

CHAPITRE 1.1.2.

PRELEVEMENT, EXPEDITION ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS POUR LE DIAGNOSTIC

INTRODUCTION

Les analyses d'une maladie animale au laboratoire dépendent essentiellement de la qualité et de l'adéquation des échantillons collectés pour l'analyse. Ce chapitre expose les normes générales intervenant dans le prélèvement, l'expédition et le stockage des échantillons. Les chapitres du présent Manuel terrestre consacrés aux différentes maladies fournissent des informations spécifiques sur les échantillons appropriés nécessaires pour détecter la présence d'agents pathogènes ou de toxines donnés. Les échantillons peuvent provenir d'animaux individuels, de populations animales ou de l'environnement et servir à diverses fins, telles que le diagnostic ou la surveillance des maladies, la certification sanitaire ou encore le suivi des réponses à un traitement et/ou à la vaccination. Afin d'obtenir des résultats valides d'un point de vue scientifique et statistique, les échantillons collectés doivent être en adéquation avec le but recherché ; leur qualité, leur volume et leur nombre doivent également être appropriés aux analyses prévues. De plus, les animaux et les tissus objets de l'échantillonnage doivent être représentatifs de la pathologie analysée.

Les échantillons doivent être prélevés en appliquant des mesures de sécurité biologique et de confinement appropriées afin de prévenir toute contamination de l'environnement, des préposés aux animaux et du personnel effectuant les prélèvements ainsi que toute contamination croisée des échantillons eux-mêmes. Il faut par ailleurs prendre soin d'éviter tout stress inutile ou toute blessure de l'animal ainsi que tout danger physique pour les personnes qui manipulent l'animal. Le matériel biologique doit être emballé de façon à contrôler rigoureusement les fuites, puis étiqueté en respectant scrupuleusement les réglementations en vigueur concernant le transport, comme énoncé au Chapitre 1.1.3 Transport de matériel biologique.

A. COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

1. Considérations générales

Un soin particulier doit être apporté à la collecte, au confinement et au stockage des échantillons, ce qui inclut les mesures de sécurité biologique qui doivent être en place afin de prévenir toute contamination de l'environnement ou toute exposition d'autres animaux ou de l'homme à des matières potentiellement infectieuses (voir Chapitre 1.1.4. *Biosécurité et biosûreté: norme sur la gestion du risque biologique dans les laboratoires vétérinaires et dans les animaleries*). Pour plus d'informations sur le transport des échantillons, veuillez consulter le Chapitre 1.1.3. *Transport de matériel biologique*.

La fiabilité des tests de diagnostic dépend essentiellement de l'adéquation et de la qualité du ou des échantillons ainsi que de leur représentativité pour le processus pathologique analysé. Avant l'échantillonnage, il faut réfléchir au type d'échantillon(s) requis, y compris à l'objectif des analyses et aux technologies à utiliser. Le volume ou la quantité d'échantillon doit suffire pour effectuer les analyses initiales ainsi que tout essai de confirmation ultérieur et doit fournir suffisamment d'échantillon résiduel à des fins de référence ou d'archivage.

Les objectifs des analyses seront alignés sur ceux pour lesquels ces tests sont validés, qui figurent au Chapitre 1.1.6. *Validation des épreuves diagnostiques pour les maladies infectieuses des animaux terrestres*, à savoir :

- i) la démonstration de l'absence d'infection dans une population donnée ;
- ii) la certification de l'absence d'infection ou de la présence de l'agent chez des animaux individuels ou dans des produits d'origine animale destinés au commerce/aux échanges ;
- iii) l'éradication de la maladie ou l'élimination de l'infection dans des populations données ;
- iv) le diagnostic de confirmation de cas cliniques ou suspects ;
- v) l'estimation de la prévalence de l'infection ou de l'exposition pour faciliter l'analyse de risque ;
- vi) la détermination du statut immunitaire d'animaux ou de populations spécifiques (post-vaccination).

Des plans d'échantillonnage épidémiologiquement appropriés doivent être élaborés avant la collecte des échantillons, de la manière décrite à la section B et à l'Annexe 1.1.2.1. Ils préciseront le nombre d'animaux ou d'autres unités d'échantillonnage devant faire l'objet d'un prélèvement.

La collecte des échantillons doit reposer sur une connaissance approfondie de l'épidémiologie et de la pathogenèse de la maladie étudiée ou du syndrome pathologique à diagnostiquer. Cela conduira à échantillonner les tissus ou les liquides les plus susceptibles de contenir l'agent infectieux ou la preuve de l'infection. Il faudra notamment tenir compte de l'organe cible ou des tissus de prédilection, de la durée et du site de l'infection dans chaque type de tissu ainsi que de la durée et de la voie d'excrétion ou encore de la période au cours de laquelle il est possible de détecter de manière fiable la preuve d'une infection passée, par exemple une réponse humorale, grâce aux tests à déployer. Ces considérations indiqueront également la ou les méthodes de collecte à utiliser. Dans de nombreuses enquêtes sur des maladies touchant un troupeau ou un cheptel, il est bénéfique de collecter des échantillons d'une cohorte saine pour effectuer des tests épidémiologiques comparatifs ou de routine (ex. : cas-témoins et approches par cohorte pour les tests de diagnostic) ainsi qu'à des fins de validation.

Là où une anesthésie ou une euthanasie chimique s'avère nécessaire à la contention de l'animal, l'effet du produit chimique sur le résultat de l'essai (p. ex. : tests toxicologiques) doit être pris en considération. Certaines analyses de laboratoire sont incompatibles avec certains anticoagulants et agents de conservation tissulaires, tels que l'héparine, le formol, la neige carbonique (exposition de l'échantillon à des niveaux élevés de CO₂), voire la congélation. S'il est essentiel de collecter les échantillons de la manière la plus aseptique possible, un soin égal doit être apporté à éviter la contamination par les détergents et traitements antiseptiques utilisés pour nettoyer le site de prélèvement sur l'animal, dans la mesure où ces agents sont susceptibles d'interférer avec les méthodes d'analyse en laboratoire. Les produits chimiques ou les détergents couramment utilisés dans la fabrication ou la préparation des outils servant aux prélèvements (ex. : produits chimiques utilisés dans la fabrication de certains types d'écouvillons et détergents servant à nettoyer la verrerie) peuvent avoir une incidence négative sur les procédures qui nécessitent une culture tissulaire d'agents pathogènes tout comme sur de nombreux tests moléculaires.

Des informations spécifiques sur les méthodes utilisées pour les tests de diagnostic et les recommandations relatives aux échantillons, aux agents de conservation et aux procédures de manipulation des échantillons se trouvent dans les chapitres du *Manuel terrestre* consacrés aux différentes maladies ou peuvent être demandées directement auprès du laboratoire qui réalisera les analyses requises. Les procédures pour la collecte et l'envoi des échantillons sont disponibles auprès de la plupart des laboratoires de diagnostic, incluant les autorités nationales et internationales ; ces informations sont fréquemment disponibles sur le site Internet du laboratoire concerné. Le site web de l'OMSA fournit les coordonnées de tous les Laboratoires de référence de l'OMSA (<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Il est non seulement essentiel de collecter les échantillons les plus adéquats pour le diagnostic, mais aussi d'informer le laboratoire responsable de l'épidémiologie de la maladie associée afin que les scientifiques du laboratoire puissent répartir les tests ou les panels de tests les plus appropriés. Les informations épidémiologiques devant accompagner les échantillons sont exposées à la section C du présent chapitre.

Lors d'enquêtes sur des maladies de cause inconnue, il convient de collecter plusieurs échantillons différents représentant les divers stades de l'évolution de la maladie chez un animal ou dans une population d'animaux (p. ex. : stade préclinique, stade clinique précoce, phase clinique active, affection chronique et convalescence). Les considérations épidémiologiques pour l'échantillonnage sont particulièrement importantes dans le diagnostic des maladies liées à des populations, par exemple dans des ruches, des cheptels ou des troupeaux. Les principes épidémiologiques utilisés pour l'échantillonnage seront présentés plus en détail à la section B du présent chapitre.

Les échantillons peuvent être prélevés *ante mortem* ou *post mortem*. Les considérations spécifiques concernant les différents types d'échantillons sont présentées ci-dessous.

2. Sang

Des échantillons de sang total peuvent être prélevés pour l'hématologie, la chimie clinique, la toxicologie, la recherche directe de bactéries ou de parasites, les épreuves de PCR, les essais immunologiques ou encore la culture des bactéries et des virus. En fonction des besoins de l'analyse, du sang total, des cellules sanguines et/ou des échantillons de plasma peuvent être obtenus à partir de sang total prélevé dans des anticoagulants appropriés. Lors du choix de l'anticoagulant à utiliser, la personne qui effectue les prélèvements doit être consciente des tests effectués au laboratoire, dont les diagnostics basés sur la PCR, la chimie clinique et la toxicologie, car certains peuvent être compromis par la présence d'anticoagulants ou d'agents de conservation spécifiques. Les chapitres consacrés aux différentes maladies du présent *Manuel terrestre* donnent des indications concernant les divers tests et les exigences en termes d'échantillons. Pour être efficaces, les anticoagulants nécessitent que le sang prélevé soit mélangé soigneusement avec l'anticoagulant choisi pendant ou immédiatement après son prélèvement sur l'animal.

Pour obtenir du sérum, le sang total est prélevé sans anticoagulants, permettant au caillot de se rétracter à température ambiante, à l'abri de conditions de chaleur ou de froid extrêmes, pour une période allant de quelques heures à une nuit entière. Le sérum clair peut être décanté ou prélevé avec une pipette une fois le caillot retiré, idéalement après une centrifugation douce destinée à séparer les composants cellulaires du sérum. En l'absence de centrifugeuse, pour faciliter la séparation du caillot, il convient d'incliner le tube de sang fraîchement prélevé à un angle d'approximativement 45 degrés jusqu'à ce que le caillot se rétracte, « d'entourer » ce dernier à l'aide d'une tige ou d'une pipette stérile afin de le séparer de la surface du tube, puis de le retirer en utilisant une pincette. Les résultats des analyses sérologiques peuvent être compromis par la qualité de l'échantillon. La contamination bactérienne et les débris de globules rouges dans les échantillons de sérum peuvent produire des faux positifs dans les épreuves d'agglutination. Une hémolyse dans l'échantillon de sérum peut avoir une incidence négative sur les épreuves sérologiques. La contamination microbienne et l'hémolyse constituent des préoccupations majeures, en particulier lors de la collecte d'échantillons de sang et de sérum chez les animaux *post mortem*. Parmi les causes fréquentes de sérum et de plasma hémolysés, citons l'exposition à des températures excessives ou les délais trop longs avant de séparer le sérum des globules rouges, la collecte de sang à l'aide d'une aiguille d'un calibre trop petit ou encore l'impossibilité de retirer l'aiguille au moment de transférer l'échantillon de sang contenu dans la seringue.

Le sang total est prélevé de manière aseptique, généralement par ponction veineuse sur l'animal vivant. En fonction de l'animal et de la situation d'échantillonnage, il est possible d'utiliser les veines jugulaire, caudale, brachiale, céphalique, mammaire ou la veine cave. Des techniques spécifiques d'échantillonnage pour les petits animaux de laboratoire ont été étudiées (Anon, 1993 ; Hem *et al.*, 1998). Il convient de manipuler les échantillons de sang avec précaution lors de leur collecte et de leur répartition afin de ne pas endommager les globules rouges, ce qui cause l'hémolyse. Le sang et le sérum sont le plus souvent expédiés et stockés au frais (ou congelé dans le cas du sérum) dans des bouteilles, tubes ou flacons incassables; cependant, pour certains tests de laboratoire qui nécessitent des cellules mononucléées du sang périphérique viables, le sang doit être conditionné, transporté et stocké de manière à prévenir une exposition aux températures extrêmes. Pour certains tests, des quantités aliquotes d'échantillons peuvent être séchées sur un morceau de papier filtre commercial non traité ou traité spécifiquement à cet effet, conçu pour le transport et le stockage d'échantillons stabilisés.

3. Fèces

Les fèces peuvent être collectées fraîchement émises ou, de préférence, directement à partir du rectum/cloaque pour des analyses comme la culture de micro-organismes, les examens parasitologiques ou la recherche de sang occulte dans les matières fécales ; elles peuvent également être prélevées dans le rectum/cloaque pour la culture et les diagnostics moléculaires au moyen d'écouvillons en coton, en dacron ou avec une gaze, en fonction du volume d'échantillon requis par la méthode d'essai spécifique. Les échantillons prélevés sur écouvillon doivent être gardés humides en les plaçant dans le milieu de transport recommandé pour l'analyse à réaliser, qui va du sérum physiologique stérile à un milieu de culture contenant des antimicrobiens ou des stabilisateurs. Les échantillons de fèces doivent être gardés réfrigérés (par exemple à 4°C ou refroidis sur glace) et analysés dès que possible après le prélèvement afin de minimiser les effets négatifs sur les résultats induits par la mort du micro-organisme cible, la prolifération bactérienne ou l'éclosion d'œufs de parasites. Le double emballage des échantillons de matières fécales dans des récipients munis d'un bouchon à vis ou pouvant être scellés, enfermés ensuite dans des sacs plastiques fermés hermétiquement, permettra de prévenir la contamination croisée des échantillons et des matériaux d'emballage associés. Les fèces contenues uniquement dans des gants utilisés pour

les examens rectaux, des sacs plastiques ou des tubes munis d'un bouchon en caoutchouc ne conviennent pas, car les bactéries s'y développent très fréquemment, ce qui s'accompagne d'une production de gaz susceptible d'entraîner la rupture des sacs plastiques ou de faire bouger les bouchons et donc de permettre des fuites de l'échantillon.

4. Épithélium

Le tissu épithélial sous la forme de biopsies ou de raclages cutanés, les écouvillons des surfaces buccale, nasale, pharyngée et gastro-intestinale ainsi que les échantillons de poils ou de laine peuvent être utilisés de manière variée pour des examens directs ou des analyses en laboratoire afin d'identifier des parasites de surface tels que des acariens ou des poux, des infections fongiques, bactériennes ou virales, des réactions allergiques ou encore des néoplasies. Les échantillons doivent être prélevés de manière aseptique et conservés de la manière indiquée pour le(s) test(s) souhaité(s). Les raclages cutanés profonds obtenus en utilisant le fil d'une lame de scalpel sont utiles pour les acariens fouisseurs. Les extrémités des plumes sont appropriées à la détection des antigènes viraux de la maladie de Marek et sont aussi utilisées comme échantillon pour la détection moléculaire d'autres maladies aviaires. Les tissus épithéliaux, en particulier ceux associés aux lésions vésiculeuses et collectés dans un milieu de transport viral, peuvent être indispensables au diagnostic d'infections virales spécifiques comme la fièvre aphteuse.

5. Prélèvements oculaires

Un échantillon de la surface de l'œil peut être obtenu par écouvillonnage ou par grattage cornéen, en s'assurant de collecter les cellules plutôt que les sécrétions mucopurulentes ou le liquide lacrymal aux fins de l'analyse. Les échantillons de la conjonctive sont généralement prélevés en maintenant la paupière et en frottant délicatement la surface de l'œil au moyen d'un écouvillon en coton, en dacron ou avec une gaze imbibée au préalable de sérum physiologique stérile ou d'un milieu équivalent. Ces écouvillons doivent être conservés humides dans le sérum physiologique ou le milieu de transport spécifiquement recommandé pour les analyses à réaliser. Riches en tissu lymphoïde, les biopsies de la troisième paupière des moutons sont utilisées pour la détection du prion.

6. Prélèvements de l'appareil reproducteur

Les liquides préputial et vaginal obtenus par lavage ainsi que les écouvillonnages du col utérin et de l'urètre peuvent être utilisés comme échantillons pour étudier les maladies de la reproduction. Les écouvillons doivent être gardés humides après le prélèvement en les plaçant dans le volume recommandé de milieu de transport requis par le test, le plus souvent du sérum physiologique stérile ou un milieu de culture défini. Les échantillons de sperme sont généralement obtenus à l'aide d'un vagin artificiel ou par extrusion du pénis et stimulation artificielle. Éviter la contamination de l'échantillon avec les solutions antiseptiques ou détergentes utilisées pour la préparation de l'animal/du site d'échantillonnage.

7. Jetage nasal, salive et liquide vésiculeux

Les sécrétions peuvent être prélevées directement dans un flacon ou un tube ou en utilisant des écouvillons. Le liquide des vésicules est une source hautement concentrée en agents pathogènes pour les tests de diagnostic ; il peut être prélevé à partir de vésicules intactes à l'aide d'une aiguille et d'une seringue stériles puis transféré immédiatement dans un flacon ou un tube fermé hermétiquement. Des instruments d'échantillonnage spécifiquement conçus à cet effet, comme les curettes œsophagiennes, peuvent servir à prélever le matériel cellulaire et le mucus du pharynx du bétail. L'utilisation de cordes en coton que les animaux sont autorisés à mordiller et à mastiquer a été validée pour le prélèvement d'échantillons de salive chez les porcs domestiques.

8. Lait

Le lait peut être prélevé chez des animaux individuels ou il peut s'agir de lait de tank en vrac, provenant de plusieurs animaux d'un troupeau. Le ou les trayons doivent être nettoyés avant le prélèvement et tout détergent soigneusement rincé avant la collecte de l'échantillon. Lors du prélèvement de lait à la mamelle, le premier jet sera jeté et seul le lait tiré par la suite prélevé. La méthode de conservation avant les analyses varie en fonction des exigences du test ; dans certains cas, il est important d'éviter la congélation ou l'ajout de conservateurs chimiques. Il convient de consulter les chapitres de ce *Manuel terrestre* consacrés aux différentes maladies ou de demander l'avis du laboratoire de diagnostic pour obtenir des recommandations quant à la manipulation appropriée des échantillons et à leur conservation.

9. Tissus prélevés à l'autopsie

Les autopsies doivent être effectuées uniquement par des anatomopathologistes et des vétérinaires qualifiés. Le personnel paravétérinaire peut être formé par des vétérinaires pour effectuer des examens *post mortem* à des fins spécifiques. Il est important de noter que le but d'une autopsie est non seulement de prélever des échantillons, mais aussi de formuler des observations avisées concernant la pathologie de l'affection. Ces observations complètent de manière essentielle les observations épidémiologiques et cliniques nécessaires à une enquête vétérinaire exhaustive sur le cas ou le foyer. Il est utile aux autorités vétérinaires d'engager des spécialistes en pathologie vétérinaire pour mener les investigations *post mortem* dans des cas importants. Lorsque cette expertise est gérée par un laboratoire vétérinaire, les méthodes employées doivent être formellement décrites dans le manuel d'assurance qualité du laboratoire et son aptitude doit être reconnue dans le champ d'accréditation du laboratoire. Les procédures détaillées pour effectuer les examens *post mortem* et le prélèvement des tissus figurent dans la plupart des manuels de pathologie ainsi que, souvent, dans les lignes directrices accessibles en ligne des laboratoires de diagnostic nationaux. Les échantillons indispensables aux laboratoires pour les enquêtes sur les maladies listées sont inclus dans les chapitres du *Manuel terrestre* se rapportant à chaque maladie.

Que l'autopsie soit effectuée dans un laboratoire désigné ou sur le terrain, des procédures appropriées de sécurité biologique et de confinement doivent être suivies pour garantir la sécurité des techniciens et fournir des tissus non contaminés et utiles pour les analyses ainsi que pour protéger l'environnement et les autres animaux d'une exposition potentielle aux agents pathogènes. Le port d'un équipement de protection individuelle qui protège la peau et les muqueuses et puisse être jeté ou décontaminé constitue une exigence minimale pour les personnes procédant aux prélèvements. Tous les liquides, tissus ou morceaux de carcasse restants doivent être confinés et traités au moyen d'un désinfectant ou d'une méthode de destruction qui convienne et l'environnement immédiat doit être désinfecté en profondeur.

En fonction de la maladie suspectée, de l'état de la carcasse et des installations disponibles pour les autopsies, les échantillons *post mortem* peuvent être prélevés sur un ou plusieurs organes et soumis au laboratoire soit frais (sans conservateur), soit sous forme d'échantillons conservés pour d'autres analyses de laboratoire. Le processus d'autolyse de la carcasse peut détruire des agents infectieux et des tissus déterminants pour le diagnostic ; il faut donc en tenir compte avant la collecte et l'expédition d'échantillons *post mortem*.

Pour les échantillons frais, une attention particulière doit être portée à leur manipulation et à leur stockage afin d'éviter l'autolyse et la prolifération de contaminants bactériens et fongiques. Dans l'idéal, les échantillons fraîchement prélevés sont conservés à une température fraîche et constante dès la collecte et jusqu'à leur traitement aux fins de l'analyse. Si le maintien d'une chaîne du froid n'est pas possible, des échantillons frais pour certaines procédures de test peuvent être collectés dans des liquides tels que l'éthylène glycol, qui inhibent la croissance des organismes secondaires. Lorsque de telles stratégies sont compatibles avec les méthodes d'essai qui suivront, cette option est mentionnée dans les chapitres du *Manuel terrestre* spécifiques à chaque maladie.

La conservation des échantillons *post mortem* s'obtient le plus souvent en les plaçant dans une solution de formol. Lorsqu'un tel fixateur chimique est fourni au personnel de l'anatomopathologie par les laboratoires ou les autorités compétentes, il convient de garantir une formation adéquate aux aspects de santé et de sécurité liés à l'utilisation de tels produits chimiques ainsi qu'une formation au respect des réglementations pour leur transport.

10. Environnement et alimentation

L'échantillonnage environnemental peut être réalisé à partir des déchets, de la litière, de l'eau des auge et abreuvoirs ou de nourriture ayant été exposée à l'urine, aux fèces et/ou à la salive d'animaux malades ; il peut aussi provenir de l'écouvonnage des surfaces des installations, des conduits de ventilation, des canalisations ou des mangeoires. Si un équipement spécialisé est disponible, il est également possible de faire des prélèvements de l'air qui circule.

11. Abeilles

Les abeilles adultes à l'agonie ou mortes récemment peuvent être collectées à proximité des colonies. Les abeilles vivantes peuvent être tuées en les congelant. Les échantillons de couvain sont généralement collectés en retirant une partie d'un rayon de couvain présentant des anomalies et incluant des larves mortes ou décolorées ; ces échantillons sont ensuite emballés dans une serviette en papier ou dans du journal plutôt que dans du papier d'aluminium ou ciré afin de prévenir toute prolifération microbienne. Il est également possible de prélever les

cellules malades d'un rayon en utilisant un cure-dent ou un objet similaire. Une planchette collante peut être utilisée pour collecter les débris de ruche, ce qui permet de piéger les parasites mobiles. Vous trouverez davantage d'informations sur les échantillons à prélever dans les chapitres de ce *Manuel terrestre* consacrés aux maladies des abeilles.

B. APPROCHES EPIDEMIOLOGIQUES DE L'ECHANTILLONNAGE

Afin de fournir des résultats scientifiquement et statistiquement valides, les échantillons doivent être en adéquation avec le but prévu pour l'étude proposée et leur qualité, leur volume et leur nombre doivent être adaptés. La diversité des objectifs poursuivis par les enquêtes ayant recours à des analyses de laboratoire est présentée à la section A ci-dessus.

Pour que les analyses effectuées en laboratoire permettent de confirmer un diagnostic, il est important de faire des prélèvements sur des animaux qui sont soit cliniquement malades, soit soupçonnés sur la base de preuves solides d'être infectés ou, pour la sérologie, d'avoir été infectés. Les échantillons susceptibles de présenter le plus haut degré de sensibilité et de spécificité pour l'enquête doivent être collectés. En règle générale, le stade de l'infection ainsi que la voie et la durée de l'excrétion détermineront le ou les animaux appropriés, le stade de la maladie clinique adéquat, le calendrier idéal pour l'échantillonnage ainsi que le tissu ou le site anatomique à privilégier pour les prélèvements. Ces critères seront déterminés grâce à une bonne compréhension de la pathogenèse de la maladie pour les affections connues et selon la pathogenèse hypothétique des affections d'étiologie inconnue.

Pour détecter des preuves d'une infection conformément aux cinq autres objectifs des essais, cités à la section A ci-dessus, l'échantillonnage doit s'inscrire dans le contexte d'un programme de surveillance. Les critères de conception et de mise en œuvre d'une surveillance efficace sont décrits au Chapitre 1.4. *Surveillance de la santé animale* du *Code sanitaire pour les animaux terrestres (Code terrestre)*. La sélection des animaux à échantillonner dans les programmes de surveillance peut être ciblée (basée sur les risques) ou aléatoire. L'échantillonnage fondé sur le risque et reposant sur la connaissance épidémiologique de l'infection étudiée ou sur les observations épidémiologiques de la population à l'étude a pour objectif de maximiser la probabilité de détecter les individus infectés.

Les déductions faites quant au statut d'une population, comme l'estimation de la prévalence, le statut immunitaire ou l'absence de la maladie, doivent reposer sur un échantillonnage aléatoire. Ce dernier garantit que les animaux concernés sont représentatifs de la population, dans les contraintes pratiques imposées par différents environnements et systèmes de production. De plus, l'échantillonnage aléatoire permet une extrapolation des résultats de l'étude à l'ensemble de la population (avec un intervalle de confiance approprié). Les principes épidémiologiques pour estimer la taille de l'échantillon sont abordés dans l'Annexe 1.1.2.1.

Les exigences spécifiques en matière de surveillance pour démontrer l'absence de la maladie/de l'infection ainsi que les exigences d'échantillonnage associées sont abordées en détail à l'Article 1.4.6 du Chapitre 1.4 du *Code terrestre*.

L'échantillonnage et les analyses en laboratoire peuvent également servir à appuyer les diagnostics et études reposant sur l'épidémiologie, comme les cas-témoins, les études longitudinales structurées ou les études de cohorte (Fosgate et Cohen, 2008 ; Mann, 2003 ; Pfeiffer, 2010). Le nombre et le choix des animaux à échantillonner ainsi que la nature des échantillons font partie du dispositif de l'étude.

C. INFORMATIONS DEVANT ACCOMPAGNER LES ECHANTILLONS

Les échantillons individuels doivent être clairement identifiés en utilisant des méthodes appropriées. Les instruments de marquage doivent pouvoir résister aux conditions d'utilisation, par exemple l'humidité ou la congélation. L'utilisation d'un stylo marqueur indélébile est requise. Le crayon peut s'effacer et les étiquettes apposées au plastique peuvent tomber lorsque les emballages sont conservés à -70°C .

Des informations concernant la provenance géographique, les coordonnées de l'expéditeur, les lieux échantillonnés, la description du cas et les données épidémiologiques associées, de la manière expliquée ci-dessus, doivent toujours accompagner les échantillons envoyés au laboratoire. Ces documents doivent être placés dans une enveloppe plastifiée à l'extérieur du récipient d'expédition afin de pouvoir s'y référer pendant le

transport ; un double doit également se trouver dans le récipient d'expédition entre l'emballage secondaire et l'emballage extérieur (voir également Chapitre 1.1.3. *Transport de matériel biologique*). Il est recommandé de contacter le laboratoire de destination pour obtenir un formulaire de demande d'examen approprié ainsi que toute autre information pertinente concernant l'expédition et la manipulation.

Les informations nécessaires incluent les éléments suivants :

1. Localisation et coordonnées

- i) Nom et adresse du propriétaire/de l'exploitant engagé par le propriétaire de l'animal et/ou lieux échantillonnés et géolocalisation (latitude et longitude, si disponibles) de l'endroit où la maladie est apparue avec les coordonnées utiles (numéros de téléphone et de fax, adresse électronique).
- ii) Nom, adresses postale et électronique, numéros de téléphone et de fax de l'expéditeur.

2. Informations sur le cas

- i) Agents pathogènes suspectés et analyses demandées.
- ii) Espèce, race, sexe, âge et identité des animaux échantillonnés ainsi que leur numéro de suivi, si disponible.
- iii) Date à laquelle les échantillons ont été prélevés et envoyés.
- iv) Liste et type d'échantillons soumis avec les milieux de transport utilisés.
- v) Historique du cas :
 - a) les signes cliniques et leur durée incluant la température des animaux malades, l'état de la bouche, des yeux et des pieds ainsi que les données concernant la production de lait ou d'œufs s'il y a lieu ;
 - b) une liste et une description des animaux examinés ainsi que les résultats des examens *ante* et *post mortem* ;
 - c) le temps que les animaux malades ont passé dans ces lieux ; s'il s'agit d'arrivées récentes, leur provenance ;
 - d) la date des premiers cas ainsi que des cas ou des pertes ultérieures, en indiquant, pour le suivi, tout numéro de référence approprié concernant une demande d'analyse antérieure.

3. Informations épidémiologiques

- i) Description de la propagation de l'infection dans le cheptel ou le troupeau.
- ii) Nombre d'animaux dans les lieux par espèce, nombre d'animaux morts, nombre d'animaux présentant des signes cliniques ainsi que leur âge, sexe et race.
- iii) Type et normes d'élevage, incluant les mesures de biosûreté et autres facteurs pertinents potentiellement associés à l'apparition de cas.
- iv) Historique des voyages à l'étranger du propriétaire ou de l'introduction d'animaux provenant d'autres pays ou régions.
- v) Liste des médicaments donnés aux animaux et date de leur administration.
- vi) Historique des vaccinations décrivant le type de vaccin utilisé et dates d'administration.
- vii) Autres observations à propos de la maladie, des pratiques d'élevage et autres maladies présentes.

D. RECEPTION, STOCKAGE ET ARCHIVAGE DES ENVOIS ADRESSES AU LABORATOIRE

1. Réception des échantillons

La réception, le déballage et le fractionnement aliquote des échantillons doivent être effectués de façon à éviter toute contamination croisée afin de garantir la fiabilité des analyses et d'éviter toute exposition du personnel.

Une appréciation du risque doit avoir lieu, de la manière décrite au chapitre 1.1.4, avant que les systèmes de manipulation des agents biologiques et des toxines ne soient établis, et ce, afin de définir les mesures appropriées en matière de biosécurité et de biosûreté au laboratoire. L'appréciation du risque doit permettre d'élaborer une politique et des procédures officielles pour faire fonctionner l'ensemble du processus de réception des envois adressés au laboratoire.

Les envois adressés au laboratoire doivent être reçus, conformément aux procédures opérationnelles normalisées définies, par un personnel formé de manière adéquate et, si possible, averti des arrivées potentielles de sorte que les colis soient traités correctement dès leur réception. Pour permettre un suivi approprié des échantillons, les informations suivantes doivent être consignées : a) heure d'arrivée, b) expéditeur, c) personne recevant les échantillons et d) transporteur avec numéro de suivi. Lorsqu'une chaîne de contrôle spécifique est requise à des fins judiciaires ou d'enquête, l'envoi doit rester fermé et mis en lieu sûr dans un endroit frais et sec, à l'abri de la lumière directe du soleil, jusqu'à ce que le personnel du laboratoire autorisé soit averti et disponible pour réceptionner le paquet et que la chaîne de contrôle puisse se poursuivre. Les laboratoires doivent disposer d'une procédure opérationnelle écrite détaillant les exigences à remplir pour être en conformité avec les obligations légales nationales pour ce type d'envois.

1.1. Zone de réception des échantillons

Les zones de réception des échantillons doivent être équipées de manière à faciliter la manipulation et le traitement en toute sécurité des envois pour diagnostic afin d'éviter la contamination de la zone de travail, du personnel ou la contamination croisée des échantillons et de permettre une désinfection facile dans le cas où les récipients contenant les échantillons auraient fui. Le local où sont réceptionnés les échantillons doit être propre et disposer de suffisamment d'espace sur la paillasse pour organiser les envois et les documents. En fonction du nombre d'envois attendus et de l'appréciation du risque, la zone de réception des échantillons pourra être soit un espace du laboratoire de diagnostic réservé à cet effet, soit un lieu séparé à l'extérieur de celui-ci.

Le local de réception doit comporter une zone réservée au déballage des échantillons, avec des surfaces et des plateaux faciles à laver et/ou une enceinte de biosécurité, en fonction de l'appréciation du risque. Il faut un espace suffisant et adapté pour stocker les échantillons (réfrigérateurs ou congélateurs), qui tienne compte de leur durée de stockage présumée. Des équipements destinés à l'enregistrement des échantillons, par exemple ordinateurs, imprimantes ou journaux de bord, doivent être disponibles. Un système de code-barres peut également être utilisé pour identifier et suivre les échantillons.

1.2. Déballage, enregistrement et préparation au traitement ultérieur

Les envois doivent rester fermés jusqu'à leur transfert vers la zone de réception des échantillons pour traitement ultérieur. L'envoi sera déballé et ouvert selon des procédures opérationnelles normalisées définies. Une décontamination des surfaces sera envisagée pour éviter toute contamination croisée et fera partie intégrante des procédures déterminées à la suite de l'appréciation du risque.

Les informations à enregistrer pour identifier l'échantillon incluent la provenance de la livraison, la date d'expédition, l'état de l'emballage extérieur et des emballages intérieurs (mentionnant la présence de fuites ou de ruptures), l'état de l'échantillon lui-même, la température de l'emballage intérieur ainsi que toute requête spécifique formulée par l'expéditeur.

Parmi les autres activités peuvent figurer l'étiquetage des récipients contenant les échantillons, le transfert des échantillons au laboratoire ainsi que leur stockage.

Les emballages doivent être éliminés de manière appropriée conformément aux réglementations nationales, ce qui peut inclure la destruction par autoclavage de tous les matériaux d'emballage, en fonction de l'appréciation du risque.

Un équipement de protection individuelle (EPI) doit être fourni pour protéger le personnel. L'EPI minimal est composé d'une blouse et de gants. En fonction de l'appréciation du risque, il pourra s'avérer nécessaire d'y adjoindre une protection respiratoire ou une protection efficace contre les projections (ex. : lunettes de protection).

Une fois qu'il est établi que l'envoi reçu contient les documents appropriés correspondant aux échantillons et que ces échantillons sont en bon état, un personnel de laboratoire formé de manière adéquate prend la responsabilité du transfert vers la zone du laboratoire appropriée, y compris du maintien de la chaîne de contrôle des échantillons de la manière requise. Il ne faut transférer que des échantillons convenablement confinés et enregistrés (identifiés) au laboratoire de diagnostic. Il s'agit là d'une bonne pratique ; en fonction de l'appréciation du risque, il est également parfois exigé, pour des raisons liées à la biosécurité et à la sûreté biologique dans le laboratoire, de placer les récipients contenant les échantillons soumis dans un second récipient en vue de garantir la sécurité du transfert des échantillons à l'intérieur du laboratoire.

1.3. Urgences

Une appréciation du risque exhaustive permettra d'établir des scénarios d'urgence crédibles et prévisibles, qui serviront de base à la préparation d'un plan d'urgence. En particulier, les échantillons qui fuient représentent un danger biologique pour le personnel du laboratoire et sont susceptibles de contaminer l'environnement ainsi que les autres échantillons. Des instructions écrites doivent donc être disponibles dans la zone de réception des échantillons pour expliquer le comportement à adopter en cas de tubes cassés ou qui fuient. Le personnel doit être formé et des exercices et simulations d'urgence doivent avoir lieu régulièrement.

Les échantillons détériorés ou dans un état inacceptable pour l'analyse doivent être décontaminés et éliminés de manière appropriée, conformément au plan de réaction du laboratoire, tel qu'indiqué dans le paragraphe précédent. Les surfaces de laboratoire contaminées doivent être décontaminées à l'aide du désinfectant adéquat. Si des échantillons sont rejetés ou des incohérences relevées entre l'échantillon et les documents qui l'accompagnent, ces problèmes doivent être résolus en contactant sans délai l'expéditeur pour qu'il renvoie un double de l'échantillon ou qu'il clarifie les documents.

2. Stockage et archivage

Les collections d'échantillons bien caractérisés, agents infectieux, tissus et liquides infectés ainsi que tissus et liquides témoins négatifs, sont très importants pour les efforts futurs de recherche et de développement, pour les études rétrospectives, les enquêtes épidémiologiques ainsi que pour fournir le matériel de référence indispensable à la normalisation et à la validation des épreuves ainsi qu'aux programmes d'essais d'aptitude. Les échantillons analysés à des fins judiciaires doivent par ailleurs être mis en banque.

Le matériel habituellement requis pour les étalons de référence et pour la validation des épreuves est décrit au Chapitre 1.1.5 *Gestion de la qualité dans les laboratoires de diagnostic vétérinaire*. Le matériel conservé dans les archives du laboratoire doit être représentatif des agents manipulés et des types d'échantillons utilisés pour les différentes méthodes d'essai : liquides et tissus frais et fixés, tissus inclus dans la paraffine et cultures stabilisées ou conservées d'une autre manière. La World Federation for Culture Collections (WFCC : www.wfcc.info/collections) est une source utile en matière d'information et de documentation de référence pour le développement, l'entretien et le partage des collections de cultures ; elle a d'ailleurs publié un guide très complet concernant l'établissement et l'exploitation des collections de cultures microbiennes (WFCC, 2010). La fourniture de matériel de référence relève en outre des attributions des Laboratoires de référence de l'OMSA.

Les principaux éléments caractéristiques des archives d'un laboratoire incluent la possession de moyens appropriés de stabilisation et de stockage, un système complet de documentation et un inventaire du matériel stocké ainsi que l'application de mesures de biosécurité et de sûreté biologique au laboratoire, nécessaires pour gérer la collection.

2.1. Stabilisation et stockage

La méthode de conservation des tissus, liquides et cultures dépendra de l'utilisation qui en est prévue. Les échantillons stockés auxquels un accès périodique est souhaité, par exemple le matériel de référence des épreuves, doivent être fractionnés en quantités aliquotes afin d'éviter tout problème potentiel associé à des allers et retours répétés en provenance du et vers le stock. Ces échantillons peuvent être stockés séparément de ceux destinés à une conservation à long terme à des fins historiques. Les conditions de stockage doivent permettre de maintenir la viabilité ainsi que les propriétés biochimiques et immunologiques des échantillons dans toute la mesure du possible. Parmi les éléments à prendre en considération pour la préservation de l'intégrité des échantillons, citons la protection contre la dessiccation (qui peut, par exemple, survenir dans certains congélateurs), les fluctuations de température fréquentes ou extrêmes, la dégradation par les UV, l'humidité, la contamination ainsi que le risque d'une perte de leur identification et des documents d'archivage associés. Le matériel et les isolats uniques ou constituant des ressources précieuses doivent être stabilisés et stockés en utilisant au moins deux procédures et emplacements de stockage différents.

Le stockage à très basses températures (ex. : azote liquide, cryoconservation dans des congélateurs à -140°C ou moins) est considéré comme la méthode optimale pour le stockage à long terme du matériel biologique. Le stockage à des températures de congélation basses de -80°C ou de -20°C est courant pour des périodes allant de quelques mois à 5-10 ans. Une congélation à très basse température n'est peut-être pas un choix pratique, car son maintien est onéreux, mais le coût doit être compensé par le fait que le risque de dégradation biologique de l'échantillon au fil du temps augmente à des températures de congélation plus élevées. Le matériel de référence nécessitant un accès régulier doit être stocké en fractions aliquotes de taille appropriée afin de permettre cet accès tout en minimisant le nombre de fois où le « stock primaire » sera manipulé. La congélation et la décongélation répétées des échantillons doivent être évitées, car cela peut dénaturer les antigènes, engendrer une perte de viabilité des agents très délicats ou encore précipiter la prolifération de contaminants ou de micro-organismes indésirables dans l'échantillon.

Les méthodes de stabilisation et de stockage des échantillons à température ambiante vont des technologies disponibles dans le commerce qui visent principalement à la stabilisation des acides nucléiques ou des processus de lyophilisation à des modèles relativement basse technologie, comme le séchage des liquides sur des disques de papier filtre ou le stockage d'échantillons biologiques en présence d'agents dessiccateurs destinés à absorber l'humidité, tels que le gel de silice ou les grains de riz.

Les considérations comme la vitesse à laquelle un échantillon est congelé ou conservé chimiquement, la taille et la densité du matériel à conserver, le récipient et le milieu de stockage, les protocoles de reconstitution et de décongélation ou encore les agents à utiliser pour la remise en culture varient en fonction des tissus et des agents. Qu'il s'agisse de stocker des échantillons congelés ou à température ambiante, il existe pour la plupart des tissus et des groupes d'agents infectieux des conservateurs spécifiques, des protocoles de stabilisation et des conditions de stockage considérées comme optimales ; il convient de consulter la littérature récente publiée sur le sujet.

2.2. Documentation et inventaire

Les agents et tissus conservés aux archives doivent être correctement identifiés et une quantité suffisante de données pertinentes caractérisant l'échantillon ou l'agent doivent être enregistrées. Pour le matériel de référence, des documents supplémentaires authentifiant l'agent ou le tissu sont requis. L'idéal est de conserver l'identité unique du tissu, du liquide ou de l'agent ainsi que l'emplacement de stockage dans un registre d'inventaire électronique ou papier, qui répertorie également la date à laquelle le matériel a été obtenu, la date et la méthode de conservation, le volume de matériel stocké, la source du matériel incluant les espèces associées, la localisation géographique ainsi que les antécédents cliniques de l'animal donneur et la situation sanitaire du cheptel ou du troupeau. Des informations supplémentaires sont extrêmement utiles et incluent généralement la méthode originale d'isolement/de recouvrement, la caractérisation (données disponibles concernant les propriétés biochimiques, titre d'anticorps ou d'antigènes, séquence génétique, etc.) ainsi qu'un historique complémentaire sur la manipulation du matériel (ex. : nombre de passages pour les agents infectieux et les lignées cellulaires, dates auxquelles le matériel archivé a été congelé-décongelé ou réhydraté et dates de modification des conditions de stockage ou de changement de récipients). Les inventaires

sont le plus souvent réalisés en attribuant un numéro d'identification unique ou un code alphanumérique à chaque échantillon (récipient) pour lequel des références croisées sont établies avec une base de données ou un registre d'inventaire. Ce dernier peut prendre la forme d'un journal de données tenu à la main, de tableurs informatisés ou de programmes informatiques spécialisés. Quelle que soit la façon dont les registres sont gérés, ils doivent être tenus à jour et il doit être possible de remonter à la source des informations qui y figurent. L'identité des individus introduisant ou modifiant des informations dans l'inventaire des échantillons doit être enregistrée.

2.3. Biosécurité et sûreté biologique au laboratoire

La première étape de création des archives consiste à procéder à une appréciation du risque biologique au laboratoire en abordant les questions de la sécurité biologique et de la biosûreté au laboratoire, notamment les mesures de contrôle et de réduction des risques à mettre en œuvre. Comme précisé au chapitre 1.1.4, une appréciation du risque appropriée pour les échantillons archivés doit s'intéresser aux compétences techniques que le personnel manipulant les tissus, les liquides et les agents doit posséder, en mettant particulièrement l'accent sur le matériel potentiellement infectieux ou toxique pour les travailleurs, les animaux et l'environnement à l'intérieur et autour du laboratoire. Le laboratoire doit prendre en considération toutes les mesures de gestion du risque biologique nécessaires afin de protéger l'intégrité de l'échantillon, la santé des travailleurs et l'environnement, à partir du moment où l'échantillon original est reçu jusqu'à son utilisation finale ou la destruction du matériel, en passant par son stockage à long terme.

Le niveau approprié de biosûreté au laboratoire, y compris l'accès contrôlé aux échantillons archivés et aux registres d'inventaire, est un élément important pour les laboratoires conservant des archives et des inventaires biologiques. Le laboratoire doit également disposer d'un plan de secours pour le transfert ou la destruction du matériel archivé potentiellement dangereux en cas de pannes électriques ou d'autres dangers pouvant compromettre l'environnement de stockage. La législation et les réglementations nationales et internationales doivent être respectées pour toutes les archives du laboratoire ; cela englobe notamment les exigences concernant les permis et autorisations pour réceptionner, conserver, travailler avec et distribuer les tissus et agents spécifiques. Les informations réglementaires actuelles concernant la réception et le stockage du matériel biologique se trouvent sur le site Internet du réseau européen des Centres de ressources biologiques (European Biological Resource Centre Network, www.ebrcn.org/), dans les lignes directrices de la WFCC (2010) et peuvent être consultées auprès des agences gouvernementales nationales pertinentes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANON (1993) Removal of blood from laboratory mammals and birds. First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW/Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals*, **27**, 1–22.

FOSGATE G.T. & COHEN N.D. (2008) Epidemiological study design and the advancement of equine health. *Eq. Vet. J.*, **40**, 693–700.

HEM A., SMITH A.J. & SOLBERG P. (1998). Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Laboratory Animals*, **32**, 364–368.

MANN C.J. (2003). Observational research methods. Research design II: cohort, cross sectional, and case-control studies. *Emerg. Med. J.*, **20**, 54–60.

PFEIFFER D. (2010). *Veterinary Epidemiology: An Introduction*. Wiley-Blackwell; pp. 37–41.

WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS (2010). *Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms*, Third Edition, Revised by the WFCC Executive Board. ISBN 92 9109 043 3.

*
* *

N. B. : PREMIERE ADOPTION EN 2008 SOUS LE TITRE « PRELEVEMENT ET EXPEDITION DES ECHANTILLONS POUR LE DIAGNOSTIC ».
DERNIERES MISES A JOUR ADOPTEES EN 2013.

APPENDICE 1.1.2.1.

APPROCHES EPIDEMIOLOGIQUES DE L'ECHANTILLONNAGE : CALCUL DE LA TAILLE DES ECHANTILLONS

Le type et le nombre d'échantillons nécessaires dépendent du but recherché. Le calcul de la taille des échantillons pour chacun des objectifs principaux des analyses ayant recours à un échantillonnage aléatoire peut être abordé de la manière suivante.

1. Démonstration de l'absence d'infection dans une population donnée (pays/zone/compartiment/troupeau où la prévalence apparente est nulle)

Bien souvent, l'objectif de l'échantillonnage est de déterminer si une maladie est présente ou absente dans une population selon un seuil spécifique (prévalence attendue). Ces méthodes d'échantillonnage sont nécessaires pour mener à bien les enquêtes scientifiquement fondées qui sont détaillées dans le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'OMSA ; elles sont utilisées pour déterminer l'absence d'infection avec et sans vaccination et pour permettre le recouvrement du statut indemne après les foyers.

Il est possible de calculer le nombre d'animaux à échantillonner dans un troupeau/cheptel d'une certaine taille en vue de parvenir à une probabilité de 95 % de détecter l'infection ou une exposition antérieure présumée chez un certain pourcentage d'animaux. La formule suivante s'applique :

$$n \cong \frac{(1 - (1 - CL)^{1/D})(N - 1/2)(SeD - 1)}{Se}$$

où

- n : est la taille de l'échantillon requis ;
- CL : est le niveau de confiance (généralement 0,95) ;
- N : est la taille de la population ;
- D : est le nombre d'animaux malades attendus dans la population ;
- Se : est la sensibilité diagnostique du test utilisé.

Par exemple, pour déterminer la taille de l'échantillon requis afin de détecter au moins l'un des animaux infectés dans un troupeau de 500 animaux, avec un intervalle de confiance à 95 % et une prévalence attendue de 10 %, la formule ci-dessus sera utilisée de la manière suivante (en supposant une sensibilité diagnostique parfaite) :

$$n \cong (1 - (1 - 0.95)^{1/50})(500 - 1/2)(50 - 1) \cong 28$$

Si les résultats du laboratoire sont négatifs pour tous les échantillons, l'épidémiologiste pourra conclure, avec une confiance de 95 %, que la prévalence est inférieure à 10 %. Si la maladie en question est hautement contagieuse et qu'il est peu probable que seuls 10 % des animaux soient infectés, le troupeau pourra être considéré indemne de la maladie. En revanche, si un ou plusieurs échantillons sont positifs, l'épidémiologiste pourra conclure, avec une confiance de 95 %, que la prévalence de la maladie est d'au moins 10 %.

2. Certification de l'absence d'infection ou de la présence de l'agent chez des animaux individuels ou des produits destinés au commerce/à circuler

Le *Code terrestre* fournit des recommandations spécifiques concernant les échanges commerciaux. Certaines reposent sur la démonstration de l'absence de la maladie au niveau d'un troupeau ou d'un cheptel et d'autres sur l'analyse individuelle d'animaux destinés à l'exportation. Lorsque la certification de l'absence de la maladie au sein d'un troupeau ou d'un cheptel est recommandée, l'approche décrite au point 1 ci-dessus peut être suivie pour calculer le nombre d'échantillons requis.

Dans le cas d'analyses individuelles d'animaux, il est généralement prévu de tester tous les animaux. La question essentielle dans ce cas porte sur la valeur prédictive négative (VPN) du test et la probabilité d'avoir au moins un faux négatif dans un groupe. La valeur prédictive négative d'un test est définie comme la probabilité qu'un animal

ne soit pas infecté dans la mesure où il a été testé négatif. La valeur prédictive négative est fonction de la sensibilité et de la spécificité diagnostiques des tests utilisés ainsi que de la prévalence de l'infection dans la population dont proviennent les animaux en question. En général, la probabilité d'avoir au moins un faux négatif dans un groupe se calcule ainsi :

$$P(x \geq 1) = 1 - (1 - VPN)^n$$

La valeur prédictive négative se calcule comme suit :

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} = \frac{(1 - p)Sp}{(1 - p)Sp + p(1 - Se)}$$

où

- VN: est le vrai négatif ;
- FN: est le faux négatif ;
- Se : est la sensibilité diagnostique ;
- Sp: est la spécificité diagnostique ;
- p : est la prévalence ;
- n : est le nombre d'animaux dans le groupe.

Des informations complémentaires sur la quantification de ces types de probabilité se trouvent dans le manuel de l'OMSA sur l'analyse de risque à l'importation pour animaux et produits animaux, analyse de risque quantitative (*Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products, Quantitative Risk Analysis*).

3. Éradication de la maladie ou élimination de l'infection dans des populations données

L'objectif de la surveillance en cas de foyer est d'essayer de trouver toute poche d'infection résiduelle. L'échantillonnage doit cibler les populations présentant un risque d'exposition plus élevé et au sein desquelles l'agent est le plus susceptible de se trouver, par exemple les animaux présentant des signes cliniques ou soupçonnés d'avoir été en contact avec des animaux infectés. Si les animaux d'un troupeau ou d'un cheptel sélectionné ne présentent pas de signes cliniques, un échantillon représentatif, basé sur la formule présentée au point 1 ci-dessus, sera prélevé pour déterminer la présence ou l'absence de la maladie.

4. Diagnostic de confirmation de cas cliniques ou suspects (dont la confirmation de tests de dépistage positifs)

Les cas cliniques ou suspects avec un résultat de dépistage positif doivent être analysés à nouveau au moyen d'un test de confirmation. Habituellement, une épreuve dont la sensibilité diagnostique est élevée est utilisée aux fins du dépistage et une autre dont la spécificité diagnostique est élevée sert à la confirmation. Si le statut du troupeau ou du cheptel a un intérêt, les animaux présentant des signes cliniques compatibles avec la maladie à l'étude doivent être échantillonnés. Cela augmentera la probabilité de confirmer l'infection. Si nécessaire, la formule mentionnée au point 1 ci-dessus pour déterminer la présence ou l'absence de la maladie, peut être utilisée pour calculer le nombre d'échantillons requis. Étant donné que la collecte d'échantillons cible les animaux présentant des signes cliniques, la prévalence attendue peut être relativement élevée, ce qui permettra de diminuer la taille de l'échantillon.

5. Estimation de la prévalence de l'infection

Il est possible que les programmes de contrôle des maladies doivent évaluer périodiquement les effets des mesures de lutte. L'un des indicateurs-clés de succès réside dans la réduction de la prévalence de la maladie. Pour déterminer la prévalence d'une maladie au sein d'un groupe d'animaux, la formule suivante peut être utilisée afin d'établir le nombre d'échantillons requis :

$$n = \frac{Z^2 pq}{L^2}$$

où

- n : est la taille de l'échantillon requis ;
- Z : est la valeur de la distribution Z pour le niveau de confiance souhaité (ordinairement 95 %) ;
- p : est la prévalence attendue dans la population ;
- q : est 1-p ;
- L : est le niveau de précision (ou d'erreur acceptable).

Il n'existe pas de règles fixes pour déterminer le niveau de précision (parfois également appelé marge d'erreur) ; le choix est laissé à l'appréciation de l'épidémiologiste qui dirige l'étude. Cependant, un niveau de précision plus élevé nécessite un échantillonnage plus large. La valeur correspondante de la distribution Z pour un intervalle de confiance à 95 % est de 1,96. Pour déterminer la prévalence d'une maladie avec un intervalle de confiance à 95 % dans un troupeau de 500 animaux selon une prévalence attendue de la maladie de 20 %, à un niveau de précision de ± 3 %, la taille d'échantillon requise peut être calculée comme suit :

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.2 \times 0.8}{0.03^2} = \frac{0.6146}{0.0009} \cong 683$$

Notons que, dans ce cas précis, la taille d'échantillon requise est supérieure à la population ; la taille de l'échantillon devra donc être ajustée pour tenir compte de la taille de la population (N) :

$$n_{adj} = \frac{1}{1/n + 1/N} = \frac{1}{1/683 + 1/500} \cong 289$$

Ainsi, 289 animaux devraient être échantillonnés de manière aléatoire.

6. Détermination du statut immunitaire d'animaux ou de populations spécifiques (post-vaccination)

Les programmes de lutte contre les maladies utilisent souvent l'outil de la vaccination; dans de tels cas, il est important d'évaluer la couverture immunitaire et pas uniquement de compter le nombre d'animaux ou de troupeaux ayant été vaccinés. La proportion d'animaux devant être immunisés en vue d'enrayer la propagation de la maladie dans une population est fonction du nombre d'infections secondaires provoquées par un cas unique d'infection (nombre reproductif, R_0). Pour de nombreuses maladies infectieuses, la proportion nécessitant une immunité afin de contrôler la propagation de la maladie se situe autour de 80 %. Deux approches peuvent s'appliquer. Si l'objectif est de trouver la proportion d'animaux immuns, la formule mentionnée au point 5 ci-dessus peut être appliquée pour déterminer la prévalence. En revanche, si les gestionnaires du programme veulent évaluer si les troupeaux ont un niveau d'immunité égal ou supérieur à un certain seuil, la formule pour déterminer la présence ou l'absence de la maladie, mentionnée au point 1 ci-dessus, doit être utilisée. La taille des échantillons varie largement en fonction de l'objectif.

Si l'on souhaite estimer le statut immunitaire d'un troupeau de 500 animaux ayant tous été vaccinés, les approches suivantes peuvent être adoptées.

6.1. Estimation de la proportion d'animaux immuns dans un groupe

- Prévalence attendue (d'animaux immuns) : 80 %
- Précision, hypothèse pour cet exemple : 3 %
- Niveau de confiance : 95 %

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.8 \times 0.2}{0.03^2} = \frac{0.6146}{0.0009} \cong 683$$

$$n_{adj} = \frac{1}{1/n + 1/N} = \frac{1}{1/683 + 1/500} \cong 289$$

6.2. Estimation de l'immunité selon un seuil défini

- Prévalence attendue (d'animaux immuns) : 80 %, c.-à-d. 400 animaux sur 500
- Niveau de confiance : 95 %
- Sensibilité diagnostique parfaite

$$n \cong (1 - (1 - 0.95)^{1/400})(500 - 1/2(400 - 1)) \cong 3$$

Si au moins l'un des trois échantillons est positif au test, l'interprétation est, selon un intervalle de confiance à 95 %, que la proportion d'animaux immuns dans le troupeau s'élève à 80 % au moins. Si aucun des échantillons n'est positif, le troupeau ne peut pas être considéré comme correctement

immunisé. Une telle approche peut être utilisée pour déterminer les localisations géographiques ou les types de systèmes de production où la couverture immunitaire est basse et où une revaccination peut s'avérer nécessaire.

Ressources en ligne

Open Epi – <http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>

Free Calc – <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=FreeCalc2>

Win Episcopes – <http://www.winepi.net/>

*
* *