

DEUXIEME PARTIE : Étude expérimentale

I) Objectifs de l'étude

En médecine vétérinaire, la mesure de la glycémie est un acte courant et la mesure de la lactatémie se développe de plus en plus. Ces mesures peuvent se faire grâce à un analyseur standard après ponction veineuse mais aussi grâce à des analyseurs portables. Ces analyseurs portables ne nécessitent qu'un faible volume de sang (0,5µL) ainsi les mesures peuvent se faire à partir du sang capillaire récupéré au niveau de l'oreille de l'animal. Les avantages des analyses à partir de sang capillaire sont multiples :

- La ponction de sang est moins invasive, plus rapide et plus facile qu'une prise de sang puisqu'une seule goutte suffit ;
- Les effets secondaires sont rares alors qu'une prise de sang veineuse peut entraîner des hématomes ;
- Les prélèvements à l'oreille peuvent être effectués par les propriétaires ce qui est intéressant pour le suivi d'un animal diabétique.

Cependant la fiabilité de la mesure de la glycémie et de la lactatémie sur sang capillaire par rapport aux mesures sur sang veineux avec des analyseurs portables n'a pas été établie.

Cette étude se propose de comparer les valeurs de la lactatémie et de la glycémie à partir de sang veineux et de sang capillaire.

II) Matériels et méthodes

1. Les animaux

Les animaux inclus dans cette étude ont été présentés aux urgences ou étaient hospitalisés au service des soins intensifs du CHUVA entre novembre 2010 et juin 2011.

Ce sont des chiens ou des chats sans distinction d'âge, de sexe, de race ou de motif de présentation aux urgences ou de motif d'hospitalisation.

Certains animaux du fait d'une hospitalisation prolongée ont été prélevés deux fois.

2. Protocole

2.1. Protocole général

Les méthodes de prélèvements veineux et capillaires sont celles utilisées couramment au service d'urgence et soins intensifs du CHUVA. Les résultats étaient notés sur une feuille comprenant l'étiquette Clovis de l'animal. (Annexe 1)

2.1.1. Ponction veineuse

Les ponctions sanguines ont été réalisées aux veines jugulaires ou aux veines céphaliques d'un des membres thoraciques ou aux veines saphènes d'un des membres pelviens. Aucune distinction de localisation des ponctions veineuses ne sera faite car l'étude porte sur la distinction sang veineux et sang capillaire.

La prise de sang est soit faite directement avec une aiguille montée sur une seringue et une compression manuelle ou indirectement à partir d'un cathéter veineux non préalablement rincé avec du sérum physiologique.

Après ponction, le sang est placé tout de suite dans un tube hépariné qui est retourné plusieurs fois pour homogénéiser le contenu ; deux gouttes sont réservées pour les mesures de lactatémie et de glycémie avec les appareils portatifs. Les analyses sanguines sont réalisées moins d'un quart d'heure après le prélèvement pour le sang placé dans le tube hépariné et moins de cinq minutes après le prélèvement pour les analyses avec les appareils portatifs.

2.1.2. Ponction capillaire

Le prélèvement de sang capillaire est fait au niveau des oreilles des animaux (figure 8). A l'aide d'une aiguille, une petite incision est réalisée sur le pavillon interne de l'oreille. L'oreille est ensuite doucement comprimée pour faire ressortir deux gouttes directement placées sur les bandelettes utilisées pour le dosage de la lactatémie et de la glycémie avec les appareils portatifs.

Figure 8 : Ponction capillaire sur un chien (Casella *et al.*, 2002)



2.2. Mesure de la glycémie

De même que pour la lactatémie, une goutte de sang est prélevée dans le tube hépariné et placée sur la bandelette spécifique à l'Accucheck Active®. Le reste est analysé avec le VetTest® de chez Idexx.

2.2.1. Description de l'Accucheck Active® (figure 9)

Le glucose contenu dans le prélèvement va diffuser à travers un film poreux pour atteindre un film imprégné de glucose oxydase et d'autres réactifs chimiques.

Le produit final de la réaction chimique est coloré. L'intensité du changement de couleur est mesurée grâce à un film inférieur transparent par le biais de la spectrophotométrie par réflectance.

Le résultat apparaît en 5 secondes. Les valeurs sont comprises entre 0,1 et 6 g/L.

Figure 9 : Accucheck Active® ([www.lactate.com/techinfo.html], 2006)

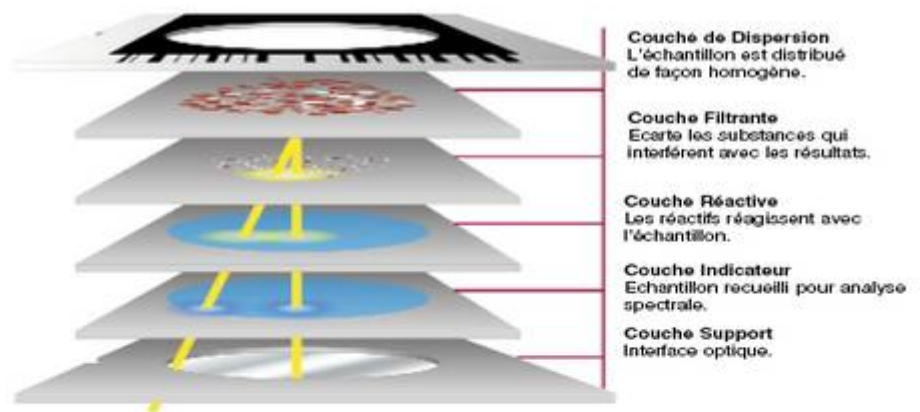


2.2.2. Description du VetTest®

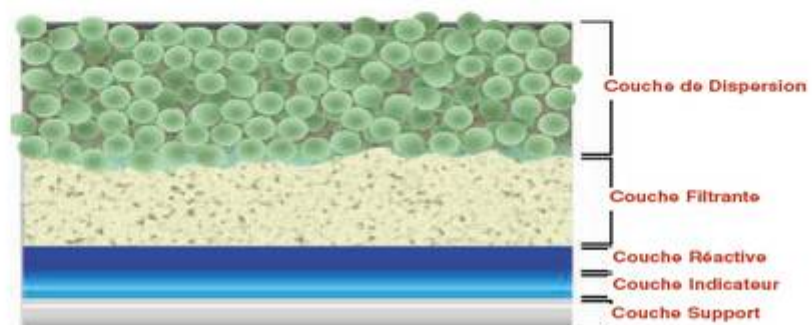
La glycémie et la lactatémie par l'analyseur VetTest® sont mesurées grâce à des plaquettes individuelles (figure 10) qui utilisent la technologie de la chimie sèche. On peut voir ci-dessous les différentes couches des plaquettes.

Figure 10 : Plaquettes VetTest® ([http://www.idexx.fr/santeanimale/analyseurs/product_caraloguefr.pdf], 2002)

Les fonctions des différentes couches des plaquettes



Détail des différentes couches



On a ensuite une réaction photométrique permettant de mesurer la glycémie. Le résultat est donné en 6 minutes.

2.3. *Mesure lactatémie*

Une goutte du sang placé dans le tube hépariné est prélevée et on la dépose sur une bandelette spécifique de l'Accutrend Lactate®.

Le reste du tube est centrifugé puis l'analyse est faite au VetTest® de chez Idexx.

La goutte de sang prélevée à l'oreille a aussi été analysée avec l'Accutrend Lactate®.

2.3.1. *Description de l'Accutrend Lactate®*

L'appareil portatif utilisé pour mesurer la lactatémie est l'Accutrend Lactate® (figure 11). Il s'agit d'un appareil portatif qui fonctionne avec des bandelettes spécifiques : BM-Lactate® sur lesquelles est déposée une goutte de sang total ou de plasma.

Figure 11 : Accutrend Lactate® (Josien, 2006)



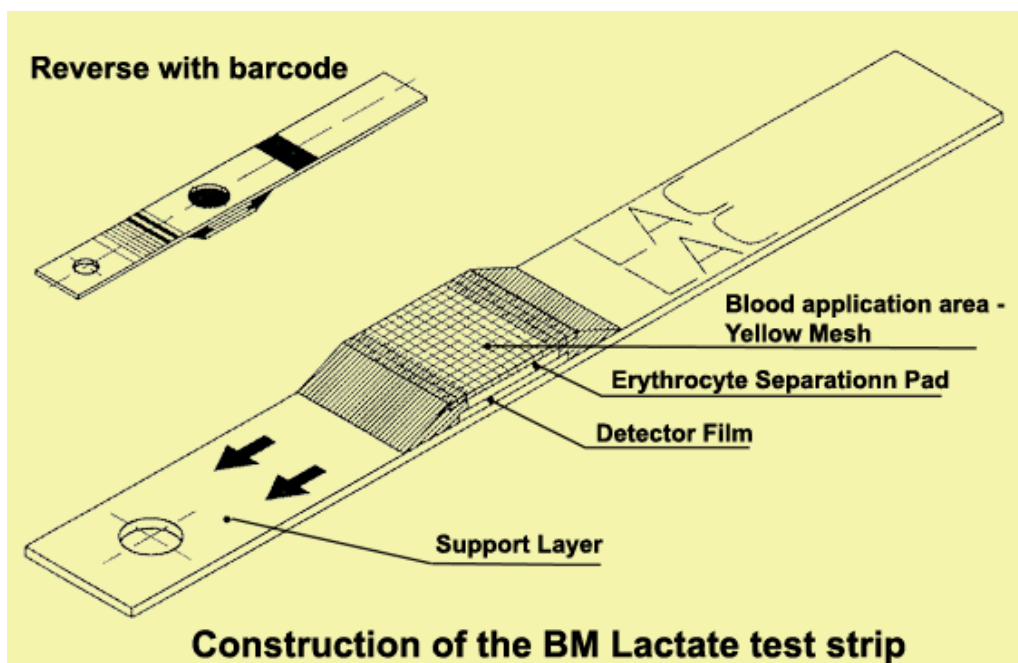
Chaque bandelette est composée de trois couches (figure 12) :

- une première couche maillée pour déposer la goutte ;
- une seconde couche dans laquelle les érythrocytes sont retenus, seul le plasma atteint la 3^{ème} couche ;
- une troisième couche réactive : la concentration en lactate est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 657nm après une réaction colorimétrique lactate-oxydase/ médiateur.

L-Lactate + Médiateur (forme1) -> pyruvate + Médiateur réduit

Médiateur réduit + 2,18-phosphomolybdate -> bleu de molybdène + Médiateur forme 2

Figure 12: Bandelette de l'Accutrend® Lactate ([www.lactate.com/techinfo.html], 2006)



Le résultat est donné en soixante secondes.

L'intervalle de mesure donné par le fabricant est de 0,8 mmol/L à 22 mmol/L sur sang total et 0,7 mmol/L à 27 mmol/L sur du plasma. Dans notre étude, l'analyse était faite uniquement sur du sang total.

L'Accutrend Lactate® est simple d'utilisation, rapide et pratique, c'est pourquoi il est adapté au service d'urgences et soins intensifs.

2.3.2. Description du VetTest®

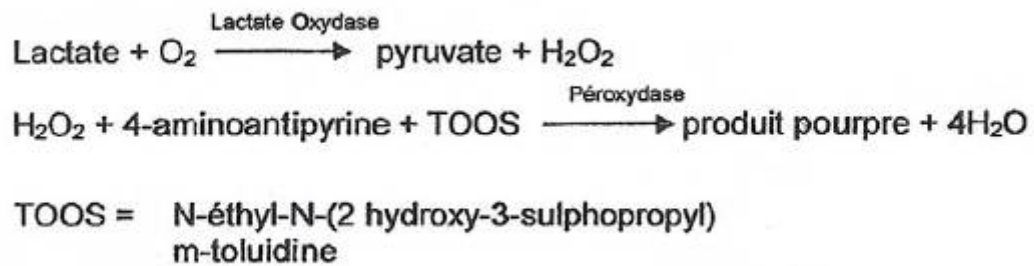
L'analyseur VetTest® (figure 13) permet de mesurer de nombreux paramètres biochimiques.

Figure 13 : Analyseur VetTest® ([http://www.idexx.fr/santeanimale/analyseurs/product_caraloguefr.pdf], 2002)



L'analyseur VetTest® mesure la lactatémie (L-lactate) par une réaction colorimétrique indirecte selon la réaction suivante (figure 14) :

Figure 14 : Réaction colorimétrique (Josien, 2006)



Les résultats sont donnés en 6 minutes. Le taux minimal détecté est de 0,5 mmol/L et la valeur maximale mesurée est de 12 mmol/L.

2.4. *Mesure de l'hématocrite et des protéines totales*

Les mesures d'hématocrite et de protéines totales ont permis d'évaluer l'état d'hydratation de l'animal. Les mesures ont été faites avec un microtube et après centrifugation une lecture manuelle de l'hématocrite (figure 15). Le coefficient de variation de la mesure de l'hématocrite est de 3 à 5%. La mesure des protéines totales est faite au refractomètre (figure 16).

Figure 15: microtube après centrifugation

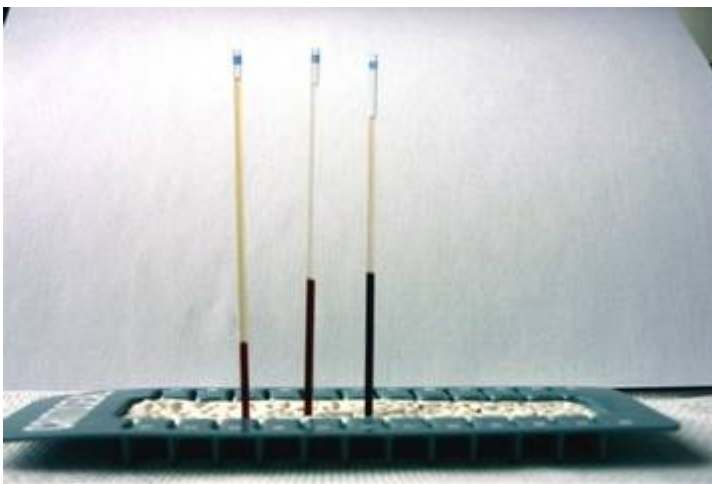


Figure 16 : Refractomètre



3. Analyse statistique

3.1. *Méthode de Bland et Altman* (Bland et Altman, 1986 ; Journois, 2004)

Notre étude consiste à comparer deux mesures quantitatives d'une même grandeur mesurée par deux instruments différents pour savoir si les deux instruments concordent. Les sources de différences entre les deux mesures viennent de la variabilité de chaque mesure. La variabilité d'une mesure quantitative a deux sources principales : la méthode elle-même (variabilité analytique) et l'individu (variabilités inter ou intra-sujet). La variabilité analytique dépend de l'exactitude de la mesure (écart éventuel à la « vraie valeur » ou tout du moins à la valeur obtenue par la méthode de référence) et de sa précision (ou reproductibilité de la mesure).

La première étape pour évaluer l'exactitude d'une mesure par rapport à la mesure de référence est d'examiner graphiquement les données en traçant le nuage de point de la différence entre les deux mesures en fonction de la moyenne des deux mesures. A partir de ce graphique, il est aisé de se rendre compte si la moyenne des différences est différente ou non de zéro et si la différence entre les deux mesures varie en fonction du niveau de la mesure (différences importantes dans les valeurs extrêmes par exemple). Cette procédure a été décrite par Bland et Altman. La méthode graphique de Bland et Altman évalue la concordance entre deux mesures d'une même grandeur, mais elle laisse à l'utilisateur le soin de décider si cette concordance le satisfait ou non (et, en particulier, de décider si la différence entre les deux mesures est ou non cliniquement acceptable).

Nous avons donc utilisé la méthode de Bland et Altman pour comparer la mesure obtenue sur sang veineux avec l'appareil portatif par rapport à la mesure obtenue sur sang veineux avec le laboratoire, ainsi que la mesure obtenue sur sang capillaire avec l'appareil portatif par rapport à la valeur obtenue sur sang veineux obtenue avec l'appareil portatif. Nous avons fait ces graphiques pour la glycémie et la lactatémie.

Les graphiques ont été obtenus grâce aux logiciels XLSTAT® et EXCEL®.

3.2. Régression de Passing Bablok (Passing et Bablok, 1983; 1984; Bablok *et al.*, 1988)

La méthode de Bland Altman ne permet pas de chiffrer la comparaison. Il est possible d'affecter des chiffres statistiques à la comparaison de deux méthodes, mais il faut éviter certains pièges. Le premier d'entre eux consiste à se fonder sur le coefficient de corrélation pour évaluer la concordance. En effet, les résultats de deux méthodes de mesures peuvent être étroitement corrélés mais systématiquement différents. Ceci provient du fait que la concordance entre deux mesures suppose non seulement une relation linéaire entre elles (comme la corrélation), mais encore que la pente de la relation soit égale à un et l'intercept à l'abscisse soit égal à un (pour une régression linéaire ou une corrélation, l'hypothèse nulle une pente égale à zéro ; pour une concordance, l'hypothèse nulle est une pente différente de un). De plus, le coefficient de corrélation est affecté par la variabilité de la mesure : pour un même niveau d'agrément, le coefficient de corrélation sera d'autant plus élevé que la variabilité entre sujets sera importante. Enfin, la régression linéaire néglige la variabilité de la méthode de mesure de référence.

Pour contourner les obstacles décrits ci-dessus, deux procédures de régression ont été spécifiquement mises au point pour comparer deux mesures. La première est la régression de Deming : cette procédure prend en compte la variabilité des deux mesures en utilisant le rapport des deux variances analytiques. Toutefois elle suppose que les erreurs de mesures (quelle que soit la méthode) suivent une distribution normale, ce que l'on ignore généralement et qui tend à ne pas être vérifié pour de nombreuses variables biologiques.

La seconde méthode est la régression de Passing-Bablok. Il s'agit d'une méthode non paramétrique d'estimation de la pente de la relation entre les deux mesures comparées et de l'ordonnée à l'origine de cette relation. Cette méthode a l'avantage d'être moins sensible aux données extrêmes et de ne pas faire d'hypothèse sur la distribution des erreurs. Si l'intervalle de confiance à 95 % de la pente de la relation inclut un et celui de l'intercept à l'abscisse zéro, on considère qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux méthodes.

Nous avons donc utilisé cette régression pour l'analyse de chacune de nos données.

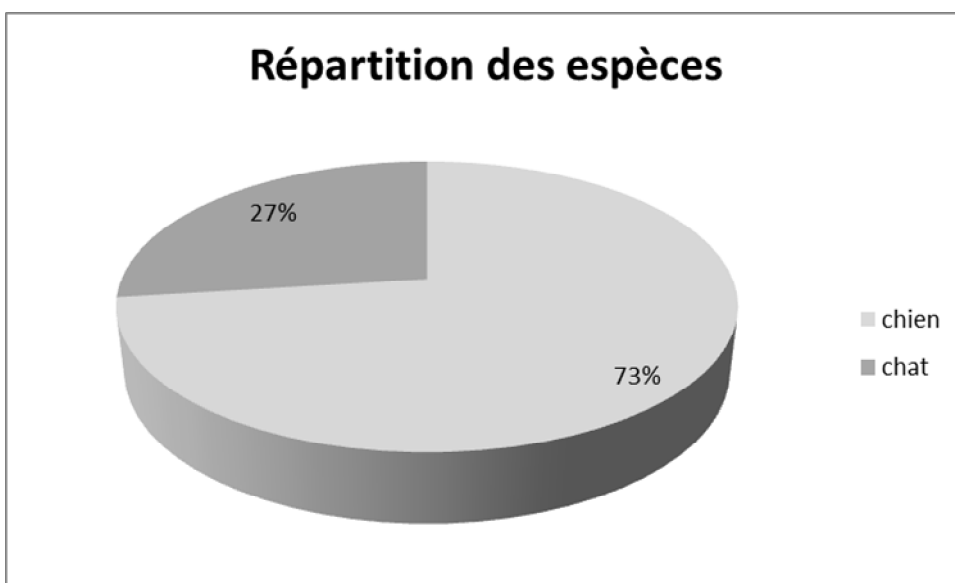
Les graphiques ont été réalisés avec les logiciels XLSTAT® et EXCEL®.

III) Résultats

1. Caractéristiques des animaux et des prélèvements

L'étude a porté sur 87 animaux (24 chats et 63 chiens) (figure17), âgés de 2 mois à 16 ans. La majorité des animaux étaient hospitalisés aux soins intensifs mais une partie des prélèvements a été réalisée sur des animaux venus pour une consultation au service des urgences (15 animaux).

Figure 17 : Répartition des animaux prélevés par espèce



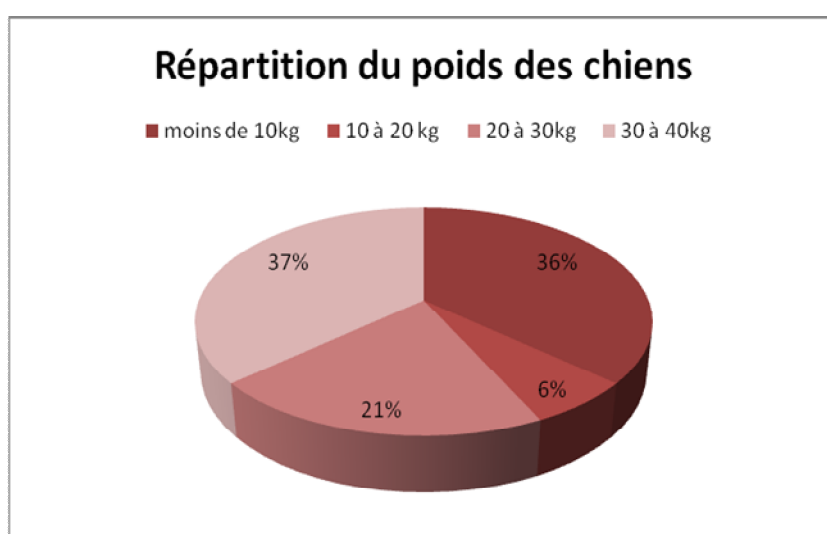
Les chiens étaient de toutes races confondues (tableau 1) et avaient un poids compris entre 2,5kg et 40 kg (figure 18).

En ce qui concerne les chats, les prélèvements ont été faits 18 chats de type européen, 2 persans, un sacré de Birmanie, un siamois et un maine coon.

Tableau 1 : Tableau de répartition des races de chien

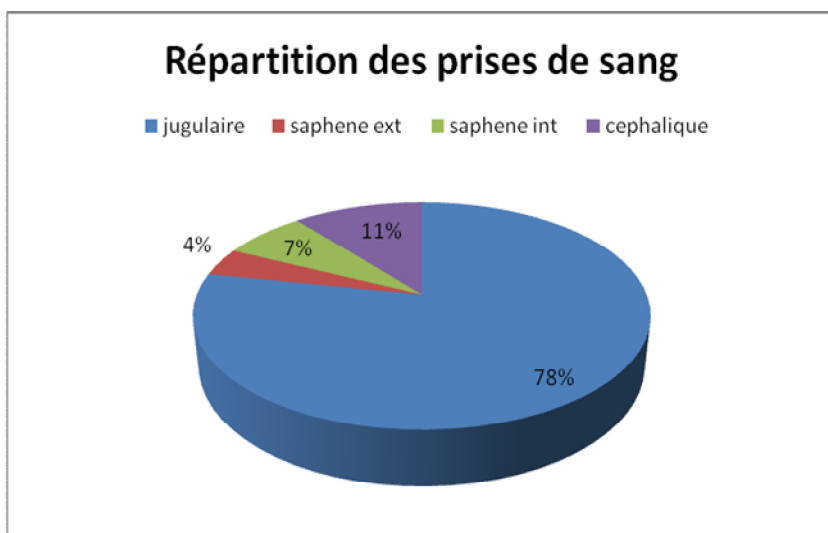
American staffordshire terrier	1	Caniche	1
Beagle	1	Cavalier king Charles	3
Beauceron	2	Cocker anglais	1
Berger allemand	3	Chihuahua	1
Berger australien	1	Croisé	6
Berger belge	2	Dobermann	1
Berger des pyrennées	1	Epagneul breton	1
Bichon	2	Golden retriever	4
Border collie	2	Jack russel	3
Bouledogue anglais	1	Labrador	5
Bouledogue français	3	Rottweiler	2
Bouvier bernois	1	Setter irlandais	1
Boxer	2	Shih tzu	4
Braque allemand	1	Westie	1
Bull terrier	2	Yorkshire terrier	4

Figure 18 : Répartition des chiens prélevés en fonction de leur poids



Les prélèvements de sang ont été faits principalement à la veine jugulaire (78%) mais aussi à la veine céphalique (11%), la veine saphène interne (7%) ou externe (4%) (figure 19).

Figure 19 : Répartition des lieux de ponction sanguine



Les prélèvements de sang périphériques ont tous été obtenus au niveau du pavillon de l'oreille. Une goutte de sang n'a pas pu être obtenue chez 2 animaux.

2. Résultats obtenus

Les résultats de glycémie et de lactatémie obtenus sur sang veineux avec l'analyseur de chez Idexx, les analyseurs portables et sur sang périphérique avec les analyseurs portables sont notés dans l'annexe 2.

La lactatémie mesurée sur sang périphérique est inférieure à 0,5g/L dans 74% des cas, le symbole « low » apparaissant sur l'appareil. Elle est inférieure à 0,5g/L dans 9% des cas sur sang veineux mesuré avec l'appareil portatif.

Pour analyser les résultats par la suite, la valeur de 0,5g/L a été prise lorsque le symbole « low » a été obtenu.

3. Graphiques obtenus

3.1. *Graphiques pour la glycémie*

3.1.1. *Comparaison de la glycémie veineuse obtenue avec le VetTest® et avec l'appareil portatif*

3.1.1.1. *Méthode de Bland et Altman*

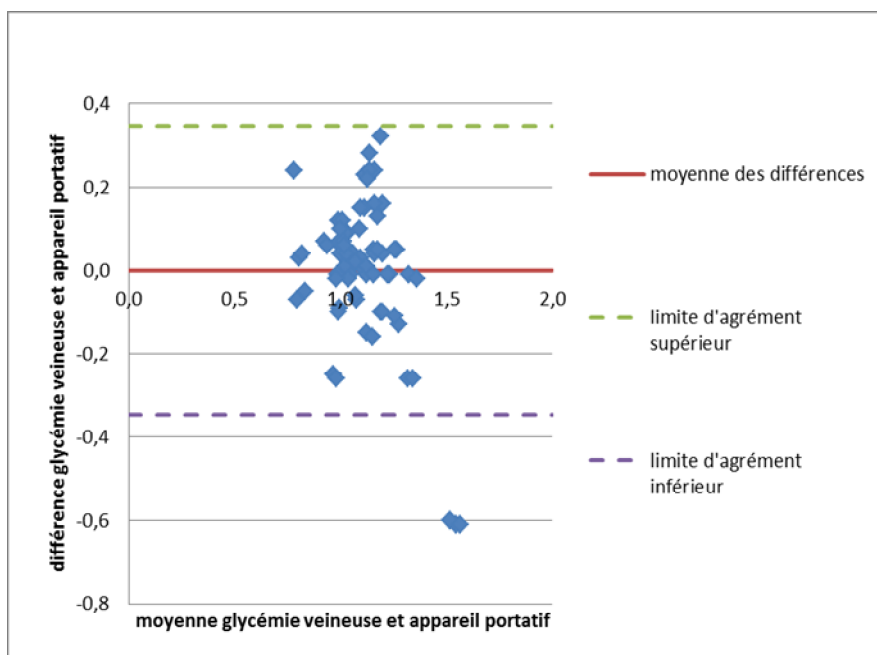
Les graphiques (figures 20 et 21) ont été obtenus grâce à la méthode de Bland-Altman. Ils sont basés sur 86 prélèvements (les résultats avec l'analyseur Idexx n'ayant pas été obtenus sur un animal). Nous avons séparé les animaux en 2 catégories : les animaux normoglycémiques (figure 20) (selon le laboratoire que nous utilisons les valeurs usuelles sont comprises entre 0,7g/L et 1,43g/L) et les animaux en dehors de ces valeurs usuelles sur sang veineux analysé au laboratoire (13 animaux) (figure 21). Dans notre cas, nous n'avons pas d'animaux hypoglycémiques, seulement hyperglycémiques. En pratique on considère qu'un animal est hyperglycémique si sa glycémie est supérieure à 1,2g/L.

- Animaux normoglycémiques

La moyenne des différences entre les deux types d'analyse de sang (soit glycémie veineuse mesurée avec le VetTest® - glycémie veineuse mesurée avec l'appareil portable) est de 0,000 g/L (avec un intervalle de confiance de 95% : -0,042 à 0,041 g/L).

Les limites d'agrément qui correspondent à la moyenne des différences + ou - 1,96 x l'écart type des différences vont de -0,347 à 0,346 g/L.

Figure 20: Graphique de Bland et Altman : glycémie veineuse mesurée au VetTest® et glycémie veineuse mesurée avec l'appareil portable



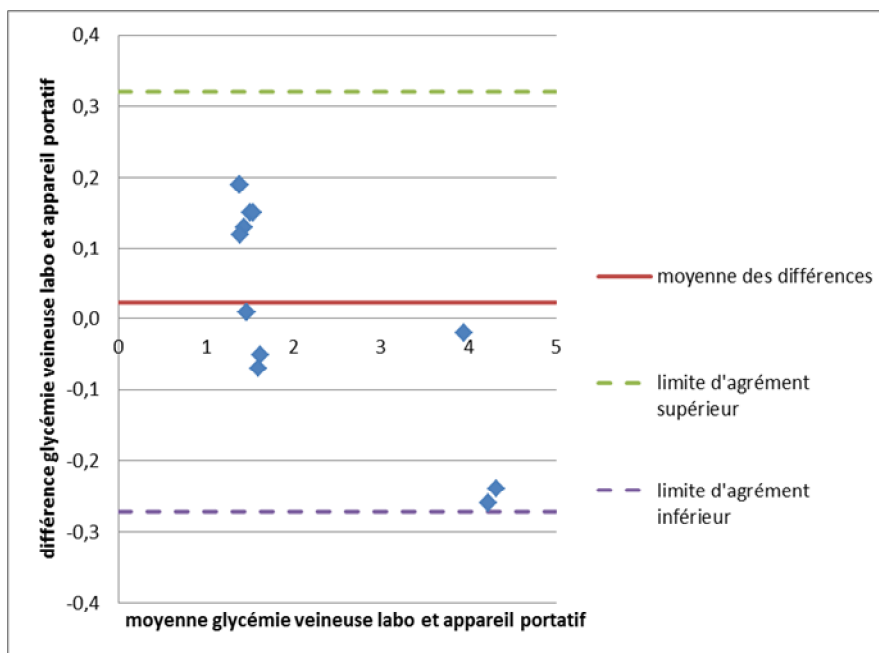
La ligne pleine représente la moyenne des différences et les lignes en pointillés représentent les limites d'agrément supérieur et inférieur.

- Animaux hyperglycémiques

La moyenne des différences entre les deux types d'analyse de sang (soit glycémie veineuse mesurée avec le VetTest® - glycémie veineuse mesurée avec l'appareil portatif) est de 0,024 g/L (avec un intervalle de confiance de 95% : -0,068 à 0,115 g/L).

Les limites d'agrément qui correspondent à la moyenne des différences + ou - 1,96 x l'écart type des différences vont de -0,272 à 0,320 g/L.

Figure 21: Graphique de Bland et Altman : glycémie veineuse mesurée au VetTest® et glycémie veineuse mesurée avec l'appareil portatif sur animaux hyperglycémiques



La ligne pleine représente la moyenne des différences et les lignes en pointillés représentent les limites d'agrément supérieur et inférieur.

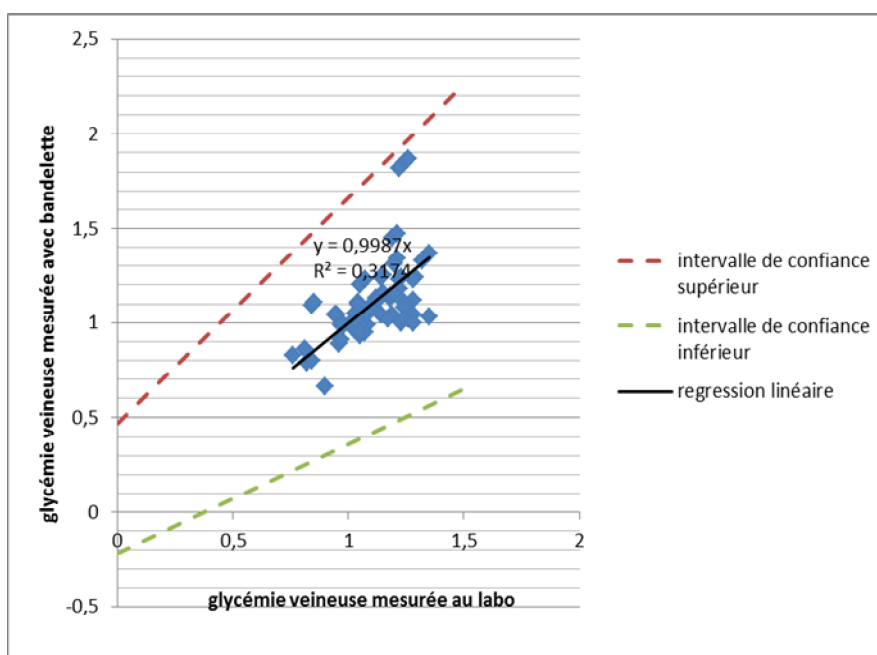
3.1.1.2. Régression de Passing-Bablok

Les graphiques ci-dessous (figures 22 et 23) sont basés sur 86 prélèvements séparés en 2 catégories : 73 animaux normoglycémiques (figure 22) et 13 animaux hyperglycémiques (figure 23). Sur ces graphiques, l'axe des abscisses représente la glycémie veineuse mesurée avec le vetTest® et l'axe des ordonnées représente la glycémie veineuse mesurée avec l'appareil portatif. On effectue ensuite une régression linéaire ainsi que son intervalle de confiance.

- Animaux normoglycémiques (73 animaux)

Le coefficient de corrélation r entre la glycémie mesurée avec le vetTest® et la glycémie mesurée avec l'appareil portatif est de 0,568. La pente de la courbe de régression est égale à 0,885 (intervalle de confiance à 95% : 0,577 à 1,193) et l'intercept à l'origine est égal à 0,127 (intervalle de confiance à 95% : -0,216 à 0,471).

Figure 22 : Régression de passing Bablok : comparaison glycémie veineuse mesurée au vetTest® et mesurée avec l'appareil portatif

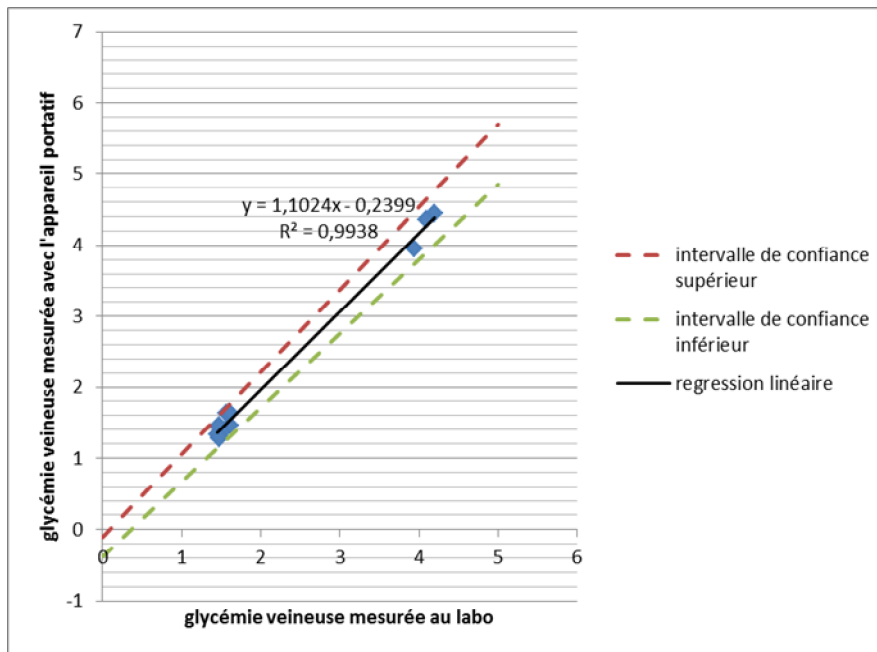


La ligne pleine représente la droite de régression et les 2 lignes en pointillés l'intervalle de confiance de la droite de régression.

- Animaux hyperglycémiques (13 animaux)

Le coefficient de corrélation r entre la glycémie mesurée avec le VetTest® et la glycémie mesurée avec l'appareil portatif est de 0,997. La pente de la courbe de régression est égale à 1,102 (intervalle de confiance à 95% : 1,045 à 1,160) et l'intercept à l'origine est égal à -0,240 (intervalle de confiance à 95% : -0,376 à -0,103).

Figure 23: Régression de passing Bablok : comparaison glycémie veineuse mesurée au vetTest® et mesurée avec l'appareil portatif sur animaux hyperglycémiques



3.1.1.3. Bilan des résultats

Les mesures de glycémie sont considérées similaires si la différence est inférieure à 0,5 g/L. Au-delà on aura un réel impact clinique.

Ainsi avec le graphique de Bland et Altman, on se rend compte que la moyenne des différences est très faible 0,000 g/L pour des animaux normoglycémiques et 0,024 g/L pour des animaux hyperglycémiques. De plus les limites d'agrément se situent entre -0.5 et 0.5 g/L qui sont nos limites acceptables puisqu'elles sont de -0,347 et 0,346 g/L chez les animaux normoglycémiques et de -0,272 à 0,320 g/L chez les animaux hyperglycémiques.

Si on s'intéresse au graphique de la régression de Passing-Bablok, la pente de la courbe de régression est proche de 1 (0,885) et son intervalle de confiance contient 1 pour les animaux normoglycémiques, elle est proche de 1 (1,102) mais ne contient pas 1 pour les animaux hyperglycémiques, la limite basse de 1,045 est très proche de 1. L'intercept est proche de 0 (0,127) avec un intervalle de confiance contenant 0 pour les animaux normoglycémiques, toutefois l'intercept est un peu plus éloigné de 0 (-0,240) pour les animaux hyperglycémiques.