

Effet de l'administration de fluméquine par voie orale sur le profil d'antibiorésistance des *Escherichia coli* de la flore fécale du porc

Catherine BELLOC (1), G. SCIMIA (2), Françoise LERAY (1), Thérèse GUYOT (1),
J.L. PELLERIN (3), Arlette LAVAL (1)

(1) E.N.V. de Nantes, UER de Pathologie du Bétail
B.P. 40706, 44307 Nantes Cedex 3

(2) SANDERS Aliments - B.P. 32 - 91201 Athis-Mons Cedex

(3) E.N.V. de Nantes, UER de Microbiologie-Immunologie
BP 40706, 44307 Nantes Cedex 3

Effet de l'administration de fluméquine par voie orale sur le profil d'antibiorésistance des *Escherichia coli* de la flore fécale du porc

L'antibiorésistance est un problème majeur, tant en médecine vétérinaire que pour la santé publique en raison du risque de transmission de bactéries résistantes des animaux à l'homme. Dans ce contexte, l'utilisation des antibiotiques, en particulier dans les élevages intensifs, est mal perçue. Cette étude contribue à évaluer l'effet d'un traitement des truies à la fluméquine par voie orale sur la sélection et l'évolution dans le temps de souches d'*Escherichia coli* résistantes aux quinolones de différentes générations dans la flore fécale des animaux traités. Dans ce but, des prélèvements de matières fécales sont analysés à différents temps après l'instauration du traitement et parallèlement les mêmes investigations sont menées dans des élevages n'utilisant pas la fluméquine. Le traitement à la fluméquine sélectionne des souches d'*E. coli* résistantes à toutes les générations de quinolones mais deux mois après l'arrêt du traitement, les souches résistantes ne sont plus mises en évidence. Les conséquences sur la sensibilité aux autres familles d'antibiotiques utilisés en médecine porcine sont également envisagées : des co-résistances entre quinolones et certains aminosides sont observées.

Ce travail contribue donc à une meilleure connaissance de la prévalence de la résistance en élevage porcin ainsi que des conditions de sélection de souches bactériennes résistantes in vivo.

Effect of treatment with a quinolone (flumequin) on the emergence and the evolution kinetics of resistance of faecal *Escherichia coli* in sows

Bacterial resistance to antibiotics is a cause of concern among health specialists due to the possible transmission of resistant bacteria from animals to man and one focus of these concerns is the widespread use of antibacterial agents in the livestock industry. The purpose of this investigation was to determine the effect of treating sows with a quinolone (flumequin) on the emergence and the evolution kinetics of resistance of faecal *Escherichia coli*. Faecal samples were collected at various times after treatment in farms using flumequin and in farms where sows are not treated with flumequin. The data indicate that treatment with flumequin induces antibiotic resistance to all generations of quinolones, but resistance disappears within two months of stopping treatment. The pattern of resistance of faecal *E. coli* to commonly used antibiotics were also determined. Cross resistance between fluoroquinolones and gentamicin has been observed.

This work contributes to a better understanding of the prevalence of resistance in pig farms, as well as the selection conditions when bacterial strains become resistant in vivo.

INTRODUCTION

L'augmentation de la prévalence des antibiorésistances en santé publique et les échecs thérapeutiques qu'elles entraînent jettent l'opprobre sur l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire. Les quinolones sont particulièrement montrées du doigt car il s'agit de la classe d'antimicrobiens la plus récemment développée chez l'homme. La présence de bactéries antibiorésistantes, même non pathogènes, dans le tube digestif des animaux pose problème pour deux raisons. D'une part car elles peuvent s'avérer pathogènes opportunistes pour l'homme. D'autre part car elles constituent un réservoir de matériel génétique impliqué dans la résistance et susceptible d'être transmis à d'autres espèces bactériennes.

Peu d'études ont jusqu'ici été consacrées à la surveillance de l'antibiorésistance chez le porc (LANGLOIS et al, 1988, GELLIN et al, 1989, NIJSTEN et al, 1993, LAPERLE et al, 1996, DUNLOP et al, 1998, MATHEW et al, 1998). Il s'agit le plus souvent de résultats ponctuels obtenus dans le cadre d'une activité de diagnostic et qui ne sont donc probablement pas représentatifs de la situation la plus courante dans les élevages. Par ailleurs, le devenir dans le temps de ces résistances n'est que rarement envisagé.

Le but de notre travail est de documenter la survenue et l'évolution dans le temps de résistances aux quinolones et à d'autres antibiotiques chez une bactérie indicatrice (*Escherichia coli*) de la flore fécale d'animaux traités par voie orale à l'aide d'une quinolone de 2^{ème} génération : la fluméquine. Le choix de cet antibiotique a été motivé par son utilisation courante afin de prévenir ou traiter les troubles urinaires chez la truie.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Animaux et élevages

Des prélèvements de matières fécales ont été réalisés sur des truies présentes dans deux types d'élevages :

- des élevages concernés par des problèmes urinaires et où les truies sont systématiquement traitées à l'aide de fluméquine à la mise bas (50 g / jour / animal pendant 5 jours par voie orale)
- des élevages témoins dans lesquels les truies ne reçoivent habituellement aucun antibiotique par voie systémique.

1.2. Prélèvements de matières fécales dans les élevages

Un prélèvement de matières fécales est réalisé sur 5 truies dans chaque élevage. Dans les élevages traités, le prélèvement est renouvelé sur les mêmes animaux à différents temps par rapport au traitement : avant traitement, une semaine, un mois et deux mois après traitement. Les échantillons sont réfrigérés et acheminés dans les 24 heures à l'École Vétérinaire de Nantes pour y être analysés.

1.3. Dénombrement des *E. coli* totaux et résistants aux antibiotiques

Le dénombrement des bactéries présentes dans les matières

fécales est réalisé par des prélèvements qui sont dilués (10^{-2} à 10^{-10} de 10 en 10) et repiqués sur milieu de culture d'orientation (gélose EMB + lactose). Le comptage des colonies est réalisé après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C des géloses de dénombrement. Les résultats (moyenne des repiquages) sont exprimés en Unité Formant une Colonie (UFC) / gramme de matières fécales. Parallèlement, le pourcentage d'*E. coli* résistants aux quinolones (acide nalidixique, fluméquine, enrofloxacin) est évalué en ensemençant les matières fécales diluées sur milieu d'orientation supplémenté avec chacun des antibiotiques aux doses suivantes : acide nalidixique (64 µg/ml), fluméquine (16 µg/ml) et enrofloxacin (2 µg/ml).

1.4. AntibioGramme

Quatre souches d'*E. coli* sont sélectionnées aléatoirement par animal, sur milieu d'orientation seul ou supplémenté avec un antibiotique (si des colonies y sont présentes). Pour chaque souche sélectionnée, le profil de sensibilité à 15 antibiotiques est déterminé par la technique de l'antibiogramme standard. Les antibiotiques testés ont été choisis en raison de leur utilisation actuelle ou potentielle en production porcine : amoxicilline, ceftiofur, streptomycine, néomycine, gentamicine, florfenicol, tétracycline, doxycycline, colistine, triméthoprime/sulfamides, acide oxolinique, fluméquine, danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin.

2. RÉSULTATS

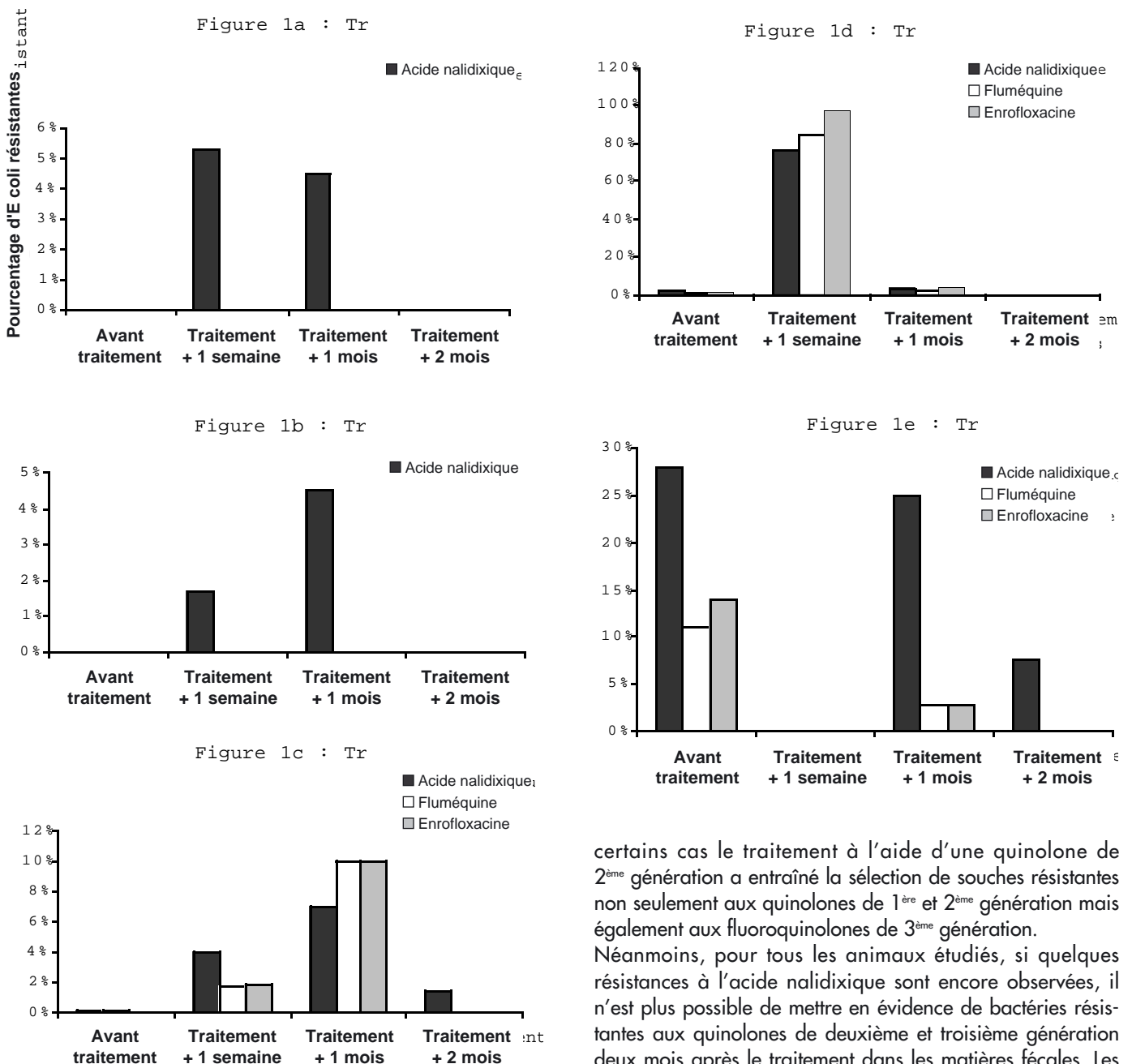
2.1. Proportion d'*E. coli* résistantes aux quinolones dans les matières fécales

Dans un élevage témoin (les truies ne reçoivent aucun traitement antibiotique par voie systémique de façon systématique), deux prélèvements de matières fécales ont été réalisés sur 5 truies à un mois d'intervalle. Les résultats des numérations sur milieu d'orientation et les proportions d'*E. coli* résistantes aux différentes familles de quinolones sont présentés au tableau 1. Le nombre d'*E. coli* présentes par gramme de matières fécales est très variable en fonction des individus (10^7 à 10^{12} pour les résultats présentés ici). Seules les quinolones de 1^{ère} génération (représentées ici par l'acide nalidixique) sont concernées par des résistances sur une très faible proportion des bactéries (10^{-3} à 10^{-8}). En revanche, aucune résistance aux quinolones de 2^{ème} et 3^{ème} générations n'a pu être mise en évidence en élevage témoin dans nos conditions expérimentales.

Les résultats concernant cinq truies d'un élevage traité sont présentés aux figures 1 a à 1 e. Ils sont représentatifs de l'ensemble des observations que nous avons réalisées dans les élevages administrant de la fluméquine aux truies. Ils font apparaître une importante variabilité individuelle. Certains animaux présentent dès avant le traitement des souches résistantes à toutes les familles de quinolones, en proportion non négligeable (figure 1e). L'effet du traitement est variable, entraînant des résistances voisines de 100% qui concernent l'ensemble des quinolones (figure 1b) ou au contraire 2 à 6% de résistances à l'acide nalidixique seulement. Dans

Tableau 1 - Proportion d'*Escherichia coli* résistantes aux quinolones en élevage témoin

Animal	Numération des <i>E. coli</i> sur gélose EMB (/g de matière fécale)	Numération des <i>E. coli</i> sur EMB + ac. nalidixique / numération sur EMB	Numération de <i>E. coli</i> sur + EMB + fluméquine / numération sur EMB	Numération de <i>E. coli</i> sur EMB + enrofloxacin / numération sur EMB
2133	38 10 ¹⁰	0	0	0
1235	16 10 ¹¹	4 10 ⁻⁸	0	0
0580	53 10 ⁶	11 10 ⁻⁶	0	0
2950	19 10 ¹¹	0	0	0
2967	11 10 ¹⁰	0	0	0
9248	10 10 ⁸	7 10 ⁻⁵	0	0
2119	36 10 ¹⁰	3 10 ⁻⁸	0	0
1470	23 10 ⁸	17 10 ⁻⁶	0	0
5349	34 10 ⁸	18 10 ⁻⁵	0	0
1485	24 10 ⁸	11 10 ⁻⁴	0	0

Figure 1 - Évolution des pourcentages d'*E. coli* résistantes aux quinolones dans les matières fécales des truies après traitement à la fluméquine

certain cas le traitement à l'aide d'une quinolone de 2^{ème} génération a entraîné la sélection de souches résistantes non seulement aux quinolones de 1^{ère} et 2^{ème} génération mais également aux fluoroquinolones de 3^{ème} génération. Néanmoins, pour tous les animaux étudiés, si quelques résistances à l'acide nalidixique sont encore observées, il n'est plus possible de mettre en évidence de bactéries résistantes aux quinolones de deuxième et troisième génération deux mois après le traitement dans les matières fécales. Les

résultats sont alors comparables à ceux obtenus en élevage témoin.

2.2. Résultats des antibiogrammes

Les résultats obtenus lors de la réalisation d'antibiogrammes sur des souches bactériennes isolées en élevage témoin (tableau 2) ou traité (tableau 3) montrent qu'il est possible de distinguer plusieurs catégories parmi les antibiotiques testés :

- Ceux vis à vis desquels nous n'avons mis en évidence aucune résistance : les céphalosporines (ceftiofur, cefquinome), le florfenicol, la colistine.
- Ceux qui présentent une faible pourcentage de bactéries résistantes : l'amoxicilline, la néomycine, la gentamicine.
- Ceux vis à vis desquels la majorité des souches d'*E. coli* isolées sont résistantes : la streptomycine, les tétracyclines, l'association triméthoprime / sulfamides.

Nous n'incluons pas les quinolones dans cette analyse semi-quantitative car certaines des souches étudiées ici étaient

Tableau 2 - Antibiotypes obtenus lors de prélèvements réalisés dans un élevage témoin

	Nombre de souches résistantes (Sur 34 souches testées provenant de 10 animaux)
Amoxicilline	4
Ceftiofur	0
Streptomycine	27
Néomycine	0
Gentamicine	0
Florfenicol	0
Tétracycline / Doxycycline	34
Colistine	0
Triméthoprime / Sulfamides	27
Acide oxolinique	23 + 1 Intermédiaire
Fluméquine	23
Danofloxacin	1
Enrofloxacin	7
Marbofloxacin	0

Tableau 3 - Antibiotypes obtenus lors de prélèvements réalisés dans un élevage traité

	Avant traitement	1 semaine après traitement	1 mois après traitement	2 mois après traitement
Amoxicilline	2	10	10	2
Ceftiofur- Cefquinome	/	/	/	/
Streptomycine	6	10	8	9
Néomycine	/	1	3	1
Gentamicine	/	5	8	/
Florfenicol	/	/	1 (I)*	/
Tétracycline	9 + 4 (I)*	12	18	8
Colistine	/	/	/	/
Triméthoprime / sulfamides	12	11	9	9
Acide oxolinique	2 (I)*	14 + 4 (I)*	16 + 1 (I)*	5
Fluméquine	2 (I)*	11 + 5 (I)*	14	5
Enrofloxacin	/	5	7	/
Marbofloxacin	/	5	7	/
Danofloxacin	/	5	7	/

(*) I = souches intermédiaires

sélectionnées sur milieu supplémenté avec une quinolone. Néanmoins, en élevage non traité en particulier, mais aussi en élevage traité (les données correspondantes ne sont pas présentées ici), il est possible d'observer une différence entre les différentes fluoroquinolones de 3^{ème} génération testées : la marbofloxacinine et la danofloxacinine sont en effet moins souvent concernées par des résistances que l'enrofloxacinine. L'évolution après traitement des antibiogrammes reproduit les observations obtenues lors des tests de sélection de souches sur milieux sélectifs : deux mois après traitement, l'importance des résistances est voisine de celle observée avant traitement.

En matière de co-résistances aux antibiotiques, il apparaît qu'en élevage traité les souches résistantes aux quinolones de 3^{ème} génération le sont également systématiquement à la gentamicine, ce qui n'est pas le cas en élevage témoin.

3. DISCUSSION

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet d'un traitement de truies avec de la fluméquine sur la sélection et l'évolution dans le temps de souches d'*E. coli* antibiorésistantes dans la flore fécale des animaux.

Dans cette étude, nous avons choisi *E. coli* comme bactérie indicatrice. Ce choix peut être discuté du fait que cette espèce bactérienne n'est pas majoritaire dans la flore fécale du porc. Néanmoins, elle est communément utilisée dans les études de surveillance de l'antibiorésistance car elle présente deux avantages majeurs. Tout d'abord elle est facile à cultiver au laboratoire et sa mise en évidence n'est donc pas entravée par des problèmes de techniques microbiologiques. D'autre part, elle est représentative du microbisme de l'élevage car les souches d'*E. coli* qui colonisent le tube digestif proviennent principalement de l'environnement et de l'alimentation (HINTON, 1986). Ceci pourrait expliquer que dans un élevage régulièrement traité à l'aide de quinolones, certaines truies présentent des souches d'*E. coli* résistantes avant d'avoir été elles-mêmes traitées, en particulier lorsqu'il s'agit de cochettes.

L'utilisation d'une quinolone de 2^{ème} génération entraîne la sélection de souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones de 1^{ère} et 2^{ème} génération, mais également vis à vis des quinolones de 3^{ème} génération. Les fluoroquinolones de 3^{ème} génération sont concernées à des degrés variables par la résistance en fonction de la molécule considérée : la marbofloxacinine est moins souvent concernée par les résistances que l'enrofloxacinine. La résistance aux quinolones est due à des mutations chromosomiques sur les gènes codant pour les sous-unités des topoisomérases II (ADN gyrase) et IV bactériennes. L'acquisition des mutations est séquentielle et l'accumulation des mutations confère un haut niveau de résistance. Un mécanisme entraînant une diminution de la concentration intracellulaire des quinolones soit par modification de la perméabilité bactérienne à l'antibiotique soit par exportation active de l'antibiotique (système d'efflux) a également été décrit (PIDDOCK, 1995). Les mécanismes sont communs, ce qui explique l'apparition de résistances croi-

sées entre les différentes molécules de la famille. Cet aspect est important à considérer car l'utilisation des quinolones en médecine vétérinaire est particulièrement mal perçue par le milieu médical. En effet, il s'agit de la classe d'antimicrobiens la plus récemment développée et une usure prématurée de ces molécules est redoutée en raison de leur prescription à grande échelle par les vétérinaires. Toutefois, le fait que les résistances aux quinolones soient à support chromosomique implique que le danger de transmission à d'autres bactéries et donc les conséquences pour la santé publique sont moindres que lorsque la résistance est à support plasmidique. Nous envisageons d'étudier les mécanismes impliqués dans les différents profils de résistance aux quinolones décrits pour nos souches d'*E. coli* afin de contribuer à la compréhension des conditions de sélection de souches antibiorésistantes in vivo.

Notre étude montre que la résistance aux quinolones sélectionnée par le traitement disparaît environ 2 mois après l'arrêt de celui-ci. Ce caractère provisoire de l'excrétion de souches bactériennes résistantes aux quinolones dans les matières fécales a également été décrit chez l'homme par CALVA et al, 1996. Dans le cadre d'un suivi de cohorte d'enfants mexicains, ces auteurs ont montré que ces enfants excrétaient en permanence des *E. coli* résistantes à l'ampicilline, au triméthoprime et aux tétracyclines. En revanche, l'excrétion de bactéries résistantes à la gentamicine, aux nitrofuranes et à la norfloxacinine était observée chez quelques enfants seulement et était de courte durée. Une étude à plus long terme est nécessaire pour confirmer ce caractère temporaire en élevage porcin.

Les résultats des antibiogrammes réalisés dans notre étude montrent l'importance des résistances aux tétracyclines et à l'association triméthoprime/sulfamidés. A l'inverse des résistances aux quinolones, les résistances aux tétracyclines sont très persistantes dans les élevages, même en l'absence de traitement. Ainsi LANGLOIS et al (1988) ont observé que plus de 10 ans après l'arrêt de l'utilisation des tétracyclines dans un élevage expérimental, la proportion de souches résistantes était encore de 40%. Néanmoins, de tels résultats ne signifient pas nécessairement que ces familles d'antibiotiques ne soient plus utilisables chez le porc. Les tétracyclines sont encore largement utilisées chez le porc pour le traitement des maladies respiratoires et donnent des résultats satisfaisants. Il en va de même pour l'association triméthoprime/sulfamidés en pathologie digestive.

Des phénomènes de co-résistances entre différentes familles d'antibiotiques ont été observés dans notre étude, en particulier entre les fluoroquinolones et certains aminosides. Nous envisageons de confirmer par une étude moléculaire que des phénomènes de modification de la perméabilité bactérienne en sont à l'origine.

CONCLUSION

De nombreux facteurs sont susceptibles de jouer un rôle dans l'apparition de bactéries antibiorésistantes parmi lesquels on peut citer la physiologie digestive de l'hôte,

les interactions microbiennes de la flore digestive ou l'administration de traitements autres que les anti-infectieux. Néanmoins il est primordial de tenter d'évaluer l'effet de traitements antibiotiques sur la prévalence des résistances en élevage porcin. Tout d'abord parce que cette prévalence mérite d'être mieux documentée. Ensuite parce que les conditions de sélection de souches résistantes in vivo restent

à préciser. Ce type d'étude nous fournira des arguments techniques susceptibles d'alimenter des discussions avec nos collègues médecins. L'optimisation de l'utilisation des antibiotiques chez l'homme et l'animal dans le but de réduire le risque de développement de résistances bactériennes est actuellement une des actions prioritaires proposées par les réunions d'experts scientifiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CALVA J.J., SIFUENTES-OSORNIO J. CERON C., 1996, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 40, 1699-1702
- DUNLOP R.H., McEWEN S.A., MEEK A.H. et al, 1998, *Prev. Vet. Med.*, 34, 265-282
- GELLIN G., LANGLOIS B.E., DAWSON K.A. AARON D.K., 1989, *Applied and Environ. Microbiol.*, 55, 2287-2292
- HINTON M., 1986, *Vet Rec.*, 119, 420-426
- LANGLOIS B.E., DAWSON K.A., LEAK I. AARON D., 1988, *Vet. Microbiol.*, 18, 147-153
- LAPERLE A., NADEAU M., CANTIN M., 1996, *Le Médecin Vétérinaire du Québec*, 26, 26-29
- MATHEW A.G., UPCHURCH W.G., CHATTIN S.E., 1998, *J. Anim. Sci.*, 76, 429-434
- NIJSTEN R., LONDON N., VAN DER BOOGARD A., STOBBERINGH E., 1996, *J. Antimicrob. Chemother.*, 37, 1131-1140
- PIDDOCK L.J.V., 1995, *Drugs*, 49, 29-35