

LA RÉCOLTE DES DONNÉES LES PRÉLÈVEMENTS ET LES RISQUES DE BIAIS

P. VANNIER,* L. GRUNER,** M. LAMAND*** et L. RENAULT****

* Services Vétérinaires, Station de Pathologie Porcine
B.P. 9 - 22440 Ploufragan

** I.N.R.A. Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie
Nouzilly - 37380 Monnaie

*** I.N.R.A., Laboratoire des Maladies Nutritionnelles, C.R.Z.V
de Theix - 63110 Beaumont

**** Société Sanders, 19 Quai de l'Industrie - 91200 Athis-Mons

RESUME

Les risques de biais liés à la réalisation des prélèvements peuvent être élevés si certains principes ne sont pas respectés. La nature des prélèvements doit correspondre aux objectifs de l'enquête et aux moyens d'investigation dont l'enquêteur dispose. Ces prélèvements doivent être réalisés sur un animal ou à partir de l'unité d'enquête choisie dont l'état a été préalablement défini. La taille de l'échantillon doit être représentative de la population étudiée. Les prélèvements doivent être de qualité afin de permettre d'en tirer le maximum d'informations dans les meilleures conditions. Enfin, les techniques de laboratoire utilisées pour analyser le prélèvement doivent être appropriées à ce qui est recherché et aux objectifs de l'enquête.

La fiabilité des résultats d'une enquête épidémiologique dépend du soin apporté à la réalisation des différentes phases de cette enquête. Or, dans la collecte des données, la récolte des prélèvements constitue une des bases objectives de l'enquête dont la qualité conditionne l'exploitation ultérieure de la totalité des données. Il faut donc veiller à ce qu'il n'y ait aucun risque de biais au niveau des prélèvements.

Le biais peut être introduit dans la représentativité de l'échantillonnage des prélèvements vis-à-vis de la population considérée dans l'enquête. Le choix des prélèvements ou de la nature des éléments à partir desquels devront être effectués les prélèvements s'avère fondamental.

ECHANTILLONNAGE ET CHOIX DES PRELEVEMENTS

Types de prélèvements :

Lors d'une enquête sur un agent infectieux, l'enquêteur devra choisir entre la recherche directe de cet agent chez un animal ou la recherche de témoins indirects de sa présence.

Si une étude est entreprise sur l'incidence de la maladie d'Aujeszky dans la population porcine, il sera préférable d'entreprendre des sondages sérologiques dans cette population à condition que la vaccination n'interfère pas avec les objectifs de cette enquête, plutôt que de tenter de dépister les animaux infectés latents par l'isolement du virus ce qui est long, difficile, coûteux et souvent aléatoire.

En parasitologie, la présence d'anticorps anti-Echinocoque, Fasciole, hypoderme renseigne sur la présence du parasite, mais ne donne pas d'indication sur l'intensité de l'infestation et le moment de l'infestation des animaux. Si ce sont ces derniers éléments qui doivent être étudiés, il sera préférable de rechercher directement la trace ou la présence des parasites par des examens systématiques à l'abattoir par exemple.

Le problème est très différent, mais extrêmement crucial, dans le cadre d'une enquête sur les carences en oligoéléments chez les animaux de rente. L'origine de ces carences peut être considérée à plusieurs niveaux et l'enquête devra tenir compte de ces éléments, ce qui conditionnera le type de prélèvements à effectuer. En effet, le transfert des oligoéléments depuis le sol jusqu'à l'animal peut être insuffisant à différents niveaux. Le sol peut être très pauvre en oligoéléments et donc être à l'origine d'une carence chez un animal consommant le fourrage cultivé sur ce sol. Mais, la recherche de la carence peut aussi être entreprise au niveau du fourrage ou du plasma de l'animal. En fonction de l'expérience et des connaissances de l'enquêteur, il faudra donc déterminer le ou les niveaux auxquels devront être effectués les prélèvements.

Lorsque le type de prélèvement aura été choisi, il reste à déterminer l'état de l'élément ou de l'animal sur lequel le prélèvement est effectué.

En reprenant l'exemple d'une enquête sur les carences en oligoéléments, il faut savoir que les traitements technologiques influent sur la digestibilité des oligoéléments ; il faut donc en tenir compte dans l'interprétation de l'enquête et limiter les prélèvements à une présentation déterminée ou, au contraire, effectuer des prélèvements concernant tous les modes de présentation de la ration.

Chez l'animal, son âge ou son état d'entretien doivent être considérés. Dans une enquête sur la maladie d'Aujeszky, les reproducteurs d'un élevage constituent un échantillon représentatif de la population porcine dans la mesure où ces animaux, d'un certain âge, témoignent du passé du ou des élevages auxquels ils appartiennent. Par contre, dans une enquête sur le Parvovirus, il sera beaucoup plus intéressant de prélever du sérum dans les différentes catégories d'animaux qui composent un élevage (reproducteurs, porcelets, porcs charcutiers).

En parasitologie, les jeunes animaux révèlent mieux la présence de coccidies dans un élevage alors que les animaux âgés représentent de meilleurs témoins de la présence de Protostrongles.

Enfin, en fonction des objectifs de l'enquête, il faudra déterminer si les prélèvements doivent être effectués sur des animaux apparemment en bonne santé, ou atteints de troubles divers, s'ils ont été traités (ver-

mifugations, antibiothérapie) ou non. Tous ces éléments doivent être pris en considération dans l'élaboration du protocole ou la réalisation des prélèvements sinon, faute de prélèvements adaptés aux objectifs de l'enquête, ses résultats risquent d'être totalement faussés.

Des biais risquent également d'être introduits dans l'enquête si les prélèvements ne sont pas effectués à un moment opportun.

Moment du prélèvement :

Dans l'enquête sur la carence en oligoéléments, il faut considérer le fait que la composition de l'herbe évolue énormément dans le temps et d'un cycle à l'autre. Donc, si cela est possible, il est nécessaire d'uniformiser le moment du prélèvement dans les différents échantillons ou d'effectuer les prélèvements sur les fourrages conservés (ensilages ou foin, récoltés à un stade relativement standardisé).

En parasitologie, il est possible de révéler la présence et surtout de définir les sites et les époques où les stades libres de strongles abondent, en procédant à des prélèvements d'herbe. Des biais peuvent être introduits selon le moment où le prélèvement est effectué, les conditions ambiantes ayant une action sur les déplacements des larves entre les matières fécales, la litière et l'herbe.

De même, lors d'enquêtes sérologiques effectuées après l'apparition d'une nouvelle maladie dans une région, le moment de la prise de sang est capital. Si elle est pratiquée trop tôt après l'apparition des signes cliniques, aucun anticorps ne sera décelé dans les sérums analysés (séro-agglutination rapide de la mycoplasmosse et de la pullorose-typhose des volailles).

Enfin, pour que l'échantillon analysé soit représentatif de la population étudiée, sa taille doit être suffisante. Celle-ci est d'ailleurs estimée par des calculs statistiques.

Taille de l'échantillon - Nombre de prélèvements :

Dans le cadre d'enquêtes sérologiques dans des élevages de porcs, afin que l'échantillon soit représentatif d'une catégorie d'animaux de l'élevage, il est nécessaire de prélever du sérum sur 15 % environ des animaux présents. Lors d'enquête dans un élevage de volailles basée sur des isollements bactériens, il faut entreprendre ces recherches sur un minimum de 5 à 10 animaux. Concernant des analyses de fourrages, un minimum d'une dizaine de fourrages par grand type de sol s'impose ce qui constitue un sondage de 40 à 50 échantillons par département.

En effet, indépendamment du nombre de prélèvements à effectuer dans l'échantillon considéré, le protocole de l'enquête doit définir l'échelle à laquelle elle est entreprise; les résultats d'une étude risquent d'être totalement faussés si l'unité d'enquête n'est pas adaptée à ses objectifs. Le problème est différent si l'on considère une étude dans une commune, un département ou un pays et la taille de l'échantillon varie en fonction de l'unité choisie (animal, élevage, zone de production...) et de la répartition de la population étudiée.

LA QUALITE DES PRELEVEMENTS

Elle est fondamentale et conditionne toute l'interprétation des résultats d'une enquête : si la mauvaise qualité des prélèvements ne permet pas d'entreprendre les analyses envisagées, des données seront manquantes ou en nombre insuffisant ; la mauvaise qualité des prélèvements peut conduire à une fausse interprétation des résultats de laboratoire.

La recherche des oligoéléments dans le plasma des animaux exige une qualité parfaite du produit analysé : les hématies étant riches en zinc et en magnésium, une hémolyse ou un simple passage par dialyse du contenu de l'hématie dans le plasma fausse l'interprétation des résultats.

Le matériel utilisé doit être adapté aux recherches envisagées : le sang doit être prélevé sur anticoagulant si l'enquêteur envisage une numération des cellules sanguines, un hémocrite ou un dosage d'hémoglobine alors qu'il doit être récolté dans un tube sans anticoagulant si les études doivent être réalisées à partir du sérum. Lors de la réalisation d'un prélèvement, il faut éviter qu'il soit "contaminé" par un élément extérieur. Dans le cadre d'une enquête sur les mammites, il est indispensable de bien désinfecter la mamelle avant de prélever le lait sinon les résultats seront totalement faussés dans la mesure où des bactéries isolées à partir du lait proviennent de l'extérieur de la mamelle. Lors d'analyse des fourrages, il faut savoir que l'ensilage acide dissout très bien les peintures, les poussières ou les substances de revêtement des instruments de prélèvement (galvanisés ou comportant des brasures en cuivre par exemple). Après l'analyse, on détectera, dans la matière étudiée, des éléments qui ne lui sont pas propres ce qui fausse totalement les résultats.

A ce niveau, intervient la formation de l'enquêteur et la standardisation des méthodes de prélèvements. Plus l'envergure de l'enquête est importante, plus le nombre des enquêteurs augmente. Si ces enquêteurs doivent effectuer, eux-mêmes, un certain nombre de prélèvements, il est indispensable que chacun d'entre eux ait reçu des instructions très précises lui indiquant les conditions et la manière de réaliser le prélèvement sinon un biais risque d'être introduit dans l'échantillonnage lié aux variations entre les manipulations des différents enquêteurs.

LE TRANSPORT DES PRELEVEMENTS

Même si la qualité des prélèvements au départ est correcte, de mauvaises conditions de transport risquent de fausser totalement l'interprétation des résultats.

D'une part, le conditionnement et le mode de préservation doivent être adaptés au prélèvement, à l'agent ou à la substance recherchée. Il est possible de congeler le prélèvement de fèces lors d'essais d'isolement de virus ; par contre, les matières fécales doivent être acheminées sous froid, sans congélation, afin de réunir les meilleures conditions d'isolement des entérobactéries et des *Escherichia coli* en particulier.

Un mauvais conditionnement du prélèvement peut entraîner l'inactivation du virus qui s'y trouve qui ne sera donc pas isolé au laboratoire, faussant ainsi les résultats. Dans le cadre d'une enquête sur la flore intestinale de porcelets, il est nécessaire d'envelopper les viscères ou des fragments de viscères dans des linges et de les expédier sous froid, avec des sachets de glace en emballage isotherme. Dans le cas contraire, des ferment-

tations aérobies puis anaérobies vont se produire détériorant l'état des viscères et compromettant l'isolement des germes initialement présents.

En parasitologie, un échauffement excessif des prélèvements (fèces, poumons) provoque l'éclosion des oeufs de strongles gastro-intestinaux et la mort des larves de strongles pulmonaires.

Enfin, des erreurs dans l'interprétation des résultats risquent d'être commises si les techniques utilisées pour le traitement des prélèvements, parvenus au laboratoire, ne sont pas appropriées aux recherches envisagées dans le protocole de l'enquête.

TECHNIQUES ET METHODES UTILISEES POUR L'ANALYSE DES PRELEVEMENTS

L'isolement d'un certain nombre de bactéries nécessite l'emploi de milieux spéciaux qui devront être utilisés afin d'éviter des résultats par défaut. Le milieu minimum caséine (Minca) doit être utilisé pour isoler les *Escherichia coli* entérotoxigènes du veau.

Les coprocultures, aux fins d'isolement de Salmonelles, doivent être réalisées sur les milieux d'enrichissement au tétrathionate et au sélénite.

Par contre, *Salmonella cholerae* suis ne se développe pas sur ces deux milieux. De même, *Salmonella typhimurium* var. Copenhagen du pigeon ne se développe pas sur sélénite.

Enfin, les germes ne pourront être identifiés avec précision que si des milieux d'identification spéciaux sont utilisés.

Par exemple, les *Hemophilus* doivent êtreensemencés sur milieu enrichi en facteurs X et V en présence de CO₂.

Les limites de sensibilité de certaines techniques doivent être prises en compte pour l'interprétation des résultats. Dans certains cas, des résultats qualitatifs (+ ou -) seront suffisants alors que, dans d'autres, un résultat quantitatif s'avère indispensable (titrage des anticorps sériques par exemple).

Si les coproscopies qualitatives pour des parasites comme les Cestodes ou la Grande Douve sont suffisantes, une coproscopie quantitative sera indispensable pour d'autres parasites.

L'interprétation des résultats doit également tenir compte des limites des méthodes d'investigation ; par exemple, il n'est pas possible d'estimer le nombre de strongles adultes présents chez les animaux ayant acquis une certaine immunité à partir du nombre d'oeufs émis étant donné la mauvaise corrélation entre ces 2 nombres.

En fait, la qualité du travail du laboratoire recevant les prélèvements sera conditionnée par l'orientation des recherches entreprises ; cette orientation ne peut être effectuée que si les prélèvements sont accompagnés de commémoratifs précis indiquant au laboratoire la nature des recherches à entreprendre ou si un protocole détaillé de l'enquête a été adressé au laboratoire avant le début des différentes phases de l'enquête.

CONCLUSION

Les risques de biais seront réduits au minimum pour la réalisation des prélèvements et leur analyse, comme d'ailleurs pour les autres phases de l'enquête, si un protocole détaillé est élaboré lors de la conception de l'enquête. Ce protocole indiquera de manière précise les types de prélèvements à effectuer, leur nombre, la manière de réaliser les prélèvements, de les acheminer vers le laboratoire et de les traiter. Si ce protocole fait défaut, trop d'initiatives seront laissées aux enquêteurs devant intervenir ce qui sera générateur d'erreurs ou de négligences responsables d'une mauvaise interprétation des données.