

# Comparaison de l'effet du guidage échographique sur les ponctions de liquide céphalo-rachidien entre les localisations cisternales et lombaires chez le chien : une étude *ex vivo*

ETIENNE A.-L.<sup>1</sup>, PEETERS D.<sup>2</sup>, BUSONI V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Section Imagerie médicale, Département clinique des Animaux de Compagnie et Équidés, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem, 5A, bâtiment B41, 4000 Liège, Belgique

<sup>2</sup> Section de Médecine interne des Animaux de Compagnie, Département clinique des Animaux de Compagnie et Équidés, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 3, bâtiment B44, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr Anne-Laure Etienne – E-mail : AL.Etienne@ulg.ac.be

**RÉSUMÉ :** Le placement échoguidé de l'aiguille spinale pour les ponctions cisternale et lombaire chez le chien a été décrit. L'objectif de ce travail était de comparer l'effet du guidage échographique pour la ponction de liquide céphalo-rachidien entre les ponctions cisternale et lombaire.

Quatre-vingt-trois opérateurs ont participé à l'étude. Ils étaient divisés en quatre groupes selon leur expérience. Après une formation théorique courte, chaque opérateur a réalisé une ponction cisternale et lombaire en aveugle et sous contrôle échographique sur des cadavres tirés au sort. L'échoguidage lombaire était direct alors que celui cisternal était indirect. Après chaque procédure, les opérateurs ont rempli un questionnaire sur leur expérience, leur performance et leur confiance en soi.

L'échoguidage augmentait significativement le taux de réussite global de la ponction (comparée à la méthode en aveugle) mais plus clairement avec la localisation lombaire. Le guidage échographique cisternal améliorait significativement le nombre de tentatives, le temps et la confiance en soi chez les opérateurs inexpérimentés et expérimentés. La première cause d'échec citée était différente selon la localisation de la ponction et était liée à la nature de l'échoguidage.

Cette étude démontre que les opérateurs inexpérimentés sont capables de réaliser des ponctions échoguidées après une formation théorique courte, justifiant l'utilité du guidage échographique à des fins pédagogiques.

## 1. Introduction

Les ponctions cisternales (PC) (dans la *cisterna magna*) et lombaires (PL) (entre les cinquième et sixième vertèbres lombaires) sont fréquemment réalisées en clinique chez le chien à des fins diagnostiques : collecte et analyse de liquide céphalo-rachidien (LCR) (Oliver, 1997 ; Dewey, 2003), myélographies (Adams, 1982) et myéloscanner (Robertson et Thrall, 2011 ; Shimizu *et al.*, 2009). Comme le LCR a un flux rostro-caudal, le

site privilégié de ponction (cisternal ou lombaire) pour l'obtention de LCR diagnostique est celui caudal à la lésion suspectée (Thomson *et al.*, 1990). Le placement de l'aiguille spinale pour ces procédures se fait principalement à l'aveugle c'est-à-dire grâce à la palpation de repères anatomiques (Oliver, 1997 ; Dewey, 2003). La PC est considérée techniquement plus facile (Oliver, 1997) que la PL mais est responsable de lésions iatrogènes (Lujan Feliu-Pascual *et al.*, 2008). La PL est quant à elle plus fréquem-

ment contaminée de manière iatrogène par du sang (Di Terlizzi et Platt, 2009).

En médecine humaine, le guidage échographique a été décrit pour un grand nombre de procédures techniquement difficiles ou à risques notamment en anesthésiologie (Grau *et al.*, 2002 ; Broking et Waurick, 2006 ; Maecken et Grau, 2007), pour les ponctions de LCR (Peterson et Abele, 2005 ; Ferre et Sweeney, 2007 ; Strony, 2010), la pose de cathéters centraux (Capalbo,

2013 ; O'leary *et al.*, 2012) et l'anesthésie tronculaire (Greher *et al.*, 2004 ; Koscielniak-Nielsen et Dahl, 2012). Ces techniques échoguidées sont considérées réduire les risques de la procédure et augmenter la confiance en soi de l'opérateur (Broking et Waurick, 2006). En effet, leur utilité par rapport aux techniques à l'aveugle a été étudiée chez l'homme. Un impact positif (augmentation du taux de réussite, diminution du nombre de tentatives, diminution du taux de complications) a souvent été mis en évidence (Gualtieri *et al.*, 1995 ; Miller *et al.*, 2002 ; Dodge *et al.*, 2012) mais quelques études démontraient un effet plutôt mitigé (Tran De *et al.*, 2010 ; Wiler *et al.*, 2010 ; Bloom, 2012).

En médecine vétérinaire, plusieurs techniques échoguidées de ponctions de LCR ont été décrites chez le cheval à différents sites : dans la *cisterna magna* (Audigie *et al.*, 2004), entre la première et la seconde vertèbres cervicales (Pease *et al.*, 2012) et dans l'espace lombo-sacré (Aleman *et al.*, 2007), Cependant aucune étude n'a été réalisée afin d'évaluer l'« avantage » du guidage échographique par rapport aux techniques traditionnelles à l'aveugle. Chez le chien, une technique échoguidée directe pour les PL de LCR (Etienne *et al.*, 2010) et une technique échoguidée indirecte pour les PC (Etienne *et al.*, 2015) ont été décrites.

Le but de cette étude était de comparer l'effet de l'échoguidage entre deux méthodes de collecte de LCR chez le chien : technique lombaire avec l'échoguidage direct et technique cisternale avec l'échoguidage indirect. L'hypothèse était que le guidage échographique pourrait avoir un plus grand impact positif sur la PL techniquement plus difficile.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Chiens

L'étude a été réalisée sur 41 cadavres de chiens. Ces derniers avaient été euthanasiés pour des raisons non liées à l'étude. Le poids moyen des chiens était de 14 kg (amplitude : 4-32 kg). Le score corporel des chiens s'étendait de 1 à 4 sur une échelle de score corporel à 5 niveaux (Thatcher *et al.*,

2010) avec une répartition comme suit : 1/5 : 3 chiens, 2/5 : 15 chiens, 3/5 : 21 chiens, 4/5 : 2 chiens. Il s'agissait de chiens adultes mais leur âge précis n'était pas connu. Les races étaient variées, incluant des petites morphologies (yorkshires, caniches, teckels, shi-tzu, Jack Russell terriers, bichons et des chiens croisés) et des morphologies moyennes à grandes (boxers, bergers allemands, bergers des Pyrénées, croisés type bergers, griffons, labradors, setters anglais, bergers belges malinois et American Staffordshire terriers). Pour cette étude, les cadavres de chiens étaient en décubitus latéral droit, les pattes postérieures repliées vers l'avant avec la tête et le cou fléchis au maximum. Les animaux étaient maintenus en position grâce à des sacs de sable. Les régions lombaires caudales et atlanto-occipitales étaient tondues après palpation des repères osseux. Ces repères semblaient « normaux » à la palpation. Des éponges imbibées d'eau chaude étaient placées sur ces zones afin d'augmenter la pénétration des ultrasons. Du gel échographique ou de l'alcool étaient utilisés pour améliorer le couplage peau/sonde. Les radiographies de la colonne lombaire caudale réalisées afin de vérifier le positionnement de l'aiguille spinale par les opérateurs (*cf.* 2.3 Protocole de l'étude) ne révélèrent que de la spondylose lombaire modérée et de l'arthropathie dégénérative légère des processus articulaires lombaires n'empêchant pas la réalisation de la PL.

### 2.2 Opérateurs

Quatre-vingt-trois opérateurs composés de 17 vétérinaires et 66 étudiants en dernière année de médecine vétérinaire ont réalisé l'étude. Pour les statistiques descriptives et grâce aux questionnaires, le groupe total d'opérateurs était divisé en quatre sous-groupes : un groupe contrôle (sans expérience en ponction ni en échographie ni en échoguidage), un groupe expérimenté en ponctions (P-expérience), un groupe expérimenté en échographie/échoguidage (E-expérience) et un groupe expérimenté à la fois en ponction et en échographie/échoguidage (P+E-expérience). Un opérateur était considéré « expérimenté » à partir du moment où il avait réalisé au moins cinq fois la technique (PC, PL, échographie ou échoguidage).

Ces opérateurs recevaient en petits groupes une formation théorique au moyen d'une présentation power point d'une durée d'environ 30 minutes par l'assistante en imagerie médicale organisant les manipulations (A-L Etienne). Cet exposé expliquait les principes de base de l'échographie et de l'échoguidage ainsi que les deux techniques (aveugle et échoguidée) des PL et PC. Après cette présentation, l'assistante procédait à une démonstration pratique des quatre techniques de ponctions devant les opérateurs sur des cadavres.

### 2.3 Protocole de l'étude

Les quatre techniques de ponctions étaient réalisées par chaque opérateur, toujours dans le même ordre : PL aveugle puis échoguidée directe et PC d'abord aveugle puis échoguidée indirecte. Pour chaque technique réalisée (4 en tout), un cadavre de chien disponible était préalablement tiré au sort par l'opérateur. Le nombre de tentatives par procédure était limité à 4. Une tentative était comptabilisée à partir du moment où l'aiguille spinale pénétrait la peau du cadavre jusqu'à sa sortie complète. Le temps de manipulation était limité à 10 minutes pour chaque procédure. Le chronomètre pour chaque procédure était enclenché à partir du moment où l'aiguille spinale touchait la peau du cadavre c'est-à-dire après le repérage par palpation ou le repérage échographique (PL) ou le marquage des repères sur la peau du chien (PC). Le chronomètre était arrêté quand l'opérateur pensait avoir réussi sa ponction. Le temps pour régler la machine échographique n'était pas comptabilisé ni mesuré. Dans cette étude *ex vivo* aucun LCR n'a été obtenu. Le contrôle du positionnement de l'aiguille spinale était réalisé par l'assistante en imagerie sans que l'opérateur ne regarde. Pour la vérification des PL (réalisées en aveugle ou sous contrôle échographique), l'assistante réalisait d'abord une radiographie de profil à blanc de la région lombaire afin d'évaluer la position de l'aiguille spinale. Si la pointe de l'aiguille s'arrêtait en regard du plancher du canal vertébral et que l'aiguille passait entre les processus articulaires de L5-L6 ou de la quatrième vertèbre lombaire (L4)-L5 en ayant une orientation oblique (crânio-ventrale et caudo-dorsale), le positionnement de l'aiguille spinale était considéré potentiellement correct. Elle

injectait alors du liquide de contraste (Télébrix®) via l'aiguille insérée et réalisait ensuite une deuxième radiographie de profil de la région lombaire. La PL était considérée réussie si l'espace sous arachnoïdien était marqué par du produit de contraste, c'est-à-dire que deux fines lignes de contraste, bien délimitées, presque parallèles dans le canal vertébral étaient visibles. Si le positionnement de l'aiguille spinale ne correspondait pas aux critères cités précédemment sur la radiographie à blanc, l'échec de la PL était directement conclu. Pour la voie haute, l'assistante posait la sonde échographique sur la région atlanto-occipitale et vérifiait que l'aiguille spinale était bien dans la *cisterna magna*. La ponction était considérée réussie quand l'aiguille spinale était dans la *cisterna magna*, peu importe son enfoncement. Les opérateurs étaient donc après chaque tentative juste informés de leur réussite ou échec.

#### 2.4 Appareillage et petit matériel

Les images échographiques ont été obtenues au moyen d'un échographe Aloka SSD-3500 Prosound (Aloka Co., Ltd., Mitaka, Tokyo, Japan). Les sondes utilisées étaient une linéaire 7,5 MHz pour la technique échoguidée de PC et une microconvexe 7,5 MHz pour la technique échoguidée de PL. Des aiguilles spinales 20 à 22G, 38 mm (PC) et 90 mm (PL), avec un biseau de Quincke (BD, Becton Dickinson S.A., S. Agustín del Guadalix, Madrid, Spain) ont été utilisées. Des gants non stériles pour manipuler les cadavres et des marqueurs de couleur noire ou bleue ont été utilisés pour la technique échoguidée indirecte cisternale.

#### 2.5 Techniques de ponctions

Les repères anatomiques pertinents pour la PC en aveugle étaient la protubérance occipitale externe, le processus épineux de l'axis pour l'axe médian et le bord crânial des processus transverses (ailes) de l'atlas (Oliver, 1997 ; Dewey, 2003 ; Tipold, 2003 ; Elias et Brown, 2008). Pour la méthode échoguidée indirecte de PC, la première étape consistait à identifier à l'échographie en coupe transversale les condyles occipitaux avec la *cisterna magna* au centre. Une fois l'image obtenue deux marques au feutre étaient dessinées sur la peau du chien de part et d'autre de la sonde.

Puis, sans bouger la peau du chien, la sonde était tournée de 90° afin d'obtenir une image sagittale avec l'occiput, l'atlas et au centre la *cisterna magna*. Des repères au feutre étaient de nouveau tracés de part et d'autre de la sonde (Etienne *et al.*, 2015). Alors que la sonde échographique était retirée, deux lignes reliant les marques opposées sont tracées. Le point d'intersection de ces deux lignes était le site d'introduction de l'aiguille spinale.

Pour la PL aveugle, les crêtes de l'ilium, les processus épineux de la cinquième (L5), sixième (L6) et septième (L7) vertèbres lombaires ainsi que les espaces inter-épineux entre eux étaient palpés et utilisés comme repères (Oliver, 1997 ; Bagley, 2005). Pour la méthode échoguidée directe, les processus articulaires de L5-L6 étaient identifiés par échographie dans un plan parasagittal. L'image triangulaire hypoéchogène entre ces processus articulaires adjacents était la cible pour atteindre l'espace sous-arachnoïdien comme décrit par Etienne et collaborateurs (2010). Cependant pour multiplier les sites de ponctions sans augmenter le nombre de cadavres nécessaires, le placement de l'aiguille spinale dans l'espace sous arachnoïdien était permis en L5-L6 et entre L4 et L5.

#### 2.6 Collection et analyse des données

Après la réalisation de chaque technique, l'opérateur remplissait un questionnaire portant sur son expérience antérieure, ses performances (échec/réussite, nombre de tentatives et temps), sa confiance en soi et ses commentaires incluant son interprétation des causes d'échec. Pour des raisons statistiques, la confiance en soi était gradée au moyen d'une échelle de 0 à 2, avec 0 = aucune, 1 = moyenne, 2 = bonne. Trois questions finales portant sur la PL d'une part et sur la PC d'autre part étaient également posées à chaque opérateur : (i) quelle est la méthode de ponction avec laquelle vous étiez le plus à l'aise ? ; (ii) quelle technique utiliseriez-vous pour votre prochaine ponction ? ; (iii) avez-vous apprécié participer à cette étude ?

Les données ont donc été obtenues à partir de 332 ponctions (83 opérateurs x 4 techniques). Une analyse descriptive a été réalisée. Un test de Z a été appliqué pour comparer les

pourcentages de réussite entre les deux méthodes (aveugle et échoguidée) pour chaque localisation de ponction sur l'ensemble du groupe d'opérateurs et sur les sous-groupes. Un test non paramétrique de Wilcoxon pour les données paires a été utilisé pour comparer différentes variables : nombre de tentative, temps, confiance en soi entre les deux techniques pour chaque ponction, dans les 4 sous-groupes d'opérateurs.

Pour comparer les pourcentages de réponses aux questions posées à la fin du questionnaire aux opérateurs, la loi binomiale a été appliquée. Une lettre commune (a, b ou c) a été attribuée aux pourcentages qui ne diffèrent pas selon un seuil de  $p=0,01$ .

Une régression logistique a été réalisée au moyen d'une procédure logistique dans SAS (SAS Institute, Inc., Gary, North Carolina, USA). L'influence d'un ou plusieurs paramètres (variables continues ou discrètes) sur le taux de réussite de la technique (variable dépendante) a été évaluée. Pour commencer, l'association entre le taux de réussite de la ponction (cisternale et lombaire) et chaque variable indépendante (avec la variable « opérateur » incluse) a été calculée (analyse univariée). Puis, une analyse multi-variable a été appliquée à la PC et à la PL sur l'ensemble des opérateurs et sur les sous-groupes isolés avec les variables qui avaient une relation forte à modérée ( $p \leq 0,10$ ) dans l'analyse univariée. Le modèle le plus puissant était finalement calculé avec les variables laissées par l'option « stepwise » dans la procédure logistique.

### 3. Résultats

En se basant sur le questionnaire, le groupe contrôle contenait 46 étudiants, le groupe P-expérience contenait deux vétérinaires, le groupe E-expérience contenait soit 26 opérateurs (20 étudiants et 6 vétérinaires) pour la PC soit 27 opérateurs (20 étudiants et 7 vétérinaires) pour la PL, le groupe P+E expérience contenait soit 9 vétérinaires pour la PC soit 8 vétérinaires pour la PL. Le sous-groupe P-expérience, contenant seulement deux opérateurs, n'était pas représentatif de cette population et n'a donc pas fait l'objet d'analyses statistiques (tableau I).

**Tableau I** : répartition des opérateurs dans les différents sous-groupes

		nombre total d'opérateurs		
			nombre d'étudiants	nombre de vétérinaires
groupe contrôle		46	46	0
groupe P-expérience		2	0	2
groupe E-expérience	ponction cisternale	26	20	6
	ponction lombaire	27	20	7
groupe P+E expérience	ponction cisternale	9	0	9
	ponction lombaire	8	0	8

Groupe contrôle (sans expérience en ponction ni en échographie ni en échoguidage), groupe expérimenté en ponctions (P-expérience), groupe expérimenté en échographie/échoguidage (E-expérience) et groupe expérimenté à la fois en ponction et en échographie/échoguidage (P+E-expérience)

**Tableau II** : taux de réussite (exprimé en %) des ponctions cisternale et lombaire selon la technique utilisée pour (i) l'entièreté du groupe d'opérateurs et (ii) les différents sous-groupes

		Taux de réussite					
		Ponction cisternale			Ponction lombaire		
		Aveugle	Echoguidé	<i>p</i>	Aveugle	Echoguidé	<i>p</i>
Tous les opérateurs		78 %	95 %	0,01*	46 %	78 %	0,001*
Groupes	contrôle	76 %	93 %	0,09	35 %	72 %	0,007*
	E-expérience	77 %	100 %	0,005*	52 %	85 %	0,045*
	P+E expérience	100 %	89 %	0,29	75 %	100 %	0,102

*p* : valeur de *p* du test de Z comparant les pourcentages de réussite entre les 2 méthodes (aveugle et échoguidée) pour chaque site de ponction, \* : statistiquement significatif pour *p* < 0,05

La méthode échoguidée augmentait significativement le taux de réussite global par rapport à la méthode en aveugle quelque soit la localisation de la ponction : PC : 95 % versus 78 % et la PL : 78 % versus 46 % (tableau II). L'effet bénéfique du guidage échographique était plus marqué avec la PL :  $p = 0,001 < p = 0,01$  (tableau II).

À l'échelle des sous-groupes, alors que la technique échoguidée lombaire augmentait significativement le taux de réussite des groupes contrôle ( $p = 0,007$ ) et E-expérience ( $p = 0,045$ ), la technique échoguidée cisternale n'augmentait significativement que le taux de réussite du groupe E-expérience ( $p = 0,005$ ) (tableau II).

L'apport de la méthode échoguidée par rapport à la méthode par palpation sur les autres variables montrait

également des différences entre la PC et PL (tableau III). Dans les groupes contrôle et E-expérience, la méthode échoguidée cisternale améliorait significativement les trois variables évaluées : nombre de tentatives, temps et confiance en soi alors que la méthode échoguidée lombaire améliorait significativement que la confiance en soi et dans le groupe contrôle uniquement, le nombre de tentatives également (tableau III). Dans le groupe P+E-expérience, aucune méthode échoguidée améliore significativement les variables considérées par rapport aux techniques à l'aveugle (tableau III).

En considérant l'ensemble des données recueillies pour les quatre techniques de ponction de LCR sur l'entièreté du groupe, l'analyse par régression logistique « univariable » nous indiquait

que la technique échoguidée et le site cisternal était largement associée de façon significative à la réussite de la ponction ( $p < 0,0001$ ). En séparant les données sur les PC et PL, l'analyse par régression logistique « multivariable » montrait quelque soit le site de ponction, une association significative entre la réussite de la ponction et la variable temps ( $p = 0,0272$  pour PC et  $p = 0,0178$  pour PL) (tableau IV). Par contre, pour la PL uniquement, la variable nombre de tentatives était associée de façon significative à la réussite ( $p < 0,0001$ ) (tableau IV).

Les causes d'échecs ressenties par les opérateurs et transcrites sur leurs formulaires ont été comparées entre la technique échoguidée cisternale et lombaire (tableau V). Pour la technique échoguidée cisternale indirecte, les causes d'échec les plus

**Tableau III** : comparaison, pour les différents groupes d'opérateurs évalués, de trois variables (nombre de tentatives nécessaires, temps nécessaire et confiance en soi), en fonction des deux techniques évaluées (en aveugle – par palpation de repères anatomiques – et échoguidée) et les deux types de ponction (cisternale et lombaire) chez le chien

		Ponction cisternale			Ponction lombaire		
		aveugle	échoguidée		aveugle	échoguidée	
Groupe (n)	Variabes	moyenne ± $\sigma$	moyenne ± $\sigma$	<i>p</i>	moyenne ± $\sigma$	moyenne ± $\sigma$	<i>p</i>
<b>Contrôle</b> (46)	Nb tentatives	2,80 ± 1,17	1,67 ± 0,87	< 0,0001*	3,40 ± 1,02	2,37 ± 1,18	< 0,0001*
	Temps (min)	5,68 ± 3,94	3,89 ± 3,37	0,02*	6,72 ± 3,79	6,41 ± 3,69	0,70
	Confiance en soi	0,80 ± 0,66	1,20 ± 0,66	0,01*	0,63 ± 0,61	1,24 ± 0,64	< 0,0001*
<b>E-expérience</b>	Nb tentatives	2,58 ± 1,24	1,27 ± 0,53	< 0,0001*	2,81 ± 1,21	2,22 ± 1,28	0,09
	(PC = 26 ; PL = 27) Temps (min)	4,85 ± 3,21	3,36 ± 3,00	0,04*	5,85 ± 3,95	6,15 ± 3,69	0,80
	Confiance en soi	0,65 ± 0,56	1,35 ± 0,56	< 0,0001*	0,78 ± 0,58	1,48 ± 0,51	0,0006*
<b>P+E-expérience</b>	Nb tentatives	2,00 ± 1,12	1,55 ± 1,13	0,32	2,37 ± 1,19	1,37 ± 0,52	0,06
	(PC = 9 ; et PL = 8) Temps (min)	4,33 ± 2,60	4,22 ± 3,90	0,47	5,06 ± 3,88	3,87 ± 3,48	0,31
	Confiance en soi	1,22 ± 0,83	1,55 ± 0,53	0,50	1,12 ± 0,35	1,50 ± 0,53	0,25

$\sigma$  = écart type ; *p* = valeur de *p* du test de Wilcoxon comparant la même variable entre les 2 méthodes (aveugle et échoguidée) pour chaque site de ponction ; \* : statistiquement significatif pour *p* < 0,05

**Tableau IV** : résultats de l'analyse par régression logistique multinomiale de la réussite de la ponction (cisternale et lombaire) en fonction de différentes variables (temps nécessaire, nombre de tentatives nécessaires, technique utilisée : aveugle ou échoguidée, confiance en soi)

variables	valeur de <i>p</i>	
	ponction cisternale	ponction lombaire
Temps	0,0272*	0,0178*
Nombre de tentatives	0,0643	< 0,0001*
Technique utilisée	0,0720	0,1211
Confiance en soi	0,1178	0,0719

\* : statistiquement significatif pour *p* < 0,05

fréquemment évoquées étaient liées au marquage indirect des repères : le fait que la peau du cadavre bouge lors du marquage des repères cutanés (75 %) suivie de la difficulté à noter les repères au marqueur sur la peau (50 %)(tableau V). Pour la technique échoguidée lombaire directe, les principales causes d'échec mentionnées étaient liées à l'échoguidage direct : difficulté d'atteindre la cible avec l'aiguille spinale : 89 % et

difficulté de conserver l'image échographique correcte sur l'écran : 72 % (tableau V). Des causes communes aux 2 ponctions étaient également observées: le nombre insuffisant de tentatives et le manque de temps (tableau V).

La méthode échoguidée était la technique avec laquelle les opérateurs se sentaient le plus confortable pour réaliser les PL (68 % d'entre eux) et les

PC (63 % d'entre eux) (tableau VI). Ce pourcentage de préférence était significativement différent de ceux des autres réponses. La majorité des opérateurs ont répondu qu'ils utiliseraient la méthode échoguidée pour leur prochaine ponction quel que soit le site (tableau VI). De plus, la totalité des opérateurs (100 %) ont apprécié participer à cette étude sur les PL et PC.

#### 4. Discussion

Dans l'étude présente, l'utilisation de la technique échoguidée améliorerait significativement le taux de réussite global (ensemble des opérateurs) en aveugle de la PC (*p* = 0,01) et PL (*p* = 0,001). Cet impact positif du guidage échographique sur le taux de réussite par rapport aux méthodes « traditionnelles » par palpation a été également identifié dans de nombreuses études humaines portant sur la pose de cathéters centraux (Verghese *et al.*, 1999 ; Karakitsos *et al.*, 2006 ; Dodge *et al.*, 2012). sur l'anesthésie tronculaire (Greher *et al.*, 2004 ; Koscielniak-Nielsen et Dahl,

**Tableau V** : distribution des causes d'échec des ponctions cisternales et lombaires avec la méthode échoguidée

Causes	ponction cisternale (%)	ponction lombaire (%)
Peau bouge	28	–
Difficulté de noter les repères au feutre	18	–
Difficulté d'obtenir l'image sagittale	18	–
Difficulté d'obtenir l'image transversale	9	–
Difficulté d'obtenir l'image de référence	9	9
Nombre insuffisant de tentatives	9	14
Manque de temps	9	8
Difficulté d'atteindre la cible avec l'aiguille	–	25
Difficulté à garder l'image à l'écran durant la ponction	–	20
Difficulté à visualiser l'aiguille sur l'écran	–	16
Manque d'expérience	–	3
Autre	–	5

**Tableau VI** : tableau récapitulatif des réponses aux questions posées aux 83 participants à la fin de l'étude

Réponses aux questions	à l'aveugle	échoguidée	les deux	aucune	indécis
Technique favorite pour la PC ?	11 (13 %) <sup>a</sup>	52 (63 %) <sup>b</sup>	13 (16 %) <sup>a</sup>	7 (8 %) <sup>a</sup>	0 (0 %) <sup>c</sup>
Technique favorite pour la PL ?	11 (13 %) <sup>a</sup>	56 (68 %) <sup>b</sup>	7 (8 %) <sup>a</sup>	9 (11 %) <sup>a</sup>	0 (0 %) <sup>c</sup>
Quelle technique pour votre prochaine PC ?	12 (15 %) <sup>a</sup>	70 (84 %) <sup>b</sup>	0 (0 %) <sup>c</sup>	0 (0 %) <sup>c</sup>	1 (1 %) <sup>c</sup>
Quelle technique pour votre prochaine PL ?	7 (9 %) <sup>a</sup>	75 (90 %) <sup>b</sup>	0 (0 %) <sup>c</sup>	0 (0 %) <sup>c</sup>	1 (1 %) <sup>c</sup>

À l'aveugle= technique à l'aveugle ; échoguidée= technique échoguidée ; PC = ponction cisternale ; PL = ponction lombaire. Selon la loi binomiale, si deux pourcentages diffèrent au seuil de  $p = 0,01$ , leur lettre attribuée (a, b ou c) est différente

2012) ou sur les PL de LCR (Peterson et Abele, 2005 ; Ferre et Sweeney, 2007 ; Strony, 2010). De même, en médecine vétérinaire, cet avantage a été abordé et doit être confirmé dans des études notamment sur les injections épidurales (Gregori *et al.*, 2014 ; Liotta *et al.*, 2015) et les poses de cathéters centraux (Chamberlin *et al.*, 2013). Cependant, nos résultats montraient une amélioration du taux de réussite plus marquée pour la PL que pour la PC ( $p = 0,001 < p = 0,01$ ). Cette différence peut s'expliquer en partie par un pourcentage de réussite en aveugle plus élevé en cisternal qu'en lombaire (78 % *versus* 46 %) car la PC est techniquement plus facile et par conséquent une différence moins marquée entre les pourcentages de réussite sans et avec usage de l'échoguidage cisternal.

À l'échelle des groupes, les méthodes échoguidées amélioraient significativement le pourcentage de réussite du groupe E-expérience pour les deux localisations de ponctions alors que seul l'échoguidage pour la PL améliorerait la réussite du groupe contrôle (groupe sans expérience en ponction ni en échographie/échoguidage). En médecine humaine, le niveau d'expérience préalable des opérateurs influençait les conclusions des études comparant les procédures traditionnelles à celles échoguidées. Plusieurs études démontraient que la méthode échoguidée de pose de cathéters veineux améliorait significativement le taux de réussite qu'elle soit pratiquée par des novices (Gualtieri *et al.*, 1995 ; Verghese *et al.*, 1999 ; Dodge *et al.*, 2012) ou par des personnes expérimentées (Karakitsos *et al.*, 2006). Nos résultats suggèrent que l'utilité de la

technique échoguidée en termes de réussite pour la PC est plus justifiée si l'opérateur a une expérience préalable en échographie alors que pour la PL la technique échoguidée est utile même si l'opérateur n'a pas d'expérience préalable en échographie.

Les différences des taux de réussite des groupes entre les deux types de ponctions peuvent s'expliquer d'une part par la différence de difficulté technique entre les PC et PL (Oliver, 1997). En effet, le pourcentage de réussite en aveugle était plus élevé en cisternal qu'en lombaire mettant possiblement moins en évidence l'impact de l'échoguidage. D'autre part, le guidage échographique mis en place pour chaque localisation de ponction dans notre étude était différent. Pour la ponction voie haute, la petite fenêtre acoustique cutanée disponible

en regard de la jonction atlanto-occipitale pour la sonde et l'aiguille nous a amené à préférer une méthode échoguidée indirecte. Un guidage échographique direct parasagittal aurait été possible pour visualiser l'aiguille sur des images transversales de la *cisterna magna*. Cependant, à cause de la position parasagittale des sinus veineux, une approche sagittale associée à une technique échoguidée indirecte ont été choisies pour la voie haute. De plus, cette méthode indirecte ne nécessite pas une coordination main-yeux pour placer l'aiguille dans le plan échographique qui est difficile pour les novices en échographie. Pour la PL, à cause de l'importante obliquité des processus épineux lombaires et de la profondeur de l'espace sous-arachnoïdien lombaire, une technique échoguidée directe nous a semblé mieux adaptée, comme décrit par Etienne et collaborateurs (2010). En médecine humaine, une étude portant sur la cathétérisation vasculaire a comparé la technique échoguidée dynamique (directe), statique (indirecte) et en aveugle (Milling *et al.*, 2005). Les résultats démontraient que la méthode échoguidée indirecte était inférieure à la directe mais restait supérieure à la technique aveugle. Nos résultats montrant un bénéfice supérieur de la méthode échoguidée directe (avec la PL) sur le taux de réussite (global et dans les sous-groupes) sont confortés par cette étude humaine.

Dans nos résultats, la variable temps était clairement améliorée grâce à la technique échoguidée indirecte cisternale (dans 2/3 groupes) alors qu'elle ne l'était pas avec la méthode échoguidée directe lombaire (dans 0/3 groupes). Ce résultat peut facilement s'expliquer par la nécessité de coordonner l'introduction de l'aiguille spinale avec sa visualisation sur l'écran par le même opérateur pour la méthode échoguidée directe alors que la méthode échoguidée indirecte ne nécessite que le placement de l'aiguille spinale sans contrôle échographique. Cette coordination main-yeux nécessite du temps qui n'était pas requis pour l'échoguidage cisternal. De plus, nous avons défini que le temps commence quand l'aiguille spinale pénètre la peau du chien comme décrit dans plusieurs études humaines (Miller *et al.*, 2002 ; Grebenik *et al.*, 2004). Cela signifie que le repérage échographique et le marquage des repères cutanés préalables à la ponction cis-

ternale et chronophages ne sont pas comptabilisés. L'association significative entre le temps et la réussite de la ponction démontrée par la régression logistique, quelque soit sa localisation et la méthode utilisée, peut s'expliquer en partie par la limite de temps imposée par l'étude. Une durée longue de la procédure (10 minutes) est associée à un échec alors qu'un temps court (1 à 2 minutes) est associé à une réussite.

Notre étude a démontré un effet positif semblable des méthodes échoguidées par rapport aux méthodes à l'aveugle sur la variable « confiance en soi » dans tous les groupes mais de façon significative dans les groupes contrôle et E-expérience. Ce résultat est semblable à ceux de Fodor et collaborateurs (2007) reportant que la confiance en soi ressentie s'améliorait significativement chez les étudiants utilisant l'échographie. Le guidage échographique pour les ponctions permet à l'opérateur de visualiser l'espace « cible » et les structures anatomiques adjacentes avant (guidage indirect et direct) et pendant (guidage direct) l'insertion de l'aiguille. Ceci permet d'augmenter la confiance en soi ressentie et l'appréciation de la méthode échoguidée.

Dans notre étude, le nombre de tentatives était amélioré avec les techniques échoguidées significativement dans le groupe contrôle et uniquement dans le groupe E-expérience avec la PC. Un nombre de tentatives le plus bas possible est recommandé car la répétition augmente le risque de contamination sanguine du LCR, ce qui risque d'invalider ou rendre difficile l'analyse et l'interprétation des résultats (Aleman *et al.*, 2007) et augmente les chances de créer des lésions iatrogéniques du tronc cérébral pour la PC (Lujan Feliu-Pascual *et al.*, 2008), de la moelle épinière (Kishimoto *et al.*, 2004) et des hémorragies sous-arachnoïdienne intracrânienne pour la PL (Packer *et al.*, 2007). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études humaines traitant de la contribution bénéfique du guidage échographique sur le nombre de tentatives chez des opérateurs novices et expérimentés (Denys *et al.*, 1993 ; Verghese *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 2002 ; Karakitsos *et al.*, 2006). Nos données montrent que même si l'opérateur a une expérience préalable en échographie et

ponction, l'utilisation de la technique échoguidée résulte en une diminution du nombre de tentatives.

Par contre, l'amélioration légère mais non significative des paramètres évalués dans le groupe P+E-expérience avec aucune des 2 méthodes échoguidées s'apparente aux travaux des équipes de Grebenik et collaborateurs (2004) et Tran et collaborateurs (2010) montrant que la méthode échoguidée n'apportait pas de bénéfice significatif sur le taux de réussite, le temps de réalisation, le nombre de tentatives et le taux de complication par rapport à la méthode traditionnelle chez les opérateurs expérimentés. L'obtention d'une tendance dans ce groupe et non d'un résultat significatif peut être mieux investigué au moyen d'études supplémentaires avec un nombre d'opérateurs P+E-expérience plus grand et des cadavres de chiens jugés difficiles à ponctionner à l'aveugle (animaux avec un haut score d'embonpoint ou des anomalies vertébrales).

D'après les réponses aux questionnaires, la méthode favorite pour réaliser une PC ou une PL restait significativement la méthode échoguidée et ce de façon semblable entre la PC et la PL. De plus, le pourcentage d'opérateurs qui utiliseraient la méthode échoguidée pour leur prochaine ponction était plus élevé que le pourcentage d'opérateurs qui préférerait la méthode échoguidée (PC : 84 % vs 63 % et PL : 90 % vs 68 %). Ce choix de la méthode échoguidée pour la prochaine ponction malgré une préférence pour la méthode en aveugle est plus marqué avec la PL. Ce constat peut s'expliquer par la plus grande difficulté technique de la PL qui engendrerait une plus grande préférence pour la méthode échoguidée lombaire.

Nos résultats ont montré que les principales causes d'échec ressenties par les opérateurs des méthodes échoguidées sont différentes selon le site de ponction. Les principales causes observées sont directement corrélées à la nature (directe ou indirecte) du guidage échographique. En effet, pour la PC indirecte, une fois la sonde échographique retirée et les repères marqués au feutre sur le cadavre, la peau du chien ne doit plus bouger afin que les repères restent valides, comme décrit sur chiens vivants pour le guidage

indirect (Nyland et Mattoon, 2002). Une des causes principales d'échec est donc les mouvements de la peau du cadavre générés par la rotation de la sonde échographique. Lors du repérage de la *cisterna magna* et du marquage des repères, la sonde échographique doit être légèrement soulevée afin qu'elle ne tire pas sur la peau. L'échoguidage direct nécessite distinctement une bonne coordination main-yeux ainsi qu'une capacité psychomotrice (Magee *et al.*, 2007). Le défaut de ces deux qualités est cité comme causes récurrentes d'échec. De plus, comme démontré dans l'étude de Nielsen (Nielsen *et al.*, 2003) avec les injections échoguidées intra-articulaires cervicales chez les chevaux, la précision de l'injection échoguidée est significativement associée à l'expérience de l'opérateur.

Nos résultats doivent être interprétés en gardant à l'esprit les limites de cette étude. La réalisation des PC et PL sur cadavres et donc l'absence d'obtention de LCR ont conduit à adapter le contrôle du placement correct de l'aiguille spinale. La méthode de contrôle alternative pour la PL semblable à celle employée dans l'étude de Nielsen et collaborateurs (Nielsen *et al.*, 2003), consiste à injecter du produit de contraste iodé dans l'aiguille spinale en place afin de contrôler radiographiquement le marquage de l'espace sous arachnoïdien. Le contrôle du placement de l'aiguille spinale dans la *cisterna magna* est plus aisé et rapide grâce à la visualisation échographique directe de l'aiguille dans la citerne. Toutefois, la PC était considérée réussie malgré un enfoncement de l'aiguille spinale trop important dans la *cisterna magna*. En effet, cette étude *ex vivo* ne permet pas l'obtention de LCR ni la sensation de « pop » lors du passage des tissus fibreux (Dewey, 2003) qui sont selon les auteurs deux critères essentiels à l'arrêt de l'enfoncement de l'aiguille spinale lors d'une PC.

À cause du nombre limité de cadavres disponibles, les opérateurs de cette étude n'ont pas eu un entraînement pratique mais juste une démonstration pratique par un opérateur expérimenté et un exposé sur les principes généraux des ultrasons et de l'échoguidage, reconnues comme primordiaux à l'apprentissage des procédures échoguidées (Belbachir *et al.*, 2012).

Chaque opérateur ne réalisa qu'une fois chaque technique de ponction toujours dans le même ordre : la technique aveugle en premier puis échoguidée pour le même site de ponction. La réalisation de la technique aveugle en premier peut influencer les résultats comme étant déjà de l'entraînement « pratique » pour la technique échoguidée. Or dans cette étude ce sont les méthodes échoguidées qui sont comparées entre elles et non les méthodes à l'aveugle avec les méthodes échoguidées. Si les deux méthodes échoguidées ont été réalisées après la méthode à l'aveugle, elles « contiennent » toutes les deux le même biais et donc peuvent être comparées entre elles. De plus, la limite de cinq techniques antérieures déjà réalisée (PC ou PL ou échographie ou échoguidage) et non une seule, a été fixée pour distinguer les opérateurs « expérimentés » de ceux « non expérimentés ».

Finalement, le nombre d'opérateurs dans les quatre sous-groupes est inhomogène : 46 pour les groupes contrôle, 2 pour les groupes P-expérience, 26 et 27 pour les groupes E-expérience en PC et PL respectivement et 9 et 8 pour les groupes P+E-expérience en PC et PL respectivement. La petite taille du groupe P-expérience ne permet pas son inclusion dans l'analyse statistique et a rendu impossible, via cette étude, une estimation du taux de réussite des ponctions à l'aveugle chez des opérateurs expérimentés en ponction uniquement. À cause du manque de données disponibles dans la littérature sur les taux de réussite à l'aveugle des PL et PC chez le chien, il est impossible de savoir si le guidage échographique direct et indirect peut être suggéré pour toutes les ponctions dans un contexte clinique ou plutôt comme une modalité de « secours » lors de ponctions difficiles, comme suggéré dans des études humaines (Bauman *et al.*, 2009 ; Benkhadra *et al.*, 2012 ; Egan *et al.*, 2013).

Nos résultats montrent que les effets positifs du guidage échographique sur le taux de réussite sont plus visibles avec la PL que l'opérateur soit expérimenté ou non. Par contre, les effets bénéfiques du guidage échographique cisternal sont plus évidents sur l'acte technique de la ponction pour les opérateurs novices et expérimentés. Cette étude démontre que l'échoguidage direct pour la PL et indirect pour

la PC après un court enseignement théorique, peut être appliqué par des opérateurs inexpérimentés et avoir un impact significativement positif sur leurs performances. Ce résultat supporte l'utilisation du guidage échographique à des fins d'apprentissage.

### **Comparison of the effect of ultrasound guidance on cerebrospinal fluid punctures between cisternal and lumbar locations in the dog: an ex-vivo study**

The ultrasound-guided needle placements for cisternal and lumbar canine puncture have been described. The aim of this work was to compare the effect of ultrasound guidance for cerebrospinal fluid puncture between cisternal and lumbar locations.

Eighty-three operators participated to the study. They were classified in 4 groups based on their experience. Each operator had a short theoretical teaching about each technique and then performed the blind and the ultrasound-guided cisternal and lumbar punctures on randomized cadavers. The lumbar ultrasound guidance was direct while the cisternal was indirect. After the procedures volunteers filled-in a questionnaire about their previous experience, their performance and their self-confidence.

Ultrasound-guidance increased significantly the total success rate of the puncture (compared to the blind technique) but more clearly with the lumbar location. Cisternal ultrasound guidance improved significantly the number of attempts, time and self-confidence in inexperienced and experienced operators. The first mentioned cause of failure was different according to location and was related to the nature of guidance.

This study demonstrates that inexperienced operators were able to realize ultrasound-guided puncture after a short theoretical teaching and this supports the use of ultrasound-guidance for learning purposes.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS W.M. Myelography. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 1982, **12**, 295-311.
- ALEMAN M., BORCHERS A., KASS P.H., PUCHALSKI S.M. Ultrasound-assisted collection of cerebrospinal fluid from the lumbosacral space in equids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2007, **230**, 378-384.
- AUDIGIE F., TAPPREST J., DIDIERLAURENT D., DENOIX J.M. Ultrasound-guided atlanto-occipital puncture for myelography in the horse. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2004, **45**, 340-344.
- BAGLEY R.S. Options for diagnostic testing in animals with neurologic disease. In : Bagley R.S., *Fundamentals of Veterinary Clinical Neurology*. Blackwell Publishing Professional : Oxford, 2005, 207-238.
- BAUMAN M., BRAUDE D., CRANDALL C. Ultrasound-guidance vs. standard technique in difficult vascular access patients by ED technicians. *Am. J. Emerg. Med.*, 2009, **27**, 135-140.
- BELBACHIR A., BINHAS M., NOUETTE-GAULAIN K., BOCCARA G., CARLES M. Échographie : enseignement. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, 2012, **31**, 179-183.
- BENKHADRAM, COLLIGNON M., FOURNEL I., OEUVRARD C., ROLLIN P., PERRIN M., VOLOT F., GIRARD C. Ultrasound guidance allows faster peripheral IV cannulation in children under 3 years of age with difficult venous access: a prospective randomized study. *Paediatr. Anaesth.*, 2012, **22**, 449-454.
- BLOOM J.E., RISCHIN, A., JOHNSTON, R. V., BUCHBINDER, R. Image-guided versus blind glucocorticoid injection for shoulder pain. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2012, **8**, CD009147.
- BROKING K., WAURICK R. How to teach regional anesthesia. *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, 2006, **19**, 526-530.
- CAPALBO E., PELI M., LOVISATTI M., COSENTINO M., TICHA V., CARIATI M., CORNALBA G. Placement of port-a-cath through the right internal jugular vein under ultrasound guidance. *Radiol. Med.*, 2013, **118**, 608-15.
- CHAMBERLIN S.C., SULLIVAN L.A., MORLEY P.S., BOSCAN P. Evaluation of ultrasound-guided vascular access in dogs. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 2013, **23**, 498-503.
- DENYS B.G., URETSKY B.F., REDDY P.S. Ultrasound-assisted cannulation of the internal jugular vein. A prospective comparison to the external landmark-guided technique. *Circulation*, 1993, **87**, 1557-1562.
- DEWEY C.W. A practical guide to canine and feline neurology. Blackwell Publishing Company : Ames, 2003, 642 p.
- DI TERLIZZI R., PLATT S.R. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part II - analysis. *Vet. J.*, 2009, **180**, 15-32.
- DODGE K.L., LYNCH C.A., MOORE C.L., BIROSCAK B.J., EVANS L.V. Use of ultrasound guidance improves central venous catheter insertion success rates among junior residents. *J. Ultrasound Med.*, 2012, **31**, 1519-1526.
- EGAN G., HEALY D., O'NEILL H., CLARKE-MOLONEY M., GRACE P.A., WALSH S.R. Ultrasound guidance for difficult peripheral venous access: systematic review and meta-analysis. *Emerg. Med. J.*, 2013, **30**, 521-526.
- ELIAS A., BROWN C. Cerebellomedullary cerebrospinal fluid collection in the dog. *Lab. Anim.*, 2008, **37**, 457-458.
- ETIENNE A.L., PEETERS D., BUSONI V. Ultrasonographic percutaneous anatomy of the caudal lumbar region and ultrasound-guided lumbar puncture in the dog. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2010, **51**, 527-532.
- ETIENNE A.L., AUDIGIE F., PEETERS D., GABRIEL A., BUSONI V. Ultrasonographic percutaneous anatomy of the atlanto-occipital region and indirect ultrasound-guided cisternal puncture in the dog and the cat. *Anat. Histol. Embryol.*, 2015, **44**, 92-8.
- FERRE R.M., SWEENEY T.W. Emergency physicians can easily obtain ultrasound images of anatomical landmarks relevant to lumbar puncture. *Am. J. Emerg. Med.*, 2007, **25**, 291-296.
- FODOR D., BADEA R., POANTA L., DUMITRASCU D.L., BUZOIANU A.D., MIRCEA P.A. The use of ultrasonography in learning clinical examination - a pilot study involving third year medical students. *Med. Ultrason.*, 2007, **14**, 177-181.
- GRAUT., LEIPOLD R.W., CONRADI R., MARTIN E., MOTSCH J. Efficacy of ultrasound imaging in obstetric epidural anesthesia. *J. Clin. Anesth.*, 2002, **14**, 169-175.
- GREBENIK C.R., BOYCE A., SINCLAIR M.E., EVANS R.D., MASON D.G., MARTIN B. NICE guidelines for central venous catheterization in children. Is the evidence base sufficient? *Br. J. Anaesth.*, 2004, **92**, 827-830.
- GREGORI T., VISCASILLAS J., BENIGNI L. Ultrasonographic anatomy of the sacrococcygeal region and ultrasound-guided epidural injection at the sacrococcygeal space in dogs. *Vet. Rec.*, 2014, **175**, 68.
- GREHER M., SCHARBERT G., KAMOLZ L.P., BECK H., GUSTORFF B., KIRCHMAIR L., KAPRAL S. Ultrasound-guided lumbar facet nerve

- block: a sonoanatomic study of a new methodologic approach. *Anesthesiology*, 2004, **100**, 1242-1248.
- GUALTIERI E., DEPPE S.A., SIPPERLY M.E., THOMPSON D.R. Subclavian venous catheterization: greater success rate for less experienced operators using ultrasound guidance. *Crit. Care Med.*, 1995, **23**, 692-697.
- KARAKITSOS D., LABROPOULOS N., DE GROOT E., PATRIANAKOS A.P., KOURAKLIS G., POULARAS J., SAMONIS G., TSOUTSOS D.A., KONSTADOULAKIS M.M., KARABINIS A. Real-time ultrasound-guided catheterisation of the internal jugular vein: a prospective comparison with the landmark technique in critical care patients. *Crit. Care*, 2006, **10**, R162.
- KISHIMOTO M., YAMADA K., UENO H., KOBAYASHI Y., WISNER E.R. Spinal cord effects from lumbar myelographic injection technique in the dog. *J. Vet. Med. Sci.*, 2004, **66**, 67-69.
- KOSCIELNIAK-NIELSEN Z.J., DAHL J.B. Ultrasound-guided peripheral nerve blockade of the upper extremity. *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, 2012, **25**, 253-259.
- LIOTTAA., BUSONIV., CARROZZO M.V., SANDERSEN C., GABRIEL A., BOLEN G. Feasibility of ultrasound-guided epidural access at the lumbo-sacral space in dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2015, **56**, 220-8.
- LUJAN FELIU-PASCUAL A., GAROSI L., DENNIS R., PLATT S. Iatrogenic brainstem injury during cerebellomedullary cistern puncture. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2008, **49**, 467-471.
- MAECKEN T., GRAU T. Ultrasound imaging in vascular access. *Crit. Care Med.*, 2007, **35**, S178-185.
- MAGEE D., ZHU Y., RATNALINGAM R., GARDNER P., KESSEL D. An augmented reality simulator for ultrasound guided needle placement training. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 2007, **45**, 957-967.
- MILLER A.H., ROTH B.A., MILLS T.J., WOODY J.R., LONGMOOR C.E., FOSTER B. Ultrasound guidance versus the landmark technique for the placement of central venous catheters in the emergency department. *Acad. Emerg. Med.*, 2002, **9**, 800-805.
- MILLING T.J., JR., ROSE J., BRIGGS W.M., BIRKHAHN R., GAETA T.J., BOVE J.J., MELNIKER L.A. Randomized, controlled clinical trial of point-of-care limited ultrasonography assistance of central venous cannulation: the Third Sonography Outcomes Assessment Program (SOAP-3) Trial. *Crit. Care Med.*, 2005, **33**, 1764-1769.
- NIELSEN J.V., BERG L.C., THOEFNERT M.B., THOMSEN P.D. Accuracy of ultrasound-guided intra-articular injection of cervical facet joints in horses: a cadaveric study. *Equine Vet. J.*, 2003, **35**, 657-661.
- NYLAND T.G., MATTOON J.S. Ultrasound-guided biopsy. In: Nyland T.G., Mattoon J.S. (Eds), *Small animal diagnostic ultrasound*. Saunders: Philadelphia, 2002, 30-48.
- O'LEARY R., AHMED S.M., MCLURE H., ORAM J., MALLICK A., BHAMBRA B., BODENHAM A.R. Ultrasound-guided infraclavicular axillary vein cannulation: a useful alternative to the internal jugular vein. *Br. J. Anaesth.*, 2012, **109**, 762-768.
- OLIVER J.E., LORENZ, M.D. Confirming a diagnosis. In: Oliver J.E., Lorenz M.D., *Handbook of veterinary neurology*. Saunders: Philadelphia, 1997, 89-108.
- PACKER R.A., BERGMAN R.L., COATES J.R., ESSMAN S.C., WEIS K., O'BRIEN D.P., JOHNSON G.C. Intracranial subarachnoid hemorrhage following lumbar myelography in two dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2007, **48**, 323-327.
- PEASE A., BEHAN A., BOHART G. Ultrasound-guided cervical centesis to obtain cerebrospinal fluid in the standing horse. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2012, **53**, 92-95.
- PETERSON M.A., ABELE J. Bedside ultrasound for difficult lumbar puncture. *J. Emerg. Med.*, 2005, **28**, 197-200.
- ROBERTSON I., THRALL D.E. Imaging dogs with suspected disc herniation: pros and cons of myelography, computed tomography, and magnetic resonance. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 2011, **52**, S81-84.
- SHIMIZU J., YAMADA K., MOCHIDA K., KAKO T., MUROYA N., TERATANI Y., KISHIMOTO M., LEE K., IWASAKI T., MIYAKE Y. Comparison of the diagnosis of intervertebral disc herniation in dogs by CT before and after contrast enhancement of the subarachnoid space. *Vet. Rec.*, 2009, **165**, 200-202.
- STRONY R. Ultrasound-assisted lumbar puncture in obese patients. *Crit. Care Clin.*, 2010, **26**, 661-664.
- THATCHER C.D., HAND M.S., REMILLARD R.L. Small animal clinical nutrition: an iterative process. In: Hand M.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotny B.J. (Eds), *Small animal clinical nutrition*. 5th ed. Mark Morris Institute: Topeka, 2010, 3-20.
- THOMSON C.E., KORNEGAY J.N., STEVENS J.B. Analysis of cerebrospinal fluid from the cerebellomedullary and lumbar cisterns of dogs with focal neurologic disease: 145 cases (1985-1987). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1990, **196**, 1841-1844.
- TIPOLD A. Cerebrospinal Fluid. In: Braund K.G. (Ed.), *Clinical neurology in small animals - Localization, diagnosis and treatment [en ligne]* (2003) Adresse URL: [http://www.ivis.org/special\\_books/Braund/tipold/ivis.pdf?q=cerebrospinal](http://www.ivis.org/special_books/Braund/tipold/ivis.pdf?q=cerebrospinal), consulté le 17/09/2009.

TRAN DE Q.H., DUGANI S.,  
FINLAYSON R.J. A randomized  
comparison between ultrasound-  
guided and landmark-based  
superficial cervical plexus block.  
*Reg. Anesth. Pain Med.*, 2010, **35**,  
539-543.

VERGHESE S.T., MCGILL W.A.,  
PATEL R.I., SELL J.E., MIDGLEY  
F.M., RUTTIMANN U.E.  
Ultrasound-guided internal jugular  
venous cannulation in infants:  
a prospective comparison with  
the traditional palpation method.  
*Anesthesiology*, 1999, **91**, 71-77.

WILER J.L., COSTANTINO T.G.,  
FILIPPONE L., SATZ W.  
Comparison of ultrasound-guided  
and standard landmark techniques  
for knee arthrocentesis. *J. Emerg.  
Med.*, 2010, **39**, 76-82.

# Qualité bactériologique du lait cru de vache vendu dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et impact sur la santé publique

HAMIROUNE M.<sup>1</sup>, BERBER A.<sup>2</sup>, BOUBEKEUR S.<sup>2</sup>

(1) École nationale supérieure vétérinaire (ENSV), B.P. 161, El Harrach, Alger, Algérie

(2) Département des Sciences vétérinaires, Université SAAD Dahleb, B.P. 270, Route de Soomâa, Blida, Algérie

**Correspondance** : Mourad Hamiroune – Email : mouradhamiroune@gmail.com

**RÉSUMÉ** : En vue d'apprécier les risques liés à la consommation du lait cru de vache de race locale et améliorée, 192 échantillons du lait ont été prélevés dans huit points de vente entre décembre 2013 à juin 2014 et une enquête a été menée parallèlement auprès des consommateurs. L'analyse a montré une présence significative de bactéries en trop grand nombre et d'inhibiteurs bactériens (28,7 % des échantillons). De plus, l'enquête a mis en évidence un taux élevé de symptômes digestifs chez les personnes qui consomment du lait cru sans traitement thermique préalable (26,0 %).

Ces résultats témoignent du risque que représentent la commercialisation et la consommation de lait cru dans ces régions d'Algérie et la nécessité de mettre en œuvre un programme de vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène et un encadrement zootechnique de tous les acteurs de la filière afin d'assurer la salubrité durant toute la chaîne de production du lait cru.

## 1. Introduction

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de trois milliards de litres par an (Kirat, 2007). Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, il apporte la plus grande part des protéines d'origine animale. Acteur clé de l'industrie agroalimentaire, la filière lait connaît une croissance annuelle de 8 % en Algérie (Salon international du lait, 2008).

La production du lait de vache se heurte souvent au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformateurs. Les conditions d'hygiène au niveau des fermes et tout le long du circuit de la production jusqu'à l'arrivée du lait à la laiterie, comportent autant de sources de contaminations à maîtriser afin de préserver la qualité hygiénique du lait (Faye et Loiseau, 2000).

Afin de surveiller l'innocuité des aliments, il est impératif de déterminer la

qualité bactériologique du lait cru destiné à la consommation humaine, ce qui nous a poussé à réaliser ce travail, dont l'objectif principal a été la mise en évidence de la qualité hygiénique du lait cru de vaches dans les régions de Jijel et de Blida (Algérie) et son risque sur la santé des consommateurs.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Échantillonnage

Des prélèvements de lait cru ont été effectués chaque semaine pendant 24 semaines (de décembre 2013 à juin 2014) dans huit points de vente, situés dans deux régions différentes (quatre points de vente dans la région de Blida et quatre dans la région de Jijel).

Les échantillons (100 ml), conditionnés dans des flacons stériles étanches en matière plastique, ont été identifiés par étiquette et directement placés dans une glacière contenant des blocs réfrigérants congelés. Ces échantillons ont été acheminés directement vers les

laboratoires d'analyses : le laboratoire de contrôle de qualité et d'emballage (CACQE) à Jijel et le laboratoire d'analyse vétérinaire, contrôle de la qualité, la conformité et de la recherche appliquée (AVCQ-LAB) à Baraki d'Alger. Une fois au laboratoire, les échantillons ont été immédiatement analysés. Le délai maximal entre le prélèvement et l'analyse des échantillons a été d'une heure pour tous les échantillons.

En parallèle, la température du lait au moment du prélèvement au point de vente était enregistrée. La mesure était effectuée au moyen d'un thermomètre à usage alimentaire.

### 2.2. Recherche et dénombrement des germes de contamination

À partir du lait homogénéisé préalablement par des mouvements de rotations (100 ml), des dilutions sériées ont été réalisées dans une solution de tryptone sel (TSE) (Institut Pasteur, Algérie).

Pour chaque échantillon, cinq groupes de bactéries ont été étudiés : la flore mésophile aérobie totale à 30 °C, les entérocoques, les coliformes thermotolérants, les *S. aureus* et les *Clostridium* sulfito-réducteurs à 46 °C.

Le dénombrement de ces bactéries a été effectué suivant des normes internationales quand disponibles.

La flore mésophile aérobie totale (FMAT) a été dénombrée sur gélose PCA (*Plate Count Agar*) (Institut Pasteur, Algérie), incubée à 30 °C pendant 48 h-72 h (Association française de normalisation, 2003).

Les *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ont été dénombrés sur la gélose de Baird Parker (Institut Pasteur, Algérie) additionnée de jaune d'œuf et de tellurite de potassium et incubée 48 h à 37 °C. La confirmation a été réalisée par la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de la coagulase (Association française de normalisation, 1994).

Les coliformes thermotolérants (CT) ont été dénombrés sur gélose biliée lactosée au rouge neutre et cristal violet (VRBL) (Institut Pasteur, Algérie), incubée 24 h à 44 °C. Toutes les colonies rouges (lactose +) d'un diamètre de 0,5 mm minimum apparues sont considérées comme étant des coliformes thermotolérants (Association française de normalisation, 1996).

Les entérocoques (EC) ont été dénombrés selon la méthode du nombre le plus probable en milieu de Rothe (Institut Pasteur, Algérie) après incubation 48 h à 37 °C. Les contenus des tubes positifs, c'est-à-dire présentant un trouble, ont ensuite été ensemencés sur milieu BEA (*Bile Esculine Azide*) utilisé pour la confirmation et soumis à une incubation à 37 °C pendant 24 h et 48 h. Les colonies d'entérocoques sont petites, translucides et entourées d'un halo noir (esculine positive) (Diagnostic Pasteur, 1987).

Pour les spores de clostridium sulfitoréducteurs à 46 °C (CSR), le lait placé dans des tubes a été préalablement chauffé 10 minutes à 80 °C puis refroidi rapidement afin d'activer les spores des clostridies et de détruire les germes sous forme végétative.

Ensuite, elles ont été dénombrées sur le milieu de culture tryptose-sulfite à la cyclosérine (TSC) (Institut Pasteur, Algérie). Après l'incubation à 46 °C pendant  $20 \pm 2$  h, seules les colonies caractéristiques entourées d'un halo noir ont été comptées (Association française de normalisation, 2009).

L'interprétation des résultats été réalisée en fonction de l'Arrêté interministériel n° 35-1998 du 24 janvier 1998, relative aux spécifications microbiologiques de lait cru. Le nombre maximal accepté pour les bactéries dénombrées dans le lait cru sont :  $10^5$  ufc/ml pour les FTAM,  $10^3$  ufc/ml pour les CT, 50 ufc/ml pour les CSR et l'absence de germe dans 0,1 ml pour les *S. aureus* et les EC (Secrétariat général du Gouvernement, 1998).

### 2.3. Détection des inhibiteurs bactériens dans le lait

Les inhibiteurs bactériens ont été recherchés en utilisant le DelvoTest® SP-NT (DSM Food Specialties B.V., Delft, Pays-Bas). Un échantillon de lait (100 microlitres) est placé dans une ampoule contenant un milieu gélosé ensemencé par *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* et enrichi en éléments nutritifs de croissance. Les ampoules sont mises à incuber pendant trois heures à  $64 \pm 1$  °C dans un bain-marie. L'interprétation finale des résultats a été réalisée à l'œil nu selon le changement de couleur : si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que l'échantillon ne contient pas des inhibiteurs bactériens. En présence des inhibiteurs bactériens, une couleur violette est observée.

### 2.4. Enquête sur le mode de consommation du lait

Un questionnaire a été créé afin d'identifier des consommateurs de lait cru et de suivre leur santé sur une période d'étude de six mois.

La participation à l'enquête était sur une base volontaire. Les personnes ont été sollicitées lors des échantillonnages dans les points de vente.

La première partie des informations récoltées consistait en des informations relatives aux données personnelles (nom, âge) et des données de

contact (adresse et numéro de téléphone). La quantité de lait achetée le jour de l'enquête était aussi répertoriée. Il leur était également demandé ce qu'ils faisaient du lait avant la consommation.

Ces personnes ont ensuite été recontactées périodiquement par téléphone mobile et des questions relatives à leur état de santé ont été posées, notamment la présence de symptômes après la consommation du lait. Des informations quant à la quantité de lait consommée ont été également obtenues en précisant si le lait en question avait préalablement subi un traitement et si les symptômes ont nécessité une hospitalisation. Le cas échéant, il a été demandé si des analyses bactériologiques qui ont été réalisées, avec quels résultats.

### 2.5. Analyses statistiques

La moyenne et l'écart type des nombres de bactéries, exprimées en unités formant colonies (ufc) par ml, ont été calculés pour chaque type de flore et chaque échantillon.

Une analyse factorielle de la variance et le test de *Student* ont été utilisés pour la comparaison entre les résultats des dénombrements.

Le coefficient de corrélation ( $r$ ) a été calculé à partir des dénombrements bactériens, pour estimer, d'une part, le lien entre les différentes flores bactériennes et, d'autre part, entre ces flores et la température de stockage des échantillons. Un lien est considéré comme significatif au seuil de 5 %.

Le test du  $\chi^2$  de Pearson a été utilisé pour l'étude de l'impact de la consommation du lait qui subi un traitement thermique ou non sur la santé des consommateurs.

Tous les calculs ont été effectués avec le logiciel STATISTICA version 2007, après transformation logarithmique décimale des résultats exprimés en ufc/ml pour normaliser la distribution.

## 3. Résultats

Une totalité de 192 échantillons de lait cru ont été prélevés dans les huit points de vente pris en considération :

**Tableau I :** taux de contamination moyens des échantillons de lait cru analysés pour les cinq indicateurs bactériens (ufc/ml)

Région	PV	NP	flore mésophile aérobie totale	entérocoques	coliformes thermotolérants	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs
Jijel	A <sub>J</sub>	24	6,6 10 <sup>5</sup>	1,4 10 <sup>4</sup>	3,0 10 <sup>4</sup>	0,1 10 <sup>3</sup>	0,1 10 <sup>2</sup>
	B <sub>J</sub>	24	7,4 10 <sup>5</sup>	1,9 10 <sup>4</sup>	2,4 10 <sup>4</sup>	1,0 10 <sup>3</sup>	0,2 10 <sup>2</sup>
	C <sub>J</sub>	24	6,5 10 <sup>5</sup>	4,8 10 <sup>4</sup>	6,1 10 <sup>4</sup>	0,8 10 <sup>3</sup>	0,3 10 <sup>2</sup>
	D <sub>J</sub>	24	7,4 10 <sup>5</sup>	2,8 10 <sup>4</sup>	4,4 10 <sup>4</sup>	1,2 10 <sup>3</sup>	0,2 10 <sup>2</sup>
Blida	A <sub>B</sub>	24	7,2 10 <sup>5</sup>	2,2 10 <sup>4</sup>	4,7 10 <sup>4</sup>	0,6 10 <sup>3</sup>	0,2 10 <sup>2</sup>
	B <sub>B</sub>	24	8,1 10 <sup>5</sup>	3,6 10 <sup>4</sup>	4,9 10 <sup>4</sup>	0,8 10 <sup>3</sup>	0,5 10 <sup>2</sup>
	C <sub>B</sub>	24	7,1 10 <sup>5</sup>	2,1 10 <sup>4</sup>	4,9 10 <sup>4</sup>	0,6 10 <sup>3</sup>	0,2 10 <sup>2</sup>
	D <sub>B</sub>	24	7,2 10 <sup>5</sup>	3,8 10 <sup>4</sup>	6,2 10 <sup>4</sup>	2,2 10 <sup>3</sup>	0,6 10 <sup>2</sup>
Moyenne			7,2 10 <sup>5</sup>	2,8 10 <sup>4</sup>	4,6 10 <sup>4</sup>	0,9 10 <sup>3</sup>	0,3 10 <sup>2</sup>
NE<CR			3 (1,6 %)	115 (59,9 %)	91 (47,4 %)	158 (82,3 %)	169 (88,0 %)
NE>CR			189 (98,4 %)	77 (40,1 %)	101 (52,6 %)	34 (17,7 %)	23 (12,0 %)

PV : point de vente, NP : nombre de prélèvements effectués, NE<CR : nombre des échantillons qui présentent une charge inférieure au critère légal, NE>CR : nombre d'échantillons qui présentent une charge supérieure au critère légal (arrêté interministériel, 1998).

96 échantillons dans quatre points de vente différents de la région de Jijel et 96 échantillons dans quatre points de vente différents de la région de Blida. Tous les prélèvements ont été effectués dans un délai constant de trois heures et demie après l'arrivée du lait aux différents points de vente.

### 3.1. Qualité bactériologique globale du lait cru

Le tableau I rapporte le taux de contamination des échantillons de lait cru par les différentes flores selon les quatre points de vente dans les deux régions de Jijel et Blida. Pour un marqueur bactérien donné, le tableau I donne la concentration moyenne en bactéries des 24 prélèvements du site considéré, exprimée en ufc/ml.

La totalité des échantillons ont été infectés par la flore mésophile aérobie totale avec un nombre moyen varié de 6,5 10<sup>5</sup> à 8,1 10<sup>5</sup> ufc/ml selon les sites.

Sur les 192 échantillons, 52,6 % ont présenté une charge en coliformes thermotolérants supérieure aux normes exigées ; selon les sites de prélèvement, leur concentration moyenne varie de 2,4 10<sup>4</sup> à 6,2 10<sup>4</sup> ufc/ml.

De même, 40,1 % des échantillons ont montrés une charge en entérocoques

supérieure aux normes, le nombre moyen variant de 1,4 10<sup>4</sup> à 4,8 10<sup>4</sup> ufc/ml selon les sites.

Seulement 34 échantillons sont infectés par des *S. aureus*, avec une charge variant de 0,1 10<sup>3</sup> à 2,2 10<sup>3</sup> ufc/ml. Les *clostridium* sulfito-réducteurs sont présents dans 12,5 % des prélèvements, soit d'un à six prélèvements selon les sites avec des concentrations de 10 à 60 ufc/ml.

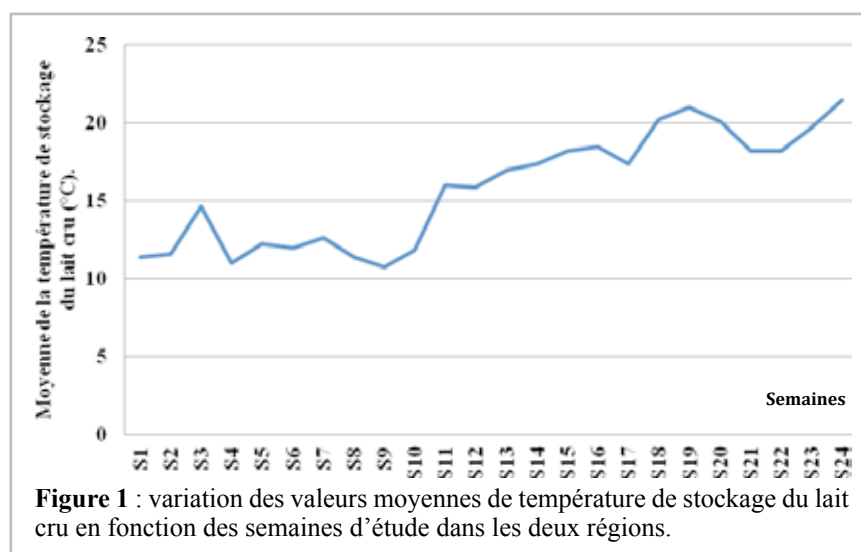
Les moyennes géométriques des bactéries dénombrées sont supérieures aux critères légaux pour tous groupes

bactériens, exceptés les *clostridium* sulfito-réducteurs.

La comparaison des résultats obtenus dans les deux régions ne montre pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) pour toutes les bactéries dénombrées.

### 3.2. Température de stockage du lait cru dans les différents points de vente

La température de stockage dans les points de vente variait entre 10,8 °C et 21,5 °C, avec une moyenne de 15,8 ± 3,6 °C (figure 1).



**Figure 1 :** variation des valeurs moyennes de température de stockage du lait cru en fonction des semaines d'étude dans les deux régions.

### 3.3. Relation entre les indicateurs bactériens et entre ces indicateurs et la température de stockage du lait cru vendu

Le tableau II reprend, pour les cinq groupes de bactéries étudiés, l'analyse entre la contamination et la température de stockage du lait. Il n'y a que deux corrélations qui sont statistiquement significatives, l'une pour les coliformes thermotolérants et l'autre pour les *S. aureus* par rapport à la température de stockage du lait.

**Tableau II** : corrélation entre les résultats de dénombrements des cinq groupes bactériens étudiés et entre ces résultats de dénombrements et la température de stockage

Relation entre les paramètres	r	valeur de p
FTAM-EC	0,060	0,40
FTAM-CT	-0,032	0,65
FTAM-SA	0,068	0,34
FTAM-CSR	-0,066	0,35
FTAM-TS	-0,017	0,80
EC-CT	0,076	0,29
EC-SA	-0,032	0,64
EC-CSR	0,094	0,19
EC-TS	0,092	0,20
CT-SA	0,035	0,62
CT-CSR	-0,012	0,86
CT-TS	0,168	0,01 *
SA-CSR	-0,074	0,30
SA-TS	0,163	0,02 *
CSR-TS	0,046	0,52

FTAM : flore mésophile aérobie totale, SA : *Staphylococcus aureus*, CT : coliformes thermotolérants, EC : entérocoques, CSR : *Clostridium sulfito-réducteurs*, TS : température de stockage de lait, r : coefficient de corrélation.

### 3.4. Fréquence d'inhibiteurs bactériens dans le lait cru

Sur un total de 192 échantillons du lait cru analysés, 28,7 % (soit 55/192) se sont avérés positifs aux inhibiteurs bactériens. La fréquence la plus élevée a été enregistrée dans les laits crus issus du point de vente A<sub>B</sub> avec une proportion de 54,2 % (soit 13/24), alors que les échantillons issus du site C<sub>J</sub> n'ont pas permis de détecter de résidu. Il y a donc de nettes différences entre points de vente pour ce paramètre (tableau III).

### 3.5. Relation entre les bactéries dénombrées et la présence d'inhibiteurs bactériens

L'étude de la relation entre la contamination du lait et la présence des inhibiteurs bactériens a permis de mettre en évidence que le niveau de contamination du lait cru par les bactéries est significativement inférieur ( $p < 0,05$ ) suite à la présence des inhibiteurs bactériens pour les *S. aureus*, EC, CT et CSR (tableau IV).

**Tableau III** : fréquence de détection d'inhibiteurs bactériens dans le lait cru, pour chacun des points de vente (PV)

Région	PV	NEP/NEE	prévalence (%)	IC95 (%)
Jijel	A <sub>J</sub>	10/24	41,7	[21,9 ; 61,4]
	B <sub>J</sub>	8/24	33,3	[14,5 ; 52,2]
	C <sub>J</sub>	0/24	0	[0,0 ; 14,3]
	D <sub>J</sub>	6/24	25,0	[7,7 ; 42,3]
Blida	A <sub>B</sub>	13/24	54,2	[34,2 ; 74,1]
	B <sub>B</sub>	5/24	20,8	[4,6 ; 37,1]
	C <sub>B</sub>	9/24	37,5	[18,1 ; 56,9]
	D <sub>B</sub>	4/24	16,7	[1,8 ; 31,6]
Total		55/192	28,7	[22,3 ; 35,0]

PV : points de vente, NEE : nombre des échantillons examinés, NEP : nombre des échantillons positifs, IC95 : intervalle de confiance à 95 %

**Tableau IV** : relation entre la détection des bactéries indicatrices et la présence d'inhibiteurs bactériens

Flore bactérienne détectée		Inhibiteurs bactériens		Total n (%)
		présence	absence	
flore mésophile aérobie totale	+	55 (100 %)	137 (100 %)	192 (100 %)
	-	0	0	0
entérocoques	+	7 (12,7 %)	70 (52,1 %)	77 (40,1 %)
	-	48 (87,3 %)	67 (47,9 %)	115 (59,9 %)
coliformes thermotolérants	+	13 (23,6 %)	88 (64,2 %)	101 (52,6 %)
	-	42 (76,4 %)	49 (35,8 %)	91 (47,4 %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	5 (9,0 %)	29 (21,2 %)	34 (17,7 %)
	-	50 (81,0 %)	108 (78,8 %)	158 (82,3 %)
<i>Clostridium sulfito-réducteurs</i>	+	5 (9,0 %)	19 (13,9 %)	24 (12,5 %)
	-	50 (81,0 %)	118 (86,1 %)	168 (87,5 %)

**Tableau V** : impact du traitement thermique du lait sur l'expression de maladies gastro-intestinales

Traitement thermique du lait	Troubles gastro-intestinaux après consommation du lait		Total
	absence de symptômes	présence de symptômes	
non	65 (54,6 %)	54 (45,4 %)	119
oui	84 (94,4 %)	5 (5,6 %)	89
Total	149 (71,6 %)	59 (28,4 %)	208

### 3.6. Impact de la consommation du lait cru sur la santé des consommateurs

Le résultat de l'enquête réalisée sur le mode de consommation du lait cru a montré que 57,2 % (soit 119/208) des personnes enquêtées consomment le lait cru directement après achat sans traitement thermique (moyenne de 0,75 litre/jour/personne dans les zones d'étude). Plus de 45 pourcents des personnes enquêtées ont déclaré avoir souffert de symptômes compatibles avec des toxi-infections d'origine alimentaire après la consommation de ce lait sans traitement thermique (soit 54/119) contre 5,6 % pour ceux qui ont traité thermiquement le lait avant consommation (soit 5/89) (tableau V).

Les manifestations cliniques sont des vomissements (6,8 % soit 4/59), de la fièvre (16,9 % soit 10/59), des douleurs abdominales (16,9 % soit 10/59) et de plusieurs symptômes associés en même temps (10,2 % soit 6/59), alors que la diarrhée était le symptôme le plus rencontré avec une prévalence de 49,2 % (soit 29/59) chez les consommateurs.

L'analyse statistique a permis de mettre en évidence que l'apparition de maladies gastro-intestinales suite à la consommation de lait cru est significativement réduite par le traitement thermique du lait ( $p < 0,05$ ).

## 4. Discussion

Des échantillons de lait cru bovin (en nombre de 192) ont été prélevés de huit points de vente dans les régions de Jijel et de Blida. Le lait a été distribué préalablement par des collecteurs dans des citernes jusqu'à des vendeurs proches des fermes. Dans les points

de vente, le lait est conservé dans des cuves de stockage sans réfrigération. La qualité bactériologique du lait a été appréciée selon les critères algériens relatifs aux spécifications microbiologiques de lait cru.

Les résultats obtenus au cours de ce travail indiquent que la majorité des échantillons de lait prélevés sont de piètre qualité microbiologique, seulement trois échantillons répondent aux critères applicables en Algérie.

La flore mésophile aérobie totale, bon indicateur de contamination globale, renseigne sur la qualité hygiénique du lait cru (Guinot-Thoms *et al.*, 1995). L'énumération de cette flore pour les 192 échantillons de lait cru a permis de relever que la moyenne des dénombrements est de  $7,2 \cdot 10^5$  ufc/ml pour tous les échantillons analysés. Nos résultats sont en accord avec ceux de Aggad et collaborateurs (2009) où le niveau de contamination moyen avoisine  $8,3 \cdot 10^5$  ufc/ml.

La majorité totalité de nos échantillons (98,4 %) sont de mauvaise qualité au vu des critères algériens qui fixent le seuil de contamination à  $10^5$  ufc/ml. Selon Amhour et collaborateurs (1998), Ils révèlent un manque de respect des bonnes pratiques de production et de stockage du lait.

Les coliformes thermotolérants indiquent en général une contamination fécale et leur nombre est généralement proportionnel au degré de pollution produit par des matières fécales (Aggad *et al.*, 2010).

La moyenne des dénombrements de ces bactéries d'origine fécale est de  $4,6 \cdot 10^4$  ufc/ml. Ces résultats sont très variables et supérieurs à la norme

$10^3$  ufc/ml (Secrétariat général du Gouvernement, 1998) pour 52,6 % des échantillons.

Les présents résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Ghazi et Niar (2011), dans la région de Tiaret avec une moyenne de  $1,7 \cdot 10^4$  ufc/ml, ils sont néanmoins similaires aux résultats obtenus par Afif et collaborateurs (2008) dans l'une des coopératives laitières à Tadla (Maroc) avec  $3,2 \cdot 10^5$  ufc/ml, mais sont nettement inférieurs aux résultats rapportés par Ouinine et collaborateurs (2004) avec  $2,0 \cdot 10^6$  ufc/ml.

Selon Mocquot et Guittonneau (1939), les coliformes du genre *Escherichia* contaminent le lait directement (par contact direct avec le pis), ou se multiplient suite à un mauvais nettoyage des ustensiles laitiers.

La charge moyenne en entérocoques est de  $2,8 \cdot 10^4$  ufc/ml et elle est très variable. Le critère algérien pour les entérocoques est l'absence du germe dans 0,1 ml de lait cru ; 40,1 % des échantillons présentent une charge supérieure. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Afif et collaborateurs (2008) où la moyenne des résultats obtenus était  $10^2$  ufc/ml. En revanche, ils sont inférieurs aux résultats de Labioui et collaborateurs (2009) avec  $4,0 \cdot 10^4$  ufc/ml. Selon Waes (1973), ils sont des indicateurs de contaminations fécales, et de manipulations non hygiéniques.

*S. aureus* contamine le lait soit par excrétion directe des mamelles d'animaux atteints de mammites ou par l'environnement lors de la manipulation et de la transformation du lait cru (Afif *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus présentent une moyenne de  $0,9 \cdot 10^3$  ufc/ml. La fréquence des résultats supérieurs au critère légal est de 17,7 % contre 82,3 % des laits analysés conformes.

Ces taux de contamination sont inférieurs à ceux décrits par Afif et collaborateurs (2008) et Mennane et collaborateurs (2007) au Maroc qui présentent des moyennes de  $8,0 \cdot 10^4$  ufc/ml et  $1,2 \cdot 10^6$  ufc/ml respectivement, mais restent proches des résultats obtenus par Aggad et collaborateurs (2009) dans l'ouest algérien avec une moyenne de  $3,5 \cdot 10^3$  ufc/ml.

La charge moyenne des laits crus analysés en clostridiens sulfite-réducteurs est de  $2,7 \cdot 10^1$  ufc/ml. Le critère algérien concernant ces bactéries étant fixée à 50 germes/ml, nous constatons que celle-ci est dépassée dans 12,0 % des échantillons.

Les résultats de cette étude montrent que 12,5 % du lait analysé est contaminé par cette flore. Ils sont nettement inférieurs à ceux de Aggad et collaborateurs (2009) dans l'ouest algérien avec un taux de contamination de 29,4 %. En revanche ils restent supérieurs à ceux de Farougou et collaborateurs (2011) avec une moyenne de  $0,4 \cdot 10^1$  ufc/ml. En parallèle, Michel et collaborateurs (2001) ont été montré que 72 % des laits contiennent moins de 180 spores de *Clostridium* par litre.

Selon Chye et collaborateurs (2004), les bactéries peuvent entrer dans le lait pendant qu'il est encore dans la mamelle mais la plupart des microorganismes retrouvés dans le lait cru sont des contaminants provenant de la surface externe de la mamelle, des ustensiles de traite et des trayeurs.

La corrélation entre les différentes flores d'une part et entre ces flores et la température de stockage des 192 échantillons de lait cru est relativement faible, seules des corrélations significatives positives entre des niveaux élevés en coliformes thermotolérants ou en *S. aureus* et la température de stockage du lait sont démontrées. Le temps qui sépare l'arrivée du lait dans les points de vente et la réalisation des prélèvements, est identique pour tous les échantillons et dans les deux régions (trois heures et demie). C'est pour cette raison, que nous n'avons pas étudié l'influence de la durée de conservation du lait sur la croissance bactérienne.

Ces faibles corrélations enregistrées entre les différentes flores dénombrées lors de cette étude ont été observées par plusieurs auteurs (Jayarao *et al.*, 2004 ; El Moslemany *et al.*, 2009). Elles supposent que chaque dénombrement fournit des informations variables en relation avec les pratiques de la traite et les sources possibles des contamination ou de multiplication bactérienne et qu'aucun dénombrement ne permet de prédire l'autre (El Moslemany *et al.*, 2009).

La température de stockage du lait joue un rôle primordial sur la croissance bactérienne. *S. aureus* se cultive à des températures comprises entre 6 °C et 46 °C (température optimale : 37 °C) et la toxinogénèse intervient dans des conditions un peu plus restrictives que celles requises pour la croissance (De Buyser, 1996). Les déjections des bovins constituent le principal réservoir des coliformes thermotolérants en particulier de l'espèce *Escherichia coli* qui se multiplie à des températures comprises entre 4 °C et 46 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C (Fédération internationale de laiterie, 1993).

Selon le Secrétariat général du Gouvernement algérien (1998), un lait de bonne qualité ne doit pas contenir des inhibiteurs bactériens. Mais les résultats de cette étude ont montré que, sur 192 échantillons de lait cru analysés, 28,7 % contenaient des inhibiteurs bactériens. Ces chiffres traduisent l'ampleur de l'utilisation des antibiotiques dans les fermes laitières où le lait est collecté, et donc le risque lié majeur sur la santé des consommateurs.

La méthode de détection des résidus utilisée dans cette étude repose sur le Delvotest SP-NT, ce test a été validée conformément à la norme internationale ISO/IDF 183. Les limites de détection pour 10 substances antimicrobiennes (pénicilline, l'ampicilline, l'amoxicilline, la céphapirine, le cefotiofur, la cloxacilline, la sulfadiazine, l'oxytétracycline, la néomycine et l'érythromycine) ont été trouvés comparables avec les limites maximales européennes de résidus (Stead *et al.*, 2008). Cependant cette méthode basée sur l'inhibition microbienne peut donner des résultats faux positifs en cas présence des agents antimicrobiens naturels dans le lait à des concentrations supérieures tel que rapporté par Navratilova (2008).

Ces résultats rejoignent ceux annoncés par Srairi et collaborateurs (2004) qui signalent un taux de l'ordre de 25,0 % d'inhibiteurs bactériens dans le lait cru. En revanche, ils sont nettement inférieurs à ceux de Zinedine et collaborateurs (2007) au Maroc, où 42,87 % des échantillons sont contaminés par des inhibiteurs bactériens.

La présence d'inhibiteurs bactériens à un taux élevé dans le lait, peut probablement s'expliquer, d'une part, par l'usage massif et incontrôlé des préparations pharmaceutiques intramammaires et, d'autre part, par un ajout volontaire des inhibiteurs de croissance des bactéries tels les antibiotiques et ce, pour stabiliser le lait.

L'étude de l'impact de la consommation du lait cru sur la santé des consommateurs montre que 45,4 % (soit 54/119) d'entre eux ont présenté des toxi-infections alimentaires (TIA) après consommation du lait cru sans aucun traitement thermique contre seulement 5,6 % après traitement thermique.

Selon Chaubeau (1992), les TIA à *S. aureus* sont directement liées à ses entérotoxines. Elles se caractérisent par un temps d'incubation très court. Les symptômes apparaissent en moyenne deux à trois h après la consommation directe du lait cru. La gravité des symptômes est en relation avec la dose des toxines et de la sensibilité individuelle (De Buyser *et al.*, 1997).

La présence des coliformes thermotolérants dans le lait indique la présence possible de micro-organismes entéro-pathogènes responsables d'une gastroentérite. Certains *Escherichia coli* font partie de ce groupe (Commission des Communautés Européennes, 1992).

Des critères de différenciation basés sur leurs sérotypes, leurs virulences et leurs conséquences cliniques ont permis de classer ces souches pathogènes en quatre groupes : les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) (Gouali et Weill, 2012).

Le respect des règles d'hygiène à la ferme et le contrôle des laits lors de leurs mises sur le marché peut permettre de réduire le nombre de toxi-infections d'origine alimentaire dues à la consommation de ces produits (Commission des Communautés européennes, 1992). Le traitement thermique du lait cru avant la consommation constituer ainsi une des méthodes efficaces pour diminuer le nombre de ces TIA.

## 5. Conclusion

À la lumière de cette étude, l'importance de la charge bactérienne du lait cru prélevé des points de vente n'est que le résultat de contaminations et multiplications successives associées aux mauvaises conditions hygiéniques et de température lors de la traite à la ferme, au cours du transport et sur les lieux de vente.

La présence de germes responsables d'intoxication alimentaire tels que *S. aureus* peut devenir un problème de santé publique même pour le lait traité thermiquement par la suite si des mesures ne sont pas prises pour éviter les contaminations.

La qualité hygiénique du lait cru à la vente peut être également améliorée par l'instauration d'une politique de traçabilité et de bonnes pratiques pour l'utilisation des antibiotiques dans la filière laitière afin d'assurer la salubrité durant toute la chaîne de production du lait.

La prévention des toxi-infections d'origine alimentaire à staphylocoques passe par la mise en place d'un programme d'action contre les mammites bovines, le maintien du lait à température de réfrigération et le strict respect des règles d'hygiène lors des manipulations à la ferme et aux points de vente, afin de limiter le nombre de *S. aureus* présents dans le lait.

## Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble du personnel de laboratoire de contrôle de qualité et d'emballage (CACQE) à Jijel ainsi que le personnel de laboratoire d'analyse vétérinaire, contrôle de la qualité, la conformité et de la recherche appliquée (AVCQ-LAB) à Baraki d'Alger.

## Bacteriological quality of raw milk from cows in the region of Jijel and Blida (Algeria) and impact on public health

## Abstract

In order to assess the risks associated with the consumption of raw milk, 192 samples of raw milk were collected from 8 points of sale between December 2013 and June 2014 and a survey was conducted among consumers. The analysis showed a meaningful presence of too many bacteria and of bacterial inhibitors (28.7% of samples). In addition, the survey revealed a high rate of gastrointestinal symptoms in people who consume raw milk without heat treatment (26.0%).

These results reflect the risk associated with marketing and raw milk consumption in these regions of Algeria and the need to implement an outreach program of good hygiene practices and livestock management of all stakeholders in the sector to ensure the safety throughout the raw milk production chain.

## BIBLIOGRAPHIE

- AFIF A., FAID M., NAJIMI M. Qualité microbiologique du lait cru produit dans la région de Tadla au Maroc. *Rev. Biol. Biotechnol.*, 2008, **7**, 2-7.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION Norme F V 0 8 - 0 5 7 - 0 1 : microbiologie des aliments : méthode horizontale pour dénombrement de Staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autre espèce) par comptage des colonies à 37 °C -1 : technique avec confirmation des colonies. Association française de Normalisation : Paris, 1994, 12 p.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION Norme F V 0 8 - 0 6 0 : microbiologie alimentaire : dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies à 44 °C : méthode de routine. Association française de Normalisation : Paris, 1996, 10 p.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION Norme ISO 4833 2003(F) : microbiologie des aliments : méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes : technique par comptage des colonies à 30°C. Association française de Normalisation : Paris, 2003, 9 p.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION Norme NF V 0 8 - 0 6 1 : microbiologie des aliments : dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfite-réductrices par comptage des colonies à 46 °C. Association française de Normalisation : Paris, 2009, 11 p.
- AGGAD H., MAHOUZ F., AHMED AMMAR Y., KIHAL M. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Rev. Med. Vet.*, 2009, **160**, 590-595.
- AGGAD H., BRIDJA M., AEK B., BENAOUALI M., DJEBLI A. Some quality aspects of pasteurized milk in Algeria. *World J. Dairy Food Sci.*, 2010, **5**, 21-24.
- AMHOURI, F., SAID B., HAMAMA, A., ZAHAR M. Qualité microbiologique du lait cru: Cas de la région d'Errachidia. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)*, 1998, **18**, 31-35.
- CHAUBEAU D.C. Toxi-infections alimentaires d'origine staphylococcique. *Point Vét.*, 1992, **148**, 33-40.
- CHYE F., ABDULLAH A., AYOB M. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol.*, 2004, **21**, 535-541.
- COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPEENNES Les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché du lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait : directive 92/46/CEE. *J. Off. Comm. Européennes.*, L 268/1, 14.09.1992.

- DE BUYSER M.L. Les staphylocoques. In : Bourgeois C., Mesclé J.F. (Eds), Microbiologie alimentaire. Tome 1. Lavoisier : Paris, 1996, 106-119.
- DE BUYSER M.L., LAPEYRE C., DILASSER F., JANIN F. Le point sur les TIAC à staphylocoques : foyers déclarés et résultats de l'analyse d'aliments suspects. In : Colin P. (Ed.), Actes du colloque « Faut-il craindre les microorganismes présents dans les aliments ? », Paris, 13-14 mars 1997, 1997, 7-16.
- DIAGNOSTIC PASTEUR Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. Imprimerie Maury : Paris, 1987, 728 p.
- EL MOSLEMANY A.M., KEEFE G.P., DOHOO I.R., DINGWELL R.T. Microbiological quality of tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 2009, **92**, 4239-4248.
- FAROUGOU S., KPODEKON T.M., SESSOU P., YOUSAO I., BOKO C., YEHOUENOU B., SOHOUNHLOUE D. Qualité microbiologique du lait cru de vache élevée en milieu extensif au Bénin. In : Université d'Abomey-Calavi, Acte du 3<sup>e</sup> colloque des sciences, cultures et technologies de l'UAC-Bénin, Akassato, 6-10 juin 2011, 2011, 323-336.
- FAYE B., LOISEAU G. Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. In : Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement, Actes de l'atelier international, Montpellier, 11-13 décembre 2000, 2000, 11-13.
- FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE F40 microbiological safety of raw and unpasteurized milk and milk products. Document n° 223, supplément. Fédération internationale de laiterie : Bruxelles, 1993, 32 p.
- GHAZI K., NIAR A. Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la wilaya de Tiaret (Algérie). *Tropicicultura*, 2011, **29**, 193-196.
- GOUALI M., WEILL F.X. Les *Escherichia coli* entérohémorragiques : des entérobactéries d'actualité. *Presse Méd.*, 2012, **42**, 68-75.
- GUINOT-Thomas P., AMMOURY M., LAURENT F. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. *Int. Dairy J.*, 1995, **5**, 211-223.
- JAYARAO B.M., PILLAI S.R., SWANT A.A., WOLFGANG D.R., HEGD N.V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell count and bacterial count. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 3561-3573.
- KIRAT S. Les conditions d'émergence d'un système d'élevage spécialisé en engraissement et ses conséquences sur la redynamisation de l'exploitation agricole et la filière des viandes rouges bovines : cas de la Wilaya de Jijel en Algérie. (Thèse pour l'obtention du titre de Master en Science). Institut agronomique méditerranéen : Montpellier, 2007, 139 p.
- LABIOUI H., LAAROUI E., BENZAKOUR A., EL YACHIOUI M., BERNY E., OUHSSINE M. Étude physico-chimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2009, **148**, 7-16.
- MENNANE Z., OUHSSINE M., KHEDID K., ELYACHIOUI M. Hygienic quality of raw cow's milk feeding from waste in two regions in Morocco. *Int. J. Agric. Biol.*, 2007, **9**, 46-48.
- MICHEL V., HAUWUY A., CHAMBA J.F. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *INRA EDP Sci.*, 2001, **81**, 575-592.
- MOCQUOT G., GUITTONNEAU G. Recherches sur la pasteurisation des laits de consommation sur la colimétrie appliquée aux contrôles de la pasteurisation des laits et des laits pasteurisés. *Le Lait*, 1939, **19**, 113-139.
- NAVRATILOVA P. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk: a review. *Czech. J. Food Sci.*, 2008, **26**, 393-401.
- OUNINE K., RHOUTAÏSSA A., EL HALOU N.E. Caractérisation bactériologique du lait cru produit dans les étables de la région du Gharb. *Al Awamia*, 2004, **109-110**, 187-204.
- SALON INTERNATIONAL DULAÏT Acte du 1<sup>er</sup> salon international du lait et de ses dérivés du 27 au 29 mai 2008. [en ligne] (2008) Adresse URL : <http://www.agroligne.com/ou-se-rencontrent-ils/algerie/22292-silait-2008-1er-salon-international-du-lait.html>.
- SECRETARIAT GÉNÉRAL DU GOUVERNEMENT Spécifications microbiologiques de certaines denrées. *J. Off. Répub. Algérienne Démocr. Pop.*, 1998, **35**, 18 p.
- SRAIRIM.T., HASNIA.I., HAMAMA A. Qualité physicochimique et contamination par les antibiotiques du lait de mélange en étables intensives au Maroc. *Renc. Rech. Ruminants*, 2004, **11**, 115.
- STEAD S.L., ASHWIN H., RICHMOND S.F., SHARMAN M., LANGEVELD P.C., BARENDSE J.P., STARK J., KEELY B.J. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest(R) SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *Int. Dairy J.*, 2008, **18**, 3-11.
- WAES G. Les streptocoques D dans le lait cru réfrigéré. *Le Lait*, 1973, **528**, 520-528.
- ZINEDINE A., FAID M., BENLEMLIH M. Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique. *Rev. Microbiol. Indust. Sanit. Environ.*, 2007, **1**, 1-9.