avantages mais aussi ses limites pour une complète et pertinente prise en charge de ses patients.

8. LIMITES ET PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- Qualités intrinsèques des tests : leur sensibilité et leur spécificité sont variables suivant les tests ; on peut craindre un nombre de « faux positifs » ou « faux négatifs » non négligeable. Ces deux qualités doivent être indiquées clairement dans la notice des tests.
- Qualités extrinsèques des tests : leurs valeurs prédictives dépendent fortement de la prévalence de la maladie recherchée lors de dépistage et de la probabilité pré-test (diagnostic clinique) en médecine individuelle.
- Conditions d'utilisation : fonction de la température extérieure, de l'humidité ambiante, des sources de contaminations croisées.
- Respect scrupuleux du mode opératoire.
- Respect scrupuleux de la matrice.

RECOMMANDATIONS

ÉVALUER LE VÉRITABLE BESOIN :

- Dépistage ou détection dans une population infectée (problématique de santé publique humaine ou vétérinaire).
- Besoin vital d'une réponse rapide au chevet du patient.
- Quantifier précisément le coût économique global et le gain économique/recours au laboratoire.

ÉVITER LE MÉSUSAGE :

- Ne pas utiliser « au hasard » sans diagnostic clinique ou sans connaissance de prévalence.
- Suivre scrupuleusement le mode opératoire de réalisation, les conditions de stockage et déstockage et les contraintes environnementales d'utilisation.
- Vérifier les espèces et les maladies ciblées.

CONNAÎTRE AVANT TOUTE DÉCISION DE MISE EN OEUVRE :

- Les éléments nécessaires pour connaître même approximativement les valeurs prédictives obtenues pour un résultat positif ou négatif (ou à défaut la sensibilité et la spécificité du test).
- Ce qui est recherché : antigène, anticorps, ADN ...
- Les espèces et populations ciblées.
- L'intérêt relatif par rapport au recours aux méthodes classiques (pour la plupart des tests, le diagnostic n'est que présomptif et doit conduire théoriquement à un recours au laboratoire pour confirmation)
- Une liste du matériel fourni et une liste du matériel particulier requis mais non fourni.
- Les indications de toute condition particulière de stockage (température, lumière, humidité, etc.) et/ou de manipulation applicable.
- La stabilité à l'utilisation, qui peut porter sur les conditions de stockage, sur la durée de conservation en stock après la première ouverture du conditionnement primaire, ainsi que sur les conditions de stockage et la stabilité des réactifs de travail, s'il y a lieu.
- S'il y a lieu, une indication de toute exigence particulière concernant les installations requises (par exemple des locaux propres) ou la formation et les qualifications de l'utilisateur prévu.
- Le nom, la raison sociale ou la marque déposée du fabricant, l'adresse de son siège social où il peut être joint et celle de son lieu d'établissement, ainsi qu'un numéro de téléphone et/ou de télécopie et une adresse de site internet permettant d'obtenir une assistance technique.
- Les certifications éventuelles du fournisseur (marquage C.E ; certification ISO...9001).

VÉRIFIER SUR LA NOTICE D'UTILISATION :

- La destination du dispositif : ce qui est mesuré, sa fonction (dépistage, surveillance, aide au diagnostic, prévision de la réponse à un traitement...).
- Automatisé ou non ; qualitatif, semi-quantitatif ou quantitatif.
- Une description des matériaux de contrôle et les réactifs.
- Les indications concernant tout traitement ou manipulation préparatoire requis avant l'utilisation du dispositif (par exemple, stérilisation, assemblage final ou étalonnage) pour que celui-ci soit utilisé comme prévu par le fabricant.
- Les caractéristiques en matière de performances analytiques, comme la sensibilité analytique, la spécificité analytique, la justesse (biais), la fidélité (répétabilité et reproductibilité), l'exactitude (résultant de la justesse et de la fidélité), les limites de détection et de quantification, (informations nécessaires pour la maîtrise des interférences pertinentes connues, réactions croisées et limites de la méthode), la plage de mesure, la linéarité et les informations sur l'utilisation des procédures de mesure et matériaux de référence par l'utilisateur.
- Les caractéristiques en matière de performances cliniques (comme le seuil, la sensibilité diagnostique et la spécificité diagnostique, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative).
- Les informations relatives aux substances interférentes ou aux caractéristiques (par exemple, signes visuels d'hyperlipidémie ou d'hémolyse, âge de l'échantillon) susceptibles d'avoir une incidence sur les performances du dispositif ; les réactions croisées possibles.
- Les qualités intrinsèques du test (sensibilité et spécificité) –pour chaque maladie si test multiplex-
Si possible, son évaluation par rapport à un test de référence.
- Les conditions de réalisation et le matériel nécessaire (tests basés sur la PCR).

NE PAS OUBLIER QUE LES TESTS PERFORMANTS EN LABORATOIRE LE SONT SOUVENT MOINS EN CONDITIONS DE TERRAIN :

La mise au point de tests rapides a été réalisée dans des conditions optimales par l'industriel.

Ne jamais exclure la possibilité que les conditions du terrain (humidité, sécheresse excessives, etc.) puissent agir sur la performance du test.

INTERET D'UN MARQUAGE CE

	MARQUAGE CE	NON MARQUAGE
DOCUMENTATION DES LOTS	Obligation de contrôle de conformité avant libération des lots	Si problème de non conformité : qui conserve le certificat de libération du lot ?
STABILITÉ	Etudes de stabilité obligatoires suivant les exigences d'une norme	Vérifications à la discrétion du fabricant des conditions de stockage, de transport et stabilité dans le temps, limites et prescriptions.
INFORMATION DES UTILISATEURS	Notice disponible, mises à jour transmises en temps réel Contact gratuit	Transmission des mises à jour si modification sensible des performances du test ?
RÉFÉRENCES	Références bibliographiques pertinentes obligatoires	Non obligatoire
VALIDATION	Si critères d'utilisation de la méthode préconisée suivis par l'utilisateur : pas de revalidation nécessaire	Les DMDIV non marqués CE ou marqués CE et modifiés ou développés au sein des laboratoires doivent être entièrement validés par l'utilisateur.

PETIT LEXIQUE

* Label CE : Le marquage « CE » est obligatoire pour tous les produits couverts par un ou plusieurs textes réglementaires européens (directives ou règlements) qui le prévoient explicitement. Il est interdit pour les produits qui ne sont pas couverts par une de ces législations.

Pour permettre la circulation d'un produit sur le territoire de l'Union européenne, le fabricant doit évaluer sa conformité aux exigences essentielles définies par les législations européennes dont il relève, en fonction de ses caractéristiques techniques.

Marquage « CE » n'est pas une marque de certification ni une indication de l'origine géographique du produit.

* DMDIV : Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, Règlement (UE) 2017/746 du Parlement européen et du Conseil du 5 avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro. Obligation d'un marquage C.E.

* RFSA : Réseau Français de Sécurité Animale

UTILISATION DES TESTS RAPIDES EN INFECTIOLOGIE

TESTS EN INFECTIOLOGIE	INCONVÉNIENTS	RÉSOLUTION DU PROBLÈME
RÉSULTAT D'UN TEST DE RECHERCHE D'AGENT INFECTIEUX	Souvent à confirmer par une autre méthode	Augmenter la valeur prédictive en ciblant le sujet et en hiérarchisant le diagnostic différentiel
SI POSITIF	N'exclut pas la présence d'un autre pathogène	Faire un diagnostic différentiel complet
SI NÉGATIF	Faux négatif toujours possible	Phase trop précoce Variabilité interindividuelle Erreurs de manipulation, de conservation
APPLICABILITÉ	Limité souvent à un type précis de spécimen (ex urines...)	NE JAMAIS DEROGER
PONCTUEL	Infection en cours ou passée ?	Associer à d'autres évaluations biologiques (hémato-biochimiques)
COÛT	Non négligeable	A confronter au besoin réel
CADRE JURIDIQUE	Absence de cadre spécifique : responsabilité engagée sur le résultat	S'assurer de l'assurance qualité du fabricant
RÉSULTAT DES TR DE SENSIBILITÉ OU RÉSISTANCE À DIFFÉRENTS ANTI-INFECTIEUX	Interrogations scientifique et morale sur la pertinence de l'utilisation	
RÉSULTATS	Non accrédité, non standardisé pour la plupart, ne peut être qu'indicatif et parfois trompeur Valeur thérapeutique prédictive mal documentée	Traitement probabiliste Recours aux laboratoires
CADRE JURIDIQUE	Absence de cadre spécifique : responsabilité engagée sur le résultat	Utilisation prudente, raisonnée et contrôle si doute

QUELLES SONT LES MODALITÉS RÉGLEMENTAIRES DE MISE SUR LE MARCHÉ DES TRODS ?

Madame Sandra DEJEAN-TCHAPO propose dans sa thèse une définition du Dispositif Médical Vétérinaire (DMV), adaptée de la définition du dispositif médical en humaine. Les TRODS pourraient s'inscrire dans cette définition.

Tout instrument, appareil, équipement, logiciel, implant, réactif, matière ou autre article, destiné par le fabricant à être utilisé, seul ou en association, chez l'animal pour l'une ou plusieurs des fins médicales suivantes :

- diagnostic, prévention, contrôle, traitement ou atténuation d'une maladie,
- diagnostic, contrôle, traitement, atténuation ou compensation d'une blessure ou d'un handicap,
- étude, remplacement ou modification d'une structure ou fonction anatomique ou d'un processus ou état physiologique ou pathologique,
- maîtrise de la conception ou assistance à celle-ci,
- désinfection ou stérilisation de tout produit susmentionné,
- communication d'informations au moyen d'un examen *in vitro* d'échantillons provenant du corps de l'animal, y compris les dons d'organes, de sang et de tissus, et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps de l'animal n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens.

Les dispositifs médicaux vétérinaires ne sont pas soumis à des modalités de mise sur le marché spécifiques définies au niveau communautaire. Il n'existe pas plus de réglementation au niveau national.

POUR EN SAVOIR PLUS

IMPLEMENTATION D'UN CADRE RÉGLEMENTAIRE POUR LES DISPOSITIFS MÉDICAUX VÉTÉRINAIRES : ANALYSE D'IMPACT
THÈSE pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE soutenue le 1er juillet 2016 par Mme DEJEAN-TCHAPO Sandra

B. EXTERNALISER EN CONFIANCE SES ANALYSES DANS UN LABORATOIRE SPÉCIALISÉ

Serge Vélou

OBJECTIFS

- apporter les bases d'une réflexion pour le choix et la relation avec des laboratoires de biologie vétérinaires prestataires de l'ESV.
- établir ses limites dans la réalisation des analyses de laboratoire dans l'ESV : pour des raisons de qualité des résultats (et des conséquences de la non qualité) mais aussi pour des motifs simplement économiques de coût de revient.

1. EXAMENS RÉALISABLES DANS UN ESV : PERTINENCES ET LIMITES

Les ESV sont susceptibles de réaliser une palette plus ou moins importante de tests. Pour un ESV, choisir dans cette palette les examens qu'il pourra réaliser dans de bonnes conditions est essentiel. Il est donc important d'aborder quelques points fondamentaux qui facilitent ce choix. L'ESV facturant ses analyses, le client est en droit d'exiger une fiabilité comparable à celle qui serait obtenue en laboratoire spécialisé.

S'il est important que la réalisation des analyses réponde à des critères de qualité - au moins le respect des protocoles et l'inclusion régulière de contrôles - il est aussi, sinon plus important d'en connaître la fiabilité (limite de détection, précision, exactitude, sensibilité, spécificité) qui permet d'évaluer les valeurs prédictives et donc d'éviter de mauvaises interprétations.

Dès que les techniques internes atteignent leurs limites – qu'il faut donc connaître - et sont insuffisantes par rapport au besoin diagnostique, le praticien devra externaliser dans une structure qui en a fait son métier : un laboratoire de biologie vétérinaire.

Quelques exemples :

- Un examen tel que la coprologie parasitaire n'est simple que dans sa réalisation.... (voir encadré placé dans la fiche Coprologie des ruminants et équidés)
- Si les automates d'hématologie et de biochimie sont fiables – beaucoup d'erreurs sont faites en utilisant sans examen critique ni validation les valeurs « sorties de l'appareil ».
- Les unités de bactériologie des laboratoires externes disposent d'une diversité de milieux, réactifs, antisérums et techniques - normées ou non - leur permettant de cultiver puis d'identifier au moins partiellement la grande majorité des souches bactériennes isolables des prélèvements – multi espèces - qui leur sont envoyés. Ceci n'est accessible qu'aux ESV ayant une réelle volonté de se hisser à ce niveau.
- Les techniques phénotypiques, malgré leur performance, ont parfois leurs limites. Quand c'est nécessaire, les techniques moléculaires d'identification (PCR ou spectrométrie de masse) permettent de pallier leurs insuffisances : elles doivent alors être privilégiées.

Chacun se doit donc de connaître les limites des techniques qu'il souhaite utiliser.

L'utilisation de contrôles internes et la participation volontaire à des campagnes de comparaisons

interlaboratoires – désormais accessibles aux ESV – sont de bons moyens de se connaître et de s'améliorer.

A partir de ces constats : comment choisir un prestataire ?

2. «SÉCURISATION» DES RÉSULTATS OBTENUS EN MATIÈRE DE DÉMARCHE QUALITÉ

2.1. PRÉREQUIS

La qualité des résultats obtenus dépend en grande partie du « pré-analytique » et de la précision de la demande d'analyse :

- réflexion sur le but à atteindre : éliminer une hypothèse (nécessite un test sensible) ou confirmer une hypothèse (besoin d'un test spécifique). Préciser le besoin permet de vérifier le bon choix de la technique, lieu, nombre et qualité des spécimens,
- informations fournies au laboratoire : est-ce une analyse de « routine » ou faut-il mettre tout ce qui est possible en oeuvre ? A quel coût ? Le spécimen est-il unique donc précieux ? Quelle est la suspicion ? etc... Ces informations permettront des conseils pertinents et un choix de technique(s) en adéquation avec les attentes cliniques et le budget consenti.

NB : Sans précisions autres que : espèce, nature du spécimen et analyse à réaliser,

- le laboratoire **ne sera qu'un sous-traitant technique** du prescripteur qui, dans ce cas, se doit de connaître lui-même précisément les caractéristiques de fiabilité du test demandé ainsi que les conditions analytiques du laboratoire mandaté pour sa réalisation – exactement comme si le test avait été réalisé en interne.
- le responsable du laboratoire ne pourra pas interpréter le résultat – il ne pourra même pas juger de la vraisemblance du résultat vis-à-vis de la demande ou du cas clinique. Il lui manquera un élément essentiel dans son contrôle de la qualité.

2.2. INTERPRÉTATION DES RESULTATS

La qualité des résultats obtenus dépend aussi du « post-analytique », donc de l'interprétation qui en est faite par le clinicien qui est le seul à même d'établir un diagnostic, en concertation avec le laboratoire.

3. CHOIX DU LABORATOIRE

Remarques préliminaires :

- Le toujours plus vite et le toujours moins cher n'est pas compatible avec la sécurité analytique.
- Un choix orienté uniquement sur des avantages commerciaux qui associent la fourniture de vaccins ou de réactifs pour l'ESV à une offre en analyses complémentaires externalisées est fondé sur de mauvaises raisons. Il convient de garder un esprit critique.

LORS DU PREMIER CHOIX D'UN LABORATOIRE – IL EST NATUREL DE SE FONDER SUR :

3.1. LA NOTORIÉTÉ : COMMENT EN JUGER ?

- Par les publicités réalisées et/ou la présence dans les congrès ? Une des difficultés des laboratoires est le « faire-savoir », certains y sont passés maîtres, d'autres ont des possibilités commerciales et financières plus réduites mais ce qui ne signifie pas une moindre compétence. Les publi-informations permettent au moins de connaître les axes de développement du laboratoire et la formation des responsables.

- Par le bouche à oreille? Toujours efficace.
- Par les interventions en congrès ou les publications scientifiques réalisées par les responsables ?
- Par l'investissement du laboratoire à travailler en concertation avec les praticiens pour faire avancer les connaissances sur des sujets précis?
- Par la mise à disposition des praticiens des outils diagnostiques les plus performants (ie : Maldi -Tof pour les examens bactériologiques)?
- Par la participation à des études cliniques ? Un laboratoire choisi pour la réalisation d'études dans le cadre d'une investigation clinique pour un dossier d'AMM instruit par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) a dû démontrer des critères de compétence suffisants.

En tous cas, garder un œil critique sur les publications commerciales parfois partielles et orientées, fondées sur des populations discutables en matière de choix ou d'effectif est essentiel.

3.2. LA COMPETENCE REELLE OU SUPPOSEE DES RESPONSABLES

Elle peut évidemment être jugée à partir des diplômes obtenus ; le premier d'entre eux étant le titre de docteur en médecine vétérinaire. Un diplôme n'est malheureusement pas un gage absolu de compétence. Il existe aussi des personnalités non vétérinaires très compétentes en laboratoires spécialisés pour élevages industriels. Ce sujet reste donc très polémique.

Il est, en revanche, important que les signataires soient présents au niveau des plateaux techniques afin d'avoir accès à tous les rouages du processus analytique.

Pour un état des lieux de la formation à la biologie vétérinaire, on lira le rapport de l'Académie Vétérinaire de France adopté le 23 novembre 2017.

3.3. LA PROXIMITE

Un critère parfois oublié ! Bien que les laboratoires vétérinaires soient rares dans certaines régions et les transports de prélèvements rapides, la proximité est importante lorsqu'il s'agit de faire des analyses de grande urgence ou faire transporter des cadavres ou des animaux vivants. Mais aucun laboratoire ne peut survivre qu'avec les urgences ou les autopsies.

3.4. LA SPECIALISATION

Un laboratoire spécialisé a plus de chance d'être compétent dans sa spécialité qu'un laboratoire multitâches.

Il est important que le laboratoire connaisse les limites de ses compétences et sache choisir ses sous-traitants quand le besoin s'en fait sentir. Aucun laboratoire ne sera compétent en tout !

Le clinicien peut donc s'appuyer sur un laboratoire généraliste dans la mesure où celui-ci sait sous-traiter dans des laboratoires plus spécialisés et maîtriser les délais de réponse. Il peut aussi s'adresser directement à des laboratoires spécialisés quand il les connaît.

Un laboratoire multi-espèces doit développer plus de techniques différentes ou des techniques plus adaptables ; il peut être d'une grande utilité lors de cas sortant de l'ordinaire, d'autant que la biologie vétérinaire est moins automatisée que sa sœur humaine. En revanche, un laboratoire spécialisé dans une discipline ou une espèce permet un dialogue plus précis entre spécialistes.

Notons que les laboratoires ont en majorité un domaine de prédilection (par exemples la bactériologie, les analyses PCR ...) mais sont aussi des laboratoires de première intention qui peuvent s'appuyer sur des sous-traitants dans les autres domaines.

3.5. LES SIGNES EXTERIEURS DE QUALITE :

Voir l'encadré

4. UNE FOIS LE LABORATOIRE CHOISI ET TESTÉ – ON S'AIME OU ON SE QUITTE ?

4.1. LES RAPPORTS D'ANALYSE

Les rapports d'analyse se doivent d'être précis mais sans excès et rester compréhensibles.

Un laboratoire sous assurance qualité ne peut pas s'exonérer d'un certain nombre de précisions sur le rapport (numérotation unique, pagination, dates de prélèvement, de réception, de mise en analyse, informations relevant de sa responsabilité ou non, méthode si elle est normée ...). En revanche les avis et interprétations peuvent ne pas être autorisés sur les rapports accrédités.

4.2. L'HUMILITE !

Un laboratoire qui ne prend pas en compte un doute raisonnable du clinicien sur ses résultats d'analyse doit être considéré comme « suspect ».

Tout biologiste connaît les risques d'erreur et les incertitudes analytiques. Il se doit de contrôler à nouveau son processus et, si possible, de ré-analyser le spécimen en cas de doute justifié du clinicien.

4.3. L'HISTORIQUE

Au fur et à mesure des mois, ce sont les rapports de confiance qui s'installent entre l'ESV et le laboratoire qui sont sans doute plus importants que les signes extérieurs de qualité.

On juge de l'efficacité, la rapidité, les conseils... Un des critères de réussite de la collaboration clinicien- biologiste est le dialogue.

SIGNES EXTÉRIEURS DE QUALITÉ... PLAÎT IL ?

Le jargon utilisé par les laboratoires et les instances satellites, administration comprise peut paraître difficile à saisir. Tous ces termes rendent compte de réalités différentes.

Notons que, en dehors des cas pour lesquels l'accréditation est obligatoire, la réglementation n'exige aucune mise sous assurance qualité pour réaliser des analyses vétérinaires.

L'AGREMENT est donné par le ministère à des laboratoires pour effectuer des analyses pour son compte (analyses officielles dites « analyses autorité »). Ces analyses ne sont pas toujours prises en charge par l'Etat. (Attention ! ne pas confondre analyses officielles, analyses réglementées, autocontrôles obligatoires, autocontrôles). Pour être agréé, il faut être accrédité et qualifié mais surtout, sauf exception, être laboratoire public ou ancien laboratoire public.

L'ACCREDITATION est attribuée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) après évaluations sur place pour vérifier l'ensemble du système de management de la qualité du laboratoire ainsi que les compétences techniques dans le domaine d'accréditation demandé (ex : bactériologie animale, immuno-sérologie). L'annexe technique précise les domaines et les analyses pour lesquelles le laboratoire est accrédité. Elle est disponible sur demande auprès du laboratoire et sur le site du Cofrac www.cofrac.fr.

Obtenir et conserver l'accréditation est lourd et onéreux. Elle est obligatoire pour nombre d'analyses touchant à la Santé publique. Il est compréhensible que les laboratoires vétérinaires ne pratiquant pas ces analyses n'entreprennent pas la démarche.

Il faut comprendre que l'accréditation d'un laboratoire pour une ou des analyses signifie qu'il respecte un très haut niveau de qualité sur celles-ci mais aussi que son système qualité global est conforme à la très exigeante norme internationale ISO/CEI 17025. En revanche, l'application de la totalité du système qualité aux analyses non accréditées relève de la volonté du laboratoire.

LA CERTIFICATION est attribuée par un organisme certificateur, lui-même accrédité par le Cofrac. L'organisme vérifie lors d'audits que l'entreprise respecte un cahier des charges (norme). La certification BPL pour bonnes pratiques de laboratoire reconnaît la conformité du système qualité du laboratoire. Elle est souvent exigée pour participer à des études cliniques. A noter que l'accréditation vaut certification du système qualité du laboratoire.

LA QUALIFICATION, quand il s'agit des laboratoires vétérinaires, signifie « Qualification pour les échanges de données informatisées (EDI) avec le ministère. Il s'agit de la « Qualification Sigal » qui impose un travail important des informaticiens du laboratoire pour « caler » les échanges d'emails sécurisés et du personnel pour comprendre ce que diable il faut mettre dans les cases pour que cela ne plante pas !

LA RECONNAISSANCE : est accordée par le ministère à des laboratoires qu'il ne veut pas agréer pour les analyses officielles mais qu'il reconnaît suffisamment indépendants et compétents (accrédités et qualifiés) pour réaliser les analyses réglementées qui ne rentrent pas dans la catégorie des analyses officielles. (Exemple : les recherches de salmonelles programmées en élevage de volailles).

L'AGREMENT CIR : C'est l'agrément Crédit Impôt Recherche qui permet des avantages fiscaux à un fournisseur d'ordre du laboratoire dans le cadre d'activités de recherche. Il ne concerne pas la biologie clinique.

C. ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE EN LABORATOIRE: L'EXISTANT ET LE FUTUR

Guillaume Lequeux

Cette fiche a pour objet d'éclairer le clinicien sur l'étendue des techniques proposées par les laboratoires de biologie vétérinaire qui offre de nouvelles possibilités d'identification de germes en bactériologie, des délais plus courts dans l'obtention des résultats et plus de fiabilité des résultats.

PRÉAMBULE

Les techniques en bactériologie médicale ont considérablement évolué depuis l'époque pasteurienne avec le développement de l'informatique et des nouvelles techniques analytiques.

L'étude des bactéries d'intérêt médical requiert toujours l'utilisation de la bactériologie dite « classique » puisqu'elle permet également l'obtention d'indications pour le traitement et l'épidémiologie.

Les dernières technologies disponibles dans de nombreux laboratoires vétérinaires sont également décrites dans cette fiche.

1. LA BACTERIOLOGIE CONVENTIONNELLE

1.1. PRINCIPE ANALYTIQUE

Isoler une ou plusieurs bactéries réputées pathogènes ou d'intérêt à partir d'une culture sur milieu solide plus ou moins précédée d'une culture en milieu liquide (enrichissement) :

Premières étapes:

- coloration de Gram,
- tests rapides: oxydase, catalase,
- tests phénotypiques : caractères biochimiques, agglutination ...
- miniaturisation sous forme de galeries (dispositifs constitués d'une série de microtubes de réactifs prêts à l'emploi dans lesquels la souche à identifier est inoculée avant incubation : api biomérieux, micronaut identification system, thermo sensititre id plate par exemple),
- standardisation de la lecture (abaques pour la lecture visuelle ou lecture spectrophotométrique),
- automatisation (VITEK 2 BIOMERIEUX validé pour de nombreux germes d'origine animale).

1.2. AVANTAGES

Il s'agit d'une approche non sélective : grande diversité de pathogènes détectables à un faible coût (différent de la technique PCR).

L'isolement permet de connaître la bactérie responsable et de réaliser un antibiogramme.

1.3. INCONVÉNIENTS

- réservée aux espèces les plus fréquentes et cultivables,
- pas toujours parfaitement cohérente avec la taxonomie microbiologique actuelle surtout pour les espèces spécifiquement vétérinaires,
- nécessite une présélection pour la réalisation de tests appropriés et une expertise en bactériologie clinique,
- nécessite une incubation de plusieurs heures avant tout résultat.

D'après Descy et al.: Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/83161/1/maldi-tof.pdf>

2. MALDI-TOF

Il s'agit d'une méthode de spectrométrie de masse permettant l'identification automatisée et rapide des bactéries, levures et moisissures, apparue pour une utilisation en routine au début de la décennie 2010.

2.1. PRINCIPE ANALYTIQUE

- un spécimen (souche, suspension bactérienne ou autre) est déposé sur une lame puis mis en contact avec une matrice qui cristallise en séchant. Les molécules de l'échantillon sont ainsi « piégées » dans cette matrice puis ionisées par un laser. Ces ions chargés sont accélérés puis percutent un détecteur, selon une rapidité liée à leur masse : les molécules les plus petites étant les plus rapidement détectées. Elles sont ainsi séparées selon le ratio m/z c'est-à-dire (masse/charge) par un analyseur de masse en fonction de leur temps de vol (TOF : Time Of Flight, temps de vol nécessaire pour traverser le tube) ;
- la génération du spectre permet de produire une « empreinte de masse peptidique », dans la très grande majorité des cas unique pour un germe donné (existence de pics spécifiques aux genres, espèces voire sous-espèces). L'« empreinte » est alors comparée à une base de données existante pour déterminer de quelle espèce/sous-espèce microbienne l'échantillon se rapproche le plus et le degré de confiance qui peut être attribué à cette comparaison, par l'intermédiaire des algorithmes du logiciel. La gamme de masses est habituellement comprise entre 2 et 20 kDa, ce qui comprend principalement les protéines ribosomales ;
- deux systèmes commerciaux existent principalement sur le marché : le MALDI Biotyper de Bruker et le VITEK MS de BIOMERIEUX. Les bases de données comprennent environ 2000 espèces ou sous-espèces bactériennes à l'heure actuelle, dont un grand nombre de bactéries, levures et moisissures d'importance vétérinaire. Leurs performances relatives sont très proches ;
- les bases de données sont en perpétuelle évolution et leur contenu en croissance exponentielle depuis plusieurs années. L'utilisateur a également la possibilité de construire ses propres bases de données, en complément de celles fournies par le fournisseur du matériel.

2.2. AVANTAGES

- le maldi-tof est relativement robuste et peu affecté par les conditions de culture des germes ;
- fiabilité des identifications. C'est un avantage majeur ;
- la rapidité d'analyse est l'élément majeur : en effet, dans cette approche, le laboratoire n'est plus dépendant de la croissance des bactéries et de l'expression de leurs phénotypes (notamment biochimiques) nécessaires aux identifications classiques ; il n'y a plus de nécessité d'attente pendant les temps d'incubation nécessaires à cette expression des phénotypes, qui requiert le plus souvent 16 à 48 heures ;

- technique moins dépendante que celles de bactériologie classique de l'état physiologique des bactéries et de leurs capacités de croissance, notamment en lien avec les conditions de conservation et d'envoi des échantillons ;
- coût modéré (de l'ordre de 0.3 à 1 € / identification) et peu de consommables nécessaires à la mise en œuvre ;
- aucune nécessité de connaître ni de suspecter la bactérie en cause ou d'avoir une orientation au préalable (différence majeure avec l'approche PCR et bactériologie classique) ;
- les performances sont très élevées en comparaison des méthodes de référence (séquençage de l'ARN 16 S) : de l'ordre de 85 à 100 % des bactéries sont correctement identifiées, ces pourcentages étant variables en fonction des genres ou espèces considérés ;
- les possibilités offertes d'identifier des germes difficiles (anaérobies à croissance lente, mycobactéries) ouvrent des perspectives importantes dans la gestion des infections liées à ces agents.

2.3. LIMITES ACTUELLES

- pas de différenciation possible entre bactéries proches : exemple d' *E.Coli* et *Shigella*, discrimination parfois difficile entre espèces de streptocoques, pas de possibilité d'identification à l'espèce entre les bactéries du complexe *Enterobacter cloacae* ;
- les bases de données ne couvrent pas l'ensemble des bactéries pouvant être isolées en bactériologie clinique et des erreurs d'identification peuvent également se produire, notamment entre espèces très proches ;
- l'identification de certaines bactéries pose encore à l'heure actuelle des difficultés pour certaines mycobactéries, actinomycétales, certains genres anaérobies ou leptospires par exemple, que ce soit en termes de préparation de l'échantillon ou de performance d'identification sensu stricto ;
- la standardisation des protocoles entre laboratoires n'est pas encore élaborée, malgré la robustesse et la reproductibilité connues des systèmes ;
- le coût de l'appareil représente un investissement très conséquent pour le laboratoire et peut représenter un frein à la diffusion massive de cette technologie : une activité suffisamment importante en bactériologie est nécessaire pour amortir ce coût ;
- les souches d'aspect muqueux (filantes après culture) peuvent ne pas pouvoir être identifiées ;
- **la croissance bactérienne sur milieu solide est nécessaire à l'exception des hémocultures et des échantillons urinaires pour lesquels il peut être possible d'identifier le germe qui y est présent en travaillant directement sur ces matrices après une phase de traitement (extraction protéique) mais sans phase de culture initiale.**

2.4. UTILISATIONS POSSIBLES POUR LE VÉTÉRINAIRE

- **identifications bactériennes et fongiques ;**
- NB : les identifications directes sur urine, cultures sanguines, liquide céphalo-rachidien, lavages respiratoires, laits de mammites pourraient être une piste prometteuse à l'avenir, en matière de gains de délai de réponse au praticien. Les premières publications sur le lait ne sont pas convaincantes
- typage, détection de facteurs de virulence et taxonomie bactérienne ;

- identification de germes auparavant non connus.

2.5. FUTUR

- **détection de résistances aux antibiotiques**

Référence : Irene Burckhardt and Stefan Zimmermann Susceptibility Testing of Bacteria Using Maldi-Tof Mass Spectrometry Front. Microbiol, 06 August 2018 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01744>

3. PCR

Biologie Moléculaire ; identification de germes pathogènes ciblés sans culture préalable

3.1. PRINCIPE ANALYTIQUE

d'après Poutrel, 2018

La PCR est une technique d'amplification de l'ADN qui permet d'obtenir in vitro un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie et définie comme étant une séquence cible spécifique à mettre en évidence.

Chaque cycle de PCR comporte 3 étapes après extraction de l'ADN présent dans l'échantillon. Les produits de chaque étape sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes :

- dénaturation de l'ADN par chauffage à 95°C pour séparer les 2 brins qui le composent, ce qui conduit à l'obtention d'un ADN monocaténaire,
- hybridation d'un couple d'amorces ou « primers » à chacune des extrémités de la séquence d'ADN recherchée et qui sera amplifiée. Ces primers « pointent » l'un vers l'autre et bornent la séquence à amplifier. Cette hybridation est réalisée entre 40 et 65°C en fonction de la longueur des primers. Plus la température est élevée, plus l'hybridation est sélective, donc plus elle est spécifique,
- élongation à 72°C par la Taq polymérase. A chaque cycle le nombre de copies de l'ADN ciblé est multiplié par 2. Ainsi après 30 cycles, le nombre de copies d'un fragment d'ADN permet en théorie d'obtenir plus d'un milliard de copies de ce fragment.

La PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps le processus à l'aide de la fluorescence.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant du fait que la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'« amplicons » générés pendant la PCR, elle-même étant corrélée à la quantité d'ADN de la matrice originale.

Plus l'échantillon est « riche » à l'origine en molécules d'ADN cible, moins il faudra de cycles pour atteindre un signal fluorescent significativement supérieur au bruit de fond (Ct = cycles seuil). La PCR quantitative exprime des résultats en quantité de génome/pathogène/cible en fonction d'un volume ou unité d'échantillon.

3.2. AVANTAGES

La majorité des bactéries d'intérêt médical sont cultivables (techniques plus ou moins longues mais peu coûteuses) mais avantage à la PCR pour :

- les bactéries non cultivables ou de culture longue ou fastidieuse (anaérobies, mycobactéries),
- les cas où la flore commensale est importante et variée (exemple du tube digestif) - recherche ciblée,
- la détection des facteurs de pathogénicité / virulence/résistance (ex : toxines de *E.Coli* ou de staphylocoque) ou des marqueurs épidémiologiques,

- la quantification possible du pathogène (ex : fréquence et seuil d'attribution d'avortement ?),
- le rapport coût / efficacité,
- la bonne sensibilité,
- la spécificité de la cible, mais, comme pour la sensibilité, ces performances sont également fonction de la valeur seuil (en Ct) retenue,
- la rapidité (délai inférieur à celui de la culture).

Applications en Bactériologie :

- détection d'un agent pathogène ciblé,
- identification,
- séquençage,
- détection des mécanismes de résistance,
- épidémiologie (typage moléculaire).

3.3. INCONVÉNIENTS

- prix parfois élevé,
- technicité nécessaire du personnel afin notamment de garantir une qualité d'extraction des acides nucléiques à partir des échantillons et de limiter le risque d'inter-contaminations,
- nécessité de locaux adaptés afin de limiter les risques de contaminations des échantillons (séparation physique ou temporelle des phases d'extraction et d'amplification, principe de la marche en avant),
- multiples analyses d'espèce ou de genre à réaliser en parallèle,
- défaut classique de la PCR : détecte la présence mais pas la viabilité d'un agent pathogène. De ce fait, le lien de causalité doit parfois être fait avec prudence selon le contexte médical,
- difficultés techniques ou d'interprétation.

DIFFICULTÉS	CONSÉQUENCES
Mise en évidence de bactéries non viables	PERTINENCE CLINIQUE
Contamination de laboratoire	FAUX POSITIF
Inhibition de l'amplification par des substances présentes dans le prélèvement biologique (charbon présent dans les flacons d'hémoculture, ...)	FAUX NÉGATIF
Hybridation non spécifique des amorces	FAUX POSITIF
Bactérie ou prélèvement biologique difficile à lyser	FAUX NÉGATIF
Choix du fragment de biopsie à analyser - hétérogénéité de l'échantillon	FAUX NÉGATIF
Inoculum inférieur au seuil de détection	FAUX NÉGATIF
Prélèvement plurimicrobien (infection plurimicrobienne ou présence d'une flore commensale)	RÉSULTAT ININTERPRÉTABLE

D'après F. Doucet-Populaire. Qu'attendre de la biologie moléculaire en bactériologie ?

<http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/2005/CT/ct9-1-doucet.pdf>

EN CONCLUSION

Les ESV auraient la possibilité de disposer des techniques de PCR (c'est déjà le cas pour certaines d'entre elles), en réunissant différentes conditions :

- formation du personnel à cette technique,
- locaux adaptés afin de limiter les risques de contaminations,
- pertinence financière : les investissements matériels restent accessibles en terme de prix (un thermocycleur neuf coûte entre 15 et 20 000 €) dès lors qu'une activité analytique suffisante peut les justifier

En revanche, la pertinence pour les ESV de s'équiper de MALDI-TOF apparaît faible, compte-tenu du nombre très élevé d'identifications quotidiennes nécessaires à son amortissement.

COMPARAISON DES DIFFERENTES APPROCHES

Méthode	Avantages	Inconvénient	Durée de préparation	Durée d'identification	Coût (consommables)	Identifications possibles	Compétence requise	Type d'échantillons analysables
Identification conventionnelle : culture puis caractères biochimiques	Sensible Faible coût Grande diversité de pathogènes détectables Permet réalisation d'anti-biogrammes	Longueur du processus : délai de réponse (24-48h)	1 à 20 minutes	5 à 48 heures	5 €/éch	Espèces les plus fréquentes d'intérêt clinique	Modérée	Souches bactériennes A peu près tous les spécimens possibles (organes, écouvillons, fluides, laits, fèces, etc...)
MALDI-TOF	Rapide (3-5 min) Fiable/précise Moins chère que PCR Peu dépendante état physiologique bactéries et de l'orientation préalable pour l'identification	Coût initial achat (150 k€) Certaines bactéries peuvent être difficilement identifiables	5 minutes 20 minutes	2 minutes	0,1 €/éch - 0,5 €/éch	Bactéries aérobies/ anaérobies Levures Mycobactéries Champignons filamenteux	Basique Compétence technique spécifique à acquérir limitée	Souches bactériennes Pas d'application actuelles validées directement sur échantillons
PCR	Sensible Spécifique Identification de souches non cultivables ou de culture longue/fastidieuse	Compétence technique Coût	60 minutes	45 minutes à 48 heures	30-50 €/éch	Toutes théoriquement	Elevée	Souches bactériennes A peu près tous les échantillons possibles (organes, écouvillons, fluides, laits, fèces, etc...)

Singhal et al. Frontiers in Microbiology, 2015 et C. Meex. Apport du MALDI-TOF en bactériologie.

<https://orbi.uliege.be/handle/2268/164531>

D. LA PLACE DE L'ESV DANS L'EXAMEN BACTÉRIOLOGIQUE

Nicolas Keck, Véronique Bachy

Cette fiche peut aider le lecteur :

- à définir la place et le rôle majeur de l'ESV dans l'examen bactériologique et en particulier dans le pré-analytique et le post-analytique,
- à disposer de résultats fiables à interpréter en coopération avec le laboratoire, pour leur exploitation clinique,
- et de résultats utilisables et compatibles avec la réglementation actuelle sur l'utilisation des antibiotiques critiques.

OBJECTIFS DE SANTÉ ANIMALE

Les principaux objectifs de l'examen bactériologique sont :

- mettre en évidence, isoler et identifier la ou les bactéries impliquées dans le processus infectieux,
- évaluer leur sensibilité aux antibiotiques,
- aider à préciser les caractéristiques épidémiologiques de l'infection,
- détecter une éventuelle colonisation bactérienne des animaux,
- suivre l'évolution d'une infection (éventuellement en cours de traitement),
- et ce, à partir de spécimens biologiques.

1. PRINCIPES

- ◆ Mise en évidence, isolement et identification de bactéries pathogènes à partir de spécimens de nature variée prélevés sur animal vivant ou en post-mortem.
- ◆ Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des espèces bactériennes d'intérêt médical.

NB : Dans certains cas (bactéries ne pouvant être cultivées, identification non obtenue par les méthodes bactériologiques) les micro-organismes responsables de l'infection peuvent faire l'objet d'une recherche par biologie moléculaire, qui doit dans ce cas respecter les recommandations de la fiche dédiée.

2. PARTICULARITÉS DE L'ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE

La plupart des techniques de bactériologie ne peut être réalisée que dans des laboratoires d'analyse spécialisés, nécessitant des locaux dédiés et sécurisés, du matériel spécifique et du personnel formé et expérimenté. Ces laboratoires sont responsables de la qualité des résultats afin de pouvoir respecter les bonnes pratiques en bactériologie et les normes NFU47-107 et NFU47-106 préconisées par le décret 2016-317 du 16 mars 2016 concernant l'usage des antibiotiques critiques.

L'arrêté du 18 décembre 2017 accepte également toute méthode ou test revendiquant la détermination de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques, ayant obtenu un résultat favorable à la validation réalisée par le laboratoire national de référence.

Des techniques rapides alternatives aux méthodes officielles, réalisables par les ESV, existent mais elles ne sont pas validées par l'Anses.

La gestion de la qualité par les ESV se limite dans la majorité des cas à celle des étapes pré-analytiques - déterminantes pour l'analyse ultérieure et pour l'obtention de résultats fiables par le laboratoire spécialisé.

Cependant certaines techniques analytiques peuvent être utilisées par le praticien pour orienter son diagnostic dans l'attente de confirmation par un laboratoire spécialisé.

Dans ce cas l'ESV devra respecter les conditions opérationnelles adéquates et les règles d'hygiène et de sécurité.

3. L'ÉTAPE PRÉ-ANALYTIQUE : PRÉLÈVEMENT/COLLECTE DES SPÉCIMENS

LA QUALITÉ DU RÉSULTAT NÉCESSITE :

- **des précautions environnementales :**

limiter au maximum la contamination par des bactéries non pathogènes, ubiquitaires d'origine animale (par exemple, flore cutanée non pathogène, fécale ou salivaire) ou humaine, notamment cutanée,

- ◇ désinfection des mains par friction hydro-alcoolique avant le prélèvement,
- ◇ port de gants à usage unique,

- **un matériel de prélèvement : matériel dédié et utilisé avant la date limite d'utilisation**

- ◇ à usage unique et étanche,
- ◇ tube sec si collecte de liquide biologique (fluides et cytoponctions) - tube borate possible pour l'urine,
- ◇ flacon adapté pour les hémocultures (sur indication du laboratoire),
- ◇ tube sec pour les biopsies et les raclages cutanés additionnés d'un peu de sérum physiologique stérile,
- ◇ écouvillons : en matériau neutre (comme nylon ou dacron) en présence d'un milieu de transport (type Amies ou Stuart) sont recommandés. Le coton et le bois ne doivent pas être utilisés. Selon les cas, il est recommandé de prélever deux écouvillons : un pour l'examen direct et l'autre pour la culture,
- ◇ cytobrosses stériles dans certains cas mais éviter les cytobrosses et écouvillons secs pour le transport (seules les espèces bactériennes les plus résistantes survivraient au transport),

- **une technique de prélèvement avec procédure standardisée**

- ◇ un volume optimum : un volume insuffisant peut conduire à des résultats faussement négatifs (par ex : un volume de 20 ml de sang est conseillé pour investiguer une bactériémie).
- ◇ pour augmenter la sensibilité, les prélèvements peuvent être multiples: plusieurs contenants avec une aiguille ou une lame de bistouri par prélèvement, celui-ci étant adapté au processus infectieux exploré :
 - ◆ privilégier les prélèvements profonds,
 - ◆ proscrire les prélèvements superficiels (bords, fistule, pus sur compresse, écouvillon sur cicatrice etc.),
 - ◆ effectuer si possible le prélèvement en début d'évolution clinique et avant la mise en place de traitements spécifiques,
 - ◆ prélèvements lors de septicémie : à organiser avec le laboratoire,
 - ◆ interaction avec la flore commensale de la zone (cf. supra « précautions environnementales »),
 - ◆ désinfecter la zone par l'utilisation d'un antiseptique (ex : ponction d'un liquide interne).

◇ **des modalités de prélèvement adaptées aux germes anaérobies :**

- ◆ pus, épanchement : prélever avec une seringue stérile, chasser toute bulle d'air, boucher stérilement et hermétiquement, envoyer au laboratoire en moins de 24h
- ◆ si le spécimen est peu abondant, écouvillonner et placer dans un milieu de transport pour germe anaérobie,
- ◆ si la conservation ou le délai de transport excèdent 24h, utiliser un milieu de transport adapté.

A FAIRE OU NE PAS FAIRE

A PROSCRIRE

- les fixateurs (formol ou autre) pour les tissus,
- la présence d'air dans le tube ou le flacon si une bactériologie anaérobie est requise,
- le délai trop important post-mortem (prélèvement réalisé moins de 6h après la mort),
- les lames de scalpel, aiguilles dans les tubes contenant les spécimens

RECOMMANDÉ

- effectuer le prélèvement avant traitement antiseptique/antibiotique. Ceci n'est pas toujours possible en pratique et doit dans ce cas être signalé au laboratoire. Si un antibiotique a déjà été administré, arrêter si possible le traitement 4 jours avant le prélèvement (notamment pour infections cutanées et urinaires),
- valider avec le laboratoire les spécimens à prélever en fonction des signes cliniques/durée d'évolution,
- utiliser un milieu de conservation des bactéries,
- utiliser un pack réfrigéré ou de température contrôlée pour certains spécimens (notamment fragments d'organes).

4. RECUEIL DES INFORMATIONS PERTINENTES

- Sur le contenant du spécimen : Nom animal/propriétaire, localisation du site pour éviter toute interversion
- Sur la demande d'analyses :
 - ◇ animal : espèce, nom animal/propriétaire, âge ;
 - ◇ contexte de réalisation : date de prélèvement, localisation du site et nature de chaque spécimen, degré d'urgence ;
 - ◇ informations pouvant aider à l'interprétation des résultats, notamment cliniques et sur l'antibiothérapie éventuellement réalisée avant le prélèvement ;
 - ◇ demande claire : culture (aérobie/anaérobie), bactérioscopie, recherche spécifique éventuelle (ex : recherche de mycobactéries) etc...

5. CONSERVATION DES SPÉCIMENS AVANT ENVOI

Certaines espèces bactériennes sont très fragiles ou à croissance difficile et les conditions de conservation pré-analytiques sont très importantes pour le déroulement ultérieur de la culture.

Il est nécessaire de rechercher le délai le plus court entre le prélèvement et la mise en culture.

A PROSCRIRE

- exposition directe à la chaleur (dessiccation des spécimens),
- congélation du sang et des fluides,
- congélation des organes (sauf exception, à valider avec le laboratoire).

RECOMMANDÉ

- réfrigération ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$), en attente de l'envoi (au maximum 2 jours à l'ESV), dans un tube ou flacon adapté pour les liquides biologiques,
- dans un milieu adapté de transport/conservation des bactéries pour les écouvillons.

6. EXPÉDITION VERS LE LABORATOIRE

- ◇ matière infectieuse de catégorie B (UN 3373),
- ◇ triple emballage avec absorbant requis pour protéger les spécimens et absorber la totalité des liquides en cas de casse,
- ◇ expédition rapide (en moins de 24h) et suivie à température ambiante ou réfrigérée.

7. ETAPE ANALYTIQUE RÉALISABLE EN ESV

7.1. EXAMEN MICROSCOPIQUE :

a. examen direct à l'état frais :

b. colorations différentielles

- I. éviter d'étaler trop de tissus sur la lame
- II. utiliser les kits prêts à l'emploi
- III. respecter le mode opératoire et les dates de péremption
- IV. augmenter la sensibilité par centrifugation à faible vitesse (ex : urines)

7.2. CULTURE BACTÉRIENNE

a. L'utilisation de réactifs prêts à l'emploi et aux normes C.E est recommandée, principalement pour des applications bien identifiées (ex : des systèmes constitués d'une lame de plastique recouverte de 2 milieux de culture gélosés permettant de déterminer la bactériurie après avoir été plongée dans l'urine fraîchement émise). Le mode d'emploi de ces milieux de culture prêts à l'emploi doit être strictement respecté.

b. La réalisation d'antibiogrammes par diffusion selon la norme NF U 47-107 est rarement applicable en routine car elle nécessite une expertise difficile à maintenir dans un ESV.

c. Les manipulations doivent respecter les règles d'hygiène et de sécurité adaptées aux analyses de laboratoire.

A PROSCRIRE

- utiliser des réactifs d'évaluation rapide de la résistance aux antibiotiques non validés par le laboratoire de référence (Anses),
- effectuer un antibiogramme à partir de colonies non isolées ou non identifiées.

La norme NF U 47-107

Elle précise dans quelles conditions réaliser un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (méthode des disques).

Elle définit notamment :

- les milieux utilisables (Mueller Hinton simple ou enrichi),
- la préparation de l'inoculum bactérien (évalué par étalons de Mac Farland ou densitomètre),
- la réalisation pratique (ensemencement, application des disques),
- la durée et les conditions d'incubation,
- l'interprétation selon les recommandations du CA-SFM*/ section vétérinaire, mises à jour chaque année,
- les modalités de réalisation de contrôles qualité réguliers à l'aide de souches de référence.

* **CA-SFM* : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie**
(<https://www.sfm-microbiologie.org/2023/06/15/casfm-veterinaire-2023/>)

E. L'ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DU LAIT DANS L'ESPÈCE BOVINE



Olivier Salat

Cette fiche présente une expérience rigoureuse d'analyse bactériologique ciblée dans un ESV (1ère partie).

OBJECTIFS ET JUSTIFICATIONS

Identifier la cause d'une inflammation/infection mammaire chez la vache, qui peut être :

- une infection bactérienne classique (la plupart du temps),
- une infection bactérienne préalablement éliminée par la mamelle (une des principales causes des cultures sans pousse bactérienne – « stériles »),
- une infection bactérienne à pourcentage élevé de guérison spontanée (infection colibacillaire responsable de mammites non sévères),
- une infection non bactérienne (levures ou champignons).

Il faut souligner la variabilité étiologique constatée dans les mammites cliniques non sévères (où la clinique ne peut orienter valablement sur le germe en cause) et la fréquence des entérobactéries lors de mammites avec répercussion sur l'état général (tableau 1).

	MAMMITES NON SÉVÈRES	MAMMITES SÉVÈRES
Effectif	1782	615
Coliformes	14%	65%
Streptococcus uberis	33%	9%
Autres Streptocoques	8%	7%
Staphylococcus aureus	8%	5%
Levures ou champignons	1%	0,2%
stériles	17%	6%

Tableau 1 : principaux résultats des analyses bactériologiques effectuées de 2016 à 2020 selon le type de mammite clinique (données personnelles – clinique vétérinaire de la Haute Auvergne)

L'intérêt de l'analyse pratiquée en ESV réside essentiellement dans le délai d'obtention des résultats, permettant parfois de ne traiter qu'après identification du germe, et dans la confrontation tableau clinique et identification bactérienne.

1. PRÉLÈVEMENT

A l'heure actuelle, le lait dans la mamelle est considéré comme un milieu normalement stérile. La mise en évidence dans ce lait de la présence de germes peut donc être interprétée comme révélateur d'une infection d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle

1.1. MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- serviette désinfectante ou tampon imbibé d'alcool à 70°,
- petits pots stériles, cette dernière qualité étant indispensable. Il vaut mieux privilégier un matériel non cassable (type PVC) plutôt que le verre.

1.2. PRÉCAUTIONS À PRENDRE

Prélever le lait de chaque quartier atteint de façon aseptique. C'est facilement réalisable pourvu que l'exécution du protocole de prélèvement soit rigoureuse, c'est-à-dire :

- trayon propre,
- extrémité du trayon désinfectée,
- premiers jets de lait jetés,
- mains propres,
- 1 ou 2 jets de lait (au moins 100 µl) dirigés vers un flacon tenu le plus horizontalement possible (et pas à l'aplomb du quartier prélevé).

Si une vache présente plusieurs quartiers infectés, la rigueur commande de prélever chaque quartier dans des pots différents. En pratique, selon l'expérience et l'interdépendance entre les quartiers (épidémiologique mais pas organique), c'est souvent le même germe qui est retrouvé, ce qui autorise à mélanger dans le même pot le lait de plusieurs quartiers (on se limite quand même à un maximum de 2)

1.3. MODES DE CONSERVATION

Dans la mesure du possible, l'analyse doit être effectuée le plus rapidement possible. Sinon le spécimen doit être gardé au froid positif (2-8°C). En cas de prélèvement correctement réalisé, le délai entre prélèvement et analyse peut aller jusqu'à 3 jours sous couvert du froid.

Il est envisageable de congeler les spécimens mais il faut savoir alors qu'une partie des bactéries risque de disparaître, en particulier les « Gram négatives ». Il existe alors des pots spécifiques de prélèvements (CRYOKIT) (laboratoire MSD).

1.4. QUALITÉ DU PRÉLÈVEMENT

Il faudra absolument la présence dans la méthode analytique d'une étape permettant de s'assurer que le spécimen n'est pas contaminé, préalable indispensable à toute tentative d'analyse de résultat.

2. MATÉRIEL ANALYTIQUE

Le matériel requis est relativement simple et d'un coût le plus souvent modéré.

Il s'agit (liste non exhaustive et fortement conseillée) :

- d'une étuve (munie d'un thermomètre interne),
- de diverses géloses ou bouillons (selon la méthode utilisée),
- de certains réactifs (eau oxygénée) ou de tests et réactifs divers (coagulase, de lancefield),
- d'un kit de coloration de Gram,
- de divers petits matériels stériles (Anses, bâtonnets, lames, puits d'identification),
- de récipients de collecte de déchets à risque et éventuellement de collecte des colorants (conteneur à DASRI),
- d'un microscope (avec objectif à immersion X 100).

NB : ce matériel ne permet pas de cultiver des bactéries anaérobies ou de culture difficile

3. MÉTHODES ANALYTIQUES

Il existe plusieurs méthodes phénotypiques d'identification des bactéries pathogènes mammaires. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 1.

S'il est concevable que l'ensemencement du lait puisse être réalisé par un technicien (ne)/auxiliaire en santé animale, il est indispensable que le reste de l'examen soit pratiqué par un vétérinaire ou par un biologiste.

	DESCRIPTION RAPIDE	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
Géloses multi compartimentées	Géloses à 2 à 4 compartiments, certains chromogènes. La lecture combinée de ces compartiments conduit à une identification avec une forte probabilité	Simplicité, Matériel requis limité Nécessite peu de formation pour l'utilisation, Lecture d'un manuel d'interprétation	Impossibilité de vérifier la contamination du spécimen. Volume d'ensemencement limité → sensibilité réduite. Lecture parfois délicate. Concordance d'identification faible avec Maldi-Tof pour les Gram + (1) Coût des géloses.
Méthode classique (2,3)	Gélose au sang à partir de laquelle les colonies identifiées vont faire l'objet de divers tests et en premier d'une coloration de Gram	Appréciation de la qualité du prélèvement, plus complète que les géloses uniques, (sources d'erreurs plus limitées,) Identification large, coût	Nécessité d'une formation spécifique. Chronophage Matériel requis (péréemption des géloses au sang). Concordance d'identification inconnue avec Maldi-Tof
Méthode dite des 3 géloses (4) ou Patho 12	Gélose au sang de mouton, gélose spécifique Gram + et gélose spécifique des entérobactéries. Compléter par différents tests complémentaires (catalase, coagulase, Gram) et autres bouillons ou géloses	Appréciation de la qualité du prélèvement plus complète que les géloses uniques (sources d'erreurs plus limitées) Identification large Méthode moyennement simple, rapide et robuste (reproductible, tests faciles à interpréter et à réaliser avec l'expérience)	Nécessité d'une formation spécifique Concordance d'identification correcte avec Maldi-Tof (= 0.77 Gram – et 0.61 pour les Gram +) Matériel requis conséquent (péréemption des géloses au sang)

4. PRÉCAUTIONS À PRENDRE

La lecture des géloses peut se faire au bout de quelques heures, en fonction de la vitesse de pousse des bactéries. Il faut au moins attendre 48 heures pour rendre un résultat définitif.

La plupart des bactéries pathogènes mammaires bovines ne présentent pas de dangers particuliers en cas de contamination humaine. Cependant les règles d'hygiène élémentaires doivent être respectées. Il n'est pas indispensable – bien que conseillé – de travailler sous bec Bunsen ou en dépression, seulement les géloses ne doivent pas être conservées plus de 48 heures à l'étuve avant lecture. Il est conseillé de mettre en DASRI les géloses immédiatement après lecture.

5. CONTRÔLE QUALITÉ

Il est indispensable de faire pratiquer en parallèle des analyses bactériologiques à partir d'un même spécimen de lait à un laboratoire de référence pratiquant régulièrement des analyses bactériologiques de lait. Il serait essentiel d'évaluer régulièrement la technique employée dans les ESV :

- ◇ soit en identifiant des souches envoyées par un laboratoire partenaire (EILVET)
- ◇ soit en faisant parvenir à intervalle régulier au laboratoire partenaire des bactéries préalablement identifiées pour confirmation.

Un certain nombre de tests rapides (gélose multi-compartmentée) ont fait l'objet d'évaluations ayant débouché sur des publications (1).

6. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'isolement d'un germe ne signifie pas qu'il est systématiquement à l'origine des troubles observés. Un isolement d'une CFU est synonyme d'infection pour les pathogènes majeurs (*Staphylococcus aureus*, les *Streptococcus uberis*, *agalactiae*, *dysgalactiae* et les coliformes), *Corynebacterium bovis* et les entérocoques.

C'est beaucoup plus discutable et à pondérer en fonction du nombre de CFU (Colony Forming Unit) isolées pour les autres germes rencontrés.

En règle générale, il faut toujours se référer à la clinique avant toute conclusion : il est donc **indispensable** que le résultat soit validé par un vétérinaire **ayant des compétences en santé mammaire**.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 : Griffioen (K.), Velthuis (A.G.J.), Lagerwerf (L.A.), Heuvelink (A.E.), Lam (T.J.G.M.). Agreement between four commercial diagnostic tests and routine bacteriological culture of milk to determine the udder infection status of dairy cows. *Prev Vet Med.* 2018 Sep 1;157:162-173.
- 2 : Le Page (P.), Poutrel (B.) L'analyse bactériologique du lait de mammites par la méthode de référence utilisant une gélose non sélective et la coloration de Gram. *Recueil Journées GTV 2014*, p. : 87-92.
- 3 : Lequeux (G.) Bergonier (D.) Diagnostic bactériologique des mammites au laboratoire. *Bull. GTV 2019*, 95 : 35-44.
- 4 : Salat (O.), Lemaire (G.) La bactériologie de lait. *Point Vet. N° spécial rurale « Les indispensables en pratique rurale » 2017*, p. 100 – 10

LA BACTÉRIOLOGIE SIMPLIFIÉE DU LAIT

Objectifs : * Traiter un spécimen de lait au moyen d'une batterie de milieux de culture, pour :	* Identifier le / les germes pathogènes * Faire le diagnostic étiologique d'une mammite * puis réaliser éventuellement un antibiogramme
Indication : * Examen entrant dans l'offre de services d'un ESV spécialisé en production laitière	<input checked="" type="checkbox"/> Indispensable <input checked="" type="checkbox"/> Utile (Très) <input type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnostic
Avantages : * Utilisation	<input type="checkbox"/> Facile <input checked="" type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input checked="" type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients /Contraintes : * Technique	<input checked="" type="checkbox"/> Difficile <input type="checkbox"/> Longue <input type="checkbox"/> Contraignante <input type="checkbox"/> Coût moyen
Apport au diagnostic : Indispensable	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Assez élevé	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Modéré	Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Elimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - spécimens, milieux de culture colorants, matériel de pipetage <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité : * Risque infectieux	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

F. ANTIBIOGRAMMES APPLIQUÉS AUX GERMES DE MAMMITES BOVINES ET RÉALISABLES EN ESV



Olivier Salat

Cette fiche apporte une expérience rigoureuse d'analyse bactériologique ciblée (avec focus sur la réalisation d'antibiogrammes par la méthode des disques) dans un ESV (2eme partie).

QUELLES TECHNIQUES ?

Il existe essentiellement 3 méthodes pour établir un profil d'antibiorésistance d'un germe ou tester sa sensibilité aux antimicrobiens :

- la méthode de diffusion en gélose dite « méthode des disques »,
- la méthode de micro-dilution en gélose qui permet la détermination précise de concentration minimale inhibitrice,
- la recherche directe de gènes d'antibiorésistance par techniques de biologie moléculaire.

Seule la méthode des disques est envisageable actuellement à l'échelle de l'ESV. C'est également encore la méthode considérée comme celle de référence en France.

1. PRÉALABLES INCONTOURNABLES À LA RÉALISATION D'ANTIBIOGRAMMES PAR LA MÉTHODE DES DISQUES DANS UN ÉTABLISSEMENT DE SOINS VÉTÉRINAIRES :

- point de départ indispensable : culture pure du germe à tester,
- application stricte de la norme NF U47-107

2. MATÉRIEL NÉCESSAIRE

- étuve et petits matériels (ampoule de sérum physiologique, écouvillons),
- milieux adaptés :
 - ◇ Mueller-Hinton simple pour les staphylocoques, les entérobactéries et les entérocoques,
 - ◇ Mueller-Hinton au sang pour les streptocoques
- outils de mesure de la densité bactérienne de l'inoculum
 - ◇ densitomètre
 - ◇ milieux étalons de Mac Farland
- disques d'antibiotiques (essentiellement bêta lactamines, macrolides, aminosides, sulfamides et diaminopyrimidines, quinolones)
- souches de référence pour autocontrôles réguliers

3. CHOIX DES DISQUES

Il doit être fait selon l'ordre prioritaire suivant :

- tout d'abord, favoriser l'expression d'une résistance
- ensuite, être représentatif (quand c'est possible) d'une famille d'antibiotiques
- enfin, être utilisé en pratique courante (les disques de spécialités antibiotiques réservées à la médecine humaine ne doivent pas être utilisés).

Pour des géloses rondes classiques, un maximum de 6 disques est utilisable, ce qui est largement suffisant en fonction de l'objectif recherché et des données disponibles d'extrapolation de ces résultats in vitro pour le traitement des mammites bovines.

4. DES LIMITES ?

- la technique des disques n'est pas adaptée à la détermination de la sensibilité des streptocoques à la pénicilline ;
- la technique des disques n'est pas adaptée à la détermination de la sensibilité des colibacilles à la colistine ;
- le test à la céfinase est complémentaire de la méthode des disques pour déterminer la sensibilité des staphylocoques à la pénicilline, surtout ceux dont la résistance est inducible, (information capitale dans la gestion des infections mammaires bovines) mais il ne peut seul déterminer ou non cette sensibilité ;
- la méthode des disques est bâtie sur une extrapolation (lien entre diamètre d'inhibition et concentration d'antibiotique).

Cela a 2 conséquences majeures :

- ◇ la méthode de microdilution en gélose est plus précise car elle détermine des CMI, information plus pertinente qu'un caractère sensible ou résistant,
- ◇ on ne peut aboutir à une information fiable que si on respecte parfaitement le protocole d'analyse précisé par la norme NF U47-107.

5. MAIS AUSSI DES INTÉRÊTS

- mise en évidence des staphylocoques et streptocoques à résistance inducible aux macrolides par juxtaposition des disques d'érythromycine et de clindamycine (forme en D caractéristique) ;
- images en bouchon de champagne autour du disque d'amoxicilline-acide clavulanique pour la détection des colibacilles BLSE ;
- recherche de souches de staphylocoques à résistance inducible à la pénicilline (par test à la céfinase sur les souches récoltées à la limite d'inhibition du disque à la céfoxitine pour *Staphylococcus aureus* et du disque oxacilline pour les staphylocoques non aureus).

6. QUE PEUT-ON EN TIRER ?

- se méfier des extrapolations résultats in vitro – in vivo (interaction majeure avec la pharmacocinétique lors d'infections mammaires),
- très peu d'études ont pu établir un lien entre sensibilité in vitro et amélioration des résultats thérapeutiques sur le terrain. Pour les infections mammaires bovines, ces données existent pour :
 - ◇ la pénicilline et *Staphylococcus aureus*
 - ◇ la céfapirine et les streptocoques
 - ◇ l'association sulfamide-triméthoprime et les colibacilles
- ainsi le nombre de disques pour lesquels une information peut être utile est limité (pour ce qui est des infections mammaires).

7. ALORS, ON FAIT QUOI ?

- **l'antibiogramme par la méthode des disques a plus d'un intérêt dans la maîtrise des infections mammaires :**
 - ◇ pouvoir déterminer les souches potentiellement pathogènes en santé publique (SARM et colibacilles BLSE)
 - ◇ établir un profil d'antibiotypie des souches du même germe circulant dans l'élevage
 - ◇ établir un pronostic de guérison
 - ◇ orienter intelligemment un traitement antibiotique
- **mais il doit absolument être réalisé selon le protocole édicté par la norme 47-107 pour que ses résultats puissent être utilisés,**
- **il doit aussi être interprété par un vétérinaire clinicien expert des infections mammaires, seul capable d'en tirer les informations utiles.**

L'ANTIBIOGRAMME APPLIQUÉ AUX GERMES DE MAMMITES BOVINES

Objectifs : * par la méthode de diffusion en gélose « Méthode des disques » * sur une culture pure du germe à tester	* Identifier la sensibilité du germe aux familles d'antibiotiques utilisés en pratique vétérinaire * Favoriser l'expression d'une résistance
Indication : * Examen entrant dans l'offre de services d'un ESV spécialisé en production laitière	<input type="checkbox"/> Indispensable <input checked="" type="checkbox"/> Utile (Très) <input type="checkbox"/> En urgence au chevet de l'animal <input checked="" type="checkbox"/> Dans un délai rapide pour poser un diagnosti
Avantages : * Utilisation	<input type="checkbox"/> Facile <input checked="" type="checkbox"/> Rapide <input checked="" type="checkbox"/> Disponible <input checked="" type="checkbox"/> Faible coût
Inconvénients/Contraintes : * limites liées à la «méthode des disques» * selon la procédure de la norme NF U47-107	<input checked="" type="checkbox"/> Difficile <input type="checkbox"/> Longue <input type="checkbox"/> Contraignante <input type="checkbox"/> Coût moyen
Apport au diagnostic : Indispensable	<input checked="" type="checkbox"/> Examen d'orientation <input checked="" type="checkbox"/> Examen de confirmation * Sensibilité : 1 2 3 4 5 (de - à +) * Spécificité : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Contrôle qualité : Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Technique manuelle (qualité de la réalisation technique) <input type="checkbox"/> Technique automatisée (contrôle de qualité du matériel et des résultats)
Niveau de technicité requis : Moyen	* Niveau : 1 2 3 4 5 (de - à +)
Coûts des examens : Modéré	Matériel : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Temps passé : <input type="checkbox"/> Bas <input checked="" type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé Prix des réactifs : <input checked="" type="checkbox"/> Bas <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Elevé
Elimination des déchets avec les DASRI :	<input checked="" type="checkbox"/> Oui - spécimens, milieux de culture colorants, matériel de pipetage <input type="checkbox"/> Non
Hygiène et sécurité : * Risque infectieux	* Risque : 1 2 3 4 5 (de - à +)

G. LES ANALYSES SÉROLOGIQUES



Véronique Bachy

Cette fiche décrit les principes et particularités analytiques puis les étapes pré-analytiques des analyses sérologiques. Le choix des analyses à réaliser et les étapes pré-analytiques, du prélèvement à l'expédition au laboratoire, conditionnent la qualité des résultats et leur fiabilité clinique.

L'envoi au laboratoire spécialisé de biologie vétérinaire est indispensable pour obtenir des résultats analytiques quantitatifs certifiés.

Dans certains cas, l'utilisation correcte des tests rapides permet de disposer de résultats qualitatifs ou semi quantitatifs utiles au chevet de l'animal.

OBJECTIF

Recherche d'anticorps (IgG et IgM) dans des échantillons biologiques.

1. PRINCIPE

Mise en évidence de la présence d'anticorps, en général d'IgM et d'IgG en diagnostic de routine vétérinaire, de façon qualitative, semi-quantitative ou quantitative, en fonction de la technique utilisée, à partir de liquides biologiques de nature variée prélevés sur animal vivant ou, beaucoup plus rarement, en post-mortem.

2. PARTICULARITÉS ANALYTIQUES

- L'analyse sérologique peut être réalisée au chevet de l'animal, dans les ESV, lorsqu'elle met en œuvre les techniques d'immunomigration/immunochromatographie (tests rapides), donnant des résultats qualitatifs, ou, plus rarement, semi-quantitatifs.
- L'analyse sérologique mettant en jeu les techniques d'ELISA, d'immunofluorescence indirecte, de Western-Blot, de séroneutralisation, d'inhibition de l'hémagglutination, de microagglutination, doit être réalisée dans des laboratoires d'analyse spécialisés, nécessitant des locaux dédiés et sécurisés ainsi que du matériel spécifique. Ce sont ces laboratoires qui sont responsables de la qualité des résultats. Dans le cas de ces techniques spécialisées, la gestion de la qualité par les ESV se limite à celle des étapes pré-analytiques et est essentielle pour l'analyse ultérieure.

2.1. ETAPES PRÉ-ANALYTIQUES

A. COLLECTE DES SPÉCIMENS : LA QUALITÉ DU RÉSULTAT DÉPEND

- des précautions environnementales : respecter, quand cela est possible, les mesures d'hygiène classiques (préparation de la zone de prélèvement, nettoyage des mains, ports de gants à usage unique ...),
- du matériel de prélèvement utilisé,
 - ◇ à usage unique,
 - ◇ stérile,
 - ◇ tube sec pour le sérum, les liquides d'épanchement, le LCR,
 - ◇ la présence d'activateurs de la coagulation, billes ou gel séparateur dans le tube sec est acceptable

pour l'obtention du sérum (attention, les billes ou les activateurs de coagulation interfèrent avec l'analyse cytologique, ils doivent être réservés à l'analyse sérologique),

◇ jamais d'EDTA dans le tube, la seringue ou le flacon.

- Des modalités de prélèvement

A PROSCRIRE

- les désinfectants/antiseptiques en contact direct avec le liquide biologique,
- les fixateurs (formol ou autre),
- le mélange par le préleveur de sérums de différents animaux,
- les aiguilles dans les tubes contenant les liquides biologiques soumis à analyse,
- l'envoi de sang total non centrifugé avant envoi, notamment si le transport ne s'effectue pas à température contrôlée entre 2 et 8°C. En effet, la lyse des hématies pendant le transport génère un sérum hémolysé, qui interfère avec la qualité de la plupart des analyses sérologiques. Une centrifugation du sang total et prélèvement du sérum uniquement sont toujours recommandés (10 minutes à 1500g),
- le sang total sur tube sec ne doit jamais être congelé

A VALIDER AVEC LE LABORATOIRE

Tout ajout de liquide (nature, volume) pouvant modifier le titre sérologique.

RECOMMANDÉ

production des IgM demande environ 5 à 7 jours et celle des IgG environ 15 jours.

- si le prélèvement est réalisé en tout début d'évolution (moins de 6 jours), alors la réalisation d'une cinétique sérologique est nécessaire (cinétique à 15 jours la plupart du temps, jusqu'à 6 semaines pour certains agents pathogènes, à valider avec le laboratoire),
- une cinétique sérologique est toujours intéressante et la séroconversion permet d'objectiver une infection récente, plutôt qu'une trace de contact ancien,
- prendre en compte le fait qu'un chiot ou un chaton peut présenter des anticorps d'origine maternelle jusqu'à 3 mois et un poulain sous la mère ou un veau jusqu'à 6 mois environ

B. CONSERVATION DES SPÉCIMENS AVANT ENVOI AU LABORATOIRE SPÉCIALISÉ

A PROSCRIRE

- exposition directe à la lumière, à la chaleur,
- congélation du sang total,
- ajout de formol,

RECOMMANDÉ

- centrifugation (10 minutes à 1500g) puis collecte du sérum dans les 4h suivant le prélèvement (à défaut, coagulation pendant 30 minutes à 2h puis prélèvement du sérum après décantation),
- réfrigération en attente de l'envoi (le titre en anticorps reste stable environ 7 jours de 2 à 8°C sur sérum et liquides d'épanchement),
- congélation pour le sérum qui ne peut pas être expédié sous 48h

C. EXPÉDITION VERS LE LABORATOIRE

- matière infectieuse de catégorie B (UN3373), bien que le sérum contienne en général moins d'agents pathogènes que certains tissus,
- triple emballage requis pour protéger les spécimens et absorber la totalité des liquides en cas de casse,
- expédition rapide et suivie (Chronopost, TNT ...) à température contrôlée de 2 à 8°C (pain de glace le cas échéant), le transport à température ambiante reste possible mais est moins recommandé.

2.2. ETAPES ANALYTIQUES POUR LES TESTS SÉROLOGIQUES POUVANT ÊTRE EFFECTUÉS EN ESV

(Tests rapides par Immunomigration / immunochromatographie)

A PROSCRIRE

- utilisation d'un lot périmé, sauf si autorisation exceptionnelle du fournisseur,
- utilisation d'un lot non conservé à la température recommandée avant utilisation,
- non respect des recommandations techniques précises du fournisseur,
- travail à température non contrôlée, exposition forte à la lumière, à la chaleur ou au froid <15 °C la température ambiante doit être comprise entre 15 et 25 °C,
- travail sur une surface non plane,
- manipulation manuelle du dispositif pendant la migration et le temps d'incubation,
- utilisation de sérums ou plasmas très hémolysés,
- non vérification de la validité des contrôles internes du test

RECOMMANDÉ

- toujours respecter scrupuleusement les recommandations du fournisseur,
- pour les kits conservés entre +2 et +8°C, ramener le dispositif à température ambiante selon les recommandations du fournisseur,
- utilisation de sérum, plasma hépariné ou sang total, selon les recommandations du fournisseur,
- respecter les volumes de sang ou de sérum à déposer (l'achat d'une pipette peut être recommandé si nécessaire) ; l'utilisation d'un volume trop faible ou trop important interfère de manière directe avec la qualité des résultats,
- respecter le temps d'incubation, à vérifier au chronomètre dans la mesure du possible - un temps de migration ou d'incubation trop court ou trop long avant lecture interfère notablement avec les résultats,
- vérifier les contrôles internes et respecter la règle d'interprétation donnée par le fournisseur,
- en cas de doute sur la lecture et l'interprétation, valider avec l'équipe technique du fournisseur

POUR EN SAVOIR PLUS :

Markey B., Leonard F, Archambault M., Cullinane A., Maguire D., Serological Diagnosis, in Clinical Veterinary Microbiology Second Edition, Mosby Elsevier, 2013, Chapter 3, p.49-58

(Référence bibliographique de base)

<https://tools.cofrac.fr/documentation/LAB-GTA-27> : Guide COFRAC

H. LES ANALYSES PCR *



Corine Boucraut-Baralon

Cette fiche décrit les principes et conditions pré-analytiques d'utilisation de ces analyses.

Le lecteur peut trouver les indications de ces analyses dans la fiche 3.7.3. « Analyse bactériologique en laboratoire : l'existant et le futur ».

Un encadré apporte la description des principes analytiques de la technique PCR.

OBJECTIFS

- Détection et caractérisation d'agents infectieux (quantification, typage de souches...)
- Analyses génétiques (détection de mutations ou autres polymorphismes génétiques, ie détection de gènes de virulence, ou d'antibiorésistance).

*PCR = **Polymerase Chain Reaction**

1. PRINCIPE

Mise en évidence de fragments de génomes, quantification et éventuellement caractérisation (souches, détection de mutations) à partir de spécimens de nature variée prélevés sur animal vivant ou en post-mortem.

2. PARTICULARITÉS ANALYTIQUES

La PCR ne peut être actuellement réalisée que dans des laboratoires d'analyse spécialisés, nécessitant des locaux dédiés et sécurisés ainsi que du matériel spécifique. Ce sont ces laboratoires qui sont responsables de la qualité des résultats. Par conséquent, la gestion de la qualité par les ESV se limite à celle des étapes pré-analytiques et est essentielle pour l'analyse ultérieure.

Lorsqu'ils sont quantitatifs, les résultats de PCR sont exprimés en nombre de copies de séquence cible / analyse ou par volume de spécimen ce qui implique l'intégration d'une gamme étalon. Les résultats parfois donnés sous forme de Ct (Cycle threshold ou cycle seuil) permettent une estimation semi-quantitative, sans gamme étalon ; il n'est pas possible de comparer les résultats de Ct d'analyses effectuées sur des séries d'analyse différentes car les Ct dépendent des conditions d'analyse et de réglage des seuils de positivité.

[NB : Des techniques moléculaires alternatives, différentes de la PCR (amplification isotherme), sont disponibles depuis peu pour une utilisation en clinique vétérinaire. Il existe peu de données indépendantes publiées sur les performances de ces tests dans les conditions d'utilisation recommandées. Les conditions pré-analytiques décrites dans cette fiche ne sont valides que pour les analyses PCR].

La qualité du résultat dépend d'une réalisation performante des étapes pré-analytiques :

2.1. COLLECTE DES SPÉCIMENS

- des précautions environnementales (au minimum nettoyage des mains à l'eau savonneuse avant le prélèvement, port de gants à usage unique recommandé),
- du matériel de prélèvement utilisé
 - ◇ à usage unique,

- ◇ tube EDTA pour le sang ou la moelle osseuse, tube sec ou EDTA pour les fluides et les cytoponctions; tube sec pour les biopsies et les raclages cutanés,
- ◇ utilisation d'écouvillons coton ou de cytobrosses stériles,
- ◇ jamais d'héparinate de lithium dans les contenants même sous forme de trace : bille retirée, tube rincé...);
- des modalités de prélèvement (à adapter à la nature du ou des spécimens prélevés)

À PROSCRIRE

- Les désinfectants/antiseptiques en contact direct avec le spécimen
- Les fixateurs (formol ou autre) pour les tissus
- Les écouvillons conditionnés dans une gélose (perte de matériel biologique, sensibilité moindre)
- Le mélange par le préleveur de spécimens destinés à être analysés en pool
- Le transfert du spécimen d'un tube à un autre contenant (le tube primaire peut ne pas convenir)
- Les lames de scalpel, aiguilles dans les tubes contenant les spécimens

À VALIDER AVEC LE LABORATOIRE

- Tout ajout de liquide (nature, volume)
- Utilisation des anesthésiques locaux, collyres à la fluorescéine (possible si le test a été validé en présence de ces milieux)

RECOMMANDÉ

- Faire le prélèvement en début d'évolution clinique et avant la mise en place de traitements spécifiques (antibiotiques, anti-viraux...)
- Faire plusieurs prélèvements (localisations multiples, sur plusieurs jours...) selon l'indication (recherche d'agents infectieux) – Validation des spécimens à prélever en fonction des signes cliniques/durée d'évolution/âge de l'animal auprès du laboratoire
- Utilisation de stabilisateurs de type DNA Shield™ ou RNA later™ si conservation sur le long terme (plusieurs semaines).

2.2. CONSERVATION DES SPÉCIMENS AVANT ENVOI

La PCR est peu sensible aux conditions de stockage des spécimens sur des périodes courtes, la viabilité des agents infectieux n'étant pas nécessaire pour l'analyse.

A PROSCRIRE

- exposition directe à la lumière, à la chaleur
- congélation du sang
- congélation des fluides (LCR, humeur aqueuse) sauf si l'expédition est réalisée à température négative
- la fixation des tissus

RECOMMANDÉ

- réfrigération en attente de l'envoi (max 1 semaine pour sang, épanchements, écouvillons) – NB : jusqu'à 1 mois à température ambiante (max 25°C) en présence d'un stabilisateur.
- congélation pour les tissus qui ne sont pas expédiés dans les 48h ou les écouvillons conservés plus d'une semaine.

2.3. EXPÉDITION VERS LE LABORATOIRE :

SPÉCIMENS NON STABILISÉS

- matière infectieuse de catégorie B (UN 3373),
- triple emballage requis pour protéger les spécimens et absorber la totalité des liquides en cas de casse,
- expédition rapide et suivie (Chronopost...) à température ambiante

SPÉCIMENS STABILISÉS

- Considérés comme non infectieux et stables à température ambiante sur plus d'un mois.

POUR EN SAVOIR PLUS

Fiche .3.7. C : Analyse bactériologique en laboratoire, l'existant et le futur § 3

4

QUELLE STRATÉGIE ANALYTIQUE POUR MON ESV ?

Un choix d'équipements de laboratoire bien adapté

- 4.0 Stratégie des analyses de laboratoire en ESV - **F. Bussieras**
- 4.1 Mes besoins pour le chien et le chat - **F. Bussieras**
- 4.2 Mes besoins en pratique équine - **M. Hasdenteufel**
- 4.3 Mes besoins pour les ruminants - **O. Salat**
- 4.4 Mes besoins pour les NAC - **S. Sauvaget**



STRATÉGIE DES ANALYSES DE LABORATOIRE DANS LES ÉTABLISSEMENTS DE SOINS VÉTÉRINAIRES (ESV)

Françoise Bussiéras

Aujourd'hui, la plupart des Etablissements de Soins Vétérinaires (ESV), quel que soit leur domaine d'activité, sont équipés d'un laboratoire leur permettant de réaliser des analyses biologiques au chevet de l'animal.

C'est une vraie plus-value :

- pour l'animal : l'interprétation des résultats est sécurisée par le fait que le praticien soit présent tout au long du processus pré-analytique et analytique, les résultats sont souvent obtenus avant la fin de la consultation et contribuent à un diagnostic précis, avec une prise de décision thérapeutique rapide et efficace,
- pour son propriétaire : les prélèvements sont réalisés lors de la consultation sans que le détenteur de l'animal n'ait à prendre un autre rendez-vous décalé dans le temps et dans l'espace,
- pour l'entreprise : le bénéfice économique de ces analyses contribue au bénéfice global de la structure, ce qui permet au professionnel de ne pas faire porter sur le seul prix des actes médicaux ou chirurgicaux la rémunération de son équipe.

Ces bénéfices imposent cependant au praticien des contreparties qu'il ne doit pas minorer :

- un engagement sur la qualité des résultats obtenus, avec des opérations de contrôle et de calibration effectuées régulièrement,
- un devoir de sécurité envers lui-même et son équipe, en évitant tout risque de zoonose ou de contamination infectieuse à partir des spécimens traités,
- la connaissance de ses limites et de celles de ses équipements, qu'elles soient analytiques, réglementaires ou sécuritaires, et la sagesse de toujours référer à bon escient dans un laboratoire de biologie vétérinaire les analyses qui le nécessitent.

Cet ouvrage a été conçu par Qualitévet pour permettre au vétérinaire de satisfaire à ces bonnes pratiques dans chaque domaine de la biologie clinique. Il pourra ainsi conserver la confiance de ses clients et celle de l'Etat pour une profession réglementée.

Les quatre fiches suivantes intitulées : Quelle stratégie analytique dans mon ESV pour le chien et le chat, les chevaux, les ruminants, les NAC ? sont le témoignage de l'expérience de leur auteur.

Elles cherchent à nourrir la réflexion de ceux qui se posent la question de la mise en place ou de l'évolution de leur laboratoire d'analyses.

Points essentiels de la stratégie d'utilisation des examens de biologie clinique en ESV :

- **Internaliser ses analyses implique la formation des praticiens et des ASV, du temps et de l'espace dédiés au laboratoire**
- **La maîtrise complète de la démarche diagnostique est une vraie opportunité pour obtenir un résultat rapide et fiable.**
- **Il faut trouver le bon équilibre entre la volonté d'améliorer la qualité des diagnostics, la prise en charge des patients et le retour sur investissements.**
- **La facilité d'utilisation des analyseurs ou des tests en ESV ne doit pas faire oublier la rigueur dans leur réalisation ni la prudence dans leur interprétation.**
- **Le contrôle permanent de la qualité des analyses et la validation des résultats sont ESSENTIELS.**
- **Pour les analyses externalisées, les échanges avec un biologiste vétérinaire sont une vraie valeur ajoutée..**

QUELLE STRATÉGIE ANALYTIQUE DANS MON ESV POUR LE CHIEN ET LE CHAT ?

Françoise Bussiéras

Le nombre et la fréquence des analyses de laboratoire à réaliser en clinique des animaux de compagnie ne fait que croître.

L'offre en matériels et réactifs à la disposition de l'ESV permet la réalisation des analyses les plus fréquentes au chevet de l'animal.

En complément, les laboratoires de biologie vétérinaire vont proposer une large palette d'examen indispensables pour le diagnostic de nombreuses affections.

1. ANALYSES EN ESV : MATÉRIELS UTILISÉS ET RAISONS DE LEUR CHOIX

1. EQUIPEMENTS DE PAILLASSE

Ces équipements représentent un investissement raisonnable étant donné leur utilisation quotidienne et leur durabilité au fil des ans.

- Microscope, lames et lamelles, colorants rapides, lactophénol, huile à immersion : c'est la base du laboratoire qui permet même en dehors de tout autre équipement de réaliser des examens hématologiques, parasitaires ou cytologiques pertinents.
- Réfractomètre : utilisation souvent limitée à une mesure de densité urinaire ou de protéines totales, mais vu son coût et la fréquence de ces analyses, il ne faut pas s'en passer.
- Centrifugeuse : indispensable pour séparer sérum ou plasma (pour certains envois d'analyses externalisées), réaliser un culot urinaire ou de liquide d'épanchement.

2. ANALYSEURS

- Analyseurs de biochimie et d'hématologie : à moins d'avoir un laboratoire vétérinaire à proximité, ils sont devenus indispensables depuis que les laboratoires de biologie humaine n'ont plus le droit de traiter des spécimens vétérinaires.
- Analyseurs pour l'endocrinologie : ils sont facultatifs car ces analyses peuvent être externalisées, ou certaines sont devenues accessibles sur un analyseur de biochimie classique. Par expérience, la réalisation de ces analyses dans l'ESV améliore le suivi clinique des animaux.

3. TESTS RAPIDES

- Les Tests Rapides à Orientation Diagnostique (TROD) sont disponibles en très grand nombre autant pour les chiens que pour les chats. Leurs principaux atouts sont la facilité d'utilisation et la rapidité des résultats, cependant ils vont parfois nécessiter une confirmation par un test externalisé. Ils sont essentiellement fondés sur une recherche d'antigènes ou d'anticorps, mais aussi disponibles pour d'autres analyses. Il faut bien comparer les différents fournisseurs non seulement sur le prix, mais aussi sur leur validation scientifique, valeur légale, sensibilité/spécificité, mode de conservation, température d'utilisation, quantité par unité de commande et dates de péremption.

- On peut ajouter à cette catégorie tous les tests sur bandelettes, soit à lecture immédiate comme des tests urinaires, ou nécessitant un appareil de lecture comme les tests de coagulation, et certains kits de réactifs pour examen au microscope tels les kits de coproscopie ou de coloration vaginale. Les tests mycologiques ne sont intéressants que s'ils sont utilisés avec une étuve et une lecture microscopique.

2. EXAMENS EXTERNALISÉS

- Certaines analyses biochimiques complexes
 - Histologie
 - Analyses bactériologiques, virologiques, mycologiques ou sérologiques
 - Recherches génétiques
 - Etc...
- ◇ Plusieurs laboratoires peuvent être nécessaires pour réaliser ces examens.
 - ◇ On les choisira selon plusieurs critères, le premier étant la possibilité de discuter avec le biologiste sur l'interprétation des résultats. Ensuite on regardera par exemple si le laboratoire est en France, s'il est spécialisé pour les chiens et les chats (certaines analyses ne sont pas transposables d'une espèce à l'autre), s'il y a bien un vétérinaire spécialiste diplômé en biologie, si l'expédition des prélèvements est facilitée, et enfin les délais d'obtention des résultats et les modes de consultation de ceux-ci.
 - ◇ Le prix n'est pas un critère majeur tant les autres sont importants pour obtenir un résultat pertinent. On pourra aussi regarder si le laboratoire se positionne dans une démarche écoresponsable. La liste des laboratoires inscrits à l'Ordre est disponible sur le site du CNOV.
 - ◇ Pour en savoir plus lire la fiche 3.7.2. « Externaliser en confiance ses analyses dans un laboratoire spécialisé ».

3. CRITÈRES DE DÉCISION

- Rapidité d'obtention des résultats : c'est la principale valeur ajoutée du laboratoire d'un ESV, et même si parfois elle engendre un surcoût par rapport à un examen externalisé, elle permet souvent un meilleur suivi clinique des animaux qui sera très apprécié par leurs détenteurs.
- Compétences requises pour leur utilisation : il faut être rigoureux même sur les examens les plus faciles à réaliser, donc un minimum de formation ou d'information est toujours nécessaire quand ces tests sont nouveaux dans l'établissement ou réalisés par une personne non entraînée. Certaines techniques vont nécessiter une formation plus pointue, et donc parfois une seule personne capable de l'utiliser, comme les analyseurs de biochimie à base de chimie liquide, avec pour avantage un coût des réactifs minoré.
- Coût : pour l'évaluer il faut inclure le coût des appareils de mesure, des réactifs (avec leur durée de péremption), le temps passé et la formation nécessaire ; à mettre en parallèle avec la fréquence d'utilisation de l'analyse et la pertinence d'un résultat.
- SAV, service technique en ligne : c'est une valeur ajoutée à prendre en compte dès le départ, il faut bien penser à interroger les fournisseurs mais aussi les confrères déjà utilisateurs avant une décision d'achat, leur retour d'expérience est souvent riche d'enseignements.

- Contrôles qualité : ils sont indispensables et nécessitent un minimum de traçabilité. Il faut prendre le temps de noter les contrôles effectués, même les plus simples, sur un registre dédié, avec les dates d'achat et de péremption des réactifs. Ils donnent une valeur à la fois scientifique et légale à l'utilisation du laboratoire dans les ESV. Il faut s'organiser, souvent en dédiant une personne à sa réalisation, pour le faire à intervalles de temps réguliers.
- Sécurité : elle est liée à la fois à l'utilisation d'appareils et de réactifs, mais aussi à la manipulation de spécimens potentiellement contaminants pour l'humain ou les animaux. Tous les risques doivent être évalués et notés dans le registre des risques de l'établissement, avec une attention particulière aux produits interdits à la manipulation par une femme enceinte.
- Valeur légale : la validation ou la confirmation d'un résultat par un laboratoire de Biologie inscrit à l'Ordre des vétérinaires ou agréé pour certaines analyses est parfois indispensable en cas d'expertise juridique.

QUELLE STRATÉGIE ANALYTIQUE DANS MON ESV EN PRATIQUE ÉQUINE ?

Marc Hasdenteufel

La pratique équine a ses spécificités : exercice ambulatoire ou en clinique, médecine individuelle, de sport ou de compagnie, pathologies diverses : de la reproduction à l'élevage, de la médecine à la chirurgie, toutes exigeantes en diagnostic et en analyses de laboratoire.

Quelle place attribuer aux analyses réalisées au chevet de l'animal, avec quel matériel ?

Et quelles sont les analyses à externaliser ?

Les examens complémentaires en biologie équine, comme pour toutes les espèces animales, sont indispensables à l'application d'une médecine vétérinaire performante, pertinente, dans le respect de nos patients, nos clients et des règles de déontologie (avancée de la science, plan éco-antibio, vermifugation raisonnée...).

Un examen biologique s'effectue sur un spécimen obtenu par prélèvement. Ce spécimen sera manipulé, transporté, conservé, transformé, acheminé puis exploité selon différentes techniques afin de lui soutirer des informations utiles voire indispensables à la bonne prise en charge du cas dont il est issu.

Toutes ces étapes : prélèvement, analyse, interprétation ont un coût, induisent plus ou moins de risques et de responsabilités. Il faut donc raisonner l'examen biologique, l'optimiser.

De quoi ai-je besoin ? Quelle technique de prélèvement pour quel type d'analyse ? Vais-je réaliser l'analyse moi-même – quel équipement, quel temps passé, ... - ou vais-je sous-traiter l'analyse en recourant à un laboratoire de biologie animale ?

Je fais ici part de mon retour d'expérience : celui d'une pratique de trente années en activité équine exclusive, 10 ans en ambulatoire, 20 ans au sein d'une clinique de six associés équins à l'activité équine très polyvalente.

1. ANALYSES EN ESV : MATÉRIELS UTILISÉS

1.1 EQUIPEMENT DE PAILLASSE

- un microscope, lames et lamelles,
- une centrifugeuse à mini-tubes, acceptant un plateau à capillaires pour réaliser des micro-hématocrites ; deux centrifugeuses acceptant des tubes vacutainer et des grosses seringues,
- un réfractomètre,
- une balance de précision,
- le petit matériel nécessaire à la coproscopie.

1.2 ANALYSEURS OU ROBOTS AUTOMATES

- automate d'analyse hématologique,
- automate d'analyse biochimique.

1.3 PETITS ANALYSEURS PORTABLES ET KITS

- petit analyseur portable : dosage rapide et semi-quantitatif de la Sérum Amyloïde A protéine ou SAA,
- kits d'analyses rapides IgG Foal test : dosage rapide semi-quantitatif des immunoglobulines du poulain nouveau-né,
- bandelettes urinaires.

2. ANALYSES EN ESV : MODE D'UTILISATION

2.1 MATÉRIEL DE PAILLASSE

2.1.1 LE MICROSCOPE

Le microscope est utile dans bien des situations ; il sera disposé dans un espace dédié, qui permettra un minimum d'aise au manipulateur.

- Examen microscopique de liquides de ponctions diverses - liquide abdominal, liquide synovial, liquide pleural, autres : l'examen d'une lame par un œil compétent permet souvent d'orienter un traitement en première intention – présence de bactéries, quantité et aspect des globules blancs, inclusion de bactéries dans des GB - voire de préciser un pronostic.
- Idem pour les prélèvements trachéaux, les frottis utérins : la quantité de cellules, la nature de ces cellules, la présence de bactéries, voire d'hyphe ou autres contaminants seront appréciées. Il va de soi que pour allier savoir-faire et compétence il faut répéter de tels examens. Ceci sera vrai en cas d'activité importante en gynécologie ou médecine interne.
- En revanche, dans notre pratique, nous n'évaluons que très rarement des étalements de sang (analyses de la lignée des globules rouges et de leurs inclusions comme les parasites intraglobulaires, de la lignée des blancs), des cyto-ponctions ganglionnaires ou nodulaires car les informations recherchées sont hors de nos compétences en cytologie.
 - ◇ Cela nécessite l'œil d'un spécialiste et nous externalisons donc ce type d'analyses.
- Examen coproscopique : simple à mettre en œuvre, il permettra notamment de raisonner au mieux la vermifugation.
- Examen de prélèvements cutanés : en dermatologie aussi l'examen d'un raclage cutané sous microscope apporte régulièrement des informations diagnostiques, en cas de parasitisme par exemple.

Tous ces exemples montrent combien le microscope est utile au quotidien et très accessible. La pertinence des résultats demandera un investissement personnel moyen (courbe d'apprentissage rapide), l'ensemble des manipulations est plutôt rapide et l'apport à la pratique quotidienne est fort.

2.1.2 LE RÉFRACTOMÈTRE

Densité urinaire, protéines des fluides. Le réfractomètre est d'un investissement modéré et ne demande que peu d'entretien; il donne l'information recherchée en très peu de temps.

2.2 PETITS ANALYSEURS ET KITS

Ce matériel, miniaturisé et souvent autonome en énergie quand il en nécessite, est utilisable en clinique mais aussi dans les écuries : c'est là un atout majeur. Pour cette même raison, son utilisation est toujours facilitée par le fabricant : instructions d'utilisation affichées directement sur l'écran des petits analyseurs ou décrites sur un feuillet explicatif pour les kits.

Mais il faut toutefois bien maîtriser leur manipulation lorsqu'on les utilise à toute heure et dans toutes les conditions de travail, afin d'obtenir un résultat d'analyse pertinent et fiable. Il faut également respecter les conditions de conservation des consommables, le cas échéant, ainsi que leur date de péremption.

Les petits analyseurs et kits (aussi bien utilisables en clinique qu'en activité ambulatoire) rendent accessibles bien des constituants essentiels. Parmi eux je veux citer :

- micro-hématocrite (grâce à une micro centrifugeuse),
- glucoses,
- lactates,
- SAA,
- IgG (poulain nouveau-né),
- analytes urinaires.

Ce même équipement permet de temporiser l'achat d'analyseurs plus onéreux.

2.3 LES ANALYSEURS

Après environ trois ans d'externalisation exclusive des examens sanguins, nous avons décidé d'investir dans des automates d'analyses hématologiques, biochimiques et électrolytiques.

Lors de la décision d'investissement, en plus de l'achat du matériel, il faut penser à l'espace nécessaire à l'installation - même si les fournisseurs produisent des analyseurs de moins en moins volumineux - à la température du local (certains robots ne fonctionnent que dans une fourchette de température ambiante), et à la disposition de multiples prises secteur.

Nous avons donc équipé un laboratoire au sein de notre structure, ceci motivé par le volume croissant d'analyses soumises au laboratoire de biologie animale, et par le manque de recours possible en dehors des horaires d'ouverture (malgré la grande souplesse du laboratoire), afin de répondre au mieux à nos besoins d'activité permanente, 24h/24, 365 jours par an, donc week-ends et jours fériés inclus. Cela s'est fait également en fonction de nos goûts et compétences, mais aussi d'un calcul de retour sur investissement favorable. Ce calcul est indispensable lorsque l'investissement dépasse plusieurs dizaines de k€.

Afin d'optimiser cet investissement financier, il était également important d'obtenir l'assentiment et l'investissement personnel de tous les vétérinaires et auxiliaires. Aujourd'hui, tous les praticiens plus une auxiliaire effectuent les analyses, c'est-à-dire 9 personnes sur les douze de notre équipe.

Des contrôles réguliers de la qualité des résultats rendus sont également indispensables, ainsi qu'une maintenance fiable car une panne d'un matériel non remplacé peut être très déstabilisante pour l'activité quotidienne.

2.3.1 COMPTEUR D'HÉMATOLOGIE

Notre équipement nous permet donc de réaliser des analyses hématologiques, très couramment utilisées dans le suivi sportif des chevaux de compétition (courses comme autres disciplines équestres), face à tout cheval fébrile, et encore dans bien des cas d'atteinte des appareils respiratoire, digestif ou même locomoteur afin de préciser si nous avons affaire à un sepsis, par exemple. Enfin, certains éléments du profil hématologique sont essentiels pour mener à bien des soins intensifs dans de nombreux cas d'urgence : hématocrite, concentration d'hémoglobine, leucocytes notamment.

Nota : il est très intéressant d'être équipé d'un robot analyseur acceptant des fluides autres que le sang : liquide de ponction abdominale, pleurale, liquide synovial. Une analyse rapide - notamment recherche de la présence de leucocytes (nature, quantité) dans ces liquides - est souvent requise dans la prise en charge urgente de cas en syndrome douloureux abdominal aigu, atteinte respiratoire avec pleurésie, boiterie grave avec distension articulaire ou synoviale tendineuse.

Pour qui a une activité polyvalente, il est très important de pouvoir paramétrer son analyseur hématologique aux caractéristiques des cellules sanguines des équidés. Nous avons opté pour un coulter utilisant une triple technologie de comptage. Le choix pourra être également influencé par le traitement post-analytique du résultat et l'intégration dans le réseau informatique de la clinique notamment.

2.3.2 ANALYSEUR DE BIOCHIMIE

D'un recours fréquent chez les chevaux, le nôtre utilise des plaquettes de chimie sèche à conserver au congélateur. La plupart des fournisseurs proposent des consommables permettant l'analyse d'un constituant unique mais aussi des profils biochimiques standardisés, aux multiples analytes, plus ou moins complets. Le choix des uns ou des autres est souvent guidé par un compromis entre recherche d'information et coût pour le propriétaire.

En activité équine, il est incontournable de pouvoir analyser les enzymes musculaires, les lactates ; bien entendu d'autres constituants sont accessibles sur notre équipement sauf ceux de la physiologie de la reproduction ou de l'endocrinologie large.

2.3.3 ANALYSEUR D'ÉLECTROLYTES ET GAZ DU SANG

Ces paramètres sont importants pour la gestion de cas graves de pathologies digestives, pour les nouveau-nés et aussi lors d'anesthésies générales longues ou délicates.

En ce qui concerne notre équipement pour ces analyses, les consommables sont chers et la péremption souvent courte : ces éléments sont importants à considérer lors du choix de son équipement.

Tous ces équipements ont été renouvelés déjà plusieurs fois en 20 ans ; leur entretien est assuré par notre auxiliaire formée à cela. Il faut préciser que chaque appareil annonce et décrit son propre entretien au fur et à mesure des analyses effectuées.

3. LES ANALYSES EXTERNALISÉES

A contrario, certains équipements et types d'analyses n'ont pas trouvé place dans notre clinique alors que nous y avons recours quasi quotidiennement.

- La bactériologie : il est évident que pour pratiquer une médecine performante et travailler dans le cadre rigoureux du plan éco-antibio, nous avons recours très fréquemment à des prélèvements soumis à analyse bactériologique.
 - ◇ Et pourtant, la rigueur des technologies nécessaires, les risques encourus par les manipulateurs, la formation nécessaire afin de maîtriser ce domaine sont autant de facteurs qui continuent à plaider contre notre investissement en la matière au sein de notre structure.
 - ◇ Chacun devra évaluer selon son activité l'avantage de réaliser ce type d'analyse dans sa structure, la formation nécessaire pour en acquérir la compétence, les contraintes d'installation et les risques encourus.
- Les kits multiples de tests de biologie moléculaire : jusqu'à présent nous privilégions le recours aux laboratoires agréés, malgré les essais répétés que nous en avons faits à la clinique. Nous n'arrivons pas à un niveau de confiance satisfaisant, face à l'attente diagnostique liée aux résultats.
- L'histologie est entièrement externalisée en ce qui nous concerne alors même que les prélèvements histologiques sont très fréquents en activité équine (dermatologie, gynécologie,...) L'anatomopathologie est une spécialité pointue ; à tel point qu'il n'est pas rare de soumettre nos prélèvements à des laboratoires différents en fonction de l'organe concerné.

Et peut-être d'autres facteurs que j'oublie ici mais que chacun retiendra selon sa propre sensibilité ; Il faut, en tout cas, être conscient de toutes les règles de bonnes pratiques des analyses envisagées :

- ◆ et cela depuis le mode de prélèvement jusqu'à la restitution du résultat au client,
- ◆ avec la rigueur du contrôle permanent de la qualité de ces étapes.

CONCLUSION

Je n'ai eu ici nulle ambition de citer de façon exhaustive les examens complémentaires utiles et nécessaires à une bonne pratique vétérinaire équine, mais plutôt de témoigner que lorsque les équipements sont choisis en fonction de besoins clairement définis, les équipes humaines déterminées, le retour sur investissement sera positif et la pertinence et la performance des soins améliorées.

QUELLE STRATÉGIE ANALYTIQUE DANS MON ESV POUR LES RUMINANTS ?

Olivier Salat

La spécificité des productions animales en particulier de la production de lait implique un développement important des besoins en analyses biologiques adaptées tant pour la reproduction et l'élevage que pour les maladies métaboliques des vaches laitières et la qualité du lait.

Les examens complémentaires entrepris peuvent se décliner tant dans le cadre de la médecine individuelle que dans celui de la médecine de troupeaux.

1. ANALYSES EN ESV : MATÉRIELS UTILISÉS.

1.1 MATÉRIEL DE PAILLASSE

- 2 microscopes (1 pour les coproscopies, 1 pour les autres types d'analyse),
- 1 centrifugeuse,
- 1 réfractomètre + plusieurs réfractomètres BRIX (optique et électronique),
- 2 pèse colostrum,
- solutions saturées en sel ou en sulfate de zinc (flottation pour coproscopies),
- kit de coloration MGG RAL.

1.2 ANALYSEURS

- 2 analyseurs de gaz sanguins dont 1 portable pour intervention sur le terrain (coût d'analyse, variété des analyses),
- 1 compteur d'hématologie pour numération et formule sanguine (NFS) commun avec les petits animaux (étalonnage bovin, fiabilité de l'analyse [technologie triple]),
- 1 analyseur de biochimie, commun avec les petits animaux (absence d'étalonnage, souplesse, interface avec logiciel pro),
- 1 analyseur de biochimie portable pour paramètres spécifiques peripartum : AGNE, Ca, Mg, lactates (spécificité, ambulatoire).

1.3 MATÉRIEL / EXAMENS CELLULAIRES ET BACTÉRIOLOGIQUES DU LAIT, ET ANTIBIOGRAMMES

- 1 analyseur de la quantité de cellules somatiques du lait,
- plusieurs étuves simples (coût et fiabilité),
- petit matériel nécessaire : anses, coton tiges, ampoules de sérum physiologique,
- kit de coloration de Gram,
- divers types de géloses et milieux, des kits de réactifs pour caractériser les caractères phénotypiques des bactéries, disques d'antibiotiques, conservés dans enceinte réfrigérée dédiée,
- milieux de Mac Farland pour mesure de concentration de l'inoculum bactérien (coût).

1.4 TESTS RAPIDES D'ORIENTATION DIAGNOSTIQUE (TROD)

- kit d'identification des principaux agents pathogènes des diarrhées néonatales,
- petits appareils portables pour mesures corps cétoniques, glycémie et lactates.

2. BESOINS EN MÉDECINE INDIVIDUELLE

2.1 ANALYSES RÉALISÉES EN ESV

2.1.1 ANALYSES EN HÉMATOLOGIE ET BIOCHIMIE

- Automates d'hématologie : numération-formule sanguines.
- Automates de biochimie, pour la mesure des constituants suivants :
 - ◇ calcium, magnésium, phosphore, +/- créatine kinase (CPK) sur les vaches couchées,
 - ◇ urée, créatinine pour la fonction rénale,
 - ◇ protéines totales (PT), albumine, bilirubine, ASAT et GGT pour la fonction hépatique.
- Centrifugeuse : différenciation hématurie – hémoglobinurie.
- Réfractomètre (et centrifugeuse) : fibrinogène.
- Frottis sanguin et coloration : hémoparasitoses.

2.1.2 ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

Technique simple, de coût réduit, avec des résultats rapides, mise en œuvre 7 jours/7.

- bactériologie du lait par culture bactérienne et méthodes phénotypiques simplifiées : identification de plus de 90% des agents pathogènes impliqués dans les infections mammaires (cf fiche infectiologie),
- antibiogramme par méthode des disques : réalisation se conformant exactement aux instructions de la norme U47-107, utilisation et interprétation par un clinicien (mise en perspective directe résultats in vitro et clinique).

2.2 EXAMENS EXTERNALISÉS

Ces examens sont externalisés pour les raisons suivantes : matériel onéreux (MALDI TOF [Matrix Assisted Laser Desorption ionization – Time Of Flight], PCR [Polymerase Chain Reaction]), technique nécessitant une formation spécifique (PCR, histologie), techniques trop chronophages (PCR), demandes trop ponctuelles (protéines de la phase aiguë) ou compétence tout à fait spécifique (histologie) :

- Analyses virologiques (PCR) :
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes abortifs,
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes respiratoires.
- Analyses bactériologiques diverses (MALDI TOF ou PCR) :
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes abortifs,
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes respiratoires.
- Mesure des protéines inflammatoires de la phase aiguë (haptoglobine).
- Analyse histologique.
- Analyse génomique (recherche free martinisme, recherche de tares génétiques).

3. BESOINS EN MÉDECINE DE TROUPEAU

3.1 ANALYSES RÉALISÉES EN ESV

Conditions requises : maîtrise des coûts (autorisant la réalisation de ces examens sur un échantillon représentatif d'animaux), fiabilité des appareils utilisés, résultats immédiats (ou très rapides), adéquation chronologique entre demandes des éleveurs et obtention de résultats permettant des applications thérapeutiques ou préventives immédiates :

- bactériologie du lait par culture bactérienne et méthodes phénotypiques simplifiées,
- mesure des concentrations cellulaires du lait (au niveau du tank ou individuel),
- lecteur portable Abbott freestyle® pour dosage bêta hydroxy butyrate, glycémie, lactate,
- analyseur Vetphotometer pour dosage acides gras non estérifiés et calcium,
- réfractomètre ou réfractomètre Brix pour juger la qualité du colostrum et le transfert colostrale,
- coproscopie (techniques de Mc Kenna et de flottation),
- kits d'identification des agents pathogènes des diarrhées néonatales.

3.2 ANALYSES EXTERNALISÉES

Indications : ce sont les mêmes raisons que pour la médecine individuelle auxquelles on peut ajouter la nécessité éventuelle d'une accréditation (type COFRAC), plus difficile à obtenir pour des établissements non spécialisés :

- analyses sérologiques,
- statut d'un échantillon d'animaux en oligoéléments et vitamines liposolubles,
- analyses virologiques (PCR) :
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes abortifs,
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes respiratoires,
 - ◇ PCR BVD,
- analyses bactériologiques diverses (MALDI TOF ou PCR) :
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes abortifs,
 - ◇ PCR multiplex pour les pathogènes respiratoires,
 - ◇ PCR paratuberculose,
- analyses histologiques,
- analyses génomiques (recherche de tares).

4. POURQUOI RÉALISER CES ANALYSES EN ESV ?

Les principales motivations qui expliquent l'investissement dans le matériel et la réalisation des analyses biologiques effectuées dans notre structure sont :

- la simplicité des techniques mises en œuvre, leur fiabilité et le temps limité nécessaire,
- les résultats, quasi immédiats la plupart du temps,
- les limites de la clinique pour des situations qui demandent une prise en charge urgente (septicémie, mammites sévères, désordres électrolytiques et/ou acidobasiques chez les veaux et les bovins adultes),
- la complexité de certaines situations avec des interférences marquées du fait des traitements déjà entrepris par l'éleveur et peu ou mal renseignés (désordres électrolytiques et/ou acidobasiques chez les veaux et les bovins adultes),
- la mise en œuvre de certains examens 7/7 jours qui permet, en particulier, une approche raisonnée de l'antibiothérapie des mammites,
- le fait que le diagnostic (et donc les examens complémentaires associés) représente un créneau porteur et en développement continu pour notre clinique.

5. COMMENT CHOISIR LE LABORATOIRE POUR L'EXTERNALISATION DES EXAMENS ?

Notre choix d'un laboratoire d'analyses se fait en fonction des raisons suivantes :

- il pratique une technique non réalisable à l'ESV : c'est typiquement le cas des laboratoires de bactériologie qui emploient le MALDI TOF ou des laboratoires qui proposent des PCR multiplex à des prix abordables (avortements, affections respiratoires infectieuses). Le choix s'effectue alors d'abord par la qualité des échanges entre l'ESV et le vétérinaire biologiste et ensuite par la rapidité et le suivi du rendu des résultats,
- il a un monopole de fait : le laboratoire réalisant la plupart des analyses effectuées dans le cadre de police sanitaire (sérologiques en particulier) nous est imposé, sans un réel choix,
- il propose des analyses spécifiques très peu fréquemment réalisées (détection de tares génétiques, free martinisme),
- il propose des analyses (elisa spécifique pour la détection des anticorps dirigés contre la grande douve) non réalisées dans les laboratoires classiques et plus pertinentes,
- il propose les analyses les plus pertinentes dans l'évaluation d'un statut (glutathion peroxydase pour le statut en sélénium).

QUELLE STRATÉGIE ANALYTIQUE DANS MON ESV POUR LES NAC ?

Samuel SAUVAGET

Les NAC dans leur diversité posent un défi diagnostique pour lequel le recours aux analyses de laboratoire ouvre le champ des possibles, tant pour celles réalisées dans l'ESV que pour celles qui sont externalisées.

1. MATÉRIELS UTILISÉS

1.1 MATÉRIEL DE PAILLASSE

- 2 microscopes (1 pour les coproscopies, 1 pour les autres types d'analyses),
- centrifugeuse,
- réfractomètre,
- solutions saturées en sel ou en sulfate de zinc (flottation pour coproscopies),
- kit de coloration MGG/ RAL,
- 1 hématocytomètre pour la numération formule des oiseaux et des reptiles.

1.2 ANALYSEURS

- analyseur de gaz sanguins,
- analyseur d'hématologie pour les petits mammifères,
- analyseur de biochimie avec les constituants spécifiques des oiseaux et reptiles (acide urique, ASAT),
- glucomètre.

2. ANALYSES RÉALISÉES EN ESV

- Avec ce matériel disponible, fiable, accessible, facile à utiliser et permettant des résultats quasi immédiats : microscope : frottis sanguin, cytologies, coproscopies, parasites externes...
- Automates d'hématologie pour numération-formule chez les petits mammifères (automates non calibrés pour les oiseaux et les reptiles en raison de la morphologie et des particularités des cellules sanguines de ces animaux),
- hématocytomètre et colorants (phloxine et éosine) pour la numération-formule des reptiles et des oiseaux (technique nécessitant expérience et compétence en hématologie des oiseaux et des reptiles),
- automates pour la biochimie, constituants mesurés :
 - ◇ calcium, phosphates, cholestérol, triglycérides pour le statut nutritionnel,
 - ◇ urée, créatinine pour la fonction rénale chez les petits mammifères,
 - ◇ acide urique pour la fonction rénale chez les oiseaux et les reptiles,
 - ◇ protéines totales, albumine, bilirubine, PAL, ALAT pour la fonction hépatique chez les petits mammifères,
 - ◇ protéines totales, albumine, ASAT, CPK pour la fonction hépatique chez les oiseaux et les reptiles.
- centrifugeuse (différentiation hématurie - hémoglobinurie),
- réfractomètre pour la densité urinaire,
- bandelettes urinaires,
- colorants rapides pour les frottis sanguins, calques cutanés ou observation de tout autre fluide (suppuration, ascite...),

- lactophénoles pour l'observation des parasites cutanés,
- kit de coproscopie (méthode de flottation).

3. ANALYSES EXTERNALISÉES

Ces examens sont externalisés pour les raisons suivantes : matériel onéreux (MALDI TOF [Matrix Assisted Laser Desorption ionization – Time Of Flight]...), technique nécessitant une formation spécifique (PCR, histologie), techniques trop chronophages (PCR), demandes trop ponctuelles (électrophorèse des protéines) ou compétence tout à fait spécifique (histologie).

- PCR
 - ◇ pathogènes de mammifères : coronavirus du furet, Encephalitozoon cuniculi, Toxoplasma gondii, RHDV classique et RHDV2, Myxovirus, facteurs de virulence des staphylocoques des lapins,
 - ◇ pathogènes d'oiseaux : PBFD, polyomavirus, PDD...,
 - ◇ sexage d'oiseaux à partir de plumes,
 - ◇ pathogènes de reptiles : herpès virus, mycoplasmes...
- Analyses bactériologiques
 - ◇ culture bactérienne classique,
 - ◇ MALDI TOF.
- Mesure des protéines inflammatoires : électrophorèse
- Sérologies
- Analyses histologiques

4. POURQUOI RÉALISER DES ANALYSES EN ESV ?

Les principales motivations qui expliquent l'investissement dans le matériel et la réalisation des analyses biologiques effectuées dans notre structure sont :

- la simplicité des techniques mises en œuvre, leur fiabilité et le temps limité nécessaire,
- les résultats, quasi immédiats la plupart du temps,
- les limites de la clinique pour des situations qui demandent une prise en charge urgente orientant vers un traitement médical ou chirurgical (ex : arrêt de transit chez le lapin),
- le fait que le diagnostic (et donc les examens complémentaires associés) représente un créneau porteur et en développement continu pour notre clinique.

5

GESTION DU LABORATOIRE D'ANALYSES DE L'ESV

Bien gérer pour plus de Qualité

- 5.1 Equipement et organisation - G. Hannotte et GT
- 5.2 Tri et élimination des DASRI des analyses biologiques - C. Bisbarre
- 5.3 Gestion économique du laboratoire de l'ESV - G. Hannotte



Le laboratoire est devenu un lieu et un service stratégiques au cœur de l'activité des ESV.

A ce titre, il requiert une mise en œuvre rationnelle, dans le respect des réglementations générales de fonctionnement de nos établissements et en particulier des règles d'hygiène et de sécurité des personnes, afin de donner satisfaction d'un point de vue opérationnel autant que technique et médical.

Pour souligner l'importance de construire son laboratoire intégré avec méthode et rigueur, il est nécessaire de faire le point sur trois aspects qui sont essentiels : l'équipement, l'organisation et le contrôle qualité.

Pour éviter les redondances, de nombreux renvois aux textes composant ce travail vous invitent à vous y reporter pour compléter votre information.

1. EQUIPEMENT

1.1 UN ÉQUIPEMENT MINIMUM RÉGLEMENTAIRE POUR NOS ESV

Une clinique vétérinaire pour animaux de compagnie doit disposer des équipements suivants tels que listés dans l'arrêté du 13 mars 2015 relatif aux catégories d'ESV :

- un microscope,
- un analyseur de biochimie,
- un analyseur d'hématologie,

Et en complément pour un CHV

- un analyseur réalisant des ionogrammes.

Pour en savoir plus :

- ◇ Fiche pratique « Biologie vétérinaire » sur le site de l'Ordre :
<https://www.veterinaire.fr/fiches-pratiques/fiches-pratiques-veterinaire/biologie-veterinaire.html>
- ◇ Textes réglementaires régissant les équipements et conditions requises par les différents types d'ESV :
<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000030395433/>

1.2. UN ÉQUIPEMENT ADAPTÉ À L'ACTIVITÉ DE L'ESV

Les témoignages des praticiens du groupe de travail, réunis dans le chapitre 4. « Quelle stratégie analytique pour mon ESV ? », apportent des informations complètes sur les besoins en analyses dans quatre activités de soins : les carnivores domestiques, les équidés, les ruminants et les NAC.

Ces témoignages peuvent constituer le socle de votre réflexion.

1.3 L'ESPACE LABORATOIRE

Le laboratoire est un endroit important dont la fonction est de « produire » des résultats d'analyse. Il va rassembler un ensemble de moyens : personnes et matériels et utiliser des systèmes analytiques divers.

L'espace, de bonne taille pour pouvoir installer les équipements (évolutifs) et pour y travailler à plusieurs, sera dédié à ce service.

Un ameublement adapté constitué d'espaces de rangement et de plans de travail :

- un secteur humide avec évier pour traiter les spécimens et réaliser les gestes techniques « salissants » avec le matériel correspondant : centrifugeuses, réfractomètre, matériel de pipetage, bain-marie, lames et colorants, solutions diverses ;
- un secteur dédié aux analyseurs avec paillasse sèche pour les manipulations et équipement informatique ;
- un emplacement un peu isolé pour le microscope, afin de visualiser ses lames tranquillement ;
- un réfrigérateur / congélateur pour la conservation des réactifs, des produits de contrôle de qualité, et des échantillons en attente ;
- un meuble avec plan de travail pour y poser les plateaux d'échantillons en attente d'analyse et les plateaux et documents nécessaires aux prélèvements ;
- un meuble pour ranger les documentations techniques et les kits de prélèvement et de transport des laboratoires référents ;
- un poste de saisie informatique avec accès internet pour la gestion générale, la maintenance des matériels et accès au réseau interne pour enregistrer les résultats dans les dossiers médicaux ...
- un lavabo avec produits d'hygiène, un kit d'évacuation des déchets d'activité de soins à risque infectieux (DASRI), une poubelle etc.

2. ORGANISATION

Sur les points suivants les fiches indiquées apportent les informations utiles :

- **Les ressources humaines**
cf fiche 1.5 « La formation des intervenants au laboratoire de l'ESV »
- **Les procédures et le système documentaire**
cf fiche 1.4. « Procédures, généralités ... »
- **Les protocoles techniques**
Ils sont développés dans l'ouvrage selon les matériels, systèmes analytiques, tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) ou analyses de spécialité étudiés.
- **Validation, enregistrement et restitution des résultats au vétérinaire et au client**
Cf fiche 1.6. « Validation – Enregistrement – Traçabilité – Matérialisation des résultats – Responsabilité »

3. LE CONTRÔLE DE QUALITÉ

Ce pourrait être le point faible de cette activité, maintenant exposée et connue du public, car elle engage notre responsabilité.

Il ne suffit pas de se ranger derrière le discours « rassurant » des fabricants ou distributeurs d'analyseurs ou de réactifs ; il est nécessaire d'avoir un esprit critique et d'être en alerte devant des inexactitudes (répétées ou majeures) ou une dérive analytique.

La maintenance du fabricant évidemment sera sollicitée pour régler un problème, mais pour qualifier ses résultats d'analyse il est indispensable d'organiser son propre contrôle de qualité.

On distingue le Contrôle de Qualité Interne (CQI) et le Contrôle de Qualité Externe (CQE)

Le CQI doit être systématisé dans son application et sa fréquence, une fois par mois paraissant un moyen terme acceptable en terme de périodicité.

Il doit concerner tous les matériels produisant des résultats, a minima par l'utilisation de solutions de contrôle, plasmas ou sérums de composition connue (valeurs dites «normales» ou «anormales») pour la biochimie ou des solutions de particules imitant la composition du sang, pour l'hématologie.

Les résultats obtenus doivent être enregistrés dans un registre ad hoc pour faire preuve de leur réalité et pouvoir vérifier la stabilité fonctionnelle des analyseurs.

Tout ceci est développé dans la fiche 1.3 « Le contrôle de Qualité ».

Un CQE est utilisé de façon quotidienne par les laboratoires d'analyses médicales dont les volumes d'analyses sont conséquents et qui ont une obligation de validation constante de leurs résultats d'analyses.

→ En médecine vétérinaire on pourra utiliser le dispositif canadien :

VLA Quality Assurance Program
Atlantic Veterinary College
University of Prince Edward Island
<http://www.vlaqap.org>
Phone: (902) 620-5014
Fax: (902) 566-0861
Email: amgood@upe.ca

→ En France une société privée EILVET développe un Contrôle de Qualité Externe et inter laboratoires (vétérinaires) en biochimie et en bactériologie du lait ; une initiative à encourager.

* EILVET : <https://www.eilvet.com/>.

4. CONNAÎTRE LES EFFETS PRÉ-ANALYTIQUES

Quels peuvent être les facteurs précédant une analyse de laboratoire : biologiques, médicamenteux, alimentaires ... ou liés au prélèvement de l'échantillon / spécimen, susceptibles de biaiser les résultats et/ou leur interprétation?

Une base de données créée et actualisée par l'équipe de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse peut être consultée dans ce cadre : <http://www.biostat.envt.fr/pre-analytical-variability-v2/>

ANALYSES DE LABORATOIRE AU SEIN DES ETABLISSEMENTS DE SOINS – LES DASRI

Corinne Bisbarre

Les analyses biologiques réalisées au sein des établissements de soins génèrent des Déchets d'Activité de Soins à Risques Infectieux (DASRI) dont le producteur est responsable, de leur production à leur élimination finale, et ceci avec d'autant plus de précautions qu'ils sont susceptibles d'être considérés comme dangereux.

Pour compléter cette fiche ou aller plus loin, nous vous conseillons d'aller consulter le guide « HYGIENE DANS LES ETABLISSEMENTS DE SOINS » de QUALITEVET <https://www.qualitevet.org/logged-guide-hygiene/>

Pour organiser le traitement de ses déchets, chaque établissement de soins devra en identifier les catégories, puis procéder à une analyse de ses besoins et de ses obligations réglementaires en matière de conditionnement, entreposage, stockage puis élimination.

PRODUCTION DE DÉCHETS D'ACTIVITÉS DE SOINS				
ETAPE N°1 TRIER		ETAPE N°2 CONDITIONNER	ETAPE N°3 ENTREPOSER	ETAPE N°4 TRANSPORTER
Déchets non dangereux assimilés aux déchets ménagers		Filière des ordures ménagères	Déchets non dangereux	Collectes sélectives
Déchets à risques	Infectieux	Bacs à DASRI spécifiques	Législation DASRI	Convention organisme agréé
	Radioactifs	Décroissance radioactive	Législation sur la radioprotection	
	Chimiques toxiques	Traitement thermique ou physicochimique	Législation des anticancéreux	
Pièces anatomiques		Sacs dédiés pièces anatomiques	Congélation	Convention incinération filière spécifique

POURQUOI TRIER ?

- ◇ Pour assurer la sécurité des personnes.
- ◇ Pour respecter les règles d'hygiène.
- ◇ Pour éliminer chaque type de déchet dans la filière appropriée, dans le respect de la réglementation.
- ◇ Pour contrôler l'incidence économique de l'élimination des DASRI.

LES DASRI DOIVENT ÊTRE

- Traités dès leur apparition, le plus près possible de la source.
- Séparés des autres déchets dès leur production.
- Collectés dans des emballages spécifiques à usage unique répondant aux normes en vigueur.
- Conditionnés, identifiés et transportés conformément à la législation.
- Incinérés ou banalisés dans des centres de traitement agréés.

ANALYSE DES BESOINS EN MATIÈRE DE DASRI

Pour procéder à une analyse de ses besoins en matière de DASRI chaque établissement de soins devra prendre en compte, dans l'ordre, les points suivants :

- volume de production,
- conditionnement – stockage,
- collecte,
- transport,
- élimination,
- traçabilité.

LES DÉCHETS CONTAMINÉS BIOLOGIQUEMENT

1. CES DÉCHETS PEUVENT ÊTRE CLASSÉS DANS DIFFÉRENTES CATÉGORIES

- Déchets produits à l'occasion des activités de soins de santé : seringues, perfuseurs.
- Piquants / Coupants / Tranchants.
- Médicaments non utilisés, périmés, flacons vides ; en traitant à part les déchets issus d'un traitement anticancéreux.
- Pièces anatomiques, sang et liquides corporels.
- Déchets issus des activités de diagnostic.

Pour les analyses biologiques, on distinguera :

- **Les déchets biologiques** : cultures en tube à essai, en boîtes de Pétri, bouillons de culture, galeries API... : ils peuvent contenir des bactéries, des champignons...
- **Le sang et dérivés (Plasma, sérum), les urines et les liquides corporels (épanchements cavitaires, pus...), faisant l'objet d'analyses biologiques... ainsi que leur contenant...**
- **Les tubes de sang / sérum après utilisation dans les analyseurs d'hématologie et de biochimie ; les plaquettes sèches usagées des analyseurs en chimie sèche...**
- **Les déchets en verre et Objets Piquants Coupants Tranchants (OPCT)** comme les pipettes Pasteur, les lames et lamelles...
- **Les déchets mous** : gants, cônes de pipettes automatiques, papiers contaminés, tubes Eppendorf, pipettes molles...
- **Les déchets des appareils d'analyses au sein des établissements de soins.**

2. PRÉ-TRAITEMENTS ET INACTIVATION :

Les emballages spécifiques répondant aux normes ne suffisent pas : afin d'éliminer tout risque biologique, les déchets contaminés et le matériel contaminé doivent être inactivés par un procédé approprié adapté à la nature du matériel ou des déchets :

- **Autoclavage** pour la stérilisation du matériel de laboratoire
- **Désinfection chimique ou décontamination** grâce à un agent chimique quand l'autoclavage n'est pas possible (décontamination à l'eau de Javel ou par une solution d'éthanol à 75% pour les virus).

3. LES CONDITIONNEMENTS

Le bon conditionnement des DASRI est une garantie de sécurité tout au long de la filière de récolte et d'élimination. La fréquence des collectes est réglementée et l'élimination doit être réalisée dans des centres de traitement agréés. De couleur jaune dominante, ils comportent un pictogramme « danger biologique ».



Ces conditionnements seront :

- adaptés au type de déchets, et au flux de production,
- homologués,
- sans dépassement de la limite de remplissage (repère horizontal),
- sans dépassement du poids (indiqué sur le conditionnement),
- fermés hermétiquement une fois remplis,
- porteurs des dates de mise en service et de fermeture + nom de l'établissement,
- préservés pour garder leur intégrité.

CHOIX DES EMBALLAGES EN FONCTION DU TYPE DE DÉCHETS

TYPE DE CONDITIONNEMENT	NORME	TYPE DE DASRI POUVANT Y ETRE DEPOSE			
		Perforants (OPCT)	Solides ou mous	Liquide	
Sacs en plastique ou en papier doublés intérieurement de matière plastique	NF X 30-501		X		
Caisses en carton avec sac intérieur	NF X 30-507		X		
Fûts et jerricans en plastiques	NF X 30-505	X	X		
Minicollecteurs et boîtes pour déchets perforants	NF X 30-500	X			
Fûts et jerricans pour déchets liquides	NF X 30-506			X	

CHOIX DES CONDITIONNEMENTS DASRI - PROCÉDURE DE GESTION DES DÉCHETS D'ANALYSES BIOLOGIQUES

DÉCHETS A RISQUE INFECTIEUX ET ASSIMILÉS				
Nature des déchets	Déchets assimilés aux déchets ménagers	Déchets à stériliser microbiologie		Déchets à enlever avec DASRI
		Papiers et emballages plastiques jetables non contaminés, essuie-mains non contaminés ayant servis à la désinfection par exemple.	Boîtes de Petri ensemencées, tubes à hémolyse, tubes de cultures ensemencés, galeries API, microplaques de microbiologie, para film, gants latex.	Lames et lamelles non cassées.
Collecteur déchets	Poubelle ménagère	Poche à autoclave	Bassine avec eau de javel	Fûts conteneur dur DASRI Collecteurs durs DASRI Cartons DASRI
				

4. ENTREPOSAGE

- **Si la production est inférieure à 15 kg / mois** : local dédié à accès limité.
- **Si la production est supérieure à 15 kg / mois** : locaux avec sol et parois lavables, identifiés, ventilés, éclairés, protégés de la chaleur, de la pénétration d'animaux offrant une sécurité optimale contre les risques de dégradation et le vol.

5. FRÉQUENCE DE RAMASSAGE, SUIVI ET TRAÇABILITÉ

- ◇ **La fréquence de ramassage est définie selon le volume produit**
 - Production < 5 kg par mois : collecte trimestrielle au minimum.
 - Production entre 5 et 15 kg / mois : collecte mensuelle.
 - Production entre 15 et 100 kg / mois : collecte hebdomadaire.
 - Production > 100 kg / mois : collecte toutes les 72 heures.
- ◇ **Trois documents réglementaires sont exigés**
 - Convention de collecte avec une entreprise agréée.
 - Bons de prises en charge lors de la collecte.
 - Récapitulatifs annuels des incinérations.

RÉGLEMENTATION

→ CODE DE LA SANTÉ PUBLIQUE :

- Partie réglementaire (articles R1110-1 à R6431-76)
 - ◇ Chapitre V : pollutions atmosphériques et déchets (art R 1335-1 à R 1335-23)
 - ◆ Section 1 : déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés (art R 1335 – 1 à R 1335 – 8 – 11)
- Articles R. 1335-1 à R. 1335.14 relatifs à l'élimination des DASRI et assimilés et pièces anatomiques.
- Articles R. 4421-1 et s. relatifs à la prévention des risques biologiques.

→ CODE DE L'ENVIRONNEMENT :

- Article L. 541-1 définit le terme et la notion de DASRI.
- Article L. 541-2 instaure le principe de la responsabilité du producteur.
- Annexe II à l'article R. 541-8 reprend la liste communautaire harmonisée non exhaustive des déchets.
- Article R. 541-42 à R. 541-48 précise les dispositions applicables au contrôle des circuits de traitement des déchets dangereux.
- Arrêté du 4 novembre 2002 fixe les procédures de décontamination et désinfection à mettre en œuvre pour la protection des travailleurs.
- Arrêté du 18 juillet 1994 modifié fixant la liste des agents biologiques pathogènes.
- Arrêté du 7 septembre 1999 relatif aux modalités d'entreposage ainsi qu'au contrôle des filières d'élimination des DASRI, assimilés et pièces anatomiques.
- Arrêté du 24 novembre 2003 modifié relatif aux emballages des DASRI.
- Arrêté du 6 janvier 2006 modifiant l'arrêté du 24 novembre 2003 relatif aux emballages des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés.
- Arrêté du 29 mai 2009 modifié relatif au transport des matières dangereuses par route.
- Circulaire DH/DGS n° 554 du 1er septembre 1998 relative à la collecte des objets piquants tranchants souillés.
- Circulaire DHOS/DGS/DRT n° 34 du 11 janvier 2005 relative au conditionnement des DASRI.
- Arrêtés du 20 septembre 2002 modifiés relatifs à l'incinération des DASRI.
- Circulaire n° 53 du 26 juillet 1991 relative à la mise en œuvre des procédés de désinfection des déchets contaminés.

Un tri sélectif permet de modérer le coût d'élimination des DASRI en réduisant leur volume. Ainsi les flaconnages vides, les tubulures de perfusion (à condition qu'ils ne contiennent pas de résidus de médicaments ou de matières infectieuses), ou les pansements peuvent être éliminés par la filière des ordures ménagères » .

TRACK DECHETS – de quoi s'agit-il ?

Le décret 2021-321, issu de la Loi Economie Circulaire, impose depuis le 1er janvier 2022, la dématérialisation de la traçabilité des déchets dangereux et/ou contenant des POP (Polluants Organiques Persistants) : TRACK DECHETS est un outil numérique complémentaire gratuit, développé par le Ministère de la Transition Ecologique, permettant d'organiser cette traçabilité ; ce n'est pas un outil de gestion des déchets (pas de facturation, bon de commande, etc ...)

L'objectif sera de calculer *in fine* le prix de revient d'une analyse puis son prix de vente.

Le prix de vente doit permettre de couvrir les dépenses du laboratoire : financement du matériel, rémunération du personnel et achat des produits consommables, tout en dégagant un résultat pour la structure, en particulier pour en payer les charges fixes générales.

La limite de faisabilité sera souvent donnée par le prix de vente de l'analyse : est-il raisonnable et acceptable pour le client ? Se situe-t-il dans les prix du marché ? Quel est l'intérêt médical, à ce prix, pour le vétérinaire, son patient, son client ?

Dans cette activité, le vétérinaire sera rémunéré sur ses actes médicaux et non sur la réalisation des analyses, ce qui revient à dire que le temps pris en compte est celui du personnel auxiliaire.

Pour développer cette approche, nous envisagerons :

- **les charges d'exploitation,**
- **le compte d'exploitation,**
- **le compte d'exploitation appliqué à un analyseur.**

1. LES CHARGES D'EXPLOITATION

ELLES SONT DE DEUX SORTES :

Charges variables (unitaires, par analyse)

- Consommables (petit matériel, réactifs, tests...).
- Frais de personnel (coût en masse salariale pour réaliser l'analyse donc le temps passé - chronométré ou estimé - x coût de l'unité de temps choisie).

Charges fixes (par entité - laboratoire ou système analytique)

- Dotation annuelle aux amortissements du matériel (de l'entité considérée).
- Frais de maintenance (sur une période donnée, par exemple pour un an) :
 - ◇ contrats de maintenance du matériel,
 - ◇ coûts d'entretien et réparation du matériel de laboratoire,
 - ◇ achats de petit matériel, ou de fournitures techniques ou administratives relatives au fonctionnement de l'entité,
 - ◇ coût des produits utilisés pour les calibrations et le contrôle de qualité,
 - ◇ temps passé par le personnel pour réaliser cette maintenance,
 - ◇ coût estimé des pertes en réactifs ou en tests (mal utilisés, périmés, mal conservés ...).

COMMENT LES TRAITER ?

Charges variables

- Évaluation précise par analyse ou examen.

Charges fixes

- Répartition sur un volume d'analyses ou d'examens réalisés par l'entité étudiée (cf 3 : Compte d'exploitation d'un analyseur).

2. LE COMPTE D'EXPLOITATION

Pour le construire on convient de certaines règles ; il sera établi :

- en mode réel ou en mode prévisionnel,
- hors taxes (HT),
- hors frais financiers d'acquisition,
- hors charges de structure de l'ESV.

C'est un Outil de gestion utile à la prise de décision d'investissement.

COMPTE D'EXPLOITATION DES ANALYSES DE LABORATOIRE

Compte d'exploitation des analyses de laboratoire	par analyse individuelle	par groupe d'analyses	du laboratoire par année
Présentation en	€ HT	€ HT	€ HT
Charges variables 1. Consommables	Évaluation unitaire	Évaluation unitaire	Montant comptable
Charges variables 2. Frais de personnel	Évaluation unitaire	Évaluation unitaire	Montant comptable
Charges fixes 1. Amortissements	Répartition <i>Charges fixes de l'entité / volume d'analyses</i>	Répartition <i>Charges fixes de l'entité / volume d'analyses</i>	Montant comptable
Charges fixes 2. Frais de maintenance	Répartition <i>Charges fixes de l'entité / volume d'analyses</i>	Répartition <i>Charges fixes de l'entité / volume d'analyses</i>	Montant comptable
Total des charges	Prix de revient de l'analyse	Prix de revient du groupe d'analyses	Charges d'exploitation du laboratoire
Marge	Marge brute	Marge brute	Marge brute
Prix de vente HT ou TTC	Prix de vente	Prix de vente	Chiffre d'affaires

3. COMPTE D'EXPLOITATION D'UN ANALYSEUR

ETABLIR SES PRIX DE REVIENT

→ Traitement des charges fixes d'un analyseur

La dotation aux amortissements et les frais de maintenance d'un analyseur, peuvent être :

- **soit** répartis strictement dans le coût de revient des analyses réalisées par cet analyseur (soit x € par analyse). Cette méthode peut être pénalisante car impactant le prix de revient et le prix de vente, en particulier pour un matériel en développement ou un équipement complémentaire indispensable,
- **soit** répartis sur une base plus large selon le principe de mutualisation (par exemple, sur un panier des examens les plus fréquents du laboratoire de l'ESV : analyse d'urine + bilans hématologiques - NFS + bilans biochimiques + ...),
- **soit** répartis sur le matériel le plus performant (en volume d'analyses et en prix de revient de l'analyse).

Cette méthode permet de faire porter le poids des charges fixes par pratiquement toute l'activité, avec un impact très modéré sur le prix de revient et le prix de vente des analyses composant le panier.

Principe de mutualisation des charges fixes

La mutualisation des charges fixes permet de prendre en compte le service laboratoire dans sa totalité, en réunissant d'un côté toutes les charges fixes (amortissements et maintenance) du laboratoire et de l'autre le volume d'analyses réalisées quelle que soit leur nature, pour une période donnée.

Exemple : coût annuel des charges fixes / volume annuel d'analyses

→ Traitement des charges variables d'une analyse ou d'un groupe d'analyses

Le coût de l'évaluation précise par analyse ou groupe d'analyses sera repris dans leur prix de revient de l'analyse sous deux rubriques :

- le prix d'achat des consommables : petit matériel, réactifs, tests ;
- le coût du personnel selon le temps passé, par ex : si la masse salariale horaire est de 30 €, la minute a un coût de 0.50 €.

Calculer le coût de l'heure de travail d'un salarié

1. Calculer la masse salariale annuelle du salarié :

Salaire brut mensuel et charges patronales (ce coût apparaît en bas de la feuille de paie) x 12 mois.

2. Calculer la masse salariale horaire :

Diviser la somme obtenue par le nombre d'heures ouvrées de l'année (soit pour un temps plein : 1607 heures)

CALCULER LES PRIX DE VENTE

Le laboratoire est à considérer comme un service externalisé.

- Il produit des prestations dont on peut connaître le prix de revient.
- Le prix de vente est calculé par le prix de revient auquel s'ajoute une marge brute.
- Pour cela, on choisira un coefficient multiplicateur du prix de revient en HT et TTC, par ex : coefficient de marge de 2 en HT ou 2.4 en TTC.

LA MARGE BRUTE

Elle est la différence entre prix de vente et prix de revient.

Cette marge brute ne représente pas le bénéfice de l'opération ; car elle doit contribuer à couvrir d'autres charges dites « de structure » telles que coût des locaux (loyers, chauffage, consommations, entretien), coûts administratifs (secrétariat, communication, gestion), taxes de formation..., au même titre que la vente de produits ou services.

Le résultat d'exploitation ne peut être établi qu'après cette opération

Pour simplifier on ne prend pas en compte ces frais de « structure » dans l'étude économique du laboratoire ; mais il faut les considérer pour définir un coefficient multiplicateur suffisant.

Le tableau suivant permet d'appliquer cette méthode.

CALCUL DU COÛT DE REVIENT ET DU PRIX DE VENTE DES ANALYSES

Analyse ou groupe d'analyses	UROLOGIE Bandelette culot urinaire	HEMATOLOGIE Numérations formule sanguine	BIOCHIMIE Bilan 10 analyses
Charges variables 1. Consommables			
Charges variables 2. Frais de personnel			
Charges fixes 1. Dotation aux amortissements			
Charges fixes 2. Frais de maintenance			
Prix de revient (HT)			
Coefficient de marge TTC (2.4)			
Prix de vente (TTC)			