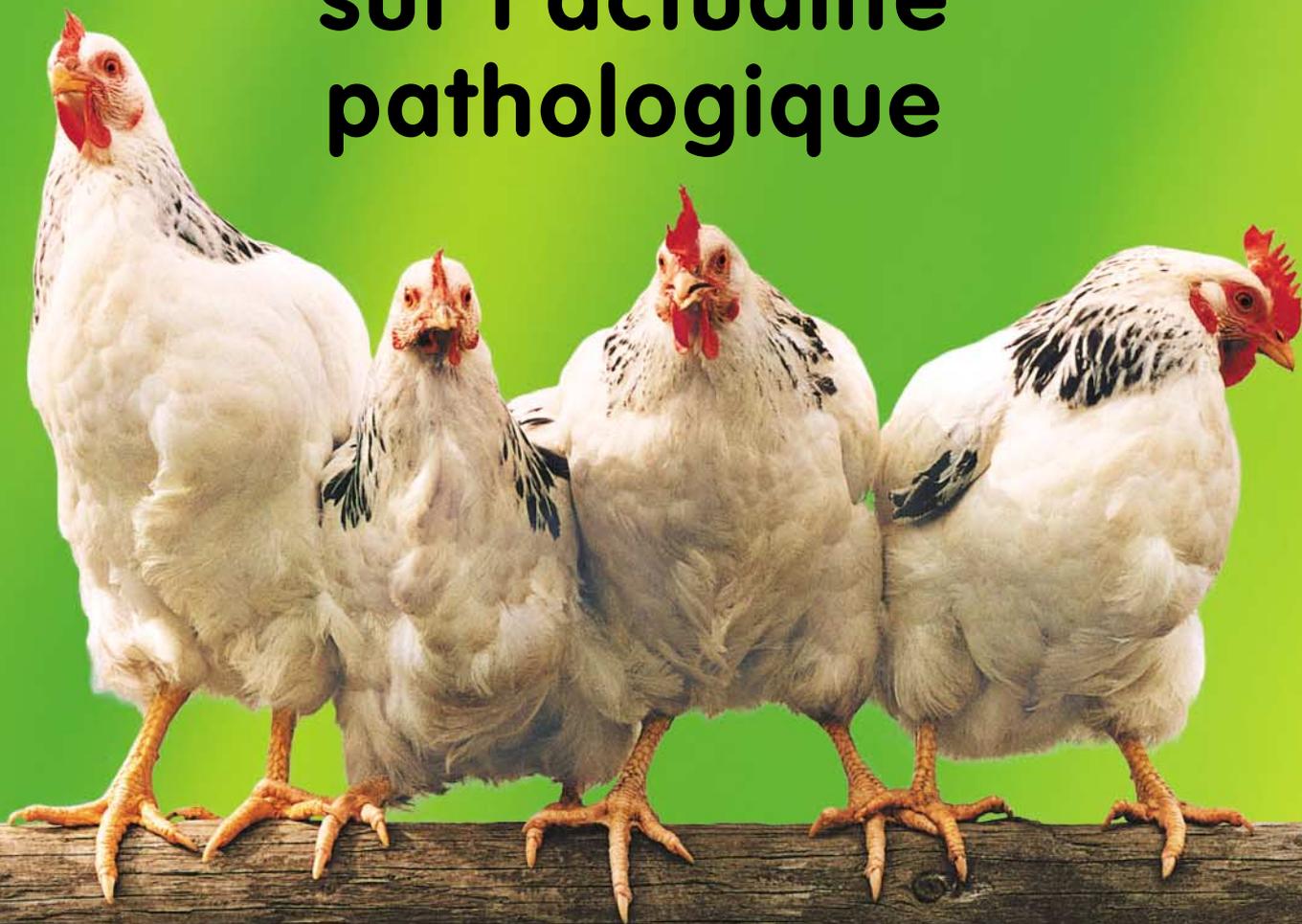


# RIPPA 2004

Rencontres InterProfessionnelles de Pathologie Aviaire

## Un regard nouveau sur l'actualité pathologique



**RDV**

**le 10 juin 2004**

**Auditorium du Triangle RENNES**

Station métro : "le Triangle"



**GROUPE**  
**chêne vert**

***RENCONTRES  
INTERPROFESSIONNELLES  
DE PATHOLOGIE  
AVIAIRE***

**Rennes**

Le 10 Juin 2004

Organisées par

Synthèse Élevage - Groupe Chêne-vert  
Rue Marie Curie  
BP 39  
35 137 PLEUMELEUC  
☎ 02 99 06 10 06  
e-mail : [syntheseelevage@chene-vert.com](mailto:syntheseelevage@chene-vert.com)

**Les organisateurs tiennent à remercier  
les firmes et organismes  
dont l'aide a été précieuse  
pour la réalisation des RIPPA 2004**

**BAYER**  
Division Santé Animale  
BP 11  
56891 SAINT AVE CEDEX

**CEVA**  
ZI DE LA BALLASTIERE  
BP 126  
33501 LIBOURNE CEDEX

**COOPHAVET**  
BP 7 - 44153 SAINT HERBLON  
COOPHAVET  
BP 7 - 44153 SAINT HERBLON

**ELANCO**  
13 Rue Pages  
92158 SURESNES

**FORT DODGE**  
22-26 AV. MARCEL DASSAULT  
BP 440  
37204 TOURS CEDEX 3

**FRANVET**  
ZI D'ETRICHE  
BP 20341  
49503 SEGRE CEDEX

**INTERVET**  
RUE OLIVIER DE SERRES  
BP 67131  
ANGERS TECHNOPOLE  
49 071 BEAUCOUZE CEDEX

**JANSSEN**  
DIVISION JANSSEN CILAG  
1 RUE CAMILLE DESMOULINS  
92787 ISSY LES MOULINEAUX CDX

**MERIAL**  
BP 7  
ST HERBLON  
44153 ANCENIS CEDEX

**NOVARTIS**  
14 BOULEVARD RICHELIEU  
BP 430  
92845 RUEIL MALMAISON CEDEX

**PFIZER**  
23-25 AV DR LANNELONGUE  
75668 PARIS CEDEX 14

**SCHERING-PLOUGH VETERINAIRE**  
92 RUE BAUDIN  
BP 229  
92307 LEVALLOIS PERRET CEDEX

**VIRBAC**  
BP 447  
06515 CARROS CEDEX

**FILIERES AVICOLES**  
13 SQUARE DU CHENE GERMAIN  
3577 CESSON SEVIGNE CEDEX

# **Organisation des RIPPA 2004**

## **Organisation et coordination**

Dr Nathalie DOUBLET

Dr Eric CHATAIGNER

## **Communication**

Séverine ROBIN

## **Comité scientifique**

Dr Nadine CARIOU	Jean LE GUENNEC
Dr Aurélie HOFMAN	Dr Jean LEORAT
Dr Paul ARNAUD	Damien MARTIN
Dr Armel BONNETE	Jean LOUIS PINSARD
Dr Jean-Charles DONVAL	Dr Brice ROBINEAU
Dr Julien FLORY	

## **Remerciements pour leur intervention**

Dr Bénédicte ALEXANDRE	Jérôme GUYONNET	Dr Pierre-Yves MOALIC
Dr Ginette MARCHANT	Dr Bernard HESKIA	Dr Pascal PAULET
Dr Eric BOUSQUET	Gilbert INIZAN	Pr Louis PINAULT
Dr Christophe BOSTVIRONNOIS	Dr Patrice LAFARGUE	Jean-Louis PINSARD
Dr Maarten DE GUSSEM,	Dr Philippe LE COZ	Dr Jean-François SOU
Dr Christophe DE LANGHE	Dr Hervé LE GALLUDEC	Dr Lionel ZENNER
Dr Jean DELAPORTE	Dr Stéphane LEMIERE	
Dr Robrecht FROYMAN	Damien MARTIN	

## **Remerciements pour leur concours**

Chantal BOUCARD	Valérie CONNAN
Laurence CLERMONT	Nadège TIREL
Valérie PUPIN	Jean-Luc CADINOT
Catherine GARÇON	Dr Jean DUDOUYT
Jacqueline MASNY	Olivier LEBARS
Edwige MOUSSU	Dr Patrick PUPIN

# Sommaire

## Médicament et Sécurité Alimentaire

---

### Page 7

Conséquences thérapeutiques et sanitaires  
de l'évolution de la réglementation de la pharmacie vétérinaire.

*Dr Bénédicte ALEXANDRE, COOPHAVET*

*Professeur Louis PINAULT - Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.*

Antibiotiques : La prise en compte des préoccupations du public.

*Dr Patrice LAFARGUE, Lilly France ELANCO.*

La maîtrise des antibiotiques : les outils au service du vétérinaire.

*Dr Philippe LE COZ, SELVET-CONSEIL.*

Sensibilité des germes bactériens d'origine aviaire  
aux antibiotiques de 2000 à 2002 : données terrain.

*Dr Jean DELAPORTE et Gilbert INIZAN, BAYER Santé Animale.*

Intérêt de l'association de 2 antibiotiques  
pour optimiser l'efficacité et limiter la résistance.

*Jérôme GUYONNET, CEVA Santé Animale.*

## Poulet : La Stratégie Vaccinale et ses Outils

---

### Page 37

Conséquences pratiques des différentes méthodes  
de détection du virus de la Bronchite Infectieuse.

*Dr Christophe DE LANGHE, INTERVET.*

Screening à l'abattoir : intérêt des sérologies en fin de bande pour le suivi  
des infections virales et le contrôle des vaccinations.

*Jean-Louis PINSARD*

*BIO-CHÊNE VERT.*

Influence de la vaccination maladie de Marek sur la décroissance  
des anticorps maternels GUMBORO. Application à la stratégie vaccinale.

*Dr Hervé LE GALLUDEC, FORT-DODGE Santé Animale.*

## Dinde : Ornithobacterium rhinotracheale

---

### Page 53

Ornithobacterium rhinotracheale en dinde de chair :  
évolution de la contamination au sein d'élevages au cours d'une bande.

*Dr Pascal PAULET, INTERVET.*

Ornithobacterium rhinotracheale : prélèvements et méthodes d'analyses

*Dr Pierre-Yves MOALIC, LABOFARM.*

Définition de nouveaux diamètres critiques pour l'Oxytétracycline dans l'interprétation des antibiogrammes d'*Ornithobacterium rhinotracheale*.

*Dr Eric BOUSQUET, Dr Jean-François SOU  
VIRBAC France.*

Étude de l'association Oxytétracycline-Lincomycine et Oxytétracycline-Tylosine vis à vis d'*Ornithobacterium rhinotracheale* isolé chez la dinde.

Méthodes de détermination et résultats.

*Damien MARTIN, BIO-CHÊNE VERT.*

Détermination de concentrations minimales inhibitrices de l'Oxytétracycline, de la Tylosine et de l'association Oxytétracycline-Tylosine, en milieu gélosé vis-à-vis de 18 souches référencées d'*Ornithobacterium rhinotracheale*.

*Dr Christophe BOSTVIRONNOIS, Lilly France ELANCO.*

Synergie de l'association lincomycine - oxytétracycline sur *Ornithobacterium Rhinotrachéale*.

*Dr Françoise PICHARD, PFIZER.*

---

## **Dinde : Pathologie Digestive**

---

### **Page 83**

Adénovirose de la dinde : étude terrain.

*Dr Stéphane LEMIÈRE, MERIAL.*

Détermination de la date de vaccination Dindoral® : intérêt pratique.

*Dr Nathalie DOUBLET, SELVET-CONSEIL.*

Nouveaux éléments pronostiques et diagnostiques sur l'histomonose de la dinde.  
*Dr Lionel ZENNER, Dr Karine HUBER et Dr Claude CHAUVE Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.*

Lutte intégrée contre les helminthoses aviaires.

*Dr Maarten DE GUSSEM, JANSSEN Animal Health International - Belgique.*

*Dr Etienne MEISSONNIER, JANSSEN Santé animale - France.*

---

## **Maîtrise des flores digestives**

---

### **Page 109**

De l'équilibre de la flore digestive à la maîtrise de l'intégrité intestinale.

*Dr Christophe BOSTVIRONNOIS, Lilly ELANCO.*

Intérêt des sulfamides dans la maîtrise simultanée des entérites non spécifiques et des coccidioses chez les volailles.

*Dr Bernard HESKIA, NOVARTIS Santé Animale.*

Importance de la viande de volaille dans la transmission de la campylobactériose humaine.

*Dr Ginette MARCHANT, Institut de la Santé Publique Belge  
et Institut Scientifique Régional de Service Public.*

L'acidification de l'eau de boisson : intérêt et limites.

*Dr Eric CHATAIGNER, SELVET-CONSEIL.*

# **MÉDICAMENT ET SÉCURITÉ ALIMENTAIRE**

## **Conséquences thérapeutiques et sanitaires de l'évolution de la réglementation de la pharmacie vétérinaire.**

DR BÉNÉDICTE ALEXANDRE, COOPHAVET, AVEC LA PARTICIPATION  
DU PROFESSEUR LOUIS PINAULT - ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE NANTES.

## **Antibiotiques : La prise en compte des préoccupations du public.**

PATRICE LAFARGUE, LILLY FRANCE ELANCO.

## **La maîtrise des antibiotiques : Les outils au service du vétérinaire.**

DR PHILIPPE LE COZ, SELVET-CONSEIL.

## **Sensibilité des germes bactériens d'origine aviaire aux antibiotiques de 2000 à 2002 : données terrain.**

DR JEAN DELAPORTE ET GILBERT INIZAN, BAYER SANTÉ ANIMALE.

## **Intérêt de l'association de 2 antibiotiques pour optimiser l'efficacité et limiter la résistance.**

JÉRÔME GUYONNET, CEVA SANTÉ ANIMALE.

# **CONSÉQUENCES THÉRAPEUTIQUE ET SANITAIRES DE L'ÉVOLUTION DE LA RÉGLEMENTATION DE LA PHARMACIE VÉTÉRINAIRE**

**Dr Bénédicte ALEXANDRE**

LABORATOIRE COOPHAVET

**Pr Louis PINAULT**

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE NANTES

## **Introduction**

Depuis plusieurs années, les professionnels de la santé animale déplorent la réduction de l'arsenal thérapeutique disponible. Ce fait est particulièrement évident dans les filières hors-sol, notamment en aviculture, où ces dernières années des molécules efficaces auparavant largement employées ont disparu. Cette restriction touche à la fois les médicaments vétérinaires et les additifs alimentaires. Citons par exemple le carbaryl utilisé dans la lutte contre les poux ou le nifursol apprécié pour la maîtrise de l'histomonose. Les intervenants de la filière sont souvent tentés d'en imputer la responsabilité aux laboratoires pharmaceutiques suspectés de délaisser les marchés industriels au profit de secteurs plus rentables. Mais l'évolution des contraintes réglementaires explique en partie le constat fait précédemment. En outre au sein de la Communauté européenne (CE) et plus largement au niveau international, on peut noter des disparités dans les conditions d'attribution des A.M.M. Mais la CE poursuit ses efforts d'harmonisation tant en son sein qu'au plan mondial en vue de faire disparaître ces différences difficilement justifiables.

## **1. Les origines de la diminution de l'offre de médicaments vétérinaires et de l'indisponibilité de certains médicaments néanmoins nécessaires**

### **1.1. Des causes réglementaires**

La finalité de la filière avicole, comme celle des autres filières hors-sol ou de l'élevage bovin, est d'élever des animaux en vue de la production de denrées destinées à la consommation humaine (DDCH) : lait, œufs, viande. Afin de protéger la santé du consommateur, les denrées produites doivent satisfaire aux normes de sécurité, établies pour l'usage de toutes les substances administrées à de tels animaux : les limites maximales de résidus ou LMR. Elles sont fixées au niveau communautaire par le règlement N°2377/90/CEE du 26 juin 1990 (J.O.C.E. N° L224 du 18/08/90) (règlement LMR) et s'appliquent dans tous les États membres, à toute denrée circulant dans la CE.

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2000, aucun médicament vétérinaire administré à des animaux producteurs de DDCH ne peut être mis, ou maintenu, sur le marché si ses constituants n'ont pas fait l'objet d'une évaluation de leurs résidus permettant leur classement sur l'une des annexes I, II ou III et il est interdit d'administrer à de tels animaux tout médicament quel qu'il soit (spécialité, aliment médicamenteux, préparations officinale ou magistrale extemporanées) contenant une substance classée sur l'annexe IV.- voir § 2.3.

En conséquence des substances sur lesquelles on ne disposait pas d'informations considérées maintenant comme suffisantes pour définir des conditions d'usage sans risque pour la santé du consommateur ont du être retirées de l'arsenal thérapeutique et d'autres ont été proscrites lorsque les études fournies mettaient en évidence un danger de leurs résidus inacceptable quelle que soit leur teneur dans les denrées.

## **1.2. Des raisons économiques**

La restriction de l'arsenal thérapeutique vétérinaire et son corollaire, la création de véritables maladies orphelines, c'est à dire sans ressource thérapeutique appropriée, a aussi une cause économique. Le coût croissant des activités de recherche et de développement (R&D) des médicaments, puis des frais d'enregistrement nécessaires à l'obtention de leur autorisation de mise sur le marché (AMM) sont de plus en plus difficilement couverts par le marché qui s'offre à eux. Une telle évolution rend aléatoire pour un industriel un retour sur ses investissements. Seules quelques grandes maladies d'élevage, parasitaires ou microbiennes, offrent de telles perspectives. Les efforts d'innovation se portent alors sur elles, délaissant les autres, non-rentables. Quelques chiffres couramment avancés donneront un ordre de grandeur des sommes mises en jeu. La R&D d'un médicament vétérinaire non-immunologique (autre que les vaccins) vraiment innovant c'est à dire à base d'un nouveau principe actif, est de l'ordre de 15 millions d'euros alors que les droits d'enregistrement par l'Agence européenne du médicament pour la procédure centralisée d'AMM auquel il est soumis sont de 116.000 euros. Les médicaments immunologiques sont assujettis à des droits réduits de 50 %. La mise au point d'un médicament partiellement innovant à base de principes actifs connus et déjà sur le marché, améliorant sa présentation ou ajoutant des indications, voire la copie quasi conforme (générique) d'une spécialité ayant une AMM, conduit à un coût de développement moindre pouvant néanmoins atteindre 1 million d'euros avec des frais d'enregistrements, pour une AMM nationale ou une reconnaissance mutuelle d'AMM de 5 à 10.000 euros. On estime (AIEMV) que seulement 37 % des médicaments vétérinaires en France ont un chiffre d'affaires annuel supérieur au droit d'enregistrement communautaire de base (116.000 euros). Le marché potentiel des médicaments pour animaux d'élevage est relativement constant, quand il ne régresse pas. Mais il en va autrement pour les coûts de R&D et enregistrement dont l'augmentation régulière est la conséquence directe de l'élévation du niveau des exigences des pouvoirs publics à l'égard du MV en matière de qualité, d'innocuité et d'efficacité pour satisfaire nos attentes d'utilisateurs-consommateurs. Il en résulte des réglementations de plus en plus nombreuses, rigoureuses, parfois excessives, nécessitant la mise en œuvre de principes de bonne pratiques de laboratoire ou cliniques, assorties de systèmes d'assurance qualité, impliquant la mobilisation de moyens matériels et humains toujours plus onéreux. Tous ces travaux, essais et études conduisent à des rapports rassemblés et ordonnés dans le dossier dont la composition est fixée réglementairement, qui est associé à toute demande d'AMM.

Le médicament vétérinaire dont le chiffre d'affaires moyen ne représente que le 20<sup>ème</sup> de son homologue humain n'en est pas moins soumis aux mêmes exigences de preuves de sa qualité (partie II du dossier) et de son efficacité (partie IV du dossier). Les exigences relatives à son innocuité (partie III du dossier), sont supérieures. En effet doivent être évaluées la sécurité de l'utilisateur, l'homme qui l'administre, l'innocuité pour l'animal destinataire, la sécurité pour l'environnement exposé directement ou indirectement, par les excréta des animaux et les effluents d'élevage, et enfin la sécurité pour la santé du consommateur des denrées produites par les animaux d'élevage. Pour

atteindre ce dernier objectif (sous partie-III B), il est nécessaire au préalable de définir quelles sont les concentrations en résidus des substances actives, dans les productions, qui seront sans risques pour la santé des consommateurs : les limites maximales de résidus ou LMR, qui constituent un véritable « verrou » de sécurité alimentaire. Certains principes actifs anciens, non-protégés par un brevet dont l'exploitation était tombée dans le domaine public, n'ont pas fait l'objet de la constitution d'un dossier de demande de fixation de LMR ou ces dossiers n'ont pas été « défendus » par la réalisation des études complémentaires requises. En effet, aucun laboratoire n'envisageait de payer des droits ou de financer des travaux dont les concurrents auraient pu profiter du résultat sans y avoir contribué. Conséquence de la non-protection de l'investissement qui aurait été nécessaire, des médicaments auparavant autorisés, à base de telles substances ont été écartés de l'arsenal thérapeutique. Cette cause, économique, de la réduction des médicaments autorisés a bien été identifiée dans la réflexion lancée par la Commission européenne et des solutions sont recherchées pour y remédier. C'est seulement ensuite que pourront être déterminées les conditions d'usage du médicament, notamment son temps d'attente (TA) garantissant que ces LMR ne seront pas dépassées. Pour définir des conditions d'emploi du médicament vétérinaire, assorties d'un risque évalué et acceptable les études doivent utiliser des modèles et/ou des petits échantillons de population. Mais cette méthodologie, réductrice, est complétée par l'organisation de la pharmacovigilance vétérinaire qui, sur le terrain, en vraie grandeur, vérifiera le bien-fondé des extrapolations effectuées et y apportera le cas échéant les corrections appropriées.

## **2. Les LMR des substances actives des médicaments vétérinaires : gage de sécurité sanitaire des aliments mais cause de l'indisponibilité de médicaments**

### ***2.1. Le concept de limite maximale de résidus ou LMR***

En application du règlement LMR « on entend par limite maximale de résidus : la teneur maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire (...) que la Communauté peut accepter comme légalement autorisée ou qui est reconnue comme acceptable dans ou sur des denrées alimentaires. » Les LMR concernent exclusivement les médicaments administrés aux animaux producteurs de denrées destinées à la consommation humaine (PDDCH). Elles s'appliquent aux substances « pharmacologiquement actives » qui entrent dans leur composition, incluant non seulement les principes actifs mais aussi divers excipients de la formule.

### ***2.2. La démarche suivie pour la fixation des LMR***

L'évaluation des risques des résidus, pour le consommateur, suit un processus scientifique internationalement accepté fixé par des lignes directrices et réglementations communautaires, comportant 4 étapes :

- 1°) L'identification précise du résidu constituant un danger. Elle fait appel aux moyens analytiques modernes, physiques, chimiques et biologiques permettant d'identifier le résidu et de le doser à l'aide de méthodes validées.
- 2°) La caractérisation du danger que représente le résidu considéré, visant à décrire la nature

de ses effets sur les organismes vivants et les relations entre les doses d'exposition et les effets observés. Elle nécessite dans une première phase la mise en œuvre d'essais toxicologiques, pharmacologiques et microbiologiques, utilisant des systèmes vivants appropriés : des animaux de laboratoires, organes, tissus ou cellules en survie ou culture (méthodes *in vitro*) ou des micro-organismes. Elle conduit à la détermination expérimentale des doses sans effet (DSE) observables, pour chaque type d'effet indésirable (toxicologique, pharmacologique ou microbiologique) potentiel, qui matérialiseront le niveau de sécurité d'exposition au résidu. Cette dose s'exprime en mg (ou microgramme :  $\mu\text{g}$ ) de résidu par kg de poids corporel de l'animal d'essai. Dans un second temps, il convient d'extrapoler à l'homme ces données expérimentales en affectant chaque DSE d'un facteur de sécurité. Cette extrapolation est très prudente. Le facteur de sécurité prend en compte les différences de sensibilité entre espèces (homme/animal) et l'hétérogénéité des individus dans la population des consommateurs. Il est en moyenne de 100 mais peut être plus élevé selon la nature de l'effet caractérisé. Ainsi affectée du facteur de sécurité approprié, chaque DSE conduit à une dose journalière admissible pour l'homme (DJA) exprimée en mg (ou  $\mu\text{g}$ ) par kg de poids corporel. On retiendra in fine la plus basse d'entre elles pour calculer la dose journalière totale admissible (DJTA) pour un consommateur dont le poids moyen standardisé, toujours pour les mêmes besoins d'harmonisation des normes, a été fixé à 60 kg, soit :  $\text{DJTA mg} = \text{DJA mg/kg} \times 60 \text{ kg}$ . Ainsi on peut raisonnablement affirmer que si les aliments n'apportent pas quotidiennement une quantité de résidus supérieure à cette DJTA, la santé du consommateur ne sera pas mise en danger.

3°) **La mesure de l'exposition du consommateur aux dangers** : les résidus de substances actives des médicaments vétérinaires. L'exposition est assurée exclusivement par les denrées issues des animaux susceptibles d'être traités avec les médicaments qui vont les contenir dans leur formule. L'estimation de la consommation quotidienne de ces produits et productions n'est pas le résultat d'une enquête de consommation du « panier de la ménagère » mais a été défini et standardisé a priori au plan mondial pour permettre des calculs harmonisés des normes internationalement acceptables non susceptibles de constituer des entraves aux échanges commerciaux. Elle s'établit comme suit : 0,5 kg de « viande » de bovins, porcins ou volailles, constituée de muscle (0,3 kg), graisse, foie, rein et peau (porcs et volailles), ou 0,3 kg de « chair » (muscle + peau) de poisson, + 1,5 kg de lait, + 20 g de miel. Seuls les vecteurs potentiels compte tenu des usages prévus de la substance considérée seront pris en compte dans les calculs.

4°) **La caractérisation du risque qui intègre les données précédentes** et se traduit par la fixation de la LMR, concentration que le résidu ne doit pas dépasser dans chaque denrée-vecteur pour garantir que la santé des consommateurs ne sera pas mise en danger, dans l'hypothèse où tous les jours de sa vie il pourra consommer la quantité maximale de résidus ainsi tolérée. Ce calcul nécessite de fractionner la DJTA et d'affecter chaque fraction à un vecteur potentiel. La quantité partielle (en  $\mu\text{g}$ ) ainsi attribuée à chaque denrée, divisée par la masse (en kg) conventionnelle de cette denrée consommable quotidiennement, s'exprime donc par une concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) qui est la LMR calculée pour cette denrée.

### **2.3. Par qui sont calculées puis fixées les LMR ?**

Les LMR constituant un critère important de qualité des denrées sont évidemment une norme à satisfaire pour permettre leur circulation et échanges. Leur fixation ne peut donc pas être le produit d'une démarche nationale mais doit recueillir un accord au niveau communautaire voire international.

Sur le plan international c'est l'une des fonctions de la Commission du codex alimentarius que d'établir de telles normes, tâche assumée par le Comité du codex sur les résidus de médicaments vétérinaires qui se réunit périodiquement.

Au niveau communautaire le Comité des médicaments vétérinaires (CVMP) de l'Agence européenne d'évaluation du médicament (EMA), à Londres, est en charge de conduire cette démarche scientifique. Le CVMP formule un avis accompagné d'un rapport d'évaluation, pour l'inscription de la substance évaluée sur l'une des 4 annexes du règlement N°2377/90/CEE et selon le classement envisagé de proposer les valeurs de LMR à fixer. Cet avis est ensuite soumis à la Commission des communautés qui va classer la substance et fixer ces LMR par règlement publié au Journal officiel des communautés. Il existe heureusement une liaison entre les travaux du Codex alimentarius et ceux de la CE permettant d'aboutir à des valeurs de LMR cohérentes.

Les 4 annexes actuelles du règlement 2377/90/CE sont les suivantes :

**Annexe I** : liste des substances pour lesquelles des LMR « définitives » ont été fixées avec les valeurs de ces LMR dans les différents tissus pour différentes espèces, celles pour lesquelles des informations ont été présentées aux évaluateurs du CVMP ;

**Annexe II** : liste des substances non-soumises à une LMR pour lesquelles au terme de l'évaluation il n'a pas été jugé utile de fixer des LMR considérant que dans les conditions d'usage thérapeutique prévues la quantité de résidus résultante ne pourrait constituer un danger pour le consommateur ;

**Annexe III** : liste des substances pour lesquelles des LMR provisoires ont été fixées avec les valeurs de ces LMR et la date limite de leur validité à laquelle devront avoir été fournies des données complémentaires nécessaires à leur inscription sur l'Annexe I. A défaut d'information produite au terme du délai ou si l'évaluation de celles fournies est défavorable, la substance sera inscrite sur Annexe IV.

**Annexe IV** : liste des substances pour lesquelles aucune LMR ne peut être fixée, soit par absence d'informations appropriées, soit parce que quelle que soit la valeur envisagée cela constituera un danger avéré ou suspecté pour le consommateur.

## **2.4. LMR et commercialisation des productions animales**

Les États membres doivent en application de la directive 96/23/CE du 29 avril 1996 (J.O.C.E. N° L125 du 23/5/96) mettre en place un plan de surveillance pour la recherche des résidus de médicaments vétérinaires (Groupes B1 : substances antibactériennes et B2 autres médicaments vétérinaires) de son Annexe I pour vérifier le non-dépassement des LMR dans les denrées. Les plans d'échantillonnage, les qualités requises des méthodes analytiques, etc., sont précisées par voie réglementaire. Ce plan doit être soumis par chaque Etat membre à l'agrément de la Commission. La coordination de son exécution, pour la France, est actuellement confiée à la DGAL du Ministère de l'Agriculture.

L'importation des productions animales en provenance des pays tiers est subordonnée à la soumission par le pays tiers concerné d'un plan de même nature qui doit être approuvé par la Commission des CE, et le cas échéant modifié et mis à jour, par décision publiée au J.O.C.E. Cette décision mentionne les animaux et les produits considérés conformes aux dispositions de la directive.

Cependant il apparaît une faille juridique dans le système de contrôle des résidus, prise en comp-

te dans la réflexion en cours initiée par la Commission, pour les substances dont aucune LMR n'a été fixée. Il s'agit d'une part de celles n'ayant pas fait l'objet d'une demande d'évaluation de leurs résidus ou dont le dossier n'a pas été « défendu », d'autre part de celles inscrites sur l'Annexe II et sur l'Annexe IV. Pour ces dernières explicitement interdites (Groupe A de l'Annexe I de la directive 96/23/CE) le contrôle de leur absence ne peut être valablement effectué que par un laboratoire prouvant la capacité de sa méthode à détecter des traces « infimes » correspondant à une « limite de performance minimale requise » (LMPR).

En contrepartie et en application de l'article 13 du règlement 2377/90/CEE, « Les États membres ne peuvent interdire ou empêcher la mise en circulation sur leur territoire de produits alimentaires d'origine animale originaires des autres pays membres sous prétexte qu'ils contiennent des résidus de médicaments vétérinaires, si la quantité de ces résidus ne dépasse pas la LMR prévue à l'annexe I ou III ou si la substance en question figure à l'annexe II. Néanmoins si un État membre estime à la vue de données nouvelles qu'il convient pour la protection de la santé des consommateurs de réévaluer les données existantes, une procédure prévue par le règlement peut être mise en œuvre autorisant entre autres cet État membre à prendre des mesures d'interdiction d'urgence, si nécessaire.

## **2.5. Conséquences du constat d'un dépassement d'une LMR**

On ne peut assurément pas en tirer la conclusion que la denrée constitue un danger avéré immédiat pour le consommateur compte tenu d'une part des facteurs de sécurité appliqués pour le calcul de la LMR et d'autre part de ce qu'elle a été établie en général avec l'hypothèse d'une consommation quotidienne répétée. Néanmoins cela justifiera le retrait de la consommation de la denrée, non-conforme aux spécifications sanitaires exigées.

Mais surtout cela stigmatise une faille dans la filière de production de la denrée. Ce qui va justifier la conduite d'investigations notamment au niveau de l'élevage d'origine pour en identifier la source : mauvais usage du médicament tel que non-respect du mode d'emploi validé et/ou du temps d'attente (TA), évaluation incorrecte du TA lors de l'attribution de l'AMM, etc. afin d'y apporter le remède approprié. Ce qui autorise les autorités compétentes à procéder aux enquêtes, prélèvements, analyses appropriées, prévues par la directive 96/23/CE et transcrites dans le Code rural.

## **3. Le respect des règles du bon usage des médicaments vétérinaires, outil primordial de prévention du dépassement des LMR**

L'objectif visé est qu'aucune denrée ne contienne des résidus d'une substance médicamenteuse vétérinaire à une teneur supérieure à sa LMR. Il convient à cette fin que soient définies, validées et recommandées des conditions et modalités d'emploi des médicaments telles que cette condition soit satisfaite. Les plans de contrôle cités précédemment permettront de vérifier statistiquement avec les aléas du plan d'échantillonnage que ces conditions sont appropriées pour autant qu'elles auront été respectées, ce qui sera aussi vérifié.

### **3.1. Le temps d'attente des médicaments vétérinaires**

La disposition essentielle est le respect du temps d'attente (TA) du médicament indiqué dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) accompagnant l'AMM des plus récents ou mentionné dans le libellé de l'AMM des plus anciens.

Le temps d'attente (art. L. 5143-4 du code de la santé publique) est « le délai à observer entre la dernière administration du médicament à l'animal, dans les conditions normales d'emploi, et l'obtention des denrées alimentaires provenant de cet animal », afin de garantir qu'elles ne contiennent pas de résidus en quantité supérieure aux LMR fixées par le règlement communautaire.

Ce TA est conditionné par la forme galénique qui conditionne la biodisponibilité du principe actif, ainsi que par les conditions d'administration du médicament (voie, doses, durée).

### **3.2. Modalités de fixation des temps d'attente des médicaments vétérinaires**

Pour sa détermination, une étude de « cinétique de déplétion des résidus », est conduite chez les animaux auxquels est destiné le médicament, conformément à des lignes directrices qui en précisent les modalités pratiques. L'étude consiste à caractériser et doser, à l'aide de méthodes analytiques validées, les résidus dans les denrées produites par ces animaux collectées à divers temps après la dernière administration. Elle doit être réalisée avec la formule finale du produit qui sera mis sur le marché, administré suivant les conditions d'emploi préconisées (voie, doses, durée, ...), sur un nombre minimum fixé d'individus nécessaire pour disposer d'un nombre d'échantillons suffisants. Pour la détermination des résidus dans les viandes, les délais d'abattage après la dernière administration doivent être judicieusement choisis pour permettre une interprétation des résultats. La détermination du TA à partir des résultats des dosages peut être effectuée selon deux méthodes conduisant à des résultats qui peuvent être différents. Selon la méthode pragmatique, la plus ancienne, le TA retenu correspond au temps où aucun des échantillons de denrées de tous les animaux d'essai ne présente une teneur en résidus supérieure aux LMR, temps expérimental souvent augmenté de 10 à 30 % par mesure de précaution. La valeur du TA ainsi déterminée pour les viandes est donc dépendante du choix initial des dates d'abattage du protocole expérimental. Selon la méthode statistique, maintenant préférée et recommandée, le TA retenu est celui calculé avec une limite de confiance de 95 % où moins de 5 % des échantillons de la population seront susceptibles de présenter une teneur en résidus supérieure à la LMR. Cette méthode s'affranchit des aléas du temps d'abattage expérimental mais elle nécessite un nombre plus élevé d'échantillons.

### **3.3. Disparités et harmonisation des TA des médicaments vétérinaires**

C'est au demandeur de l'AMM de proposer un TA pour son médicament en fournissant les résultats des essais sur lequel se base son raisonnement. Cette proposition est ensuite soumise à l'évaluation de l'autorité, communautaire ou nationale selon le cas qui octroie l'AMM et qui peut l'accepter ou la modifier.

Dans le cas d'une AMM centralisée communautaire, valable dans tous les pays membres, le TA est nécessairement identique quelque soit le pays où sera commercialisé le médicament puisqu'il est fixé par une seule instance. Par contre pour les AMM nationales, des TA différents peuvent avoir

été fixés si les autorités des divers pays ont apprécié différemment les mêmes données fournies. Cela était courant jusqu'en 1998 où un laboratoire souhaitant commercialiser un médicament dans plusieurs États membres déposait des demandes d'AMM (même dossier) dans chacun d'eux qui la traitait indépendamment. Avec la mise en application de la procédure de « reconnaissance mutuelle » qui s'est substituée à la précédente depuis 1998, ces différences ne sont plus possibles ; mais toutes les divergences « historiques » n'ont pas encore disparu.

Des médicaments contenant un même principe actif, présentés sous une forme pharmaceutique voisine et prescrits à la même posologie peuvent logiquement avoir des TA différents car ils ne sont pas nécessairement bioéquivalents et les données expérimentales fournies dans le dossier de la demande d'AMM peuvent ne pas être interprétables par la même méthode.

Par contre pour des médicaments génériques, « essentiellement similaires » de la première spécialité mise sur le marché qualifiée de référence, présentant la même composition quantitative et qualitative en principes actifs, même forme pharmaceutique et bioéquivalents, des TA identiques devraient être observés. Ce n'est pas toujours le cas. En effet si un demandeur d'AMM pour un générique présente des rapports d'études complémentaires lui permettant d'argumenter pour un TA plus court, lui seul pourra bénéficier des fruits de son travail et s'en prévaloir, mais pas les autres. Cette disposition suit une logique économique peu discutable garantissant à ceux qui investissent un avantage mérité.

Enfin on notera que le TA de certaines spécialités peut avoir été fixé sur la base de LMR provisoires (Annexe III) qui peuvent avoir été modifiées lors de l'inscription définitive de la substance considérée en Annexe I après l'examen des données complémentaires requises. La conséquence est une nécessaire réévaluation de ce TA en fonction des nouvelles informations produites par le titulaire de l'AMM, le cas échéant prolongé si les LMR ont été diminuées.

### ***3.5. Le respect du TA clef de la sécurité sanitaire des denrées***

Le TA, aboutissement de la démarche d'évaluation du risque des résidus, est par excellence l'outil de gestion de ce risque. Il est donc primordial qu'à tous les stades de la ligne de vie du médicament, chacun concoure à son respect. Le vétérinaire prescripteur d'abord, devra respecter les conditions d'emploi approuvées du médicament, garantes de la validité du TA fixé. Il devra aussi mentionner sur l'ordonnance remise au détenteur des animaux sa valeur et mieux encore indiquer explicitement la date à partir de laquelle les animaux pourront être abattus et/ou leurs productions livrées pour la consommation. En cas d'utilisation d'un médicament « hors AMM », c'est à dire non-conforme aux recommandations d'emploi validées du RCP ou du libellé de l'AMM, ce qui peut être légitime, selon le principe de la « cascade », le vétérinaire doit alors fixer un temps d'attente suffisant pour garantir le non dépassement des LMR dans les denrées. La valeur de ce TA, définie de manière irrationnelle par arrêté ministériel, est par exemple à 28 jours pour les viandes. Le détenteur des animaux, chargé aussi de l'administration du médicament, devra respecter les instructions du prescripteur et conserver l'ordonnance dans son registre d'élevage pendant au moins 5 ans. Cette suite de bonnes pratiques est nécessaire à la qualification sanitaire de la filière et à la création de la confiance des consommateurs.

## **Conclusion**

Aujourd'hui la société a des exigences élevées en matière de sécurité sanitaire des aliments et de traçabilité des produits. Fortement marqué par les différentes crises sanitaires (ESB, poulet et dioxine, fièvre aphteuse), le consommateur a besoin d'être rassuré et d'avoir confiance dans les denrées qu'il achète. Les évolutions de la réglementation évoquées et le respect des temps d'attente n'ont d'autre but que de garantir des denrées saines sans résidu dangereux pour la santé. La filière avicole peut percevoir cette évolution comme une contrainte supplémentaire dans un environnement économique déjà difficile, surtout aux vues des disparités existant entre les différents pays intervenant dans les flux mondiaux de volailles. Dans la chaîne alimentaire, chaque intervenant est un maillon solidaire du précédent et du suivant. Il est donc indispensable que chacun (laboratoire, groupement, vétérinaire, technicien, éleveur) soit convaincu de la nécessité de l'application de la réglementation afin de répondre aux attentes légitimes de la société. Les Bonnes Pratiques doivent permettre à notre filière de se valoriser et à terme de se différencier des concurrents étrangers par une offre alliant originalité et qualité.

# **ANTIBIOTIQUES : LA PRISE EN COMPTE DES PRÉOCCUPATIONS DU PUBLIC**

**Dr Patrice LAFARGUE-HAURET**

LILLY FRANCE - ELANCO

## **Introduction**

Aujourd'hui, les différents médias mettent en avant régulièrement le développement des résistances aux antibiotiques de bactéries responsables de pathologies en médecine humaine. Ils relient généralement ce risque à l'utilisation des antibiotiques en élevage (émission Canal + août 2003, article Nouvel Observateur janvier 2004). Même si les autorités scientifiques reconnaissent que le développement des résistances en médecine humaine est principalement dû à l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine, les filières de productions animales doivent prendre en compte cette crainte et mettre en œuvre les actions permettant de minimiser le risque. Nous vous proposons dans une première partie d'expliquer la nature de ce risque et dans une seconde partie, de voir quelles actions peuvent être mises en place pour le minimiser tout en optimisant la bonne santé des animaux.

## **Préoccupations du consommateur à prendre en compte :**

La découverte des antibiotiques a marqué une nouvelle ère dans la médecine humaine permettant de sauver de très nombreuses vies. En médecine vétérinaire, les antibiotiques ont contribué de façon très importante à l'amélioration de la qualité des produits et au bien-être des animaux.

Ils permettent :

- de traiter et de contrôler les maladies ;
- de stopper la progression des maladies et de prévenir leur expression clinique ;
- de réduire voire éliminer certains germes pathogènes améliorant ainsi la sécurité et la qualité des aliments.

Ainsi l'utilisation des antibiotiques en élevage apparaît indispensable pour assurer la bonne santé des animaux garante d'une viande de bonne qualité sanitaire.

Dès le début de l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine et bien avant le développement des élevages hors sol, des mécanismes de résistances protégeant les bactéries pathogènes de l'atteinte des antibiotiques ont été constatés. On sait maintenant que ces mécanismes sont très anciens. Il a été démontré que des gènes de résistances préexistaient dans la nature, le sol, l'eau, et que leur présence était liée à la production naturelle d'agents antibactériens synthétisés dans l'environnement par de nombreux microorganismes tels que les actinomycètes qui offrent une remarquable diversité et sont les principaux producteurs d'antibiotiques extractifs. Mais ces micro-organismes doivent se protéger contre leurs propres produits comme l'ont montré certaines études. Les chercheurs ont eu la surprise de découvrir chez les espèces analysées à la fois la capacité de produire un antibiotique donné et la présence du mécanisme de résistance correspondant précisément à ce produit<sup>3</sup> :

Tableau 1<sup>4</sup> : Découverte des différents antibiotiques et développement des résistances.  
 (Ronald et al., 1966, Kliebe et al., 1985 ; von Eiffel et al., Davies, 1997 ; O'Brien, 1997 ; Soussy,1998, Wiedemann and Heisig, 1999)

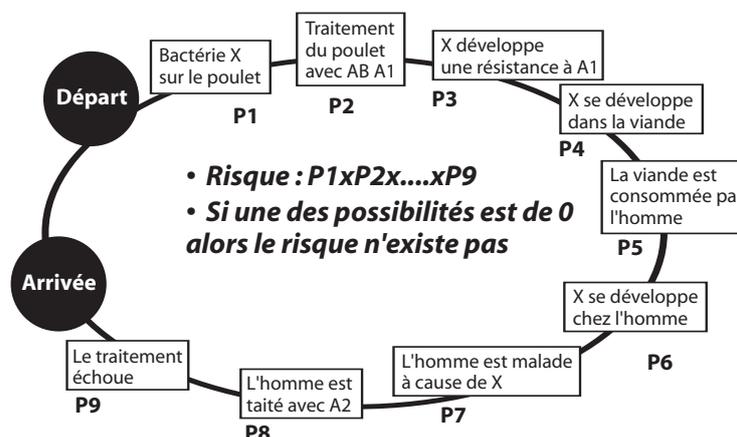
NA = donnée non-disponible

Antibiotique	Découvert en	Usage clinique depuis	Résistance identifiée en
Pénicilline	1940	1943	1940 (Methicillin 1961/5)
Streptomycine	1944	1947	1947,1956
Tétracycline	1948	1952	1956
Erythromycine	1952	1955	1956
Vancomycine	1956	1972	1987
Ac. Nalidixique	1960	1962	1966
Gentamicine	1963	1967	1970
Céphalosporines de troisième génération		NA	1980,1985
Fluoroquinolones	1978	1982	1985

Il est reconnu que toute utilisation d'antibiotique peut conduire à la sélection plus ou moins importante de résistances. Or, lors de l'utilisation d'antibiotiques en élevage, certaines bactéries présentes chez l'animal pouvant être responsables de Toxi-infections Alimentaires Collectives (ou TIAC) pourraient acquérir une résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Néanmoins, les intoxications alimentaires sont aujourd'hui assez peu fréquentes. Sur les années 1999 et 2000, le rapport de l'INVS (Institut National de Veille Sanitaire) signale 260 foyers de TIAC c'est-à-dire concernant au minimum 2 personnes. Elles sont en général attribuables à une consommation de viande ou d'œufs<sup>2</sup>. Ce chiffre est à ramener aux plus de 36 milliards de repas consommés par les Français chaque année. Les 4 germes principalement impliqués dans les TIAC sont les Salmonelles, les Campylobacter, les Clostridium et les Staphylocoques. Sur ces 4 germes, seuls les Salmonelles et Campylobacter revêtent une importance du fait de l'utilisation d'antibiotiques en élevage car les pathologies qu'ils entraînent sur l'homme peuvent, dans les formes les plus graves, nécessiter l'utilisation d'antibiotiques<sup>1</sup>.

Le processus par lequel l'utilisation d'un antibiotique en élevage pourrait entraîner l'échec d'un traitement antibiotique en médecine humaine est le suivant :

### Etude de risque



Ainsi, dans cette longue succession d'événements conduisant de l'utilisation d'un antibiotique en élevage à l'échec d'un traitement d'un Homme lors d'une intoxication alimentaire, il y a 3 grandes étapes<sup>5</sup> :

- Le développement de la bactérie résistante à l'antibiotique utilisé sur l'animal ;
- L'ingestion par l'Homme de la bactérie résistante contenue dans la viande ;
- L'échec chez l'Homme d'un traitement antibiotique de la même famille que celui utilisé chez l'animal.

Même si ce risque est reconnu comme étant très faible, les laboratoires pharmaceutiques doivent mettre en place les recherches permettant de le quantifier. D'autre part, les pratiques en élevage doivent en tenir compte et chercher en permanence à le minimiser sans nuire à la bonne santé des animaux.

La sécurité alimentaire passant d'abord par la production d'animaux sains, les filières de production doivent pour répondre aux interrogations des consommateurs démontrer dans leur conduite de l'élevage qu'elles ont ce souci permanent.

## **Les actions à développer**

### ***1. La quantification du risque par les laboratoires :***

Elanco s'est engagé à quantifier le risque que l'utilisation d'un antibiotique en élevage se traduise par un manque d'efficacité d'un traitement avec la même classe d'antibiotique sur l'Homme. Cette quantification repose sur l'étude des probabilités d'une succession d'événements allant du traitement de l'animal en élevage à l'échec du traitement d'un Homme avec un antibiotique de la même famille.

Cette étude a été réalisée pour la tylosine et la tilmicosine en élevage de porc et volaille. Le risque mesuré est l'échec d'un traitement avec un macrolide d'un Homme atteint d'une pathologie à *Campylobacter* ou à *Enterococcus*. Le résultat de l'étude a montré que ce risque était extrêmement faible.

### ***2. L'application de bonnes pratiques dans la gestion du sanitaire dans les élevages :***

- Le respect des mesures d'hygiène :

Ces actions doivent s'attacher, bien sûr en tout premier lieu, à diminuer au maximum le risque de contamination bactérienne de la viande qui peut, si elle est mal conservée, entraîner une intoxication alimentaire. Le respect de l'ensemble des règles d'hygiène depuis l'élevage jusqu'à la sortie de l'abattoir va dans ce sens.

- Une thérapie de précision :

La pratique d'une thérapie de précision est également un des moyens indispensables au maintien des animaux en bonne santé. La bonne santé des animaux arrivant à l'abattoir minimise fortement le risque de contamination bactérienne des carcasses. A titre d'exemple, une étude récente a démontré que l'absence d'aérosacculite en élevage de poulet diminue la variabilité du poids de carcasse, la fréquence de rupture du tube digestif à l'abattoir et la contamination fécale des carcasses<sup>6</sup>.

Cette thérapie de précision doit s'appuyer sur :

• Une détection rapide des signes cliniques et un diagnostic précis :

La détection rapide des signes cliniques en élevage permettra souvent de poser un diagnostic précis et d'identifier le germe primaire responsable de la pathologie. La mise en place d'un traitement précoce ciblé contribue également à maintenir un bon état sanitaire des animaux et à limiter les surinfections mettant en cause un polymicrobisme plus difficile à combattre.

• Le recours à un antibiotique de spectre étroit chaque fois que cela est possible :

La détection rapide des signes en élevage va souvent permettre de poser un diagnostic précis quant au germe initiateur du problème. Le vétérinaire pourra alors mettre en place une thérapie ciblée s'appuyant dans toute la mesure du possible sur des examens de laboratoire et un antibiogramme. Cette thérapie de précision fera appel lorsque cela est possible à un antibiotique de spectre étroit. L'utilisation d'un antibiotique de spectre étroit est fondamentale pour limiter le développement de résistances<sup>7</sup>. En effet, l'utilisation d'un antibiotique de spectre large exercera une pression de sélection sur un nombre de germes plus important et notamment sur Salmonelles et Campylobacter. En revanche, l'utilisation d'un antibiotique de spectre étroit exercera une pression de sélection contre un nombre de germes plus limité. Ainsi, l'utilisation d'un polypeptide lorsque cela est possible pour traiter un colibacille ne sélectionnera pas de résistance chez le Campylobacter, de même l'utilisation d'un macrolide pour traiter une Entérite nécrotique ou une pathologie respiratoire à *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) ou à Mycoplasme ne sélectionnera pas de résistance chez les Salmonelles.

L'utilisation d'antibiotiques à spectre étroit diminue donc fortement le risque de développement de résistance.

• L'évaluation des résultats cliniques :

Toujours dans l'objectif d'éviter toute surinfection par des germes opportunistes souvent plus difficiles à combattre que le germe primaire, il est important de contrôler les résultats obtenus suite à la mise en place d'une antibiothérapie. Des examens complémentaires pourront être nécessaires si la rémission des signes cliniques ne se fait pas normalement. Pour surveiller l'évolution des signes cliniques certains outils peuvent être très utiles comme l'Elanco box qui permet à la fois une détection rapide des signes d'entérite et également le suivi du rétablissement suite à la mise en place de mesures correctives. De même la réalisation d'écouvillons lors des premières toux permet de détecter le germe initiateur de la pathologie respiratoire et de pratiquer une thérapie de précision avant que des surinfections colibacillaires se produisent nécessitant l'utilisation d'antibiotiques à spectre large et entraînant souvent des mortalités importantes.

## Conclusion

Pour répondre aux préoccupations du consommateur concernant le développement des antibiorésistances en médecine humaine, les filières doivent respecter les bonnes pratiques de gestion de l'hygiène dans les élevages et de la santé des animaux. La bonne santé des animaux est le préalable nécessaire à la production d'une viande de bonne qualité sanitaire. L'élevage d'animaux en bonne santé doit s'appuyer sur la vigilance quotidienne de l'éleveur notamment dans la détection des signes cliniques. La réalisation d'examens complémentaires, demandés par le

vétérinaire suivant l'élevage, s'avèrera toujours utile pour poser un diagnostic précis. Lorsque le vétérinaire jugera que le recours à l'antibiothérapie est nécessaire, l'utilisation d'un antibiotique à spectre étroit permettra d'optimiser les résultats en élevage et de minimiser le développement des résistances aux antibiotiques. L'utilisation raisonnée des antibiotiques est un outil permettant d'accroître la sécurité alimentaire dans le respect de la santé public.

## **Bibliographie :**

1. *American Medical Association, Diagnosis and management of food borne illness, 2001*
2. *INVS (Institut National de Veille Sanitaire) : Toxi Infections Alimentaires Collectives en France en 1999 et 2000, 2000*
3. *E Bergogne-Bérézin, Les résistances bactériennes.*
4. *EMEA, Antibiotic Resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines, 1999*
5. *H.S. Hurd : Risk Assessment of Macrolide Use*
6. *Russel SM, the effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of Campylobacter spp and Escherichia coli, Poultry Science 2003; 82, 1326-1331*
7. *World Health Organization : Global Principles for the Containment of Ant microbial Resistance on Animal Intended for Food.*

# **LA MAÎTRISE DES ANTIBIOTIQUES : LES OUTILS AU SERVICE DU VÉTÉRINAIRE**

**Dr Philippe LE COZ**

SELVET - CONSEIL LOUDEAC

## **Introduction**

L'augmentation des maladies nosocomiales, la multiplication des antibiorésistances de certaines bactéries affectant l'homme et les soucis d'économie de l'Assurance Maladie, sont à l'origine d'un "courant" sécuritaire, qui bien sûr, touche les médecins : "Les antibiotiques, c'est pas automatique !", mais également par contrecoup, les vétérinaires et l'ensemble des productions animales.

A l'évidence, il est nécessaire de faire le tri entre les preuves scientifiques et les peurs non-contrôlables de notre époque. Mais une chose est sûre : il s'agit d'un phénomène de société qui ne sera pas passager. Les vétérinaires et toute la filière avicole doivent s'engager dans une action volontaire pour une plus grande maîtrise de l'utilisation des antibiotiques.

## **Qui sont les acteurs concernés ?**

Tout d'abord l'Etat, au travers de ses différentes administrations qui évoluent dans un contexte européen influencé principalement par les pays d'Europe du Nord. Un objectif fort est affiché : lutter contre les antibiorésistances qui touchent des bactéries susceptibles d'atteindre l'homme et limiter le risque de présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale (viande, lait, œufs, etc.).

Pour atteindre cet objectif, l'Etat a engagé plusieurs actions :

- Mesurer quantitativement la consommation d'antibiotiques dans les différentes productions ;
- Mesurer qualitativement l'évolution des antibiorésistances au travers d'un plan de surveillance sur des germes de référence (1) ;
- Supprimer les régulateurs de flore "antibiotiques" ;
- Réexaminer pour chaque molécule, la définition d'une LMR (*limite maximale de résidus*) au travers d'un dossier défendu par les laboratoires pharmaceutiques avec, par voie de conséquence, l'interdiction des molécules ne répondant pas à ce critère ;
- Renforcer les contrôles des conditions de prescription et de délivrance des antibiotiques par les vétérinaires ;
- Renforcer les contrôles des conditions d'administration des traitements antibiotiques par les éleveurs au travers du registre d'élevage ;
- Renforcer les contrôles de résidus antibiotiques sur les denrées d'origine animale.

Au niveau des organisations de production, la volonté est là et elle s'affiche au travers de différentes chartes de qualité et les responsables ont bien compris l'importance de ce message auprès du consommateur. Pour notre filière, une crise médiatique serait catastrophique et malheureusement, les antibiotiques font partie des sujets préférés des journalistes parisiens.

Les éleveurs considèrent, dans une très grande majorité, le recours aux antibiotiques comme un constat d'échec, échec tout particulièrement des mesures préventives mises en place (vaccins, vermifuges, vitamines, etc. ). Un état des lieux des pratiques vétérinaires en élevage de dindes de chair paru en 2002 (2) montre que les éleveurs sont soucieux de réduire la consommation de "produits vétérinaires" pour des raisons économiques mais aussi qu'ils sont sensibles à l'image négative véhiculée par les antibiotiques.

Mais attention, pour vivre de l'élevage, il faut des animaux en bonne santé. Si les éleveurs comprennent la nécessité de limiter l'utilisation des antibiotiques, ils attendent d'autres solutions de remplacement.

Enfin, les vétérinaires, maillon essentiel mais souvent tiraillé entre les besoins parfois contradictoires de "l'Administration", des organisations de production et des éleveurs.

Il est nécessaire de réaffirmer deux principes qui peuvent peut-être passer pour des évidences :

- On ne peut pas se passer des antibiotiques dans le monde animal, ils constituent une arme indispensable pour lutter contre les maladies ;
- Le vétérinaire a le devoir de soigner les animaux malades bien sûr en respectant la santé des consommateurs mais aussi, et il ne faut pas l'oublier, dans l'intérêt économique de son client.

Le vétérinaire doit donc jouer un rôle essentiel dans cette "volonté générale" de maîtrise de l'utilisation des antibiotiques mais en ne perdant jamais de vue qu'il soigne des groupes de plusieurs milliers d'animaux et que nous sommes donc très loin de l'approche individuelle du médecin ou du vétérinaire d'animaux de compagnie.

Il faut prendre en compte deux éléments essentiels : L'URGENCE et le risque de CONTAGION.

- L'URGENCE : dans la plupart des cas, l'éleveur est alerté par une augmentation de la mortalité car sur les volailles, les signes précurseurs d'une maladie sont souvent frustes ;
- Le risque de CONTAGION : si le matin on compte 20 morts, le soir c'est parfois 50 à 100 nouveaux cadavres.

Par conséquent, la prise de décision doit être très rapide (quelques heures) et le temps pour le diagnostic est très court. Soumis à cette "pression", il faut être capable de ne pas succomber au fameux "principe de précaution" qui commanderait de traiter immédiatement sans avoir l'approche diagnostic nécessaire.

## **Quels sont les moyens à mettre en œuvre par les vétérinaires ?**

De notre point de vue, trois axes sont à développer pour répondre à l'objectif :

- L'amélioration de la précision du diagnostic avec, en tout premier lieu, le recours au laboratoire d'analyse ;
- La formation de l'éleveur par le binôme vétérinaire-technicien ;
- Le développement de traitements alternatifs, soit symptomatiques pour attendre le diagnostic final, soit préventifs lors de certaines phases difficiles (démarrage, etc. ).

## 1. Le recours au laboratoire d'analyses..

Chez l'homme, l'accent est mis sur le diagnostic des angines virales par la mise en place par les médecins, de tests rapides et par une meilleure communication auprès de leurs patients. Que faire en aviculture ?

Il n'y a pas comme chez l'homme, une pathologie virale de ce type sur laquelle porter ses efforts. Il faut donc agir à plusieurs niveaux. Le "challenge" est de mieux diagnostiquer les maladies qui ne sont pas dues à des bactéries, c'est-à-dire les passages viraux, les affections parasitaires, les désordres nutritionnels et métaboliques ou bien encore les problèmes liés à une cause technique (température, abreuvement, etc. ). Cela peut paraître évident mais à la seule observation des animaux, il est très difficile de faire le diagnostic et c'est très souvent l'AUTOPSIE qui permettra d'émettre une hypothèse et d'éliminer certaines causes non-infectieuses.

Si le vétérinaire et le technicien sont déjà très sensibilisés à l'intérêt de l'AUTOPSIE, l'éleveur peut tout à fait au quotidien et après formation, se servir de l'observation de certains organes pour déclencher l'appel du technicien ou du vétérinaire.

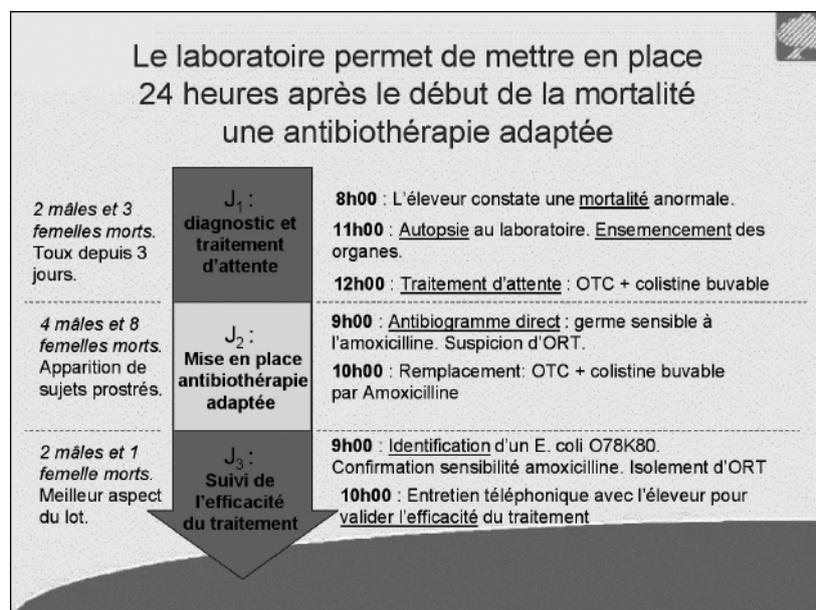
Dans le même état des lieux des pratiques vétérinaires en dinde de chair cité précédemment (2) lors d'un problème sur un lot, l'autopsie est pratiquée dans 90 % des cas : 50 % des cas par le technicien suite à l'appel de l'éleveur, 27 % des cas directement au laboratoire d'analyses et 13 % des cas par l'éleveur lui-même.

Mais attention, si l'autopsie peut permettre d'éviter en première intention certains traitements antibiotiques, elle n'est pas suffisante pour choisir le traitement le plus adapté dans un souci de mieux gérer notre arsenal thérapeutique, en particulier en "économisant" les molécules de dernière génération.

Le recours au laboratoire d'analyses est donc primordial pour établir le traitement.

Aujourd'hui, dans la plupart des régions françaises, on trouve des laboratoires spécialisés en aviculture qui peuvent répondre très rapidement et de ce point de vue, nous sommes très en avance par rapport à nos voisins.

Un exemple concret de l'utilisation du laboratoire d'analyses lors d'une pathologie aiguë en élevage de dinde de chair.



Mais il ne suffit pas de lire un résultat de laboratoire, encore faut-il être capable de l'interpréter à la lumière de connaissances et d'une réelle expérience en élevage avicole. Les oiseaux sont bien différents des autres animaux ; les maladies et la zootechnie sont bien spécifiques et on ne peut être réellement efficaces qu'en étant spécialisés.

**Cela veut dire quoi être spécialiste avicole aujourd'hui ?**

- Soit on a suivi un cursus officiel de spécialisation mais ce cursus n'en est qu'à son tout début ;
- Soit on a intégré une organisation de production pour apprendre le plus souvent au contact du terrain ;
- Soit on a constitué un groupe spécialisé en y consacrant beaucoup de temps pour étudier et se former en France et à l'Etranger mais aussi beaucoup d'argent pour s'équiper d'un outil performant de diagnostic (autopsie, analyse, laboratoire).

Aujourd'hui, même si ce n'est pas officiel, il y a de la part des professionnels, une reconnaissance des compétences d'un certain nombre de vétérinaires qui peuvent se proclamer spécialistes avicoles.

## **2. Le deuxième axe à développer est celui de la formation des éleveurs.**

On ne peut pas être uniquement un "pompier" en considérant que chaque nouveau lot est un redémarrage à zéro. La répétition des problèmes malgré un plan de prévention complet doit alerter le vétérinaire.

Plus précisément, il s'agit de mettre en place un BILAN SANITAIRE D'ELEVAGE appelé parfois AUDIT D'ELEVAGE. Il ne s'agit pas d'une simple visite d'élevage mais d'un réel bilan à trois : Eleveur – Vétérinaire – Technicien.

**Quels sont les objectifs de ce BILAN ?**

- Faire le point des équipements et de la conduite de l'élevage ;
- Analyser les problèmes passés et l'efficacité des mesures mises en place ;
- Définir la procédure en cas de nouveaux problèmes : les critères d'alerte du technicien et du vétérinaire ;
- Actualiser le plan de prévention pour l'élevage.

**A cette occasion, plusieurs messages sont à faire passer :**

- Limiter au maximum l'utilisation de l'antibiotique "préventivement" même si les risques sont élevés à certaines phases critiques : exemple du démarrage ;
- Expliquer les solutions alternatives. Tout d'abord au niveau de la conduite de l'élevage mais aussi l'utilisation de nouveaux produits (acidifiants, complexes de plantes, etc. ...) ;
- Former l'éleveur à l'autopsie pour découvrir des signes précurseurs avant la "flambée" de la mortalité ;
- Sensibiliser aux bonnes pratiques d'administration du traitement : stockage des antibiotiques, utilisation du matériel de distribution (pompe, etc.), vérification des posologies et calcul des concentrations, respect des durées de traitement et du délai d'attente.

### **3. Enfin, le troisième axe important, le développement de traitements alternatifs aux antibiotiques.**

Aujourd'hui, l'arsenal thérapeutique en volaille est trop limité, en particulier au niveau des traitements symptomatiques : antiseptiques, anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, anti-spasmodiques, analeptiques respiratoires, diurétiques, etc. Les dossiers de médicaments (AMM) coûtent trop cher pour des espèces souvent "mineures" sur le plan mondial.

Il faut donc trouver d'autres solutions au travers de suppléments nutritionnels spécifiques, de complexes de plantes, d'acidifiants, etc. pour accompagner les phases critiques et gérer l'urgence en attendant les résultats de l'antibiogramme.

Au quotidien, cette approche alternative porte ses fruits et peut limiter le recours aux antibiotiques.

Le vétérinaire est le "passage obligé" de la prescription. Il doit assurer la traçabilité de cette prescription et ceci au travers de deux outils très importants :

**1. L'ordonnance** véritable "traceur" de la prescription qui doit bien sûr répondre aux exigences réglementaires mais qui devra être de plus en plus précise concernant l'identification du lot d'animaux traités. Les éleveurs, dans leur quasi-totalité, conservent bien les ordonnances et suivent les indications.

**2. Le dossier éleveur** constitué par le vétérinaire et qui sera la preuve de son implication.

Celui-ci doit contenir :

- Le BILAN (ou AUDIT) SANITAIRE DE L'ELEVAGE ;
- Les résultats et les interprétations des différentes autopsies et analyses de diagnostic ;
- Les ordonnances ;
- Les différents comptes-rendus de visite et de consultation impliquant le vétérinaire, le technicien et l'éleveur.

## **Conclusion**

Le message adressé aux vétérinaires est clair. Nous devons nous impliquer dans cette démarche générale de maîtrise des antibiotiques et nous serons jugés sur les résultats. Pour notre groupe, nous porterons nos efforts comme je l'ai indiqué, dans trois directions :

**DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE – FORMATION – SOLUTIONS ALTERNATIVES.**

Mais il faut que nos administrations de tutelle regardent bien tout le chemin déjà parcouru par les différents acteurs de la filière volaille et que les efforts demandés soient cohérents. On ne peut pas mener de front l'arrêt des farines animales, l'arrêt des régulateurs de flore dont certains comme le NIFURSOL nous font cruellement défaut, la réduction de normes maximales admissibles en cuivre dans l'aliment et une diminution des traitements antibiotiques.

1. *Rapport intermédiaire : utilisation des antibiotiques chez l'animal et résistance aux antibiotiques chez les espèces d'origine animale. Programme français 1999 – 2000. AFSSA. 50 pages.*
2. *Etat des lieux des pratiques vétérinaires en élevage de dindes de chair. B. OLIVIER, I. BOU-VAREL et A. BERTHELOT- Sciences et Techniques Avicoles Juillet 2002 – N°40.*

# ***SENSIBILITÉ DES GERMES BACTÉRIENS D'ORIGINE AVIAIRE AUX ANTIBIOTIQUES DE 2000 À 2002 : DONNÉES TERRAIN.***

**Dr Jean DELAPORTE et Gilbert INIZAN**

BAYER PHARMA SANTÉ ANIMALE

L'enjeu majeur de l'efficacité des antibiotiques en élevage a entraîné les instances internationales (OMS, OIE, Codex Alimentarius) à émettre des recommandations d'utilisation, à réglementer la surveillance :

- Pour analyser le risque pour l'homme et l'animal ;
- Pour étudier l'émergence d'une résistance ;
- Pour fournir une base à une politique d'usage ;
- Pour suivre les effets de l'application d'une politique ;
- Pour identifier les besoins de nouvelles interventions ;
- Pour fournir des informations pour les prescripteurs et recommander un usage prudent.

Cela se traduit par :

- La surveillance des pathogènes vétérinaires : RESAPATH ;
- La surveillance des bactéries d'origine animale : Plan de surveillance à l'abattoir ;
- La surveillance des Salmonelles : AFSSA LERQAP.

Dès le lancement de l'Enrofloxacin sur le marché français (1992), nous avons mis en place un suivi des résultats d'antibiogrammes.

Nous avons, tout d'abord, collecté les résultats d'antibiogrammes de quelques laboratoires d'analyses importants en aviculture. Puis nous avons élargi le cercle des laboratoires, en même temps nous nous sommes intéressés aux autres espèces animales : porcs, veaux de boucherie, bovins d'une manière générale et maintenant Animaux de Compagnie.

En 2002, nous avons collecté les résultats de 17 299 antibiogrammes dans 23 laboratoires, dont 9 440 effectués sur des germes d'origine aviaire.

Notre premier objectif était de suivre l'évolution de la sensibilité des bactéries d'origine aviaire à notre molécule l'Enrofloxacin, mais aussi de comparer cette évolution avec celle des autres antibiotiques. Et ceci pour les germes bactériens pathogènes les plus importants dans les principales espèces de volailles.

C'est aussi un outil d'évaluation de la prévalence des pathologies.

Sont collectés et traités tous les antibiogrammes renseignés selon la méthodologie et validés après vérification de la cohérence des résultats.

Même si un antibiogramme est devenu un examen « banalisé », il demeure une technique standardisée mise en œuvre par différents comités nationaux : en France, le Comité de

l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Sa qualité repose sur l'application correcte de la technique standardisée.

L'observation des résultats des antibiogrammes de 2000 – 2002 ne montre pas de différences notoires ou appréciables d'une année à l'autre.

Malgré tout, il y a une évolution constante des résistances. La répartition des diamètres permet l'étude d'une population (la distribution de la sensibilité) :

- Population unimodale ;
- Population bimodale (population résistante, population sensible) ;
- Population multimodale.

Les résistances sont plus marquées pour les antibiotiques qui sont soit plus fréquemment utilisés, soit plus anciens et quelquefois les plus utilisés et les plus anciens. Malgré tout, ces antibiotiques conservent une place importante dans les prescriptions, notamment en traitement de première intention.

Cet outil permet de suivre l'évolution des sensibilités des différents germes aux différents antibiotiques :

- Dans le temps ;
- Au niveau national ;
- Au niveau régional.
- Au niveau local (clientèle du laboratoire).

Il permet aussi de détecter des anomalies de résultats consécutives au non-respect de la technique standardisée de l'antibiogramme.

La gamme des antibiotiques utilisables en médecine vétérinaire n'est pas promise à un élargissement, aussi la préservation de l'efficacité des antibiotiques par un usage raisonné et raisonnable doit être notre priorité à tous (éleveurs, vétérinaires et laboratoires).

# **INTÉRÊT DE L'ASSOCIATION DE 2 ANTIBIOTIQUES POUR OPTIMISER L'EFFICACITÉ ET LIMITER LA RÉSISTANCE**

**Jérôme GUYONNET**

CEVA SANTÉ ANIMALE

## **Introduction**

Le risque lié à l'antibiorésistance n'est plus un phénomène de mode mais bien une réalité. Que faire en face de ces excès de réglementation ?

La réponse semble simple mais difficile à mettre en œuvre. Les industriels qui conçoivent des médicaments vétérinaires à base d'antibiotiques doivent donner une image forte de la profession en expliquant leurs méthodes de gestion de la crise. Ils doivent se poser les questions suivantes :

- Quels sont les risques en fonction de nos clients (éleveur et consommateur) ?
  - Risque pour la santé animale ;
  - Risque pour la santé humaine.
  
- Comment minimiser l'apparition de souches résistantes ?
  - Recommander une mono-thérapie avec une posologie plus élevée !
  - Recommander une bi-thérapie en proposant des associations qui ont du sens !

Une présentation rapide de l'évolution récente de la réglementation est décrite ci-dessous ainsi qu'une description des outils permettant de définir des associations qui ont du sens. Enfin, quelques applications d'associations synergiques sont présentées ainsi que leur impact sur la minimisation de la résistance.

## **La réglementation**

Le point de vue de l'Europe documenté par les nouvelles normes européennes (VICH Topic GL27) et américaine (Guidance#152) montrent l'importance du problème et la réglementation très ferme vis-à-vis de l'antibiorésistance. Seule l'approche américaine qui est certainement la plus ferme pour l'instant est résumée ci-dessous :

La FDA a publié une nouvelle recommandation qui décrit pour la première fois une approche compréhensive pour prévenir la résistance antimicrobienne qui peut résulter de l'utilisation de médicaments antimicrobiens chez les animaux.

La recommandation fournit un processus scientifique pour évaluer la probabilité qu'un médicament antimicrobien utilisé pour traiter un animal puisse causer un problème de résistance aux antibiotiques chez l'homme consommant de la viande ou d'autres sous-produits animaux. Ce processus peut aider à empêcher des antibiotiques présentant un risque antibiorésistant important d'être incorrectement employé chez les animaux de rente, et de ce fait potentiellement conduire à la résistance antimicrobienne chez l'homme.

La nouvelle recommandation encourage les fabricants de médicaments vétérinaires à employer un

processus d'évaluation des risques pour démontrer qu'un antibiotique utilisé pour traiter les animaux de rente ne produira pas un risque antibiorésistant conduisant à des problèmes de santé humaine. La résistance aux médicaments antimicrobiens utilisés pour traiter des maladies humaines est une menace sérieuse de santé publique, et la FDA a l'intention d'employer les meilleures méthodes scientifiques pour l'empêcher. En particulier, rationaliser l'utilisation des médicaments antimicrobiens en médecine vétérinaire.

La voie suggérée dans la recommandation [Guidance 152] est d'établir un système en trois phases afin de déterminer le risque potentiel chez l'homme quand ce médicament est utilisé pour traiter les animaux de rente. Les trois phases du processus sont décrites ci-dessous :

- 1 – « **Release assessment** » de la propagation » qui détermine la probabilité que des bactéries résistantes seront présentes chez les animaux en raison de l'utilisation de la nouvelle drogue antimicrobienne ;
- 2 – « **Exposure assessment** » qui mesure la probabilité que les humains ingéreraient les bactéries résistantes ;
- 3 – « **Consequence assessment** » qui évalue les chances que l'exposition de l'homme à des bactéries résistantes aurait comme résultats des conséquences défavorables de santé humaine. Dans ce contexte, ce sont des situations par exemple dans lesquelles un médecin aurait des difficultés à traiter un malade avec une substance antimicrobienne parce que les bactéries infectant la personne auraient acquis la résistance au médicament. Cette résistance proviendrait de l'utilisation du médicament chez les animaux.

Dans ce système, tous ces processus d'évaluation intègrent le niveau global du risque pour la santé humaine de transmission de bactéries résistantes liées à l'utilisation d'un médicament antimicrobien chez les animaux.

Si les évaluations prouvent que les risques sont significatifs, la FDA pourrait refuser la demande d'autorisation de vente, de ce fait empêcher l'utilisation du médicament chez des animaux de rente ou bien la FDA pourrait approuver le médicament, mais mettre en place des conditions spécifiques d'utilisation pour s'assurer qu'il ne posera pas un risque pour la santé humaine.

Un processus similaire est-il en train de se mettre en place en Europe ? Afin de maîtriser ce risque réglementaire, il est nécessaire de montrer que le « monde vétérinaire » a bien assimilé les différents types de risques liés à ses clients.

## **Quels sont les risques liés à nos clients ?**

### **• *Le risque pour la santé animale***

Il est d'usage de penser que le client final est l'éleveur. Quoi de plus logique que de concevoir un médicament adapté pour guérir une pathologie ! Comme il existe une relation logique entre pathologie – pathogène et antibiotique, le praticien choisit l'antibiotique le plus adapté afin de garantir un succès clinique mais aussi d'assurer un traitement bactériologique total. Seulement, si l'éradication bactérienne ne se produit pas totalement, les bactéries les moins sensibles sont susceptibles de participer à un processus de recolonisation et une population plus résistante du pathogène devient prédominante après l'arrêt de la thérapie. Il s'agit de la sélection d'une bactérie résistante à la suite d'un traitement antibiotique chez l'animal conduisant à un défaut d'efficacité chez l'animal cible. Ce risque touche directement l'éleveur et le vétérinaire praticien.

### • **Le risque pour la santé humaine**

Des organismes zoonotiques tels que *Salmonella* et *Campylobacter* peuvent causer des maladies chez l'homme. Le transfert d'organismes zoonotiques sensibles comme résistants de l'animal à l'homme devient un problème de santé publique. Il s'agit donc d'un risque de la sélection d'une bactérie pathogène résistante ou non qui transmise à l'homme va conduire à l'apparition d'une pathologie ou à un échec thérapeutique lors d'un traitement antibiotique.

Des organismes entériques comme *E.coli* (capable de causer chez les humains des maladies aussi diverses que des infections de l'appareil urinaire et des méningites néonatales) présentent aussi des risques de santé publique. Par conséquent, il est raisonnable de penser que le transfert d'organismes commensaux résistants ou de leur matériel génétique par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire est aussi un problème de santé publique. Il s'agit donc d'un risque de la sélection d'une bactérie résistante ou de son matériel génétique à la suite d'un traitement antibiotique chez l'animal qui transmise à l'homme va conduire à un échec thérapeutique lors d'un traitement antibiotique. Ce risque touche directement le consommateur qui devient un client potentiel.

## **Comment minimiser les résistances ?**

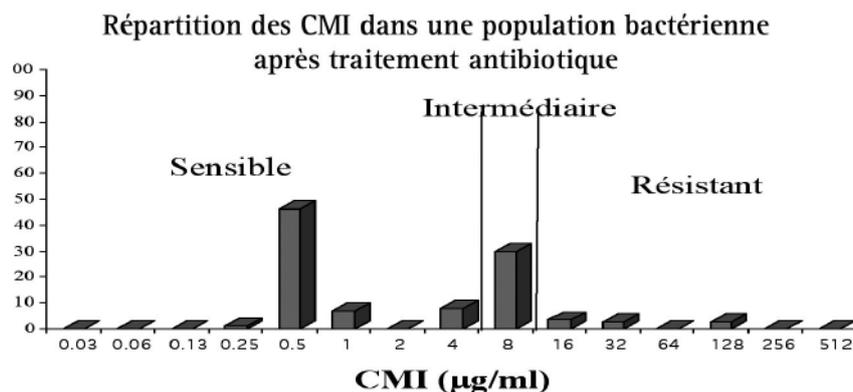
Au plan pratique, le risque lié à l'antibiorésistance doit être pris en compte dans le développement des nouveaux médicaments antibiotiques mais aussi en réactualisant les plus anciens. Le processus suivant peut être proposé :

- Recommander une mono-thérapie avec une posologie plus élevée !
- Recommander une bi-thérapie en proposant des associations qui ont du sens !

### • **La mono-thérapie**

L'établissement de schémas posologiques inadéquats ont contribué à « fabriquer » de la résistance aux antibiotiques parmi d'autres phénomènes. Une thérapie antibiotique raisonnable exige une optimisation des schémas posologiques, non seulement pour garantir l'efficacité clinique, mais aussi pour réduire au minimum la sélection et la diffusion des microbes pathogènes résistants. En effet, dans beaucoup d'infections, le but final d'une thérapie à base d'antibiotique n'est pas simplement de garantir un succès clinique mais aussi d'assurer un traitement bactériologique total. Seulement, si l'éradication bactérienne ne se produit pas, les bactéries les moins sensibles sont susceptibles de participer à un processus de recolonisation et une population plus résistante du pathogène devient prédominante après l'arrêt de la thérapie.

Les mécanismes de résistance peuvent surgir comme étant le résultat d'une unique mutation. En effet, la population bactérienne n'est pas homogène et se comporte comme un mélange de populations distinctes ayant chacune leur propre susceptibilité à un antibiotique. De plus, la fréquence de mutation y est relativement haute. Dans cette situation complexe, l'exposition à l'antibiotique n'induit pas mais sélectionne de la résistance. L'émergence de la résistance est seulement la croissance prévisible d'une sous-population bactérienne préexistante en faible quantité mais avec une tolérance plus haute à l'antibiotique en début de traitement. Cette sous-population résistante devient majoritaire à l'arrêt du traitement.



Le recours à des doses plus élevées concourent à accroître le succès clinique et bactériologique. Cependant, l'utilisation de doses plus élevées est difficile à prescrire en raison des effets secondaires toxiques pour l'animal et aux délais d'attente non-établis à ces posologies. Le recours à la bithérapie en associant 2 antibiotiques entre eux peut permettre d'éradiquer l'ensemble des sous-populations bactériennes.

### • **Les associations d'antibiotiques (la bithérapie)**

De nombreux ouvrages sont disponibles et les quelques informations citées ci-dessous sont loin d'être exhaustives. Il existe plusieurs objectifs de la pratique d'une association comme élargir le spectre, obtenir une synergie, diminuer la toxicité et l'émergence de mutants résistants. Seul l'impact des associations sur la diminution de la résistance est présenté ci-dessous.

#### • **Diminuer l'émergence de souches résistantes**

C'est un objectif de santé publique. Au sein de la population bactérienne visée par le traitement, la proportion de mutants résistants varie selon l'espèce et selon l'antibiotique. La proportion de mutants résistants à la fois à deux antibiotiques est beaucoup plus faible puisque égale au produit des proportions de mutants résistants à chacun des deux antibiotiques. Le nombre absolu de mutants résistants est ainsi toujours en relation directe avec la proportion de mutants et la taille de la population bactérienne (inoculum) et du mode de résistance chromosomique ou plasmidique. La sélection de mutants résistants est conditionnée par les paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Elle n'est possible que si la concentration de l'antibiotique au sein du site infectieux est supérieure à la CMI de l'antibiotique vis-à-vis de la population sensible et inférieure à la CMI de l'antibiotique vis-à-vis de la sous-population résistante.

En pratique, le risque d'émergence est particulièrement élevé pour les bactéries du tractus digestif en cause lors d'infections digestives vis-à-vis des antibiotiques habituellement utilisés.

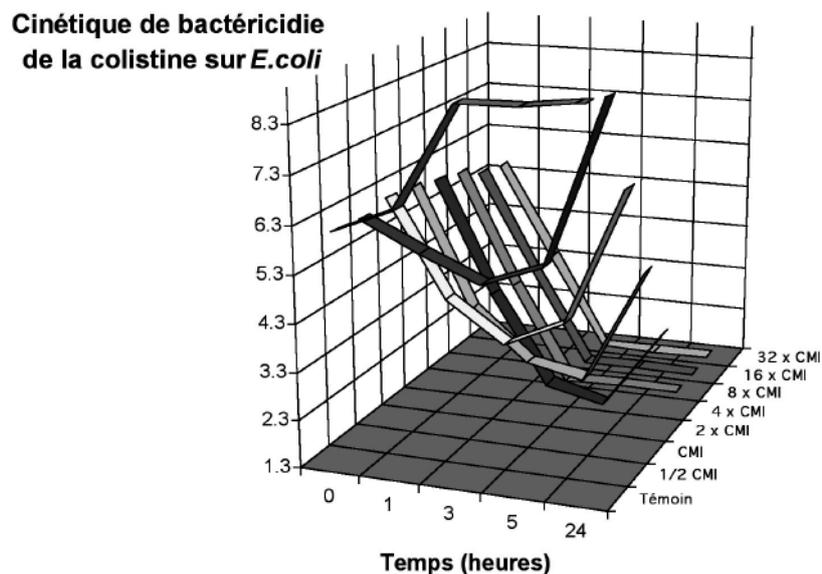
Ces situations conduisent à recommander une association de deux antibiotiques, non-affectés par un même mécanisme de résistance, et pénétrant tous deux correctement sur le site de l'infection, afin d'obtenir une bithérapie effective.

Il est nécessaire de rappeler qu'il faut utiliser des posologies suffisantes et un rythme d'administration prenant en compte les propriétés pharmacodynamiques de chacun des partenaires de l'association de manière à assurer par exemple :

- a) une concentration élevée au pic pour les aminosides ;
- b) une concentration résiduelle élevée pour les  $\beta$ -lactamines ;
- c) une aire sous la courbe optimale pour les fluoroquinolones.

## Les Outils

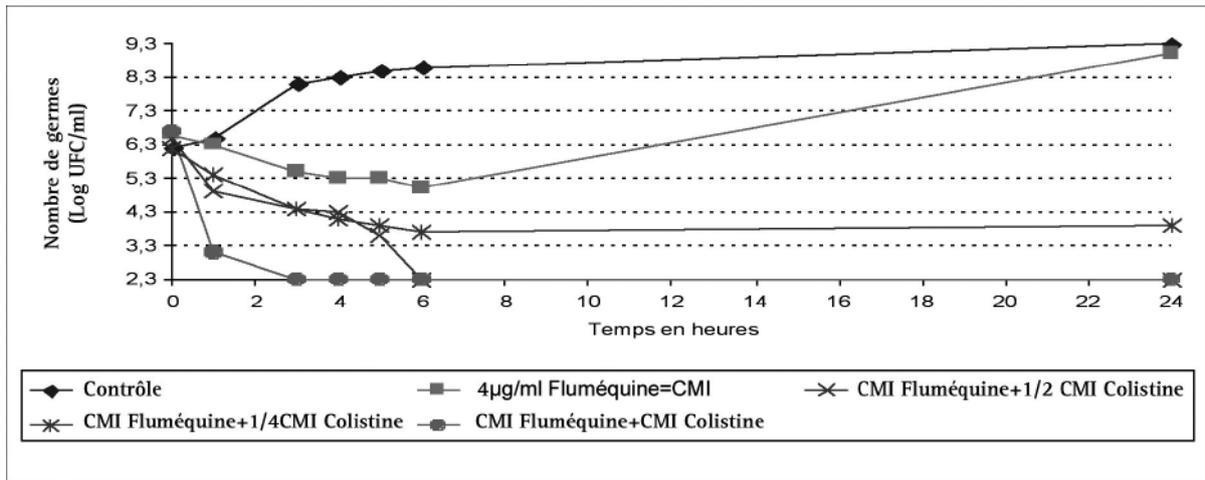
Plusieurs techniques in-vitro permettent de tester le bénéfice obtenu en associant 2 antibiotiques. La plupart sont des méthodes statiques, c'est-à-dire permettant d'observer un effet qu'après un temps de contact en général d'une nuit. Ces méthodes ne permettent pas d'apprécier l'évolution de l'effet en fonction du temps et ainsi d'observer les 2 phases du processus (phase précoce et phase tardive). En effet la phase précoce (environ les 6 premières heures de contact) permet de mesurer l'activité pharmacodynamique de l'antibiotique, tandis que la phase tardive permet d'apprécier les re-croissances qui sont directement liées à la sélection de mutants résistants. Un exemple théorique est présenté ci-dessous :



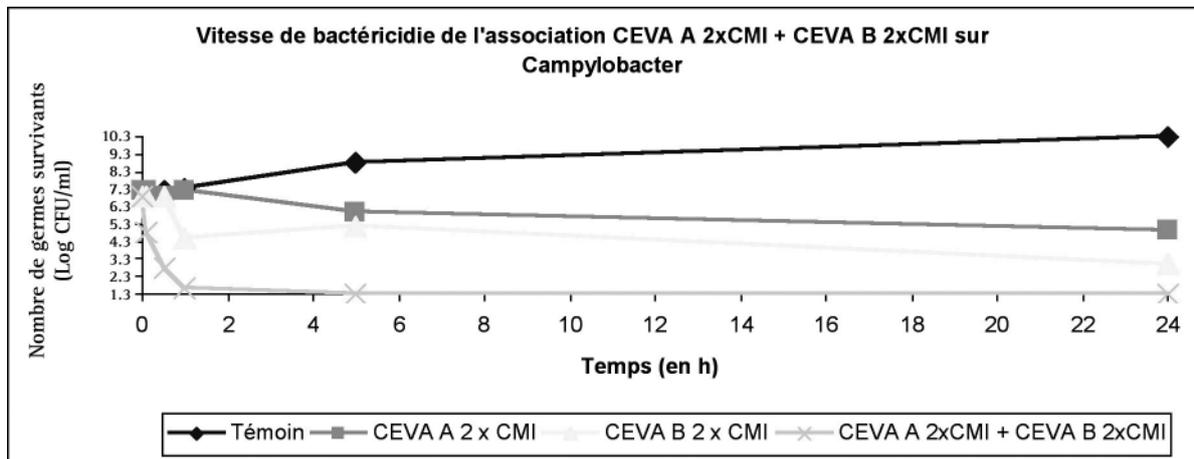
Cet exemple montre que l'antibiotique présente une activité bactéricide qui croît en fonction de l'augmentation des concentrations pendant la phase précoce. Cependant, la souche bactérienne devient tolérante à l'antibiotique pendant la phase tardive pour des concentrations ne dépassant pas 4 fois la CMI. Seule l'augmentation des concentrations au-delà de 8 fois la CMI permet d'éradiquer toute la population bactérienne. Cette re-croissance est le signe d'une acquisition potentielle de résistance. L'acquisition définitive de la résistance devra être démontrée en repiquant l'inoculum sur gélose. Cet essai sera de nouveau à réaliser pour toutes les sous-populations bactériennes.

### **- Exemple de synergie de l'effet pendant la phase précoce**

L'exemple suivant montre l'effet bactéricide de la fluméquine associée à la colistine sur *E.coli*. La vitesse de bactéricidie de l'association augmente pendant la phase précoce. On constate que la synergie de l'effet pendant la phase précoce est très significative et qu'aucune re-croissance secondaire (signe de sélection de mutants résistants) est observée pendant la phase tardive.

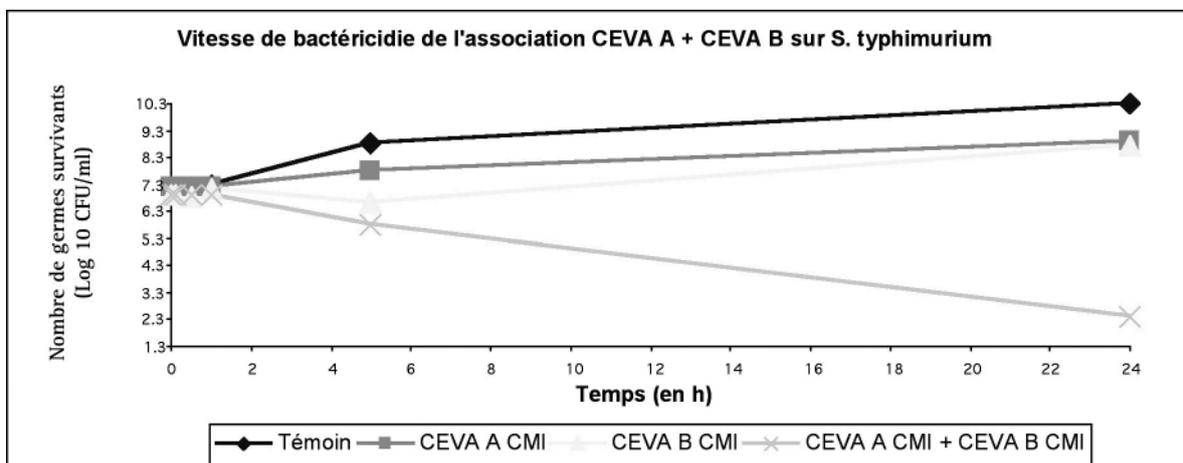


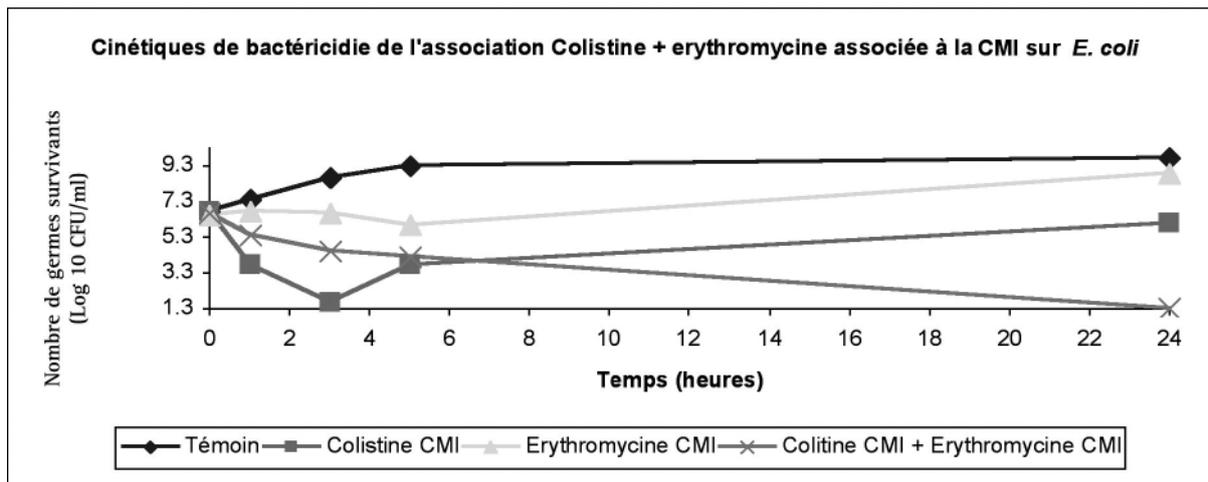
Un effet similaire est observé à partir de l'exemple ci-dessous ou un effet synergique est observé pendant la phase précoce sur *Campylobacter* (un germe zoonotique ayant un fort impact de santé publique).



### - Exemple de synergie pour limiter l'émergence de la résistance

Un effet synergique est observé seulement pendant la phase tardive pour les exemples d'associations suivantes. Une absence de re-croissance montre une éradication des bactéries après 24 h de contact.





## L'association est-elle utile ?

Elles sont le plus souvent justifiées en début de traitement dès lors que le diagnostic bactériologique est obtenu et que le traitement peut être ciblé. Les preuves cliniques du bien-fondé de l'emploi d'une association pour obtenir un effet synergique sont rares. On peut supposer qu'après deux à trois jours, maximum cinq jours de traitement, l'état de l'animal s'étant amélioré, l'inoculum bactérien étant réduit, il est raisonnable de supprimer un des partenaires de l'association. Une très large expérience conforte cette attitude qui peut être appliquée à de nombreuses situations cliniques. En tout état de cause, le praticien recommandera une association d'antibiotiques pour des bactéries à fort risque de sélection de mutants résistants sous traitement (comme *E. coli*, *Campylobacters*) ou que l'antibiotique choisi possède une CMI trop haute au site de l'infection pour qu'un traitement en mono thérapie suffise.

## Conclusion

Le recours à la bithérapie augmente le rapport bénéfice sur risque. C'est-à-dire que les effets cliniques sont exacerbés tandis que les risques d'émergence de bactéries résistantes sont réduits. Cependant, le choix de la bithérapie ne doit pas être simplement opportuniste mais savamment pesé de manière à cibler les associations qui ont du sens avec à la base une véritable réflexion qui repose sur les questions suivantes :

Pour quelles bactéries une association ?

Pour quels antibiotiques une association ?

Pour quelles pathologies une association ?



# ***POULET : STRATEGIE VACCINALE ET SES OUTILS***

**Conséquences pratiques des différentes méthodes  
de détection du virus de la Bronchite Infectieuse.**

DR CHRISTOPHE DE LANGHE, INTERVET.

**Sreening à l'abattoir : Intérêt des sérologies en fin de bande  
pour le suivi des infections virales  
et le controle des vaccinations.**

JEAN-LOUIS PINSARD, BIO-CHÊNE VERT.

**Influence de la vaccination maladie de Marek sur  
la décroissance des anticorps maternels GUMBORO.  
Application à la stratégie vaccinale.**

DR HERVÉ LE GALLUDEC, FORT-DODGE SANTÉ ANIMALE.

# **"CONSÉQUENCES PRATIQUES DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DÉTECTION DU VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE."**

**Dr Christophe De LANGHE**

INTERVET

Le virus de la Bronchite Infectieuse (IBV) est responsable de pertes économiques pour l'industrie avicole, de problèmes respiratoires ou rénaux ou de chute de ponte. L'agent de la Bronchite Infectieuse n'est cependant pas spécifique de ces symptômes. La relation entre la clinique et le passage du virus ou les traces de son passage peut être contrôlée par des outils de laboratoire. Ces contrôles nécessitent la réalisation de prélèvements dont la réussite conditionne pleinement les résultats d'analyse.

## **1. Choix d'un diagnostic de laboratoire**

La grande majorité des confirmations de passage du virus BI se fait par la technique ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay). L'augmentation des titres d'immunoglobulines (IgG) en technique ELISA classique est consécutive à la présentation des antigènes de groupe IBV au système immunitaire de l'oiseau. Elle caractérise l'évolution de la protection à médiation humorale. La technique ELISA ne donne pas de détails sur le sérotype du virus BI et donc d'informations sur l'adéquation des programmes vaccinaux BI utilisés ni sur la qualité de la protection à médiation cellulaire. Lors d'échec de la prophylaxie contre la Bronchite Infectieuse, il est nécessaire de préciser le sérotype du virus qui circule. Deux orientations s'offrent alors : l'isolement et l'identification ou bien le sérotypage par séroneutralisation.

## **2. Pourquoi et comment contrôler les traces du passage d'un virus de Bronchite Infectieuse**

Il est possible de rechercher les traces du passage des virus BI en dosant les anticorps du sang. L'objectif est alors de mettre en évidence soit le passage d'un virus vaccinal pour estimer la qualité de la protection, soit le passage d'un virus sauvage pour le diagnostic de la maladie, le contrôle de la protection vaccinale ou l'analyse de la circulation des virus BI dans l'environnement. La séroconversion (IgG) est mesurée en générale 2 à 3 semaines après les premiers symptômes ou certaines vaccinations. Les IgG disparaîtront ensuite progressivement. Les autres Ig ne sont en pratique pas recherchées par ELISA.

Pour un dépistage de virus sauvage, il peut ainsi être nécessaire de conserver au moins 15 jours des oiseaux en vie après l'abattage d'une bande afin de pouvoir dépister la séroconversion liée à un passage du virus BI peu avant le jour d'abattage de la bande. Sur des animaux plus jeunes, la présence d'anticorps d'origine maternelle (AOM), l'âge des animaux et leur immunocompétence, l'existence de l'immunité au moment du contact avec un virus BI ou la vaccination elle-même influent sur le niveau et la durée de séroconversion et donc sur l'aptitude des tests au dépistage. L'interprétation finale nécessite donc de tenir compte de tous ces paramètres. L'immunité acquise par un vaccin ou par le passage de virus sauvage par exemple limite l'amplitude et la durée de la réponse sérologique après un nouveau challenge viral du même type. Le rappel BIH120 ne donne même aucune réponse sérologique par la méthode ELISA.

Les techniques ELISA utilisées en laboratoire de terrain peuvent révéler l'éventuel passage d'un virus BI sans qualifier son groupe antigénique (voir diagramme 1). Le niveau de séroconversion ne permet pas de différencier de façon certaine le passage des virus classiques des virus variants. Ces derniers pourront être démasqués par des techniques poussées d'investigation (séronéutralisation, ELISA spécifique, inhibition de l'hémagglutination). Cependant, il n'y a d'intérêt à les réaliser que si on se situe tardivement par rapport à une vaccination de rappel variant ou dans les cas où aucun rappel de variant n'a eu lieu. Dans le cas où il y a un rappel de variant, il faut tenter d'isoler le virus (voir §3).

Pour un contrôle de vaccination ( voir diagramme 2), la connaissance exacte du programme vaccinal et des modalités de vaccination est également indispensable avant toute recherche. Si les contrôles de vaccination par la sérologie (Elisa classique IgG) ne peuvent se faire pour les primo-vaccinations (BIH120), en revanche, ils sont utiles pour les rappels avec certains vaccins « variants » ou les vaccins inactivés. Cette même analyse peut également démasquer le passage d'un virus sauvage proche de la vaccination, ce qui pose la limite du système de contrôle. Dans tous les cas, ce sont les antigènes de groupe du virus qui seront investigués en routine.

Un prélèvement sanguin d'un millilitre conservé au frais permet de réaliser la plupart des contrôles existants. Il est centrifugé puis congelé quand l'analyse ne peut se faire dans les heures suivant le prélèvement. La taille de l'échantillon est de vingt en pratique mais peut varier en fonction des tailles de bande par exemple (Tableau 1). Ce taux, bien que faible, peut gagner en représentativité quand on prélève les mêmes animaux lors d'un suivi.

### **3. Pourquoi et comment isoler le virus de la Bronchite Infectieuse**

L'isolement d'un virus BI permet de distinguer l'origine vaccinale ou sauvage d'un virus BI et d'identifier des variants. C'est par ailleurs l'unique moyen de découvrir de nouvelles souches d'un virus BI et de pouvoir les reconnaître par séronéutralisation ultérieurement.

Il se fait dans la semaine qui suit le début des symptômes généralement à partir des trachées (prélèvement de toute la trachée ou écouvillonnage). Les prélèvements doivent être mis au frais le plus tôt possible. Ils seront congelés dans le cas où l'analyse est faite plus de 24 heures après le prélèvement. Là encore, un minimum de 20 prélèvements est réalisé en pratique, mais ce nombre peut fluctuer (Tableau 1). Chez des animaux correctement vaccinés, un virus sauvage ne peut être détecté dans la trachée que dans 20 % des cas dans les 4 jours post-infection et ne sera plus détectable une semaine après l'infection (Tableau 2). La protection vaccinale correcte limite donc les chances d'isolement d'un virus. Chez les animaux mal protégés (mal vaccinés ou valence vaccinale inadaptée), les chances d'isoler le virus sauvage augmentent ce qui facilite la démonstration et permet de procéder à un test d'efficacité des vaccins après challenge par le virus isolé. Tous les types de virus BI peuvent être détectés au niveau de la trachée entre 3 et 5 jours post-infection, mais ils disparaissent rapidement par la suite. Un prélèvement d'amygdales caëcales, de rein, de rate ou un écouvillon cloacal permet de retrouver un virus BI lors d'une infection chronique ou lorsque les symptômes datent de plus de huit jours.

Si les animaux reçoivent plusieurs valences vaccinales, le risque de circulation du virus et sa prévalence sont diminués et le nombre d'échantillons à prélever est directement augmenté (Tableau 1). Il faut alors multiplier les prélèvements. Les échantillons sont enrichis par passages sur œufs embryonnés au laboratoire, c'est pourquoi là encore, il est nécessaire de bien accompagner les prélèvements de commémoratifs.

L'isolement du virus peut se réaliser de différentes manières. Dans tous les cas, la première étape consiste à multiplier le virus sur des œufs embryonnés ou des cultures cellulaires. Cette multiplication peut se poursuivre jusqu'à l'obtention de la mort embryonnaire, l'histologie servant alors pour l'identification. L'étape suivante est l'identification exacte du virus par ses antigènes dans le cas d'une utilisation d'anticorps monoclonaux, (Immunofluorescence), par son génome dans le cas de la PCR ou RT PCR RFLP. Cette dernière méthode permet de classer les virus en fonction de leur génome mais ne donne pas de prédiction sur l'efficacité des vaccins contrairement aux méthodes antigéniques. Des challenges in vivo sont alors nécessaires.

On ne lance pas de protocoles de dépistage sans avoir réuni un maximum de commémoratifs sur les symptômes et le moment de leur apparition, le schéma vaccinal et l'historique de l'élevage lui-même. Les prélèvements restent simples à réaliser, cependant que ce soit pour l'isolement viral ou la recherche d'anticorps, il est essentiel de respecter au mieux les règles d'échantillonnage et les recommandations de conservation des prélèvements. Enfin, tout résultat positif ou négatif ne doit pas exclure d'autres origines des symptômes que celle du virus BI.

## Référence

Detection of infectious bronchitis virus, JJ.De Witt AVIAN PATHOLOGY (2000, 29, 71-93)

Tableau 1 :

Probabilité d'isoler dans la trachée un virus BI en fonction du statut vaccinal et de l'ancienneté de l'infection.

<b>% d'animaux où la détection d'un virus BI est possible</b>	<b>3-4 jours post infection</b>	<b>6-7 jours post infection</b>
<b>Non protégés</b>	<b>90</b>	<b>70</b>
<b>Protégés</b>	<b>20</b>	<b>0</b>

Tableau 2 : Tailles d'échantillons (pour recherche d'antigène ou d'anticorps) en fonction de différentes tailles de bandes, de la prévalence du virus et de la sensibilité du test permettant de détecter une infection avec 95 % de chances.

Flock size	Expected test sensitivity	Prevalence (%)				
		50-100	25	10	5	1
20	100	2	9	16	19	-
	50	4	18	32	38	-
	25	8	36	64	76	-
100	100	2	10	25	45	95
	50	4	20	50	90	190
	25	8	40	100	180	380
1000	100	2	11	29	57	258
	50	4	22	58	114	516
	25	8	44	116	228	1032
5000	100	2	11	29	59	290
	50	4	22	58	118	580
	25	8	44	116	236	1160
10000	100	2	11	29	59	294
	50	4	22	58	118	588
	25	8	44	116	236	1176
100000	100	2	11	29	59	298
	50	4	22	58	118	596
	25	8	44	116	236	1192

Diagramme 1 : identification virale et technique utilisée

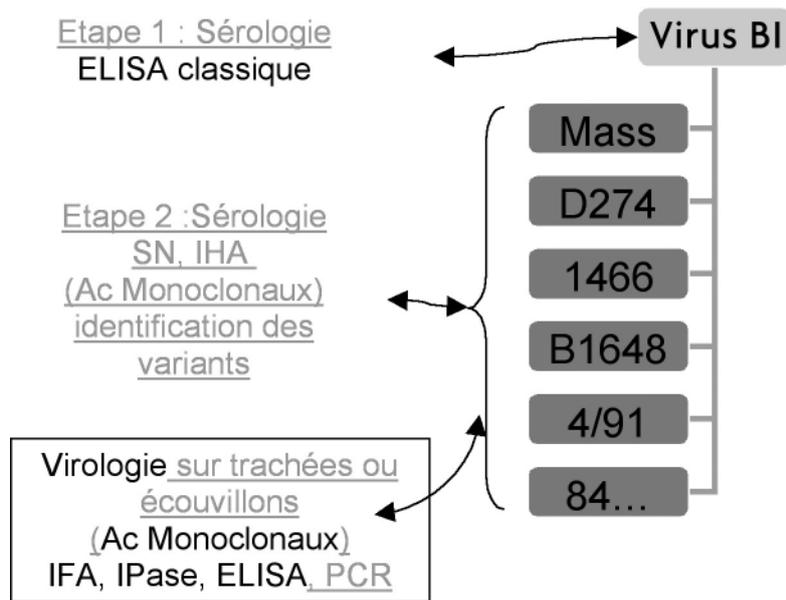
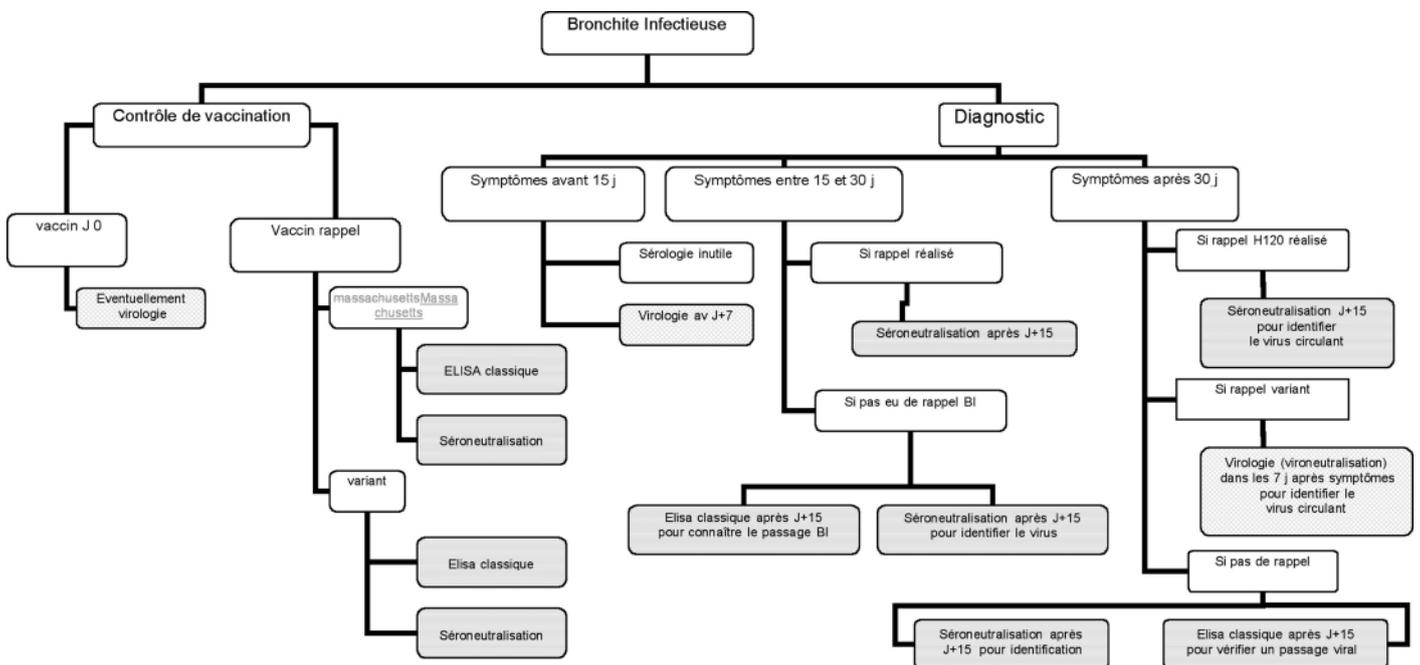


Diagramme 2 : Choix des techniques de laboratoire et mode de prélèvement à effectuer.



# **SCREENING A L'ABATTOIR : INTERET DES SÉROLOGIES EN FIN DE BANDE POUR LE SUIVI DES INFECTIONS VIRALES ET LE CONTROLE DES VACCINATIONS.**

**Jean-Louis PINSARD - Jean LE GUENNEC – Damien MARTIN  
Marylène RAFFEGEAU - Catherine MEREL - Elisabeth RAYMOND  
BIO-CHÊNE VERT**

## **Introduction**

L'infection de troupeaux de volailles par des micro-organismes (virus, bactéries, parasites...) dénommés antigènes peut être à l'origine de maladie et entraîne la production d'anticorps par l'organisme. Réaliser un bilan sérologique c'est faire un état des lieux du statut immunitaire. Le bilan sérologique nous permet d'évaluer les prises vaccinales et de mettre en évidence des passages viraux sauvages. L'Elisa est une des techniques sérologiques permettant de mettre en évidence des anticorps (c'est une technique enzymatique).

## **Généralités**

### **1. Immunité**

Pour se défendre contre ses agresseurs (virus, bactéries, parasites...), l'organisme dispose de 2 systèmes :

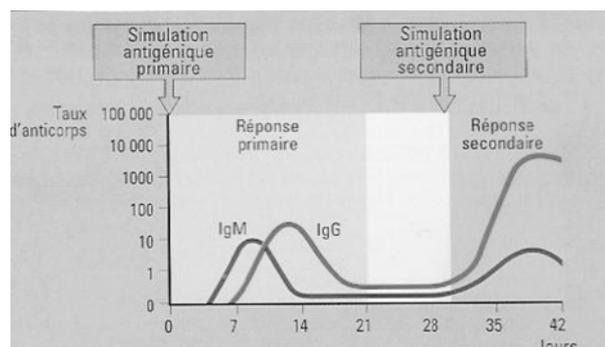
- immunité non-spécifique : réponse spontanée et identique quels que soient les agresseurs ;
- immunité spécifique : réponse acquise et différente selon les agresseurs :
  - réponse cellulaire : destruction des cellules reconnues comme étrangères par les lymphocytes T (Thymus, rate...) ;
  - réponse humorale : sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B (Bourse de Fabricius).

Les Anticorps sont également appelés : immunoglobulines.

Il en existe plusieurs (graphique 1) :

- Ig G : Elles sont les plus nombreuses. Elles permettent d'agglutiner et de neutraliser les antigènes et stimuler les défenses non-spécifiques de l'animal pour détruire les agresseurs ;
- Ig A : Elles jouent un rôle de protection des muqueuses en empêchant la fixation des microbes sur les parois ;
- Ig M : Elles ont des fonctions voisines des Ig G.

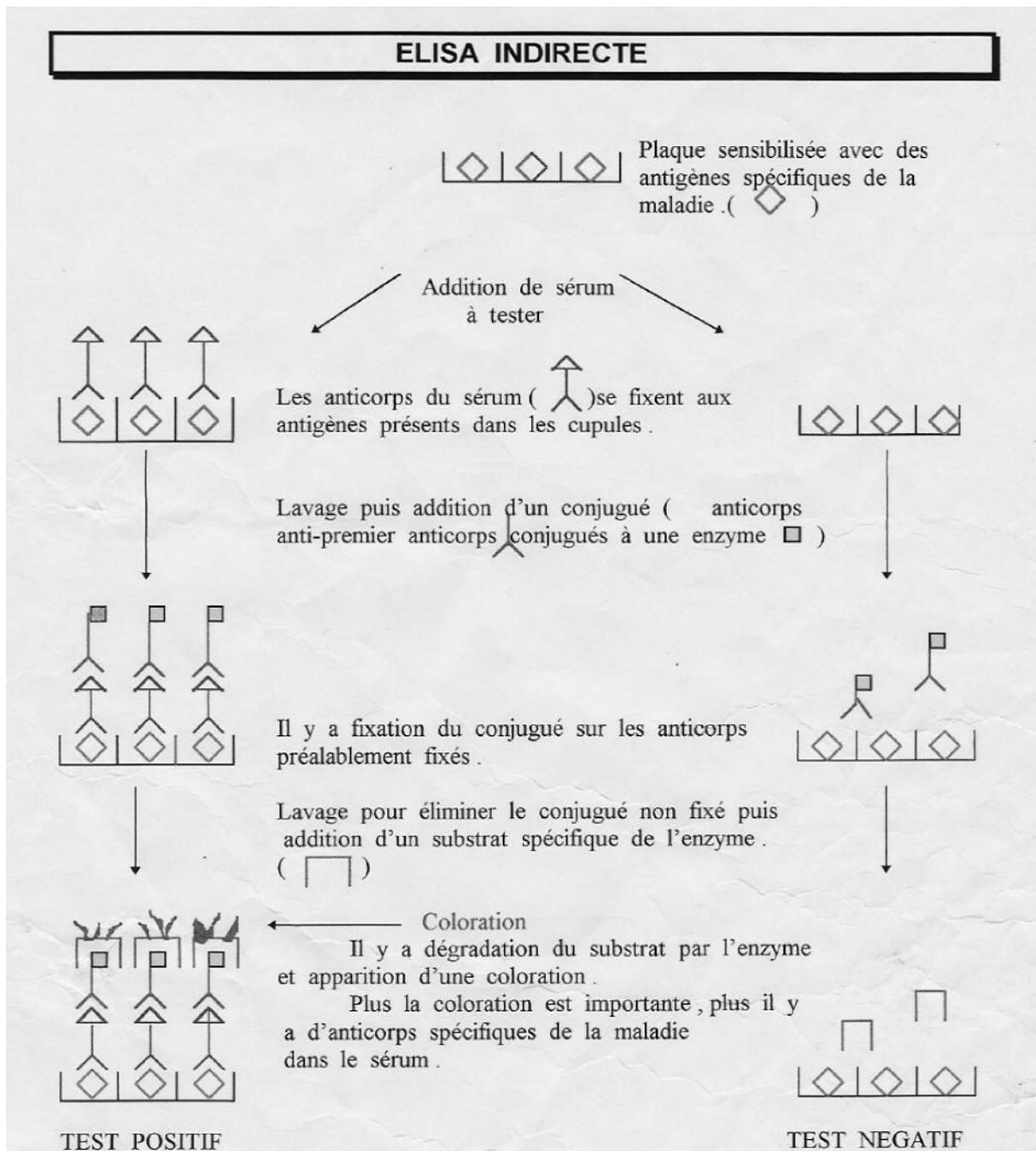
Graphique 1 : Evolution de la protection d'anticorps\*



## 2. Sérologie

De manière générale, un anticorps est capable de se fixer à un antigène spécifique (virus ou bactéries...). La mise en évidence de cette liaison permet de révéler, voire de quantifier les anticorps présents. La technique Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est une technique immunoenzymatique permettant de révéler un complexe Antigène-Anticorps. (Exemple : Elisa indirecte (schéma 1).

Schéma 1



L'Elisa est une technique rapide, standardisable, répétable, comparable, permettant de traiter un grand nombre de prélèvements, peu coûteuse (surtout comparée aux autres techniques sérologiques), mais elle nécessite une bonne technicité et une bonne connaissance des caractéristiques techniques du kit (matériel permettant de réaliser les tests) : sensibilité, spécificité, répétitivité, reproductibilité.

C'est une technique qualitative, mais de par la transcription en titres, elle permet d'avoir une approche quantitative des résultats exprimés.

### **3. Echantillonnage**

En production aviaire, nous nous intéressons à un groupe d'animaux et non à l'individu. Pour que les coûts d'analyses restent dans des limites acceptables, nous sommes amenés à ne prélever qu'une partie de la population étudiée. Cependant il faut garder à l'esprit que le nombre de prélèvements conditionnera en partie le résultat et qu'il faut adapter ce nombre à l'objectif recherché (tableau 1).

**Tableau 1 : Nombre de prélèvements à faire en fonction de la taille de la population et de la prévalence de la maladie pour un risque de 5 %.**

<b>Taille population</b>	<b>Prélèvements</b>			
	1%	10%	20%	50%
100	95	25	15	5
1 000	258	28	15	5
10 000	294	28	15	5
20 000	296	28	15	5

En pratique, pour un diagnostic individuel d'élevage, on réalise 15 prélèvements (voire 10), ceci nous permet d'avoir une très bonne valeur prédictive pour une prévalence de 20 %, à condition également de réaliser les prises de sang au moins 3 semaines après une infection supposée.

Pour un screening à l'abattoir, si nous réalisons 5 prélèvements, nous ne pouvons mettre en évidence qu'une prévalence minimum de 50 %, ceci est donc applicable pour un agent très contagieux (exemple : Maladie de Gumboro ou Bronchite Infectieuse).

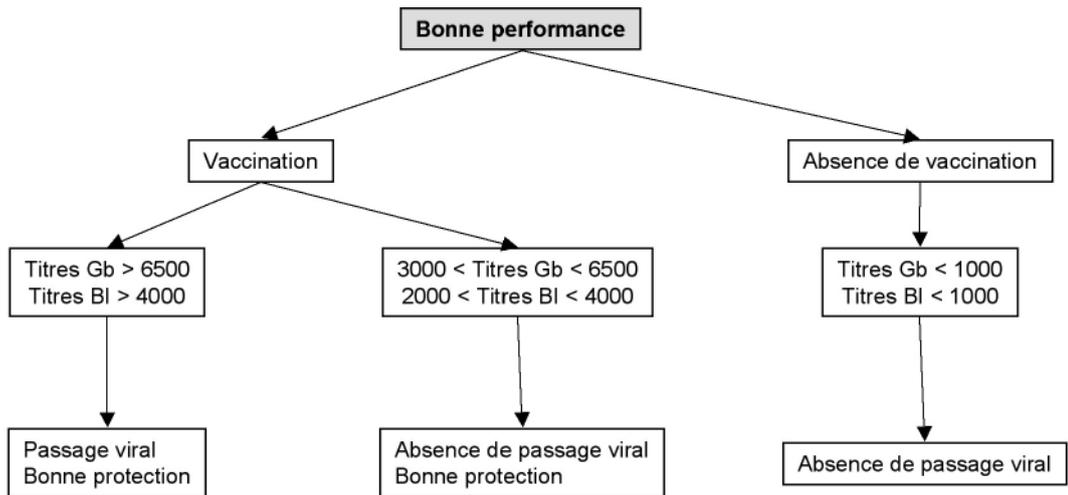
## **Étude**

Nous avons demandé à 3 organisations de réaliser 5 prises de sang sur 36 lots à l'abattoir. Nous avons récolté les prises de sang et les commémoratifs puis traité les sérums vis-à-vis de la Maladie de Gumboro et la Bronchite Infectieuse (virus se propagent très rapidement dans le bâtiment) par la technique Elisa.

Après analyse des résultats et confrontation avec le plan de prophylaxie et les performances technico-économiques de chaque lot, nous pouvons :

- faire un bilan sanitaire de l'élevage (si les titres sérologiques sont élevés et homogènes) (schémas 2 et 3).

Schéma 2

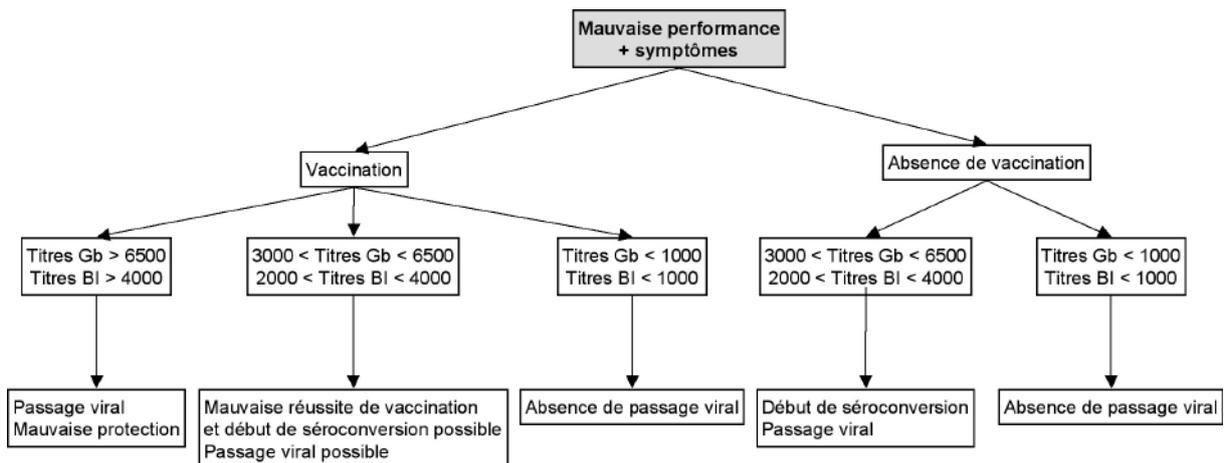


- Bonne technique de vaccination  
- Protocole de vaccination adapté

- Bonne technique de vaccination

- Surveiller la pression virale

Schéma 3



- Revoir la technique de vaccination  
- Revoir le protocole de vaccination

- Contrôler la technique de vaccination  
- Discuter du protocole de vaccination

- Revoir la technique de vaccination

- Revoir le protocole de vaccination

- Surveiller la pression virale

- Permettre à l'organisation de connaître la prévalence de leur élevage vis à vis de :  
la Maladie de Gumboro et de la Bronchite Infectieuse ;
- Justifier d'un programme vaccinal adapté ;
- Expliquer des baisses de performance ;
- Etablir des zones à risques ;
- Planifier des rotations d'élevage.

## **Conclusion**

En réalisant seulement 5 prises de sang en fin de bande et en recherchant les anticorps de virus contagieux (Gumboro et Bronchite Infectieuse) par la technique sérologique : Elisa, on peut au sein d'un organisme connaître la pression virale du terrain, juger ou justifier un plan de prophylaxie ainsi qu'apprécier la prise vaccinale et donc la qualité de la vaccination.

## **Référence**

1. \* : Male D., *Immunologie - Aide mémoire illustré*, Editions DeBoeck Université.
2. *Manuel de Pathologie Aviaire* – J Brugère-Picoux et A Silim
3. *Communication interne*

# **INFLUENCE DE LA VACCINATION MALADIE DE MAREK SUR LA DÉCROISSANCE DES ANTI-CORPS MATERNELS GUMBORO. APPLICATION À LA STRATÉGIE VACCINALE.**

**Dr Hervé LE GALLUDEC**

FORT-DODGE SANTÉ ANIMALE

## **Introduction**

Ces dernières années, les arguments justifiant une vaccination maladie de Gumboro au couvoir étaient les suivants :

- Efficacité sur les poussins à faible titre en Ac maternels ;
- Prévention de la multiplication du virus sauvage par ces poussins ;
- Retardement du challenge par le virus sauvage.

Des études récentes indiquent qu'il y a un intérêt supplémentaire à cette vaccination lorsque les animaux sont également vaccinés contre la maladie de Marek.

## **Étude sérologique**

Des poussins commerciaux sont vaccinés à 1 jour d'âge par injection contre la maladie de Marek et/ou contre la maladie de Gumboro. Un groupe témoin non-vacciné est également constitué. Ces poussins sont issus de reproducteurs ayant reçu 2 vaccins inactivés contre la maladie de Gumboro. Les titres moyens des poussins à 1 jour sont pour le 1er essai de 14.190 avec le kit IDEXX XR et 7.124 avec le kit KPL, et pour le 2<sup>e</sup> essai de 10.401 avec le kit IDEXX XR et 6.804 avec le kit KPL. Un suivi sérologique par séroneutralisation contre les antigènes de référence D-78 (souche classique) et 89/03 (souche variant) est effectué. Lors du premier essai, les prélèvements sont effectués à 2, 4, 7, 10 et 14 jours post-vaccination. Lors du second essai, les prélèvements sont effectués à 2, 3, 4, 5 et 7 jours post-vaccinal.

Les résultats sont représentés par les graphiques 1 à 4.

Cette étude démontre que la vaccination maladie de Marek entraîne une décroissance très rapide des anticorps séroneutralisants vis-à-vis de la maladie de Gumboro. La vaccination Gumboro associée à la vaccination Marek permet d'éviter ce phénomène qui n'est pas expliqué aujourd'hui.

## **Étude vaccination-épreuve**

Des poussins commerciaux sont vaccinés à 1 jour d'âge par injection contre la maladie de Marek et/ou contre la maladie de Gumboro. Les vaccins Gumboro utilisés sont soit de type « mild » (souche 89/03), soit de type « intermédiaire » (souche Lukert). Ces poussins sont issus de 2 parquets de reproducteurs ayant chacun reçu 2 vaccins inactivés contre la maladie de Gumboro et âgés respectivement de 39 et 54 semaines. Les titres moyens des poussins à 1 jour sont de 5.984 avec le kit IDEXX XR pour les issus du parquet A (39 semaines) et de 3.148 avec le même kit pour les issus du parquet B (54 semaines).

Ces poussins sont soumis à une épreuve à 11 jours avec un virus Gumboro classique de groupe moléculaire 6 (Classification de Jackwood) ou avec un virus Gumboro variant type Georgia V1. La protection face à ces épreuves est mesurée par le rapport poids de la bourse de Fabricius / poids du corps. **Les résultats sont représentés par les graphiques 5 et 6.**

Cette étude démontre que le vaccin intermédiaire apporte une protection significative face aux épreuves virulentes réalisées pour les 2 parquets de reproducteurs. En revanche, le vaccin « mild » n'apporte une protection significative que chez les poussins issus du parquet A (titres à 1 jour plus élevés). Les poussins avec un titre à 1 jour faible sont mieux protégés des épreuves virulentes par le vaccin intermédiaire.

## **Étude in ovo**

Des poussins commerciaux sont vaccinés in ovo contre la maladie de Marek. Certains poussins reçoivent en même temps un vaccin « mild » ou « intermédiaire » contre la maladie de Gumboro. Les poussins sont issus de reproducteurs ayant reçu 2 vaccins inactivés contre la maladie de Gumboro et présentent un titre moyen à 1 jour de 3.448 avec le kit IDEXX XR.

Ces poussins sont ensuite soumis à une épreuve virulente par un virus de groupe moléculaire 6 (classification de Jackwood) à 8 jours d'âge (essai 1) ou à 11 jours d'âge (essai 2). Des mesures du rapport poids de la bourse de Fabricius / poids du corps sont effectuées à 8, 15 et 21 jours d'âge. **Les résultats sont représentés par les graphiques 7 à 11.**

Cette étude démontre l'innocuité de la vaccination associée maladie de Marek-maladie de Gumboro administrée in ovo. Par ailleurs, si les 2 vaccins Gumboro apportent une protection significative face à l'épreuve à 8 jours, seul le vaccin intermédiaire permet de retarder significativement l'apparition des lésions suite à l'épreuve à 11 jours.

## **Seconde étude in ovo**

Des poussins commerciaux présentant un titre sérologique moyen à 1 jour de 11.000 avec le kit IDEXX XR reçoivent un vaccin contre la maladie de Gumboro par voie in ovo. Les poussins sont soumis à une épreuve tous les 3 jours avec un virus classique (souche STC) ou un virus variant (Del-E). Des analyses PCR et histologiques permettent de déterminer l'âge auquel les poussins deviennent sensibles au virus d'épreuve.

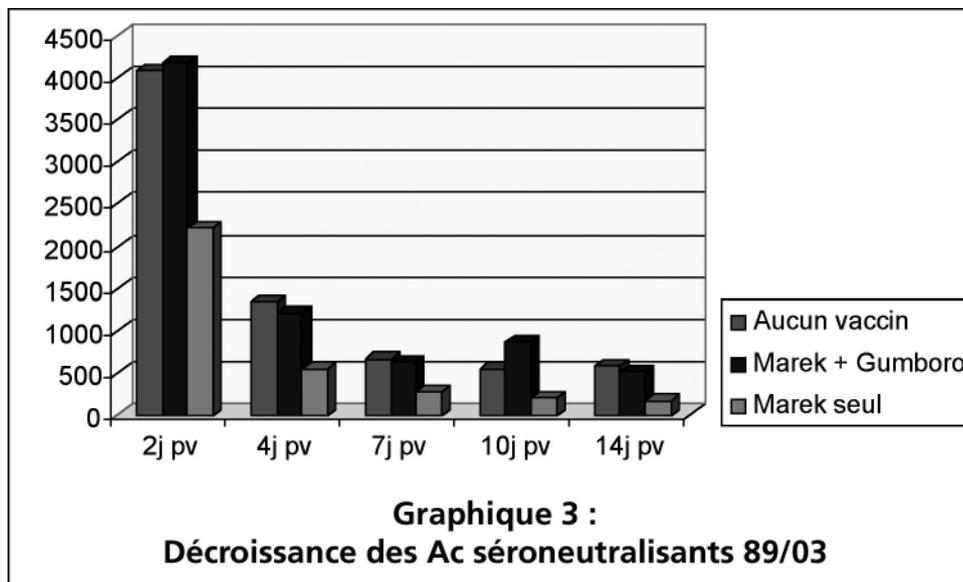
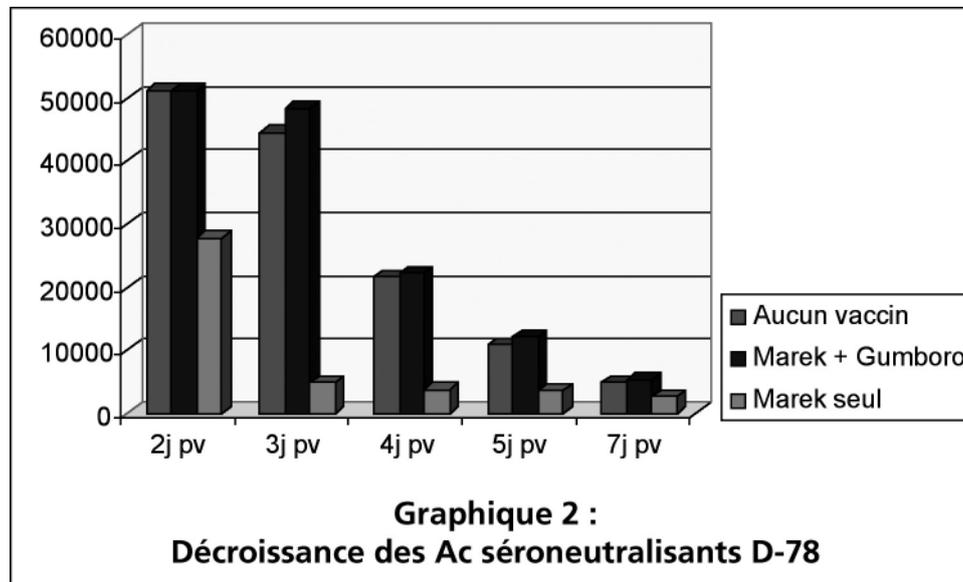
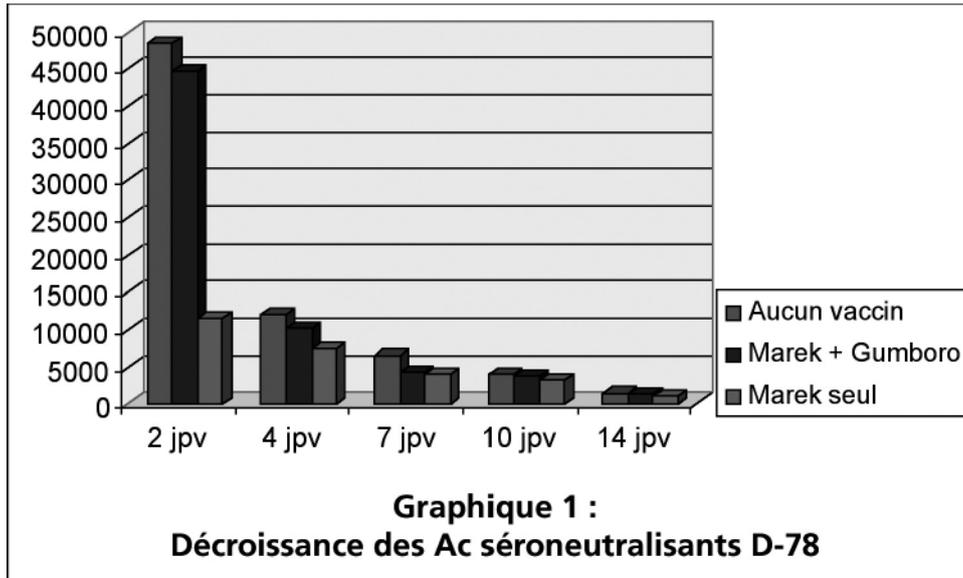
**Les résultats sont représentés dans le graphique 12.**

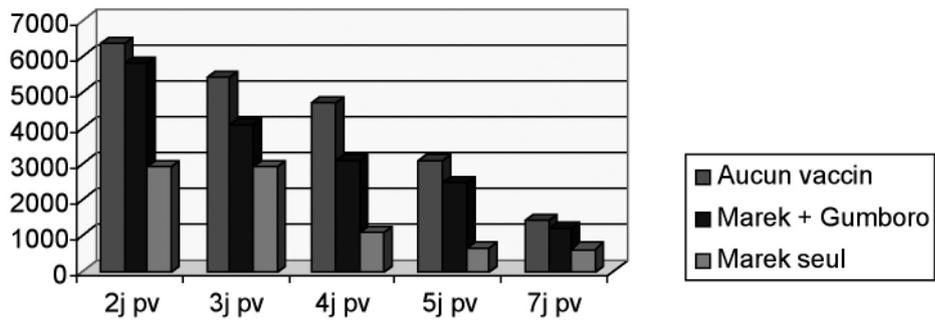
Cette étude démontre l'intérêt de la vaccination in ovo contre la maladie de Gumboro pour retarder l'âge de sensibilité des oiseaux au challenge.

## **Conclusion**

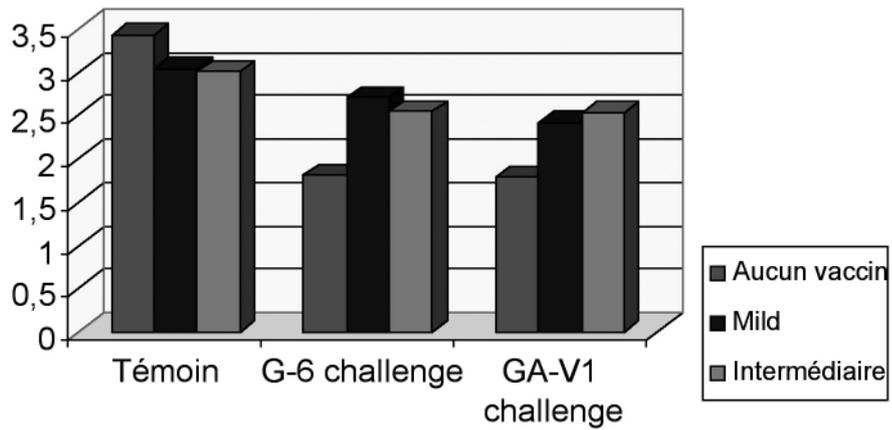
La vaccination contre la maladie de Gumboro effectuée au couvoir se traduit par 2 effets : un effet de préservation de l'immunité passive en cas de vaccination contre la maladie de Marek et un effet de stimulation immunitaire chez les poussins à faible taux d'anticorps maternels.

Les intérêts de cette vaccination au couvoir sont de protéger les animaux contre un challenge précoce quel que soit leur statut sérologique et d'améliorer l'efficacité de la vaccination en élevage en retardant l'âge auquel les oiseaux deviennent sensibles aux virus sauvages et en limitant la multiplication de ces virus sauvages dans l'élevage par les poussins à faible taux d'anticorps maternels.

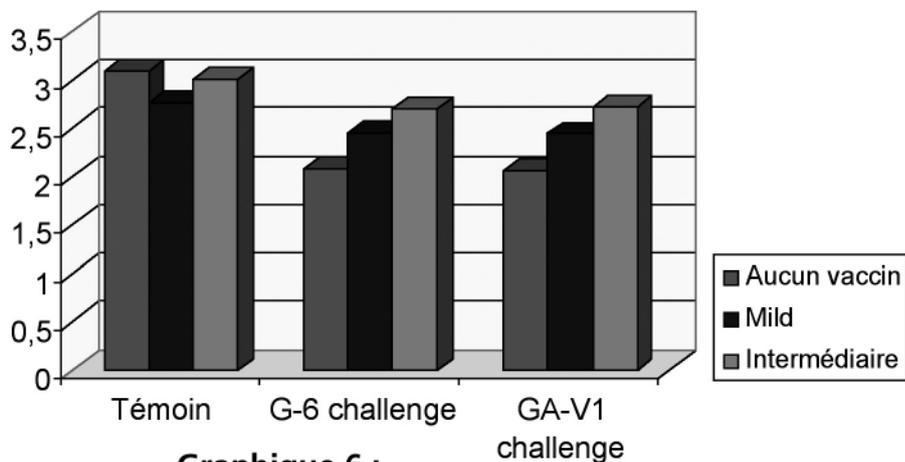




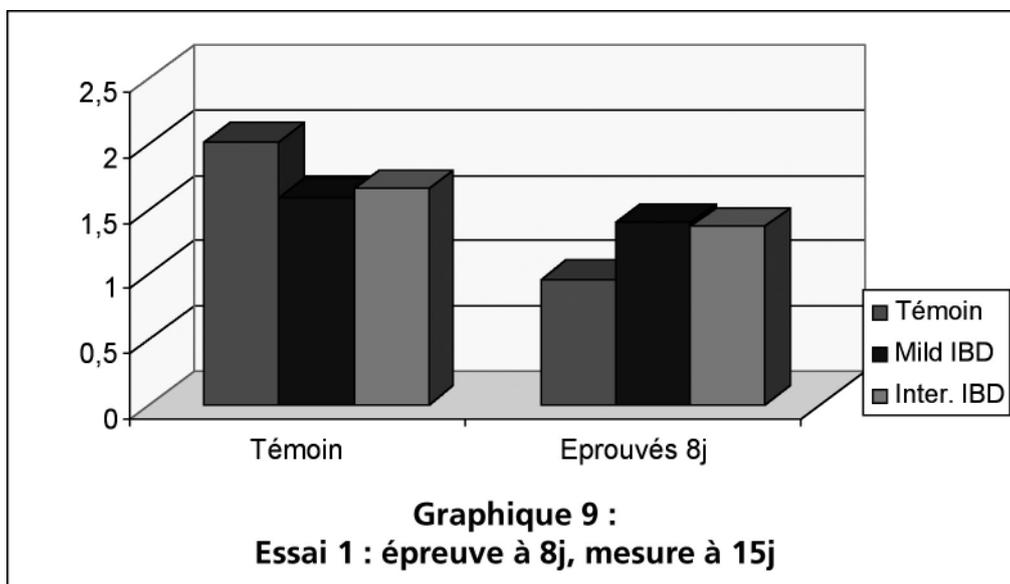
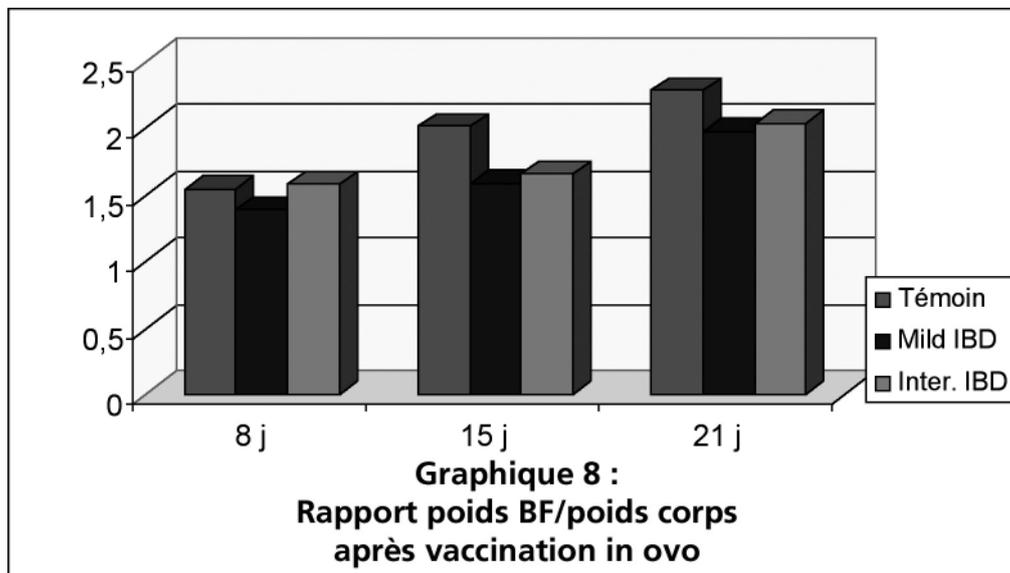
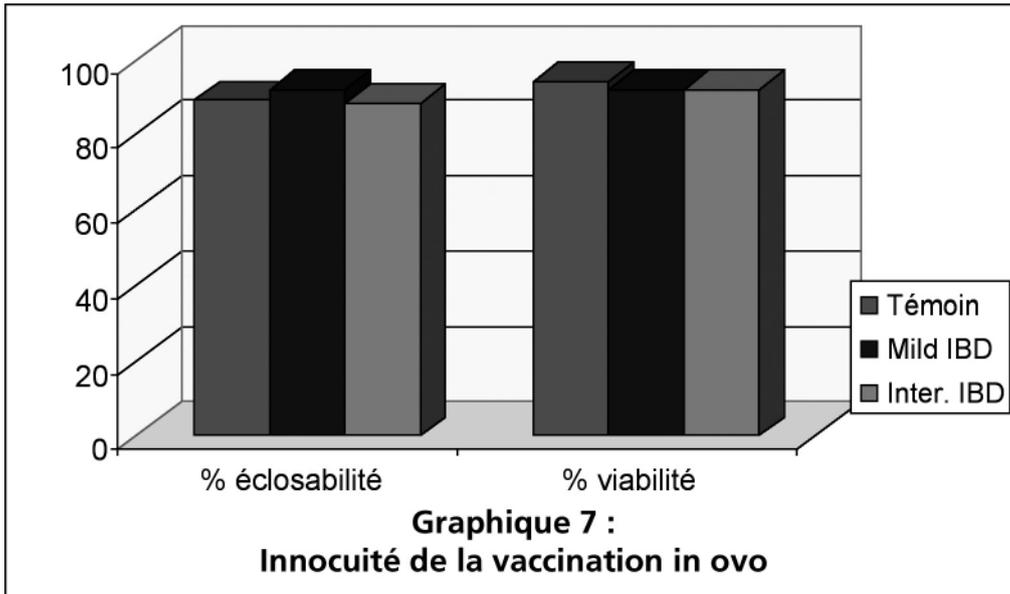
**Graphique 4 :  
Décroissance des Ac séroneutralisants 89/03**

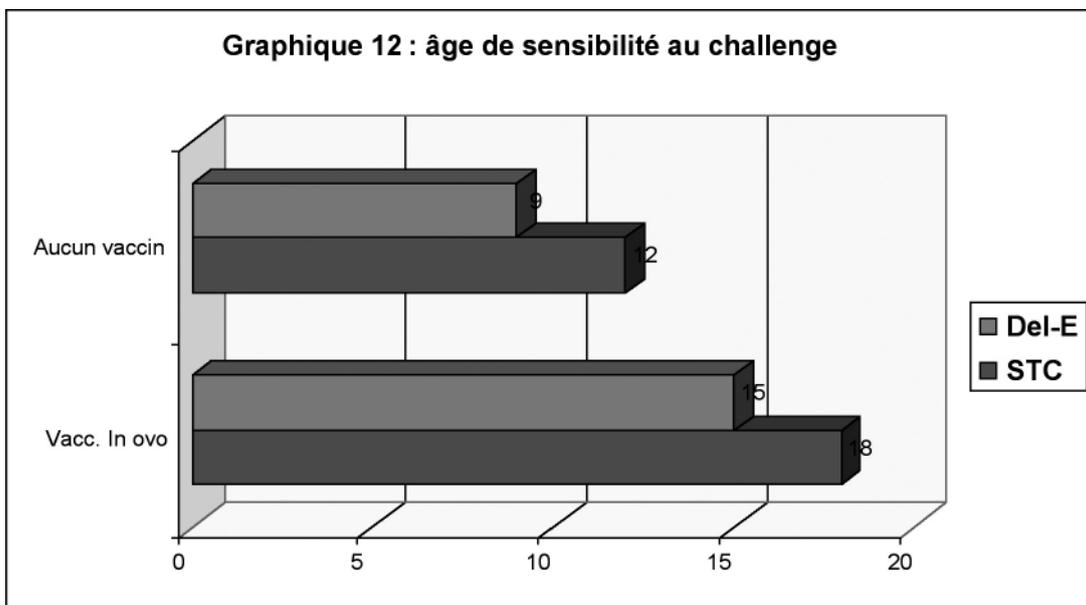
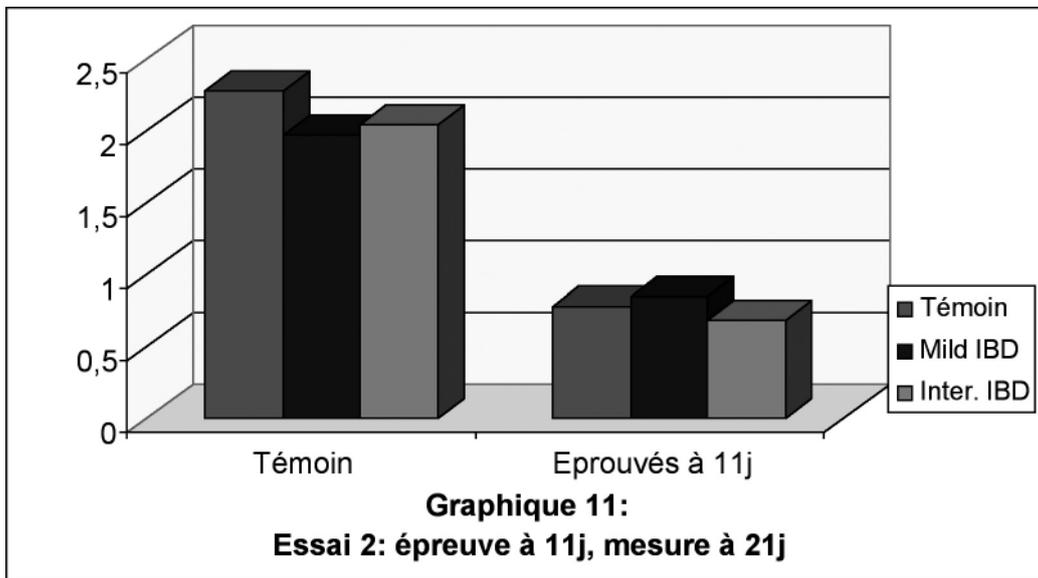
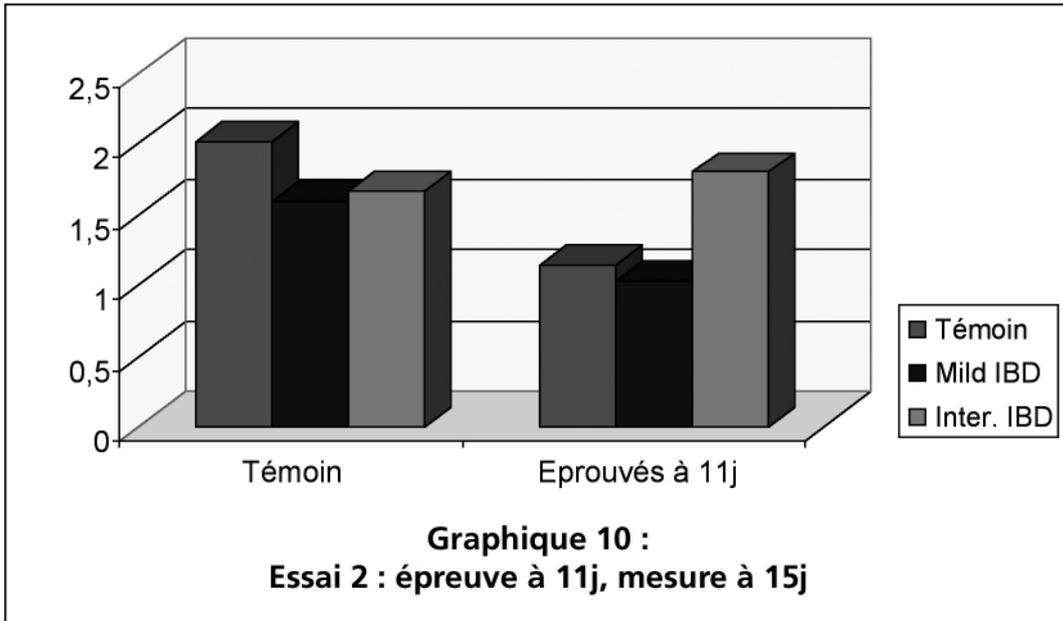


**Graphique 5 :  
Résultat parquet A (39 semaines)**



**Graphique 6 :  
Résultats parquet B (54 semaines)**





# ***DINDE :*** ***ORNITHOBACTERIUM*** ***RHINOTRACHEALE***

**Ornithobacterium rhinotracheale en dinde de chair :  
évolution de la contamination  
au sein d'élevages au cours d'une bande.**

DR PASCAL PAULET, INTERVET.

**Ornithobacterium rhinotracheale :  
prélèvements et méthodes d'analyses.**

DR PIERRE-YVES MOALIC, LABOFARM.

**Définition de nouveaux diamètres critiques  
pour l'Oxytétracycline  
dans l'interprétation des antibiogrammes  
d'Ornithobacterium rhinotracheale.**

DR JEAN-FRANÇOIS SOU ET DR ERIC BOUSQUET, VIRBAC FRANCE.

**Étude de l'association Oxytétracycline-Lincomycine  
et Oxytétracycline-Tylosine vis-à-vis  
d'Ornithobacterium rhinotracheale isolé chez la dinde.  
Méthodes de déterminations et résultats.**

DAMIEN MARTIN, BIO-CHENE VERT.

**Détermination de concentrations minimales inhibitrices  
de l'Oxytétracycline, de la Tylosine et de l'association  
Oxytétracycline-Tylosine, en milieu gélosé vis-à-vis de  
18 souches référencées d'Ornithobacterium Rhinotracheale.**

DR CHRISTOPHE BOSTVIRONNOIS, LILLY FRANCE ELANCO.

**Synergie de l'association lincomycine - oxytétracycline  
sur Ornithobacterium Rhinotrachéale.**

DR FRANÇOISE PICHARD, PFIZER.

# "ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE EN DINDE DE CHAIR : ÉVOLUTION DE LA CONTAMINATION AU SEIN D'ÉLEVAGES AU COURS D'UNE BANDE."

**Pascal PAULET**

INTERVET

Au cours de la dernière décennie un nouvel agent responsable de problèmes sanitaires a été isolé chez les volailles : *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). ORT est une bactérie Gram négative responsable de symptômes respiratoires et articulaires sur de nombreuses espèces de volailles : poulets, dindes, canards, oies, pintades faisans, perdrix...

Des études sérologiques ont montré une présence mondiale de cette bactérie tant sur les oiseaux d'élevages que sur des de nombreux oiseaux sauvages.

Malgré l'avancée des recherches sur sa pathogénicité, ses voies de contamination, de nombreuses questions restent en suspens sur les problèmes du quotidien rencontrés en élevage dues à ORT.

Après une synthèse des connaissances actuelles sur la bactérie, cet article présente les résultats d'une étude de suivi de la contamination d'élevages de dindes de chair en Bretagne au cours d'une bande par ORT.

## I. Rappel sur ORT

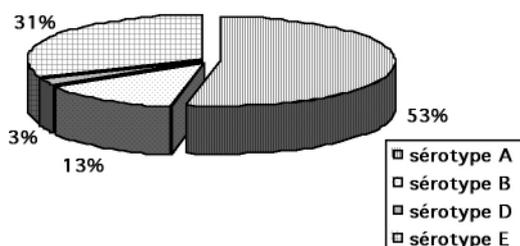
### 1.1. La bactérie

ORT est une bactérie difficile à cultiver. Elle croît lentement et nécessite des conditions de culture spécifiques. Un isolement optimal est obtenu sur une gélose au sang de mouton, avec une incubation d'au moins 48 heures dans une atmosphère enrichie de 5 à 10 % de CO<sub>2</sub>. Un enrichissement en gentamicine et polymyxine permet de limiter la prolifération d'autres bactéries, permettant un meilleur isolement d'ORT. ORT forme alors de petites colonies d'un blanc grisâtre dégageant une odeur butyrique.

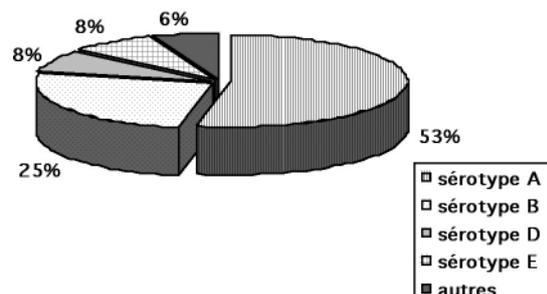
Dans les conditions tant expérimentales que terrain son isolement reste néanmoins délicat.

Actuellement 18 sérotypes ont été identifiés de A à R. Les sérotypes majeurs en dindes sont A, B D et E avec des répartitions variables suivant les pays.

**Répartition des sérotypes en dindes en Bretagne et Vendée. Bazin (1)**



**Répartition des sérotypes en dindes au niveau mondial. Van Empel (4)**



Des tests Elisa détectant les principaux sérotypes sont disponibles, mais l'apparition rapide (5 à 7 jours après infection) et la disparition rapide des anticorps (2-3 sem) suite à un premier contact n'en font pas un outil idéal de diagnostic.

Une technique PCR existe également, permettant de s'affranchir des difficultés de culture, mais ne permet pas l'établissement d'antibiogramme ni de sérotypage.

## **1.2. L'infection par ORT**

ORT peut être un pathogène primaire c'est-à-dire qu'il peut provoquer des symptômes par lui-même, néanmoins les facteurs environnementaux (ventilation, hygiène et autres agents pathogènes) jouent un rôle non négligeable dans l'apparition de la maladie et surtout dans la gravité des symptômes.

Dans des conditions expérimentales (6), il a été montré qu'ORT se fixe aux cellules épithéliales des sacs aériens dans le jour suivant la contamination. Le second jour il apparaît une infiltration de l'épithélium par des cellules immunitaires. Le 4ème jour la bactérie est retrouvée au sein de l'épithélium causant un important granulome.

L'infection chez la dinde par ORT provoque un écoulement nasal transitoire associé à baisse de la consommation d'aliment. A l'autopsie, on observe une pneumonie souvent unilatérale, associée à une aérosacculite. Sur des dindes plus âgées on peut observer des lésions d'arthrite, ostéite avec parfois à des hépatites et péricardites.

Sur la dinde (5), lors d'infection expérimentale par voie intra veineuse la bactérie est détectée dans les articulations dans la semaine qui suit l'épreuve, les boiteries apparaissant 3 semaines après l'épreuve.

Des études ont montré (2) qu'ORT peut persister dans des conditions de laboratoires 40 jours à 4°C dans de la litière stérilisée et 6 jours à 22°C. Cette résistance non négligeable permet peut être d'expliquer la persistance d'une infection au sein d'un même élevage sur des bandes successives.

ORT est bactérie découverte récemment et de nombreuses questions restent en suspens sur les origines de la contamination, la persistance dans le bâtiment, et les infections successives ou concomitantes d'un même troupeau par une ou plusieurs souches d'ORT au cours d'une bande.

Un suivi de quelques troupeaux de dindes de chair au cours d'une bande a été réalisé afin de tenter de progresser sur la connaissance de la maladie.

## **2. Étude terrain.**

### **2.1. Matériel et méthodes.**

Plusieurs lots de dindes de chair ont été suivis dans des exploitations bretonnes présentant des problèmes récurrents d'ORT.

Différents prélèvements ont été réalisés en cours de la bande :

\* Prise de sang pour suivi des anticorps par technique Elisa. 10 prises de sang ont été prélevés les semaines : 3, 5, 7, 9, 11 et 13.

Les sangs ont été centrifugés puis congelés. Les serum ont été traités par le laboratoire d'Intervet International Boxmeer pour recherche des anticorps de sérotypes A et B suivant la méthode décrite par Paul Van Empel (3).

\* Ecouvillons pour mise en culture et antibiogramme des souches éventuellement isolées. Les prélèvements ont été mis en culture suivant la technique bactériologique utilisée par le laboratoire de Selvet conseil, 56 Bignan.

Les souches isolées ont été repiquées sur milieu de transport, puis ont été sérotypées par le laboratoire de recherche d'Intervet International Boxmeer par une technique de précipitation en milieu gélosée suivant la méthode décrite par Paul Van Empel (3).

\* Des écouvillons ont été congelés puis stockés pour recherche PCR. Cette recherche avait pour but de détecter une contamination non décelée par la bactériologie.

Les écouvillons ont été traités par PCR par le laboratoire Labofarm de Loudéac.

## **2.2. Résultats**

Les résultats n'étant pas disponibles lors de la mise sous presse de cet article, ils seront fournis sur demande auprès d'Intervet SA.

## **Références**

1. *Bazin T. Ornithobacterium en élevage de dindes de chair : suivi d'élevages cas en Vendée et en Bretagne. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Nantes, 2003*
2. *Lopes VC., Velayudhan B., Halvorson DA., Nagaraja KV. Survival of Ornithobacterium rhinotracheale in sterilized poultry litter. Avian Disease, 2002,46,1011-1014.*
3. *Van Empel P., Van den Bosch H. Loeffen P., Storm P. Identification and serotyping of Ornithobacterium rhinotracheale. Journal of Clinical Microbiology, 1997,35,418-421.*
4. *Van Empel, Ornithobacterium rhinotracheale, 1998.*
5. *Van Empel P. O. rhinotracheale is a global concern. World Poultry, august 2002, 25-26.*
6. *Van Veen L. Do we know the real impact of Ornithobacterium rhinotracheale infections ?. Poultry International, 2003, vol 42, N°5.*

# **ORNITOBACTERIUM RHINOTRACHEALE : PRÉLÈVEMENTS ET MÉTHODES D'ANALYSES**

**Dr Pierre-Yves MOALIC**

LABOFARM

*Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) est un bacille gram négatif, non-sporulé, immobile, à l'origine de troubles articulaires et respiratoires chez le poulet et la dinde. Décrite en 1990, cette bactérie fut isolée initialement en Allemagne (1981) puis en Afrique du Sud, en Israël, aux USA et dans de nombreux pays européens. La description tardive du genre et de l'espèce est probablement liée aux conditions de culture particulières de cette bactérie et à l'absence de test spécifique disponible à cette époque dans les laboratoires d'analyses. Les signes cliniques ainsi que les lésions qui peuvent être observés sur des animaux issus de troupeaux malades sont assez peu spécifiques d'ORT et le diagnostic différentiel doit être établi avec *P. multocida*, *R. anatipestifer*, et *H. paragallinarum* par la détection directe de l'agent microbien ou indirectement par des examens sérologiques. La distribution mondiale de ce germe ainsi que l'impact économique lié à l'infection des élevages a favorisé ces dernières années les travaux pour la mise au point d'outils de diagnostic.

## **Diagnostic direct :**

### **L'isolement bactérien en culture et la détection par PCR**

#### ***Importance du prélèvement***

Comme pour tout test de diagnostic, le prélèvement doit être représentatif de la pathologie. De plus, il devra être réalisé à un stade précoce de la maladie. Il a été en effet démontré que le réisolement d'ORT après inoculation expérimentale n'est plus possible dans la trachée 7 jours après l'infection. A l'autopsie, le prélèvement est réalisé à partir de la trachée, des poumons, des sacs aériens ou des articulations. A l'élevage, un écouvillon trachéal (ou cloacal) peut suffire pour renseigner sur le portage. D'autres organes ont permis la mise en évidence du germe (sang cardiaque, péricarde, foie, rate, ovaires, oviducte) mais de manière plus aléatoire. Les tests PCR, du fait de leur très grande sensibilité, permettent d'abaisser le seuil de détection d'ORT. Cette propriété est utilisée pour la recherche d'ORT à partir de prélèvements réalisés dans l'environnement des bâtiments de volailles. Plusieurs auteurs ont suggéré que l'émergence des foyers d'ORT pendant les mois d'hiver était à mettre en relation avec la nécessité pour cette bactérie de températures basses pour survivre. Cette propriété a été étudiée et Lopes et coll (2002) montrent une survie d'ORT dans la litière jusqu'à 50 jours à 4°C contre 8 à 10 jours à 22°C. Une étude de Varga et coll. (2001) montre une survie possible sur des coquilles d'œufs au-delà de 10 jours à 4°C contre 2 jours à 22-25°C. Des essais menés sur la survie de cultures d'ORT à Labofarm ont montré une décroissance très rapide du titre de ces cultures, lorsqu'elles sont conservées à température ambiante ou à 4°C : le maintien à 4°C permet cependant une survie au moins deux fois supérieure à une conservation à température ambiante. Ces différentes expériences montrent

l'importance de la conservation du prélèvement dans l'aptitude du laboratoire à réisoler ORT. Les recommandations seraient donc de placer les écouvillons immédiatement après prélèvement, au contact d'un bloc réfrigérant et de les acheminer le plus rapidement possible vers le laboratoire (surtout pendant les mois d'été). Une mauvaise conservation des prélèvements peut être à l'origine de l'échec de réisolement de la bactérie.

## **La culture**

A leur arrivée au laboratoire les écouvillons sont mis en culture sur un milieu gélosé spécifique. En effet, l'emploi d'un milieu sélectif permet de s'affranchir des bactéries contaminantes (*Proteus*, *Pseudomonas*, *E. coli*...) Les colonies sont petites, de couleur grise, opaques, non-hémolytiques avec un diamètre variant de 1 à 3 mm .

## **Identification des colonies**

L'identification des colonies suspectes peut être faite par quelques tests simples : aspect cultural, gram, oxydase, catalase, et peut être complété à l'aide de galeries biochimiques. L'identification biochimique des souches d'ORT avec le test API donne pour plus de 99 % des souches un code 002004 ou 022004, lorsque les galeries sont incubées à 30°C. Le sérotype des isolats peut être déterminé par précipitation en milieu gélosé, ELISA ou agglutination rapide sur lame (ARL). Ces méthodes ne sont pas utilisées couramment en laboratoire de diagnostic et le sérotypage reste une exigence spécifique du client. A ce jour l'ARL a permis de mettre en évidence 18 sérotypes différents d'ORT. D'autres techniques utilisant la biologie moléculaire ont pu être testées pour le typage des souches d'ORT. La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) permet de différencier les sérotypes par un profil génétique spécifique et semble un outil intéressant d'investigations épidémiologiques. La PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) permet de faire la distinction entre 17 sérotypes (A-Q) et permet même d'observer des homologues ou des différences à l'intérieur d'un même sérotype. Cette méthode met par exemple en évidence des homologues entre les souches appartenant à 1 même sérotype mais isolées de pays différents.

## **La PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Des tests PCR existent pour la détection d'ORT dans différents types de prélèvements : écouvillons, fragments d'organes, chiffonnettes de l'environnement. Ces tests permettent la mise en évidence et l'identification d'ORT sans mise en culture et sans donner de réaction croisée avec des bactéries phylogénétiquement proches. La PCR ORT est environ 10 fois plus sensible que la culture lorsque l'on travaille avec des souches purifiées. Dans les conditions du terrain, la PCR peut s'avérer 100 à 1000 fois plus sensible que la culture (abstraction des bactéries potentiellement contaminantes). Cet atout est utilisé pour rechercher ORT dans l'environnement. Les oiseaux contaminés excrètent des bactéries qui sont ensuite véhiculées par la poussière et s'accumulent sur toutes les surfaces du bâtiment (parois, extracteurs d'air...). Une chiffonnette peut alors être utilisée pour prélever ces poussières et les soumettre à une analyse par PCR.

Cette technique peut également permettre de s'assurer d'une bonne désinfection entre deux bandes, lors du vide sanitaire.

## **Diagnostic indirect : la sérologie**

La détection des anticorps anti-ORT peut être réalisée de deux manières : par agglutination rapide sur lame ou par ELISA.

L'agglutination rapide sur lame consiste à mélanger un antigène bactérien coloré avec un sérum de volaille. La présence d'agglutinats traduit le passage de l'agent infectieux sur l'oiseau testé. Cette méthode est sensible et permet un diagnostic précoce de l'infection. Cependant elle est très peu utilisée dans les laboratoires pour la recherche d'anticorps anti-ORT et aucun antigène commercial n'est disponible. Le test ELISA en revanche, permet une détection plus tardive de l'infection. Ce n'est donc pas l'outil adapté pour diagnostiquer une infection aiguë. En effet, les anticorps apparaissent tardivement et forment un pic au bout de 1 à 4 semaines après le début de l'infection, puis disparaissent rapidement. Le suivi des lots de volailles doit donc se faire en réalisant fréquemment des séries de prises de sang.

Les antibiotiques administrés aux animaux peuvent également avoir un effet sur le niveau de sécrétion des anticorps : en effet, en raison de la sécrétion tardive des anticorps, l'administration d'antibiotiques 5 à 7 jours après le début supposé de l'infection induit une réponse anticorps plus faible que si le traitement est entrepris dès le 1er jour de l'infection.

## **Bibliographie :**

1. *Souillard Rozenn, 2002, Thèse vétérinaire*
2. *Hafez Mohamed, 2002, International Journal of Poultry Science*
3. *Varga J, 2001, Acta Veterinaria Hungarica*
4. *Lopes VC, 2002, Avian Disease*
5. *Leroy-Setrin S, 1998, Letters in Applied Microbiology*

# **DÉFINITION DE NOUVEAUX DIAMÈTRE CRITIQUES POUR L'OXYTÉTRACYCLINE DANS L'INTERPRÉTATION DES ANTIBIOGRAMMES D'ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE.**

**Dr Eric BOUSQUET, Dr Jean-François SOU,  
Dr Jean-François RICOULEAU et Annaële SANQUER**

VIRBAC

**Damien MARTIN, Annie RESTIF**

BIO-CHÊNE VERT

*Ornithobacterium rhinotracheale* est un bacille gram négatif induisant des symptômes respiratoires (pneumonies) et articulaires (téno-synovites) chez la dinde et le poulet (Léorat et al 1997, van Veen et al 2000). La technique de l'antibiogramme (méthode par diffusion en milieu gélosé) est utilisée en routine pour déterminer la sensibilité *in vitro* de souches bactériennes isolées dans un contexte clinique vis-à-vis d'un panel d'antibiotiques. La lecture du diamètre d'inhibition permet de classer chaque couple bactérie/antibiotique dans une des 3 catégories sensible, intermédiaire ou résistante selon des normes établies par la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2004). Cette catégorisation est basée sur une droite de concordance reliant le diamètre d'inhibition mesuré par l'antibiogramme et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) déterminée selon une méthode de référence par dilution. Néanmoins la technique standard de l'antibiogramme ne s'applique pas aux germes à croissance lente comme *Ornithobacterium rhinotracheale* (Devriese et al 1995, Guérin-Faubleé et Carret 1999). Afin de valider une adaptation de l'antibiogramme à ce germe, un échantillonnage de souches a été testé à la fois par la technique de l'antibiogramme et selon une méthode de référence par dilution en milieu gélosé. Cette étude a permis de déterminer une droite de concordance et d'en déduire des diamètres critiques pour l'oxytétracycline dans l'interprétation des antibiogrammes d'*Ornithobacterium rhinotracheale*. L'exemple de l'oxytétracycline a été pris, compte-tenu de l'utilisation courante de cet antibiotique dans le traitement des infections à *Ornithobacterium rhinotracheale*.

## **1. Matériels et méthodes**

### **1.1 Souches bactériennes**

Les 36 souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) testées ont été isolées en 2003 sur des dindes présentant des troubles respiratoires (31/36), locomoteurs (4/36) ou respiratoires et locomoteurs associés (1/36), dans des élevages répartis dans l'ouest de la France : départements 35(11), 56(8), 22(1), 50(4), 29(1), 49(4), 53(4), 72(1) et 44(2). (un tableau eut été plus digeste...). Les organes d'isolement sont les poumons (9/36), les poumons et trachées (20/36), les trachées ( 2/36), les articulations et gaines tendineuses (4 / 36) et pour 1 cas, les poumons, trachées et gaines tendineuses. Les souches d'ORT ont été choisies pour avoir un panel de diamètres de zone

d'inhibition de 6 à 40 mm (diamètres obtenus avec les antibiogrammes réalisés lors de diagnostics). La souche bactérienne de référence, incluse dans chaque série d'essai, est *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## **1.2 Inoculum**

Pour chaque souche bactérienne, un inoculum a été préparé et utilisé le même jour pour la détermination du diamètre d'inhibition par la technique de l'antibiogramme et de la CMI par la méthode de dilution. L'inoculum est une suspension bactérienne de 1 à 3 x 10<sup>7</sup> bactéries / ml obtenue par prélèvement, dans 10 ml de bouillon tryptone-sel, de 7 à 8 colonies bien isolées à partir d'une culture d'ORT de 48 heures sur milieu gélosé supplémenté avec 5 % de sang de mouton. La souche de référence de *Staphylococcus aureus* est traitée de façon identique, sauf pour la préparation de l'inoculum où seul un fragment de colonie est prélevé. Pour chaque souche, un dénombrement de contrôle est réalisé en double sur gélose au sang.

## **1.3 Antibiogramme**

L'antibiogramme est la technique classique, utilisée en routine, d'ensemencement d'un milieu gélosé, de dépôt d'un disque d'antibiotique et, après incubation, de mesure de la zone d'inhibition. Pour chaque souche bactérienne, une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé (supplémenté avec 5 % de sang de mouton) est ensemencée par écouvillonnage de la suspension d'inoculum. Après séchage de la boîte, 2 disques d'oxytétracycline (30 UI par disque) sont appliqués pour chaque souche. Les géloses sont mises en incubation à 37°C, en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, pendant 48 heures. Les diamètres sont mesurés au pied à coulisse et enregistrés.

## **1.4 Détermination des CMI en milieu gélosé.**

Une solution mère d'oxytétracycline est réalisée par dilution dans de l'eau déminéralisée de chlorhydrate d'oxytétracycline (la pesée tient compte du sel et de la pureté du produit). Une stérilisation de la solution est faite par filtration sur membrane 0,45 µm. Des dilutions sont réalisées pour obtenir, en concentration finale après inclusion de 1 ml de chaque dilution dans 18 ml de gélose et 1 ml de sang de mouton, une gamme de concentrations en oxytétracycline de 1/2 en 1/2 allant de 0,0625 à 512 µg / ml. Deux géloses sont préparées par dilution, ainsi que 2 géloses témoins sans antibiotique. Les boîtes sont ensuite séchées sous hotte à flux laminaire. Les géloses sont utilisées le jour-même. Les différentes souches d'ORT et la souche de référence sont inoculées sur les géloses avec oxytétracycline à l'aide d'un multi-inoculateur (appareil de Denley). Chaque tige délivre environ 1 µl, soit environ 10<sup>4</sup> bactéries par dépôt. Une boîte témoin est ensemencée en début et fin d'inoculation. Les boîtes sont incubées pendant 48 heures, à 37°C, avec 5 % de CO<sub>2</sub>. La CMI est la concentration minimale d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible. Les valeurs sont enregistrées, ainsi que les dénombrements de contrôle.

## **1.5 Analyse des données**

Pour chaque souche, la moyenne arithmétique des 2 diamètres d'inhibition mesurés par la technique de l'antibiogramme a été prise en compte. En cas de divergence lors des 2 détermina-

tions de CMI, la valeur la plus élevée a été retenue. La droite de concordance est obtenue par régression linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme en base 2 (log<sub>2</sub>) de la CMI (logiciel S-PLUS 6.2, Insightful). Les diamètres critiques d et D ont été calculés à partir de l'équation de la droite selon les concentrations critiques en oxytétracycline établies par la Société Française de Microbiologie (tableau 1).

Tableau 1: Catégorisation des bactéries vis-à-vis de l'oxytétracycline

Catégorie	CMI (µg/ml)	Diamètre (∅) (mm)
Sensible	CMI ≤ 4	∅ ≥ D
Résistante	CMI > 8	∅ < d
Intermédiaire	4 < CMI ≤ 8	d ≤ ∅ < D

## 2. Résultats

La lecture du diamètre d'inhibition par la technique de l'antibiogramme s'est avérée reproductible dans la mesure où l'écart entre les 2 déterminations par souche n'excède pas 1 mm dans 92 % des cas. La technique de détermination des CMI est également reproductible car l'écart entre les 2 mesures par souche n'excède pas une dilution et ne concerne que 8 % des souches. Le coefficient de corrélation de la droite de concordance est très proche de 1 (0.977), ce qui confirme la relation linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme de la CMI (figure et tableau 2). L'équation de la droite de concordance est :

$$\varnothing = -3,8521 \times \log_2(\text{CMI}) + 33,084$$

∅ : diamètre d'inhibition (mm)                      CMI : exprimée en µg/ml

Les diamètres critiques correspondant aux concentrations critiques inférieure et supérieure valent respectivement 25 mm (D) et 21 mm (d).

Figure : Droite de concordance entre diamètres d'inhibition et CMI

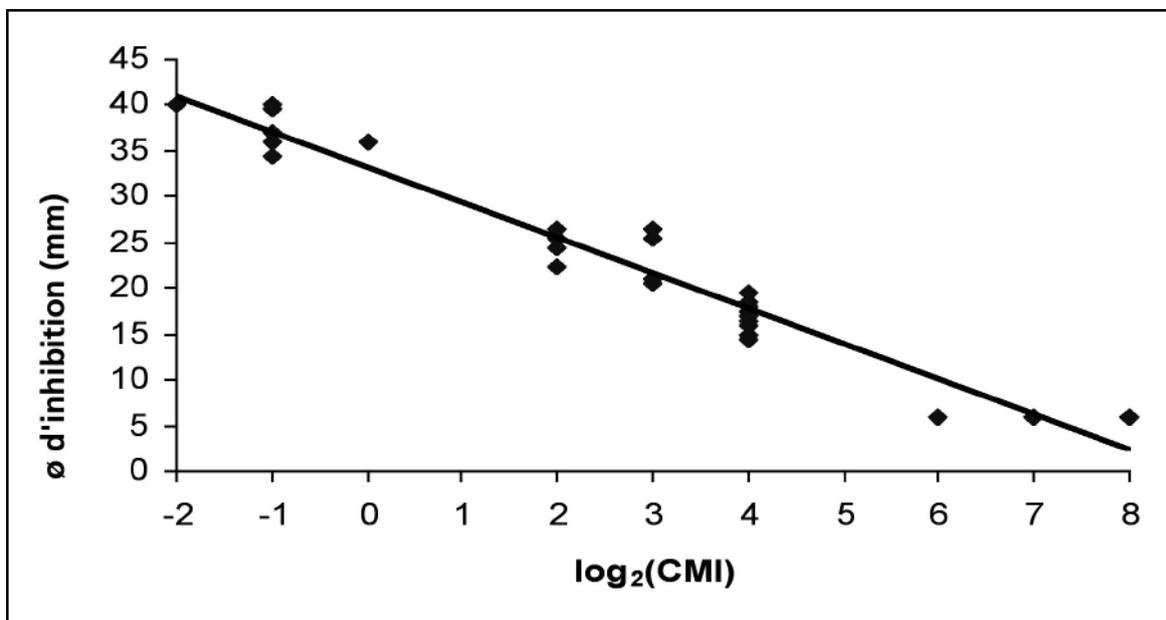


Tableau 2: Correspondance entre log<sub>2</sub>(CMI) et CMI (µg/ml)

log <sub>2</sub> (CMI)	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
CMI (µg/ml)	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256

### 3. Discussion

Un échantillonnage de souches couvrant tout l'intervalle des diamètres d'inhibition observés avec l'oxytétracycline vis-à-vis d'*Ornithobacterium rhinotracheale* a été testé en vue de la représentativité de la droite de concordance. Sur cet échantillon, la droite obtenue évite les erreurs majeures (souche sensible par la méthode des CMI et résistante selon l'antibiogramme) et très majeures (souche résistante par la méthode des CMI et sensible selon l'antibiogramme). Les diamètres critiques calculés sont supérieurs à ceux établis par la Société Française de Microbiologie (SFM) pour l'oxytétracycline (respectivement 19 mm et 17 mm). Cette divergence peut s'expliquer par le fait que la droite de concordance de la SFM a été établie à partir de souches bactériennes d'espèces différentes et de surcroît à croissance rapide. Par ailleurs les concentrations critiques en oxytétracycline ont été définies à partir de données obtenues en médecine humaine (CMI, pharmacocinétique, essais cliniques). Il convient donc d'être prudent dans l'extrapolation de ces concentrations critiques en médecine vétérinaire. Néanmoins afin d'éviter des erreurs très majeures (souches classées sensibles selon les recommandations de la SFM et résistantes selon la droite de concordance adaptée à *Ornithobacterium rhinotracheale*), il est recommandé de retenir désormais le diamètre critique de 21 mm (au lieu de 17 mm) comme valeur seuil de résistance à l'oxytétracycline pour ce germe. En l'absence de données spécifiques, cette nouvelle interprétation ne s'applique pas à d'autres germes.

### Références

1. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2004.
2. Devriese L.A., Hommez J., Vandamme P., Kersters K., Haesebrouck F. *In vitro* antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. *Vet. Rec.* 1995, 137, 435-436.
3. Guérin-Faubleé V. et Carret G. *L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites.* Journées Nationales GTV-INRA Nantes 1999, 5-13.
4. Léorat J., Roger M.F., Martin D. *Ornithobacterium rhinotracheale: Actualités, extension épidémiologique, approche symptomatique et thérapeutique.* Deuxièmes journées de la Recherche Avicole, Tours, 1997, 119-120.
5. Van Veen L., van Empel P., Fabri T. *Ornithobacterium rhinotracheale, a primary pathogen in broilers.* *Avian Diseases* 2000, 44, 896-900.

# **ÉTUDE DE L'ASSOCIATION OXYTÉTRACYCLINE-LINCOMYCINE ET OXYTÉTRACYCLINE-TYLOSINE VIS-A-VIS D'ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE ISOLÉ CHEZ LA DINDE. MÉTHODES DE DÉTERMINATION ET RÉSULTATS.**

**Damien MARTIN, Annie RESTIF, Jean-Louis PINSARD**

BIO-CHÊNE-VERT

Étude réalisées par :  
LILLY ELANCO FRANCE  
PHARMACIA SAS SANTÉ ANIMALE

Le but de ces études est d'évaluer, in vitro, la sensibilité d' *Ornithobacterium rhinotracheale* d'une part à l' oxytétracycline, la lincomycine, la tylosine et d'autre part aux associations oxytétracycline-lincomycine et oxytétracycline-tylosine.

La méthode utilisée est celle de l'échiquier, permettant ainsi de quantifier l'interaction de deux antibiotiques.

## **Matériel et méthode**

### **1. Souches bactériennes**

#### ***1.1 Les souches d'Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) sélectionnées et testées,***

ont été isolées lors de troubles respiratoires et locomoteurs, dans des élevages répartis dans le grand Ouest au cours des années 2002 et 2003. Sur chaque souche, un antibiogramme a été réalisé lors de l'analyse, permettant de classer les souches en sensible, résistant et intermédiaire et d'avoir une C.M.I. calculée, selon les critères du Comité Français de l'Antibiogramme.

#### ***1.2 En fonction des concentrations testées,***

une voire deux souches bactériennes de référence sont incluses dans chaque série d'essai :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est sensible à l'oxytétracycline, la lincomycine et à la tylosine ;
- *Escherichia coli* ATCC 25922 est sensible à l'oxytétracycline et résistant à la lincomycine et à la tylosine.

### **2. Méthode.**

La méthode utilisée est celle de l'échiquier. En milieu gélosé, chaque souche est testée dans un premier temps à différentes concentrations de chaque antibiotique isolément puis à différentes associations de concentrations de 2 antibiotiques.

## 2.1 Antibiotiques

Chaque antibiotique est dissout dans de l'eau déminéralisée pour obtenir une solution mère (la pesée tient compte de l'activité du produit). Après filtration stérilisante, une gamme de dilution pour chaque antibiotique est préparée avec de l'eau déminéralisée stérile. Les solutions d'antibiotiques sont incorporées à 17 ml de milieu gélosé, maintenu en surfusion, auquel est ajouté 1 ml de sang de mouton. Pour la détermination de la C.M.I. de chaque antibiotique, le deuxième antibiotique est remplacé par de l'eau déminéralisée stérile.

(Pour chaque dilution, 2 géloses y compris les géloses témoins sans antibiotiques sont coulées puis séchées sous hotte à flux laminaire.)

Schémas de distribution des antibiotiques (les concentrations sont les concentrations finales).

Schéma d'association oxytétracycline - lincomycine

		Oxytétracycline µg / ml								
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
Lincomycine µg / ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	

## Schéma d'association oxytétracycline – tylosine

		Oxytétracycline µg / ml								
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
Tylosine µg / ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	.0075	.0075	.0075	.0075	.0075	.0075	.0075	.0075	.0075	.0075
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	

### 2.2 Préparation de l'inoculum

L'inoculum est une suspension bactérienne de  $1$  à  $3.10^7$  bactéries / ml obtenue par prélèvement de 7 à 8 colonies bien isolées à partir d'une culture sur gélose au sang d'ORT de 48 heures, dans 10 ml de bouillon tryptone-sel. Pour chaque souche, un dénombrement de contrôle est réalisé par dilutions successives de la suspension bactérienne et inoculation en surface de 0,1 ml de la dilution  $10^{-5}$  sur 2 géloses au sang.

### 2.3 Inoculation

Les différentes souches d'ORT et la souche de référence sont inoculées sur les géloses à l'aide d'un multi-inoculateur (appareil de Denley). Chaque tige délivre environ 1 µl, soit environ 104 bactéries par dépôt. Une boîte témoin estensemencée en début et fin d'inoculation. Les boîtes sont incubées pendant 48 heures, à 37°C, avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.4 Lecture

La C.M.I. retenue est la concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible. Les valeurs sont enregistrées ainsi que les dénombrements de contrôle.

## 2.4 Interprétation (FIC)

La détermination des CMI pour chaque antibiotique seul et pour les 2 antibiotiques associés permet de calculer un index FIC qui est la fraction de concentration inhibitrice.

$$\text{FIC A} = (\text{CMI de A avec B}) / (\text{CMI de A seul})$$

$$\text{FIC B} = (\text{CMI de B avec A}) / (\text{CMI de B seul})$$

$$\text{FIC} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

Interaction : Synergie	FIC < 0.75
Addition	0.75 < FIC < 1
Indifférence	1 < FIC < 2
Antagonisme	2 < FIC

Exemple de résultats :

		Antibiotique A $\mu\text{g} / \text{ml}$								
		0	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
Antibiotique B $\mu\text{g} / \text{ml}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

$$\text{CMI de A} = 2 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{CMI de B} = 0.25 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{CMI de A avec B} = 0.5 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{CMI de B avec A} = 0.06 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{FIC} = (0.5 / 2) + (0.06 / 0.25) = 0.49 \text{ Pour cet exemple, il existe une synergie entre A et B.}$$

## Références

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2002.

L'Antibiogramme. P.Courvalin, F.Goldstein, A.Philippon, J.Sirot.

# **DÉTERMINATION DE CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DE L'OXYTÉTRACYCLINE, DE LA TYLOSINE ET DE L'ASSOCIATION OXYTÉTRACYCLINE-TYLOSINE, EN MILIEU GÉLOSE VIS-À-VIS DE 18 SOUCHES RÉFÉRENCÉES D'ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE.**

**Dr Christophe BOSTVIRONNOIS**

LILLY-ELANCO

## **Introduction**

La présence de plus en plus répandue d'*Ornithobacterium rhinotracheale*, en production de dindes de chair en particulier, en France amène certains prescripteurs à utiliser différentes solutions de type antibiotiques. Si plusieurs antibiotiques sont effectivement efficaces individuellement in vitro sur ce germe, les pratiques terrains font que parfois certains utilisateurs souhaitent conforter le pronostic thérapeutique en associant plusieurs antibiotiques sensibles vis-à-vis de ce germe.

En particulier, il arrive classiquement d'associer de l'Oxytétracycline avec un antibiotique de la famille des macrolides : la Tylosine. Ce type d'association est tout à fait habituel dans d'autres productions (bovine, porcine) en particulier lors d'atteinte sévère et importante des fonctions respiratoires et il a pu être prouvé in vitro la pertinence de cette association puisque l'on obtient un véritable effet synergique entre ces deux molécules.

A ce jour, en production de volailles de chair, aucun travail n'a été publié sur l'intérêt d'une association Tylosine - Oxytétracycline dans le cadre du contrôle d'une pathologie respiratoire et a fortiori sur *Ornithobacterium rhinotracheale* de la dinde de chair.

L'objectif de cette étude est bien de valider en conditions laboratoire et in vitro si la synergie déjà démontrée entre la Tylosine et l'Oxytétracycline en pathologie respiratoire sur des germes et des espèces différentes est également valable dans le cadre d'une maîtrise d'*Ornithobacterium* de la dinde à partir de 18 souches référencées isolées dans le bassin de production « Grand Ouest ».

## **Matériels et Méthodes**

Ceux-ci ont été exposés dans l'intervention précédente (Etude de l'association Oxytétracycline-Lincomycine et Oxytétracycline-Tylosine vis-à-vis d'*Ornithobacterium rhinotracheale* isolé chez la Dinde. Méthodes de détermination et résultats par D. Martin, A. Restif et J.-L. Pinsard). Les matériels et méthodes ne seront donc pas développés dans cet article.

## Résultats

### 1. Résultats des diamètres d'inhibition de l'Oxytétracycline et de la Tylosine en fonction des souches

Numéro de la souche	Département	Oxytétracycline		Tylosine	
		Diamètre d'inhibition en mm	Interprétation	Diamètre d'inhibition en mm	Interprétation
1	35	37,26	Sensible	35,35	Sensible
2	35	38,46	Sensible	33,22	Sensible
3	53	38,63	Sensible	33,51	Sensible
4	35	40	Sensible	33,51	Sensible
5	35	24,46	Sensible	35,30	Sensible
6	44	36,6	Sensible	33,10	Sensible
7	53	15,95	Résistant	26,67	Sensible
8	35	17,16	Intermédiaire	27,69	Sensible
9	53	18,51	Intermédiaire	23,83	Sensible
10	53	32,31	Sensible	27,62	Sensible
11	29	28,25	Sensible	38,93	Sensible
12	22	25,65	Sensible	34,23	Sensible
13	56	18,52	Intermédiaire	26,98	Sensible
14	56	31,1	Sensible	22,96	Sensible
15	56	22,73	Sensible	30,07	Sensible
16	22	16,51	Résistant	25,35	Sensible
17	56	28,34	Sensible	26,81	Sensible
18	56	13,75	Résistant	23,64	Sensible

Les diamètres d'inhibition des souches testées pour l'Oxytétracycline varient entre 13,75 mm et 40 mm, elles balayent une large variété de sensibilité avec 3 souches résistantes, 3 souches intermédiaires et 12 souches sensibles. Pour la Tylosine par contre, toutes les souches testées étaient sensibles avec des diamètres d'inhibition variant entre 22,96 mm et 38,93 mm.

### 2. Détermination des C.M.I. respectives de l'Oxytétracycline et de la Tylosine

La zone des C.M.I. balayées a été définie de 0,0075 µg/ml à 4 µg/ml pour la Tylosine avec une dilution de 2 en 2 et de 0,06 µg/ml à 8 µg/ml pour l'Oxytétracycline avec une dilution de 2 en 2 également à partir de données bibliographiques.

Le F.I.C. ou Fraction Inhibitrice de la Concentration est le résultat d'un calcul réalisé sur chaque souche d'*Ornithobacterium* :

$$\begin{aligned} \text{F.I.C.} &= \text{F.I.C. Oxytétracycline} + \text{F.I.C. Tylosine} \\ &= (\text{C.M.I. OTC associée à la Tylosine} / \text{C.M.I. OTC seule}) + (\text{C.M.I. Tylosine associée à} \\ &\quad \text{l'Oxytétracycline} / \text{C.M.I. Tylosine seule}) \end{aligned}$$

Le F.I.C. retenu sera le F.I.C. minimum résultant des C.M.I. minimales obtenues lors de l'association de chacun des 2 antibiotiques.

Les résultats ont été les suivants :

Numéro de la souche	Dpt	C.M.I.		Détermination du F.I.C. minimum	Interprétation
		Oxytétracycline	Tylosine		
1	35	0,5	0,25	0,75	Synergie
2	35	0,5	0,5	0,56	Synergie
3	53	0,5	0,25	0,75	Synergie
4	35	0,5	0,25	0,75	Synergie
5	35	8	0,25	0,62	Synergie
6	44	0,5	0,25	0,75	Synergie
7	53	>8	>4	NC	Synergie*
8	35	>8	4	NC	Synergie*
9	53	>8	4	NC	Synergie*
10	53	0,5	0,25	0,75	Synergie
11	29	8	0,25	0,62	Synergie
12	22	8	0,25	0,62	Synergie
13	56	>8	0,25	NC	Synergie*
14	56	1	4	0,52	Synergie
15	56	8	0,25	0,75	Synergie
16	22	>8	>4	NC	Addition*
17	56	4	0,015	0,56	Synergie
18	56	>8	>4	NC	Addition*

NC : Non-Calculable

\* : du fait de l'apparition de zones d'inhibitions sur l'échiquier lors des dilutions respectives

L'interprétation des F.I.C. (Fraction Inhibitrice des Concentrations) permet de donner les niveaux de compatibilité des deux antibiotiques sur *Ornithobacterium rhinotracheale*. Il s'avère qu'on observe au final sur les 18 germes :

- Une synergie entre la Tylosine et l'Oxytétracycline (F.I.C. < ou = à 0,75 ou apparition de zones d'inhibitions suffisantes sur l'échiquier des dilutions) dans 16 cas sur 18 soit 89 % des cas ;
- Une addition entre la Tylosine et l'Oxytétracycline (F.I.C. > 0,75 et < ou = à 1 ou apparition de zones d'inhibitions suffisantes sur l'échiquier) dans les 2 cas restant soit 11 % et donc a fortiori sur les 16 autres souches, soit 100 % des souches testées ;
- Aucun cas d'indifférence (1 < F.I.C. < ou = 2) ;
- Aucun cas d'antagonisme ( F.I.C. > 2).

### 3. Validation de la correspondance entre C.M.I. et diamètres d'inhibition de la Tylosine

Les résultats présentés permettent de vérifier la cohérence entre les deux types de données et de calculer une droite de régression à partir de ces données (Tableaux 1 et 2). Celle-ci a pour formule :

$$\text{Diamètre d'inhibition} = -1,0413 \text{ C.M.I.} + 32,214$$

Compte-tenu des bornes des seuils intermédiaire et des seuils de résistance (18 et 13 mm respectivement), les C.M.I. correspondantes seraient de 13,7 et 18,5 µg/ml respectivement ce qui est

cohérent avec les concentrations tissulaires atteignables avec la Tylosine. Il apparaît donc à ce jour que la droite de régression actuellement utilisée par les laboratoires d'analyses est cohérente avec *Ornithobacterium rhinotracheale* et que les bornes de sensibilité sont correctes.

Une telle analyse demande toutefois une quantité beaucoup plus importante de souches (une centaine en principe), pour pouvoir être établie de manière certaine et demanderait à être affinée.

#### **4. Validation de la correspondance entre C.M.I. et diamètres d'inhibition de l'Oxytétracycline**

Ce point est évoqué par un autre intervenant plus en détails dans un autre article et ne sera donc pas développé ici.

#### **5. Relation entre les C.M.I. de la Tylosine et de l'Oxytétracycline**

Une telle étude permet de visualiser si les C.M.I. de ces deux antibiotiques sont dépendantes ou non et si les profils de sensibilité correspondent. Là encore une comparaison des deux données de C.M.I. pour chacun des germes donne une droite de régression dont le  $R^2$  est faible (0,34) : il n'y a pas de lien entre les deux antibiotiques dans leur profil de sensibilité vis-à-vis d'*Ornithobacterium rhinotracheale*.

### **Discussion**

#### **1. Sensibilité de la Tylosine sur *Ornithobacterium***

Cette étude, nonobstant les autres résultats, a permis de valider la très bonne sensibilité de la Tylosine sur *Ornithobacterium rhinotracheale* qui a par ailleurs été confirmée dans de nombreuses études. Les diamètres d'inhibition étaient tous dans la zone «sensible» et ceci a pu être confirmé par les C.M.I. in vitro qui se sont révélées très basses avec une C.M.I. 50 de 0,25 µg/ml ce qui est bien en deçà des niveaux atteignables au niveau tissulaire. Cette étude a permis de confirmer l'intérêt de la Tylosine dans la lutte contre ce germe en pathologie respiratoire des volailles.

#### **2. Intérêt de l'association Oxytétracycline – Tylosine**

Ce n'est qu'une demi-surprise que de voir qu'il existe une réelle synergie in vitro entre ces deux antibiotiques. Ceci a pu être montré à de multiples reprises entre ces deux antibiotiques en pathologie respiratoire. Par contre, c'est la première fois que cela peut être montré in vitro sur un germe spécifique des volailles.

Les résultats ont montré une absence d'antagonisme, une absence d'indifférence, une addition dans 100 % des cas et une synergie dans 89 % des cas. L'association des deux antibiotiques est tout à fait sécuritaire quant au pronostic de l'infection et chacun des deux antibiotiques vient renforcer l'action de l'autre.

Un point intéressant provient de certaines souches testées, en particulier les numéros 7-8 et 18 qui étaient jugées « résistantes » par la méthode des disques diffusion et les 8-9 et 13 qui étaient jugées « intermédiaires » vis-à-vis de l'Oxytétracycline.

La synthèse est résumée dans le tableau ci-après :

NC : Non-Calculable

Numéro de la souche	Résultat de la méthode disque diffusion en Oxytétracycline	Résultat de la méthode disque diffusion en Tylosine	Détermination du F.I.C. minimum	Interprétation
7	Résistante	Sensible	NC	Synergie
8	Résistante	Sensible	NC	Synergie
9	Intermédiaire	Sensible	NC	Synergie
13	Intermédiaire	Sensible	NC	Synergie
16	Intermédiaire	Sensible	NC	Addition
18	Résistante	Sensible	NC	Addition

Bien que le F.I.C. n'ait pu être déterminé car l'échiquier ne couvrait pas la zone de C.M.I. > 8 pour l'Oxytétracycline, il est apparu malgré tout des zones d'inhibition bactérienne à des niveaux de C.M.I. < ou = à 8 µg/ml lors d'association avec la Tylosine : tout se passe comme si la Tylosine potentialisait l'Oxytétracycline et comme si la résistance à l'Oxytétracycline n'était pas absolue mais relative lors de l'association avec la Tylosine tant et si bien que même sur des souches résistantes ou intermédiaires, on observe au moins une addition des effets antibiotiques dans 33 % des cas et une synergie dans 66 % des cas.

### 3. Indépendance des deux antibiotiques

Il a été comparé le profil de sensibilité à travers les diamètres de diffusion de ces deux antibiotiques afin de voir s'ils étaient comparables. En fait, cette analyse a conduit à une courbe de régression de faible  $R^2$  (0,34). Ces deux antibiotiques ne possèdent pas au vu de ces souches une corrélation de sensibilité, ce qui va dans le sens d'un meilleur pronostic lors d'association et vers des modes de résistance différents envers l'Oxytétracycline ce qui correspond aux données bibliographiques.

## **Conclusion**

Cette étude *in vitro* a confirmé et a permis de mieux cerner l'efficacité de la Tylosine sur *Ornithobacterium rhinotracheale* et la pertinence de l'association avec l'Oxytétracycline qui permet une réelle synergie entre les deux antibiotiques dans 89 % des cas et une addition dans les 11 % restants.

Elle met en valeur la pertinence des analyses de laboratoire. Un point important est qu'elle permet, au-delà de la simple classification Résistant / Intermédiaire / Sensible, d'associer un diamètre d'inhibition à une posologie antibiotique et à une association antibiotique éventuelle qui autorisera, si elle est raisonnée, une amélioration du pronostic, de l'issue, et des conséquences économiques et de bien-être de cette pathologie en développement croissant sur le plan international. C'est aussi peut-être pour demain une adaptation des schémas de prescription selon les résultats chiffrés des antibiogrammes.

## **Remerciements**

A Damien Martin et Jean-Louis Pinsard pour l'excellent travail accompli par eux-mêmes et leur équipe et les compétences techniques mises en œuvre.

A Jean Léorat pour nous avoir apporté les moyens techniques et l'idée de réaliser cette étude.

## Bibliographie

1. Back A. et al. - Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys - *The Veterinary Record* (1998) 143, 52-53
2. Chéritel P., Léorat J. - *Ornithobacterium rhinotracheale* confirmé par sérologie - *Filières Avicoles* - Janvier 1998
3. De Herdt P. et al. - The relevance and efficacy of *Ornithobacterium rhinotracheale* control in chickens - *World Poultry* - Elsevier volume 17, n°10.01
4. *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires* (12ème édition) Editions du Point Vétérinaire, 2003.
5. *Filières Avicoles - Ornithobacterium rhinotracheale* incriminé dans les troubles locomoteurs - *Filières Avicoles* - Octobre 2001
6. Ganière J.P. - Cinétique de bactéricidie de l'association Tylosine-Oxytétracycline vis-à-vis de souches de pasteurelles d'origine bovine - *Rapport d'étude* - 1994
7. Lafay D. - *Ornithobacterium rhinotracheale* : Pathogénicité et importance en médecine vétérinaire - Thèse ENVT : 2000- TOU3 - 4004
8. Léorat J., Roger M.F. - *Ornithobacterium rhinotracheale* est mieux maîtrisé - *Filières Avicoles* - Juin 1997
9. Lopes VC et Al. - Survival of *Ornithobacterium rhinotracheale* in sterilized poultry litter - *Avian Disease* 46:1011-1014,2002
10. Prescott JF, Baggot J.D., Walker R.D. - *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* - Third Ed. - 2000
11. Souillard R. - Observations de cas de ténosynovites à *Ornithobacterium rhinotracheale* dans des élevages de dindes de chair en Bretagne - Thèse ENVT : 2002-TOU3-4013
12. Sprenger S.J. et al. - *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection in turkeys : experimental reproduction of the disease - *Avian Disease* 42 : 154-161, 1998
13. Van Empel Paul et al. - Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale* - *Avian Diseases* 40:858-864, 1996
14. Van Veen L. - Do we know the real impact of *Ornithobacterium rhinotracheale* infections ? - *Poultry international*, May 2003-06-27
15. Varga J. et al. - Characterisation of some *Ornithobacterium rhinotracheale* strains and examination of their transmission via eggs - *Acta Veterinaria Hungarica* 49 (2), pp. 125-130 (2001).

# **SYNERGIE DE L'ASSOCIATION LINCOMYCINE – OXYTÉTRACYCLINE SUR ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE**

**Dr Françoise PICHARD**

PFIZER

## **Résumé**

Cette étude a été réalisée sur 20 souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) isolées en France dans le Grand Ouest, au cours de l'année 2002. Les prélèvements provenaient de dindes soumises à l'autopsie pour pathologie respiratoire. La méthode utilisée a été celle de l'échiquier. Elle a permis de mettre en évidence la synergie existant entre l'Oxytétracycline et la Lincomycine. Dans l'association, la CMI de l'Oxytétracycline a été divisée par 2 à 16 et celle de la Lincomycine par 2 à 66.

Référence : D-V-4006-125-IN-Février 2003

## **Introduction**

*Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) est responsable de pertes économiques importantes dans les élevages de dindes par mortalité ou par saisie de carcasse à l'abattoir. Elle a un tropisme respiratoire et locomoteur<sup>4</sup>. Les lésions post-mortem prédominantes sont une aérosacculite et une pneumonie fibrinopurulente. Cette pathologie a été bien décrite et ORT constamment isolée en culture pure et abondante, depuis une dizaine d'année, dans la plupart des pays producteurs de volailles (France, Royaume Uni, Allemagne, Etats-Unis, Canada, etc.)<sup>1,4,10,13,14,15,16,19</sup>. ORT est une bactérie Gram négatif longtemps apparentée aux pasteurelles<sup>7,11</sup>. Varga & Van Veen ont étudié sa sensibilité aux antibiotiques et son évolution<sup>6,17,18</sup>. Aucune spécialité pharmaceutique ne possède d'AMM spécifique sur cette indication. Le traitement le plus courant en pratique est l'Oxytétracycline, parfois associé à des macrolides ou apparentés dans les cas graves.

La Lincomycine est un antibiotique de la famille des Lincosamides, un apparenté macrolide. Elle possède une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en volaille en France sous sa forme poudre orale soluble Lincocine<sup>®</sup> 40% contre l'entérite nécrotique et sous sa forme injectable en association avec la Spectinomycine, Linco-Spectin<sup>®</sup> sur l'aéro-sacculite et la pathologie respiratoire des volailles.

## **Objectif**

Le but de cette étude était d'étudier in vitro la sensibilité d'*Ornithobacterium rhinotracheale* à l'association Lincomycine - Oxytétracycline.

## **Matériels et méthodes**

### **1. Laboratoire**

L'étude a été réalisée au laboratoire Bio-Chêne Vert de Châteaubourg.

## 2. Les souches

20 souches d'ORT issues d'une souchothèque ont été testées. Elles provenaient de dindes soumises à l'autopsie pour des troubles respiratoires. Elles ont été choisies de manière à assurer une large dispersion des élevages sur tout le Grand-Ouest

Tableau 1 : origine des souches

Espèce	Pathologie	Age	Département	Nombre
Dinde	Respiratoire	76 jours +/- 44 jours mini = 36 j maxi = 245 j	22	1
			29	1
			35	5
			44	1
			50	3
			53	3
			56	5
			72	1

Des tests de vérification (oxydase/catalase) et un dénombrement ont été réalisés sur chaque souche avant la réalisation des CMI.

Deux souches bactériennes témoins ont été incluses dans chaque série de tests : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible à l'Oxytétracycline et à la Lincomycine) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible à l'Oxytétracycline et résistant à la Lincomycine).

Un antibiogramme a été réalisé sur chaque souche par la méthode de diffusion en milieu gélosé, selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie<sup>5</sup>, avec les conditions particulières nécessaires à ORT et mentionnées dans la bibliographie. Le milieu gélose a été supplé menté à 5 % avec du sang de Mouton et l'incubation réalisée pendant 48 heures à 37°C en atmosphère enrichie avec 5 % de CO<sub>2</sub>. La lecture du diamètre d'inhibition a permis de déterminer l'antibio-sensibilité. Il n'y a actuellement pas de méthode standard pour ORT aussi le choix a été fait selon les critères habituellement utilisés par ce laboratoire d'analyses.

Une CMI a été extrapolée pour chaque souche à partir du diamètre lu.

## 3. La méthode

La méthode retenue est celle de l'échiquier<sup>3,11</sup>. Bien que longue à mettre en place, elle est simple à réaliser et à interpréter. Elle a donné lieu à plusieurs publications la comparant aux autres méthodes disponibles<sup>9,12,20</sup>. Il n'existe aucune méthode de référence mais d'après Berenbaum, c'est la méthode de choix pour l'étude de la synergie de deux antibiotiques bactériostatiques comme la Lincomycine et la Tétracycline<sup>2</sup>.

Le choix de la galerie de dilution a été fait en tenant compte des CMI estimées, selon les règles de la méthode de l'échiquier. Après pesée, chacun des 2 antibiotiques a été dissout dans le solvant approprié afin d'obtenir les solutions mères. Après filtration, celles-ci ont été diluées avec de l'eau déminéralisée stérile pour obtenir les différentes concentrations de la gamme désirée. (cf tableau 2). L'inoculum a été préparé par mise en suspension de colonies obtenues à partir d'une culture de 48 heures sur gélose au sang, afin d'obtenir une suspension d'environ 10<sup>7</sup> bactéries par ml.

Le multi-inoculateur a été utilisé pour répartir 1 µl des différents inoculums.

Après incubation à 37°C pendant 48 heures en étuve à CO<sub>2</sub> en atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>, les CMI ont été lues. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) retenue est la concentration d'antibiotique(s) la plus faible inhibant toute culture visible à l'œil nu.

\*mg/ml

Tableau 2 : schéma de distribution des antibiotiques (concentrations finales)

Lincomycine		Oxytétracycline (mg/ml)							
		0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
16 souches	0,016	0,06-0,016	0,12-0,016	0,25-0,016	0,5-0,016	1-0,016	2-0,016	4-0,016	8-0,016
	0,03	0,06-0,03	0,12-0,03	0,25-0,03	0,5-0,03	1-0,03	2-0,03	4-0,03	8-0,03
	0,06	0,06-0,06	0,12-0,06	0,25-0,06	0,5-0,06	1-0,06	2-0,06	4-0,06	8-0,06
	0,12	0,06-0,12	0,12-0,12	0,25-0,12	0,5-0,12	1-0,12	2-0,12	4-0,12	8-0,12
	0,25	0,06-0,25	0,12-0,25	0,25-0,25	0,5-0,25	1-0,25	2-0,25	4-0,25	8-0,25
	0,5	0,06-0,5	0,12-0,5	0,25-0,5	0,5-0,5	1-0,5	2-0,5	4-0,5	8-0,5
	1	0,06-1	0,12-1	0,25-1	0,5-1	1-1	2-1	4-1	8-1
	8	0,06-8	0,12-8	0,25-8	0,5-8	1-8	2-8	4-8	8-8
	16	0,06-16	0,12-16	0,25-16	0,5-16	1-16	2-16	4-16	8-16
	32	0,06-32	0,12-32	0,25-32	0,5-32	1-32	2-32	4-32	8-32
	64	0,06-64	0,12-64	0,25-64	0,5-64	1-64	2-64	4-64	8-64
	128	0,06-128	0,12-128	0,25-128	0,5-128	1-128	2-128	4-128	8-128
	256	0,06-256	0,12-256	0,25-256	0,5-256	1-256	2-256	4-256	8-256
	512	0,06-512	0,12-512	0,25-512	0,5-512	1-512	2-512	4-512	8-512

#### 4. Interprétation (FIC)<sup>8,11</sup>

Les CMI ont été enregistrées et les index FIC (fraction de concentration inhibitrice) calculés pour chaque souche ORT.

- FIC OTC = (CMI de OTC avec LINCO) / (CMI de OTC seule)
- FIC LINCO = (CMI de LINCO avec OTC) / (CMI de LINCO seule)
- FIC = FIC OTC + FIC LINCO

##### Interprétation

- FIC < 0,75 : synergie
- FIC = 1 : effet additif
- 1 < FIC < 2 : indifférence
- 2 < FIC : antagonisme

## Résultats

\*(mg/ml)

Référence des souches	CMI OTC	CMI Linco	CMI association	Réduction CMI association	Index FIC	Interprétation
16454	8	0,25	1-0,125	8 - 2	0,63	SYNERGIE
15631	1	0,25	0,5-0,06	2 - 4	0,75	
15189	0,5	0,5	0,12-0,25	4 - 2	0,75	
12175	8	0,5	2-0,25	4 - 2	0,75	
7370	8	0,25	1-0,03	8 - 8	0,25	
5560	>8	>1	2-0,12	8 - 20	<0,2	
4700	4	0,5	1-0,25	4 - 2	0,75	
4105	8	0,25	2-0,12	4 - 2	0,75	
2868	8	0,25	2-0,12	4 - 2	0,75	
3649	>8	>1	2-0,06	8 - 33	<0,2	
3159	8	0,25	2-0,03	4 - 8	0,37	
3669	4	0,25	2-0,03	2 - 8	0,62	
3357	8	0,25	1-0,12	8 - 2	0,6	
3174	>8	>1	2-0,03	8 - 66	<0,2	
16457	>8	> 512	2 - 512	8 - 2	0,6	
12896	>8	> 512	1 - 128	16 - 8	<0,2	
3015	>8	> 512	1 - 128	16 - 8	<0,2	
6083	8	0,25	4-0,12	2 - 2	1	ADDITION
4986	1	0,5	0,5-0,25	2 - 2	1	
3201	2	> 512	1 - 512	2 - 2	1	

Il y a addition pour 3 souches et synergie pour 17 souches sur 20.

Dans l'association, la CMI de chaque antibiotique a été diminuée d'un facteur 2 à 16 pour l'Oxytétracycline et d'un facteur 2 à 66 pour la Lincomycine.

## Discussion

Cette étude a permis de montrer la synergie existant in vitro entre la Lincomycine et l'Oxytétracycline sur ORT. Cette synergie a par ailleurs déjà été montrée sur des souches de *Pasteurella multocida* et d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* d'origine porcine (étude LDA 22 - 1993 - Upjohn). Or *Ornithobacterium rhinotracheale* a été classée dans le groupe des pseudo-Pasteurelles jusqu'en 1994 puis dans la famille des Flavobacteriaceae<sup>11</sup>. Cette proximité permettait d'émettre l'hypothèse d'une similitude entre les deux cas.

Cependant, pour espérer une efficacité clinique, les CMI de l'association in vitro doivent être plusieurs fois supérieures aux concentrations effectivement obtenues in vivo aux sites d'infection. De plus, l'efficacité ne peut être démontrée que par des épreuves cliniques. Nous ne disposons pas de données de pharmacocinétique pour l'oxytétracycline par voie orale. Nous disposons en revanche de données de concentrations pulmonaires et d'efficacité clinique dans la pathologie respiratoire des volailles pour la Lincomycine administrée dans sa forme associée à la Spectinomycine, Linco-Spectin®, pour la formulation injectable (AMM en France) et pour la formulation poudre orale soluble (pas d'AMM en France, AMM dans d'autres pays)

## Conclusion

Cette étude de l'association Lincomycine - Oxytétracycline sur 20 souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* isolées sur des dindes malades, a mis en évidence une synergie in vitro dans la majorité des cas (17/20) et une addition dans les autres (3/20). Même si cela ne présage pas, a priori, d'une activité supérieure in vivo, cela encourage cependant à mettre des essais en place pour valider l'intérêt de cette association dans le traitement de cas graves d'arthrite et/ou d'aérosacculite due à *Ornithobacterium rhinotracheale*.

## Références bibliographique

1. Abdul-Aziz T.A. & al *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in a turkey flock in Ontario. *Can Vet J.* 1999 May; 40(5): 349-50.
2. Acar J. Antibiotic synergy and antagonism. *Med Clin North Am* 2000 Nov; 84(6): 1391-1406
3. Berenbaum M.C. A method for testing for synergy with any number of agents. *J Inf Dis* 1978 Feb; 137(2): 122-130.
4. Back A. & al. Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys. *Vet Rec.* 1998 Jul 11; 143(2): 52-3.
5. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Communiqué 2002.
6. Devriese L.A. & al. In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. *Vet Rec.* 1995 Oct 21; 137(17): 435-6
7. Hafez H.M. Current status on the laboratory diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" in poultry. *Berl Munch Tierarztl Wochnenschr.* 1998 Apr; 111(4): 143-5. Review
8. Hall M.J. & al The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Ant Chemother* 1983 May; 11(5): 427-433
9. Hsieh M. Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. *Diag Microb Inf Dis* 1993 May-Jun; 16(4): 343-9.
10. Joubert P. & al. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. *Avian Dis* 1999 Jul-Spe; 43(3):622-6

11. *Koneman et al Color atlas and textbook of diagnostic microbiology 5th Ed 1997 Lippincott.*
12. *Mackay M.L. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. Int.J.Micro.Agents 2000 Jul; 15(2): 125-9*
13. *Roepke D.C. et al Isolation and identification of Ornithobacterium rhinotracheale from commercial turkey flocks in the upper Midwest. Avian Dis. 1998 Jan-Mar; 42(1): 219-21.*
14. *Sakai E., Ornithobacterium rhinotracheale infection in Japan: preliminary investigations. Vet Rec 2000 Apr 22; 146(17): 502-3*
15. *Soriano V.E. et al, Identification and characterization of Ornithobacterium rhinotracheale isolates from Mexico. Avian Dis 2002 Jul-Sep; 46(3): 686-90*
16. *Sprenger S.J., Ornithobacterium rhinotracheale infection in commercial laying-type chickens, Avian Dis.2000 Jul-Sep; 44(3): 725-9*
17. *Varga J. et al. Characterisation of some Ornithobacterium rhinotracheale strains and examination of their transmission via eggs. Acta Vet Hung 2001; 49(2): 125-30*
18. *van Veen L. In vitro antibiotic sensitivity of strains of Ornithobacterium rhinotracheale isolated in The Netherlands between 1996 and 1999. Vet Rec.2001 Nov 17; 149(20): 611-3*
19. *van Veen L. Ornithobacterium rhinotracheale a primary pathogen in broilers. Avian Dis 2000 Oct-Dec; 44(4): 896-900.*
20. *White R.L. et col. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E test. Antim.Agents & chem. Aug 1996; 40(8): 1914-1918.*

#### LINCOCINE® 40% poudre soluble

Poudre orale. **COMPOSITION** : Lincomycine (sous forme de chlorhydrate) : 40 g. Silice colloïdale 0,12 g. Lactose qs : 100 g. **INDICATIONS THERAPEUTIQUES** : Affections à germes sensibles à la lincomycine. Chez les porcs : traitement de l'entérite hémorragique à *Serpulina hyodysenteriae*. Chez les poulets : traitement préventif en milieu infecté des entérites nécrosantes à *Clostridium perfringens*. **VOIE ET MODE D'ADMINISTRATION** : voie orale. La poudre orale doit être diluée dans l'eau de boisson. L'eau additionnée de lincocine poudre soluble sera la seule source d'eau potable; une nouvelle solution sera préparée chaque jour. **POSOLOGIE** : porcs : 5 mg / kg / jour de lincomycine pendant 10 jours. Poulets : 3 mg / kg / jour de lincomycine pendant 7 jours. **CONTRE INDICATIONS** : Ne pas administrer aux animaux hypersensibles à la lincomycine. Ne pas administrer aux ruminants, aux chevaux, aux lapins. **EFFETS SECONDAIRES** : des selles molles peuvent être observées, ainsi que quelques cas de diarrhée ou d'œdème de l'anus en début du traitement. Ces troubles sont transitoires et disparaissent sans arrêt du traitement en 4 à 5 jours. **TEMPS D'ATTENTE** : viande et abats, porcs : 0 jour, poulets : 2 jours. **PRESENTATION** : Boîte de 150 g : AMM n° 673 220.1 du 30/01/95. Boîte de 1,5 kg : AMM n° 673 221.8 du 30/01/95. **LISTE I** : Usage Vétérinaire. A ne délivrer que sur ordonnance devant être conservée pendant la durée du temps d'attente du médicament. PFIZER 23-25 rue du Dr Lannelongue F-75668 PARIS CEDEX 14

## LINCO-SPECTIN® 100

**COMPOSITION** : Lincomycine (sous forme de chlorhydrate) : 22,2 g. Spectinomycine (sous forme de sulfate) : 44,4 g. Benzoate de sodium q.s.p. 100 g. La boîte de 150 g de poudre contient 33,3 g de Lincomycine (sous forme de Chlorhydrate) et 66,7 g de Spectinomycine (sous forme de Sulfate) soit au total 100 g d'activité antibiotique. **INDICATIONS** : Porcs : Affections à germes sensibles à la Lincomycine et/ou à la Spectinomycine : Prévention de l'entérite hémorragique. Traitement de l'Adénomatose Intestinale Porcine (Iléite) à *Lawsonia Intracellularis*. **POSOLOGIE** : 10 mg / kg de PV et par jour soit 1 boîte de Linco-Spectin 100 pour 1.600 litres d'eau de boisson. Durée du traitement : Iléite, 7 jours. Entérite hémorragique, 8 à 10 jours. **PRÉCAUTION D'EMPLOI** : Linco-Spectin 100 est entièrement soluble dans l'eau. Pour obtenir une solution complète toujours ajouter l'eau à la poudre. **CONTRE-INDICATION** : Ne pas administrer aux ruminants, aux lapins et aux chevaux. **DÉLAI D'ATTENTE** : Animaux de boucherie : 7 jours. Présentation : Boîte de 150 g. A.M.M. 673 036.6 du 21/07/92. **LISTE 1** : A ne délivrer que sur ordonnance devant être conservée pendant la durée du temps d'attente du médicament. Usage Vétérinaire. PFIZER 23-25 rue du Dr Lannelongue F-75668 PARIS CEDEX 14

## LINCO-SPECTIN® Solution injectable.

**COMPOSITION** : Lincomycine (sous forme de chlorhydrate) : 5 g. Spectinomycine (sous forme de sulfate) : 10 g. Alcool benzylique : 0,9 g. Eau pour préparations injectables q.s.p.100 ml. **INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES** : Affections à germes sensibles à la lincomycine et à la spectinomycine chez les veaux, ovins, caprins, porcins, volailles, chats et chiens. **VOIE D'ADMINISTRATION** : intra-musculaire, sous cutanée. **POSOLOGIE** : **PORCS** : entérites hémorragiques et colibacillaires, infections mycoplasmiques, arthrites infectieuses. Voie intramusculaire uniquement : 1 ml pour 10 kg de poids. Renouveler si nécessaire 24 h plus tard pendant 5 jours maximum. **VOLAILLES** : MRC d'origine mycoplasmaïque associée ou non à *E.Coli*, aérosacculites, choléra aviaire, infections à Arizona. Voie sous-cutanée uniquement : 0,5 ml pour 2,5 kg de poids une fois par jour pendant 3 jours. **EFFETS SECONDAIRES** : un ramollissement des selles peut être observé; celui-ci cède sans intervention au bout de quelques jours. **CONTRE-INDICATIONS** : Hypersensibilité à la Lincomycine ou à la Spectinomycine. Ne pas administrer aux lapins et aux chevaux. **TEMPS D'ATTENTE** : Animaux de boucherie : 14 jours. Ne pas administrer aux volailles pondeuses dont les oeufs sont destinés à la consommation humaine. **PRÉSENTATION** : Flacon verre de 50 ml : AMM 672 949 8 du 30/06/1992. Flacon verre de 100 ml : AMM 672 950 6 du 30/06/1992. Flacon verre de 250 ml : AMM 675 789 1 du 30/06/1992. Liste I. Usage Vétérinaire. A ne délivrer que sur ordonnance devant être conservée pendant la durée du temps d'attente du médicament. . PFIZER 23-25 rue du Dr Lannelongue F-75668 PARIS CEDEX 14



# ***DINDE : PATHOLOGIE DIGESTIVE***

**Adénovirose de la dinde : étude terrain.**

DR STÉPHANE LEMIERE, MERIAL.

**Détermination de la date de vaccination Dindoral® :  
intérêt pratique.**

DR NATHALIE DOUBLET, SELVET-CONSEIL.

**Nouveaux éléments pronostiques  
et diagnostiques sur l'histomonose de la dinde.**

DR LIONEL ZENNER, ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON.

**Lutte intégrée contre les helminthes aviaires :  
relation entre Heterakis et Histomonas chez la dinde.**

DR MAARTEN DE GUSSEM, JANSSEN ANIMAL HEALTH, BEERSE BELGIQUE.

# **ADENOVIROSE DE LA DINDE : ÉTUDE TERRAIN**

**Stéphane LEMIERE**

MERIAL

**Nathalie DOUBLET, Eric CHATAIGNER**

SELVET CONSEIL - CHÂTEAUBOURG

**Jean LÉORAT, Armel BONNETÉ**

SELVET CONSEIL - BIGNAN

## **Introduction**

L'adénovirose de la dinde ou Entérite Hémorragique (EH) est une maladie virale causée par un adénovirus, Hæmorrhagic Enteritis Virus (HEV.) Cet adénovirus est classé dans le groupe II comprenant notamment également le virus de la rate marbrée du faisane. Le groupe I par opposition comprend des adénovirus présentant un antigène d'un groupe différent des adénovirus du groupe II (virus Chicken Embryo Lethal Orphan, CELO, et autres adénovirus affectant l'espèce Gallus.) L'incubation du virus est d'environ 5-6 jours. La transmission du virus est uniquement horizontale. Le virus est éliminé par les fientes et peut résister plusieurs semaines en théorie dans les cadavres. La maladie apparaît brutalement sous sa forme suraiguë et dure le plus souvent entre 6 à 10 jours. Les dindes présentant une diarrhée hémorragique soit meurent (5-10 %, voire plus) soit se rétablissent définitivement. La partie terminale du tube digestif des dindes à l'autopsie présente une couleur gris-bleu et contient du sang coagulé noirâtre. La muqueuse duodénale est congestive et hémorragique. La rate est hypertrophiée. La mise en œuvre d'un programme vaccinal permet le contrôle de cette forme de la maladie. Dans les conditions du terrain il est décrit aussi une forme subaiguë de la maladie présentant un tableau clinique associant au niveau lésionnel une splénomégalie et une hépatomégalie à l'origine d'une mortalité le plus souvent entre 7 et 9 semaines d'âge (syndrome « gros foie grosse rate. ») La mortalité est le plus souvent inférieure à 5 %. Les résultats d'analyses sérologiques ELISA EH et de bactériologie (isolements non spécifiques de germes tels qu' Escherichia coli, Pseudomonas sp., Pasteurella multocida, Ornithobacterium rhinotracheale, etc.) pourraient orienter les hypothèses d'étiologie vers l'implication éventuelle d'adénovirus de type II et d'expression clinique plutôt des propriétés immunosuppressives du virus, bien que la vaccination à vaccin vivant atténué soit largement répandue, mais non systématiquement appliquée ou parfois appliquée avec défaut dans la maîtrise de la technique d'administration utilisant l'eau de boisson. Un isolement d'adénovirus de type II à partir de rates de dindes montrant à l'autopsie le tableau lésionnel montre que dans 12 % des cas il est mis en évidence la souche vaccinale Domermuth. Il est, à ce stade de la connaissance de ce syndrome « gros foie grosse rate » impossible d'impliquer le HEV (prélèvements J. Léorat et analyses Merial, données non-publiées.) Au niveau microscopique les organes cibles de dindes présentant la symptomatologie de l'entérite hémorragique présentent pour les cellules réticulo-endothéliales de la rate des inclusions intranucléaires. Des infiltrations lymphocytaires sont montrées dans les tissus du tube digestif et du foie. La bourse de Fabricius présente une déplétion lymphocytaire. L'agent viral responsable a un pouvoir immunodépresseur qui favorise les infections secondaires à colibacilles notamment (Pierson et Al., 19961). Au point de vue mécanisme immunitaire il semble que les lymphocytes T (immunité à médiation cellulaire et immuno-modulation) et les monocytes circulants (phagocytose pour les macrophages dans les tissus et immuno-

modulation) sont impliqués directement dans les mécanismes d'interaction entre le virus et le système immunitaire. Les lymphocytes B (immunité à médiation humorale) seraient directement la cible du virus (Suresh et Al., 19952, Rautenschlein et Al., 19983.) Les dindes sont sensibles au virus HEV dans les conditions du terrain généralement entre 6 et 12 semaines d'âge. Les dindonneaux semblent être réfractaires au virus avant 3-4 semaines d'âge à cause de la présence d'anticorps d'origine maternelle qui peuvent être présents jusqu'à l'âge de 6 semaines (Fadly et Al., 19894). En l'absence d'anticorps d'origine maternelle les dindonneaux semblent sensibles à une infection à adénovirus de type II. Néanmoins il est décrit une période réfractaire de l'éclosion à 13 jours d'âge durant laquelle une absence de possibilité d'infection chez le dindonneau sans anticorps d'origine maternelle (Fadly et Al., 19825). Dans ce contexte il a été établi une étude de la cinétique du titre d'anticorps ELISA EH chez la dinde standard de chair dans les conditions du terrain de l'éclosion à J35 suivant la vaccination à J28 par voie orale utilisant le vaccin vivant atténué, souche Domermuth.

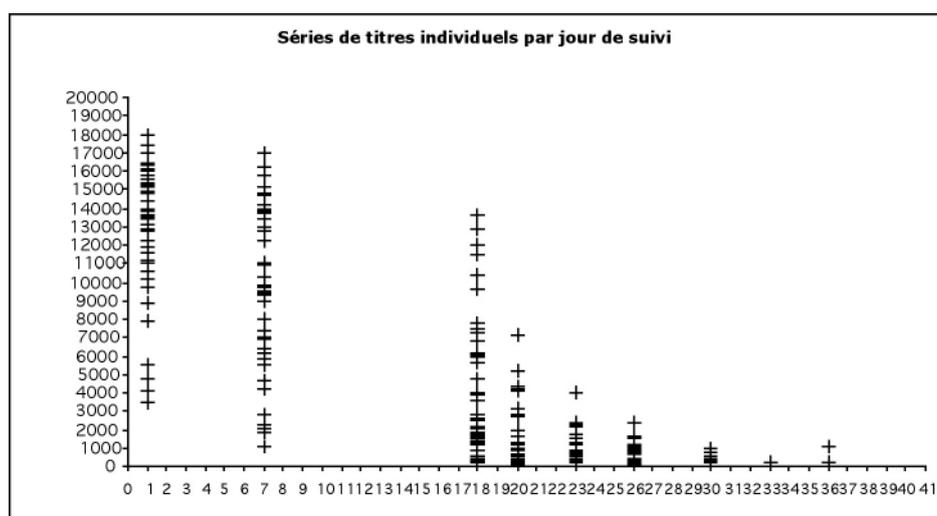
## Matériel et méthodes

Un essai de cinétique du titre ELISA EH est mis en œuvre dans un élevage de dindes en Bretagne situé dans une zone de production avicole intensive (Nord du département du Morbihan.) Un groupe de 40 dindonneaux parqués et marqués individuellement est constitué à part du troupeau. Les dindes reçoivent un vaccin EH à J28. Il s'agit du vaccin vivant atténué, souche Domermuth, Merial lot L70626. L'administration s'effectue par ajout de la suspension vaccinale reconstituée dans l'eau de boisson. Les 40 dindes marquées sont vaccinées à J28 en même temps que le reste du troupeau, le vaccin étant administré via l'eau de boisson. 40 prises de sang à 9 reprises dans le groupe d'animaux marqués individuellement : chaque série de prises de sang est effectuée suivant le calendrier suivant : J1, J8, J19, J21, J24, J27, J31. Un suivi sérologique sur les animaux après l'essai de cinétique est également effectué (prises de sang sur 20 dindes prises au hasard à J57 puis à J78). Les prises de sang sont centrifugées et les sérums sont analysés par le laboratoire Bio-Chêne Vert, ZI Bellevue 2, F-35221 Châteaubourg cedex). La technique ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay) est la technique de détection des anticorps anti-EH (Hemorrhagic enteritis virus antibody test kit, Symbiotics Corporation<sup>6</sup>, anciennement KPL) aussi bien chez les dindonneaux (anticorps d'origine maternelle) que chez les animaux vaccinés. Le titre en anticorps du sérum à tester dirigés contre l'adénovirus de type II responsable chez la dinde de l'entérite hémorragique est obtenu par une technique ELISA indirecte qui met en œuvre une réaction classique antigène-anticorps. L'analyse est effectuée dans le cadre du diagnostic (dépistage des élevages de dindes infectés) et de détermination du titre en anticorps d'origine maternelle chez le dindonneau. Les résultats sont exprimés sous la forme de titres individuels en anticorps. La densité optique (DO) est mesurée à 405-410 nm de longueur d'onde.  $Sp = (DO \text{ échantillon} - DO \text{ moyenne des échantillons témoins}) / (DO \text{ moyenne des échantillons positifs} - DO \text{ moyenne des échantillons témoins.})$  Le titre est calculé selon la formule suivante proposée par le fabricant de kit :  $\log_{10} \text{ titre} = (1,464 \log_{10} Sp) + 3,197$ . Le coefficient de variation est calculé sur les titres pour les séries effectuées par échantillonnage à J57 et à J78. Le seuil de positivité est de 147 selon les normes du laboratoire. Une cinétique des titres en anticorps suivis individuellement est établie. Les titres individuels sont calculés pour toutes les autres séries d'échantillons de J2 à J34. Ils serviront à l'établissement d'une cinétique type servant de référence pour l'établissement des programmes de vaccination de la dinde contre l'entérite hémorragique.

## Résultats

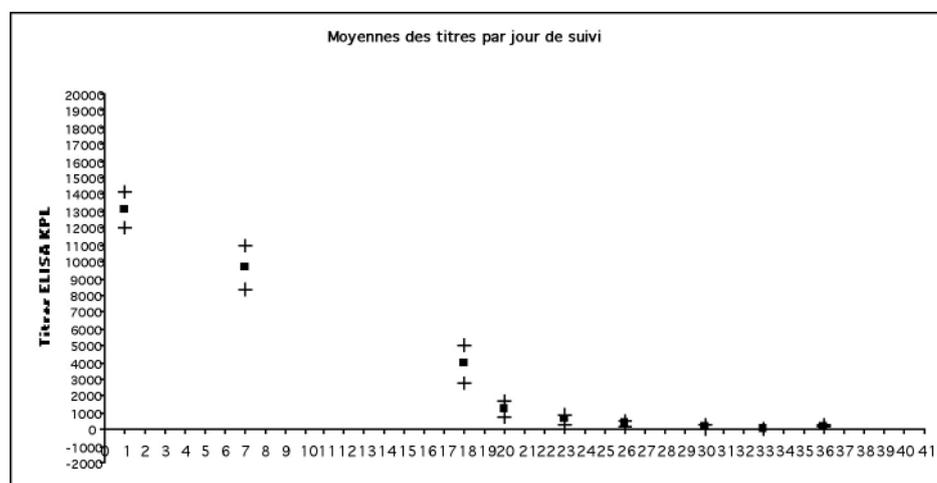
L'ensemble des titres ELISA EH à J2, J8, J19, J21, J24, J27, J31, J34 et J37 sont présentés sur le graphique (figure n°1, séries de titres individuels par jour de suivi). L'hétérogénéité des valeurs est telles que la valeur minimale à J2 est de 3485 (dinde n° 25) et la valeur maximale est de 17984 (dinde n° 26.) Le suivi individuel montre une variabilité attendue des résultats quelle que soit la date. 3 / 44 titres (soit 7 %) sont inférieurs à 5000. 4 / 44 titres (soit 9 %) sont compris entre 5000 et 10000. 19 / 44 titres (soit 43 %) sont compris entre 10000 et 15000. 18 / 44 titres (soit 41 %) sont supérieurs à 15000.

Figure n° 1 : séries de titres individuels par jour de suivi.



Les titres moyens (plus ou moins l'erreur type avec risque alpha égal à 5 %) montrent une décroissance durant la cinétique passant de 13084 +/- 1094 à J2 à 321 +/- 161 à J27 puis à 132 +/- 70 à J31. Le passage en-dessous du seuil de positivité apparaît entre J27 et J31. Les valeurs moyennes ont tendance à monter après J37 (figure n° 2, moyenne des titres par jour de suivi.) Il s'agit de la cinétique type pouvant servir de référence pour l'établissement de programmes de vaccination de la dinde contre l'EH. L'échantillon de 44 séries de sérums montre une grande variabilité à J2 (entre 3485 et 17984.)

Figure n° 2 : moyennes des titres individuels par jour de suivi.



La répartition des titres en 4 classes (<5000, compris entre 5000 et 10000, compris entre 10000 et 15000, >15000) permet de trier les valeurs et de détailler l'étude de la cinétique dans chacun des cas (titres très bas ou bas ou moyens ou élevés). Pour les titres très bas (3 / 44, <5000) le titre 0 est atteint à J21 (figure n° 3, titres <5000). Pour les titres bas (4 / 44, compris entre 5000 et 10000) le titre moyen 0 est atteint à J24 (figure n° 4, 5000 < titres < 10000). Pour les titres moyens (19 / 44, compris entre 10000 et 15000) à J27 le titre moyen est de 122 +/- 111 (en-dessous du seuil de positivité) et à J31 il est de 59 +/- 41 (figure n° 5, 10000 < titres < 15000). Pour les titres élevés, (18 / 44, > 15000) à J31 le titre moyen est de 260 +/- 89 et à J34 il est de 35 +/- 24 (figure n° 6, titres > 15000).

Figure n° 3 : titres <5000 (très bas).

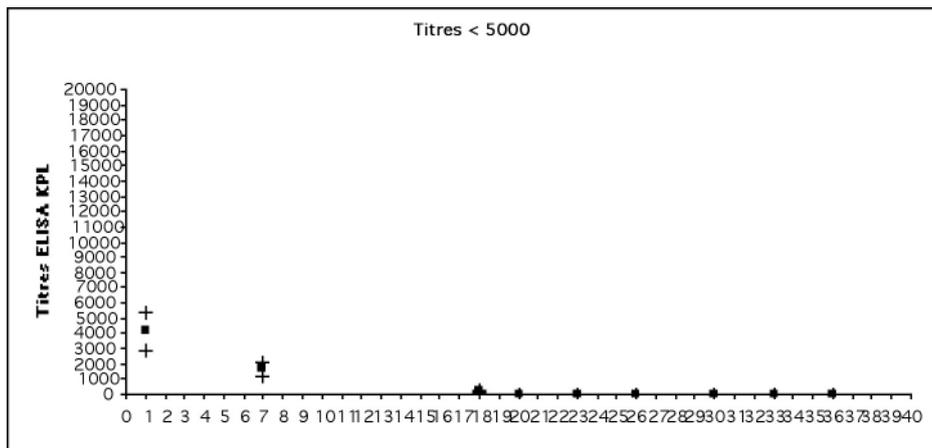


Figure n° 4 : titres compris entre 5000 et 10000 (bas).

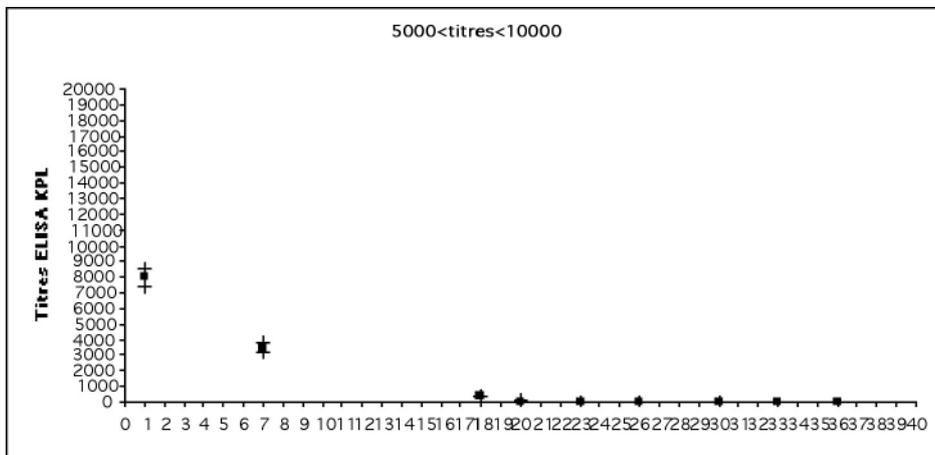


Figure n° 5 : titres compris entre 10000 et 15000 (moyens).

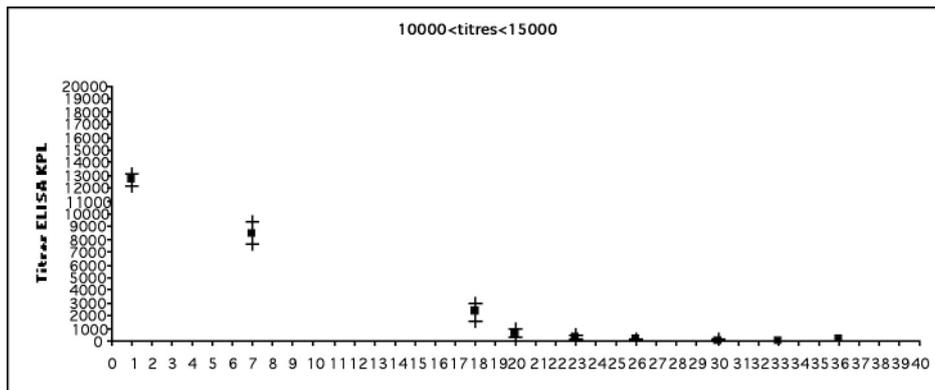
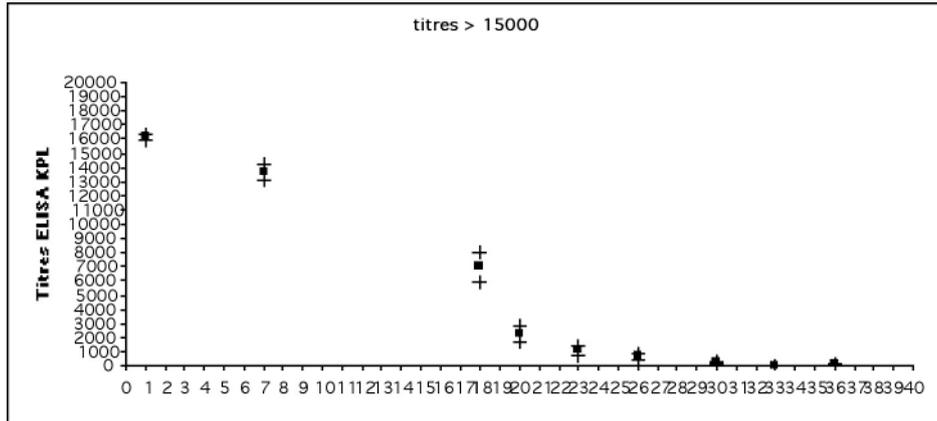


Figure n° 6 : titres > 15000 (élevés).

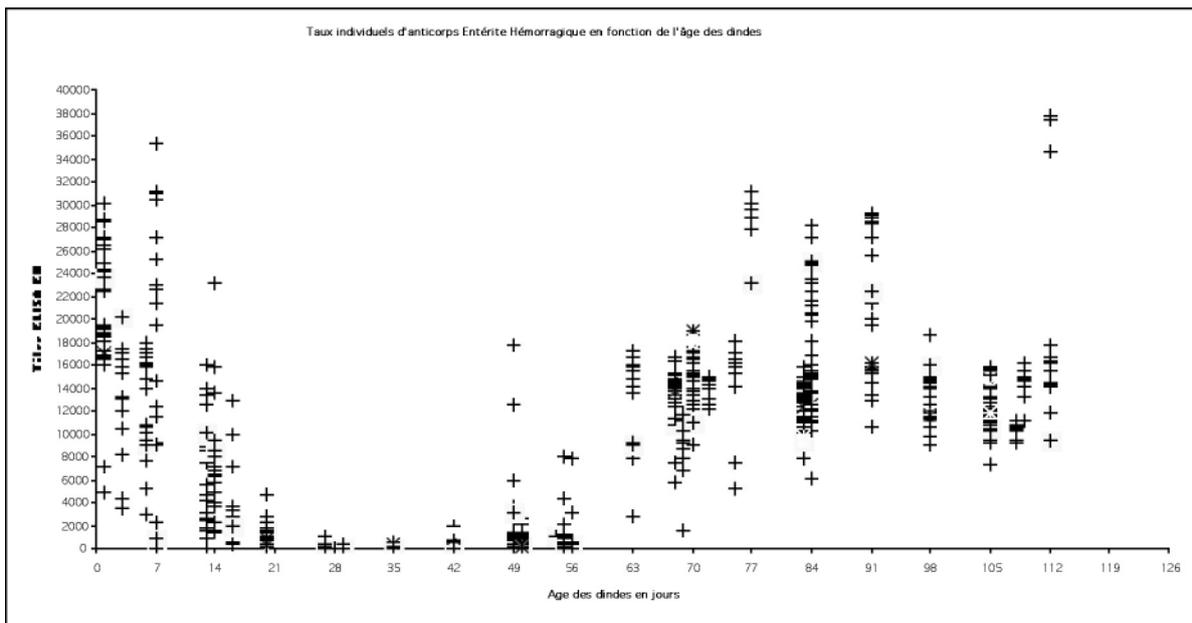


Le titre moyen ELISA sur 20 sérums de dindes prises au hasard à J57 est de 2540 avec un minimum de 1109 et un maximum de 6317. Le coefficient de variation de la série est de 53 %. A J78 le titre moyen ELISA sur 20 sérums de dindes prises au hasard est de 15770 avec un minimum de 7790 et un maximum de 20818. Le coefficient de variation de la série est de 21 %.

## Discussion

La cinétique de décroissance des anticorps d'origine maternelle est représentative des observations des récentes années en France. Les résultats compilés entre 1997 et 2001 représentés sous forme graphique (figure 7) montrent un minimum en moyenne entre J28 et J42 (décroissance des anticorps d'origine maternelle puis relais par anticorps produits suivant la prise vaccinale et passage de virus sauvage).

Figure n° 7 : suivi des titres individuels ELISA EH entre 1997 et 2001 (études Merial, non publiées).



Les titres en anticorps à J2 (pouvant être extrapolés à J1) sont des valeurs prédictives du profil de décroissance des anticorps d'origine maternelle. Plus ils sont élevés (par exemple classe supérieure à 15000) plus la date de disparition des anticorps susceptibles d'avoir un effet neutralisant in vivo (Fadly et Al., 1989) est tardive, le titre moyen étant de 260 +/- 89 à J31, titre très proche du seuil de positivité, ce qui est conforme aux résultats attendus. Dans le cas de titres très bas ou bas (<10000), le titre 0 est atteint entre J21 et J24. La date cible de J28 pour la date de vaccination est dans tous les cas de figure le meilleur compromis en l'absence de données de sérologie à J1. Il s'avère que la circulation du virus HEV dans les conditions du terrain, y compris chez les reproducteurs, est fréquemment observée. Ces données sont corroborées dans le cadre de cette étude par les résultats de sérologie obtenus à J57, date à laquelle est notée une séroconversion post-vaccinale avec valeur moyenne de titre de 2540 et coefficient de variation de 53 %. La moyenne des titres obtenus à J78 augmente pour atteindre la valeur de 15770 avec un coefficient de variation resserré de 21 %, montrant l'homogénéité de ces titres. Il est à noter qu'une symptomatologie de syndrome « gros foie, grosse rate » avec surinfection à E. coli O<sup>2</sup> K1 a été noté vers J57 (communication Dr J. Léorat). La séroconversion ELISA EH est le témoin d'un passage de virus HEV. L'implication de ce virus dans le syndrome observé est à étudier en mettant en oeuvre d'autres moyens de diagnostic. L'intérêt du suivi individuel sur un échantillon représentatif et d'effectif n > 30 permet de mieux connaître dans les conditions du terrain la variabilité liée à l'individu sous réserve de la garantie d'origine des animaux mis en place. A l'heure actuelle, la vaccination est la seule garantie d'induction d'une protection contre un passage de virus HEV.

## Conclusion

L'étude de la cinétique de décroissance des anticorps ELISA EH chez la dinde dans les conditions du terrain montre clairement la prédictibilité des résultats de sérologie à J1. La date cible de J28 pour la vaccination est un compromis tenant compte de cette variabilité individuelle, de la variabilité liée au parquet de reproducteurs et de la nécessité de stimuler les défenses immunitaires du dindonneau contre le risque de passage de virus HEV observé fréquemment dans les conditions du terrain.

## Références

1. Pierson F.W., Larsen C.T. & Domermuth C.H., 1996, *Avi. Dis.*, 40, 837-840.
2. Suresh M. & Sharma J.M., 1995, *J. Virol.*, 70, 30-36.
3. Rautenschlein S., Suresh M., Neumann U. & Sharma J.M., 1998, *J. Comp. Path.*, 119, 251-261.
4. Fadly A.M. & Nazerian K., 1982, *Avian Dis.*, 26, 525-533.
5. Fadly A.M. & Nazerian K., 1989, *Avian Dis.*, 33, 778-786.
6. ProFLOK® HE T ELISA kit, Symbiotics Corporation, San Diego, USA, US Vet. Lic. N° 312, 8 pages.

# **DÉTERMINATION DE LA DATE DE VACCINATION DINDORAL® : INTÉRÊT PRATIQUE.**

**Dr Nathalie DOUBLET**

SELVET CONSEIL - CHÂTEAUBOURG

## **Introduction.**

Le virus de l'entérite hémorragique est largement répandu sur le terrain, les souches circulantes sont décrites comme étant plus ou moins pathogènes. Dans tous les cas, ce virus est immunosuppresseur. Il peut interférer avec les prises vaccinales, comme celle de la rhinotrachéite par exemple. Combiné à d'autres agents pathogènes (RTI, PMV1, mycoplasme, E. coli...), on observe une synergie, une association de malfaiteurs dont il résulte un effet néfaste total, plus important que la somme de celui des deux agents pathogènes pris séparément.

La mise en place de la vaccination entérite hémorragique dans les années 80 a permis de limiter en France l'incidence de la RTI.

Ce virus occupe donc une place prépondérante dans la pathologie de la dinde. Aujourd'hui les formes cliniques, aiguës, accompagnées de fortes mortalités, d'une diarrhée hémorragique, et d'une prostration marquée ne sont plus guère observées que dans quelques élevages de type fermier où la vaccination contre l'entérite hémorragique n'est pas pratiquée.

La vaccination contre l'entérite hémorragique est très largement répandue en France, et pratiquée à l'aide du vaccin Dindoral® (Merial) en moyenne entre 25 et 32 jours.

Nous observons cependant des épisodes de mortalité – prostration dans certains élevages, d'une durée comprise entre une semaine et 10 jours, dans la période de sensibilité à l'entérite hémorragique, soit vers 45 – 60 jours d'âge. Ce passage de mortalité s'accompagne de lésions septicémiques, et est plus communément appelé « adénovirose » ou « syndrome gros foie – grosse rate ». Le foie est hypertrophié et friable, congestif, présentant parfois un piqueté hémorragique, verdissant à l'air. La rate est friable, noirâtre, hypertrophiée : la taille de l'organe pouvant être multipliée par plus de 4 fois la taille normale. Les poumons sont noirâtres. Le duodénum est également noirâtre. Le contenu digestif est plus ou moins liquide, sans congestion, ni lésion hémorragique du reste de la muqueuse intestinale.

Dans l'état actuel des connaissances, la cause ne peut être clairement établie : passage viral, réaction vaccinale, immunodépression transitoire ...?

Il est néanmoins certain que le traitement des surinfections colibacillaires qui accompagnent constamment cet épisode n'est pas toujours nécessaire. Le plus souvent d'ailleurs ces germes opportunistes sont multiples : plusieurs souches de colibacilles sont isolées sur le même animal, ou sur plusieurs animaux du même lot. Un traitement de la diarrhée (colistine buvable par exemple), et/ou un traitement visant à stimuler les défenses immunitaires (vitamine E + sélénium) est suffisant dans la majorité des cas. Sur le même site d'élevage, 2 bâtiments de dindes subissant un passage classique du syndrome GF/GR de même importance, ont été traités l'un avec un antibiotique par voie orale (association Triméthoprime-Sulfamides), l'autre avec de la colistine + Vitamine E / sélénium. Au final, les mortalités cumulées dans les 2 bâtiments sont identiques, les résultats techniques également. (E. CHATAIGNER, communication personnelle).

La conduite tenue est différente si des lésions de périhépatite, de péricardite, de pneumonie, ou d'aérosacculite accompagnent le tableau clinique précédemment décrit.

## **Détermination de l'âge de vaccination.**

Le virus de l'entérite hémorragique est donc un virus digestif, immunosuppresseur, très largement répandu sur le terrain.

Les anticorps d'origine maternelle interfèrent avec la prise du vaccin, et rendent impossible la vaccination avant que ces anticorps n'aient disparu.

La précédente étude a montré une variabilité individuelle certaine. Elle a montré également la valeur prédictive du taux d'anticorps du jeune dindonneau sur la décroissance future des anticorps d'origine maternelle, et sur la date de vaccination à respecter.

A la lumière de ce que nous pratiquons régulièrement contre la maladie de Gumboro chez le poulet, il semble intéressant de voir si la détermination de la date de vaccination chez des éleveurs concernés par le syndrome GF/GR apporte une amélioration. En effet, dans les deux cas, la vaccination concerne un virus digestif, immunosuppresseur, très largement répandu sur le terrain, dont les anticorps maternels protègent le jeune âge, mais empêchent la prise vaccinale.

## **Résultats sérologiques sur 25 lots de dindes de chair.**

Dans le schéma ci-après, les résultats sérologiques de 25 lots de dindes de chair sont représentés. Le kit utilisé est le kit ELISA Hemorrhagic Enteritis Virus antibody test kit, de Symbiotics.

### ***1- Echantillonnage et moyenne des résultats.***

Les 25 lots sont issus d'organisations, de régions, et d'origine couvoir différentes. Certains lots concernent cependant le même site d'élevage, pour la même période de mise en place, ou pour des lots successifs. Les lots choisis sont issus d'élevages ayant connu des épisodes d'adénovirose importants.

L'âge moyen de prélèvement est 1,48 jour, les lots qui avaient été prélevés au-delà de 3 jours ont été supprimés. Un seul lot a été prélevé à 3 jours (c'est l'élevage 11 dans les schémas 1 et 2). On constate dans les élevages prélevés par erreur au-delà de 3 jours que le coefficient de variation augmente notablement.

C'est le cas également pour les lots au nombre insuffisant de prises de sang (inférieur à 10 pour un lot classique de 7000 à 9000 dindes). Ces lots ont été également retirés de la synthèse de résultats.

Le nombre de prises de sang en moyenne par lot a été de 12.

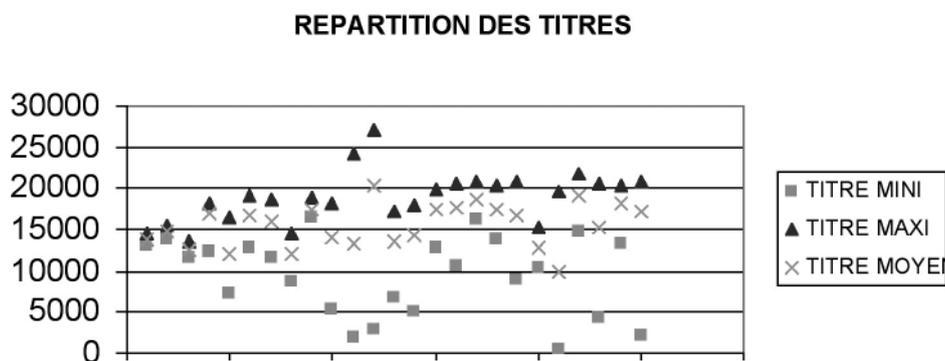
Au total sur les 25 lots dans la période de 14 mois considérée dans la synthèse (février 2003 à avril 2004, résultats laboratoire BIO-CHENE VERT), la moyenne des titres mini est de 9482, la moyenne des titres maxi est de 18983, la moyenne des titres est de 15549.

La date de vaccination calculée sur ces 25 lots a été en moyenne de 31 jours : nous sommes donc dans les dates recommandées par le laboratoire fournisseur du vaccin.

Graphique 1 :

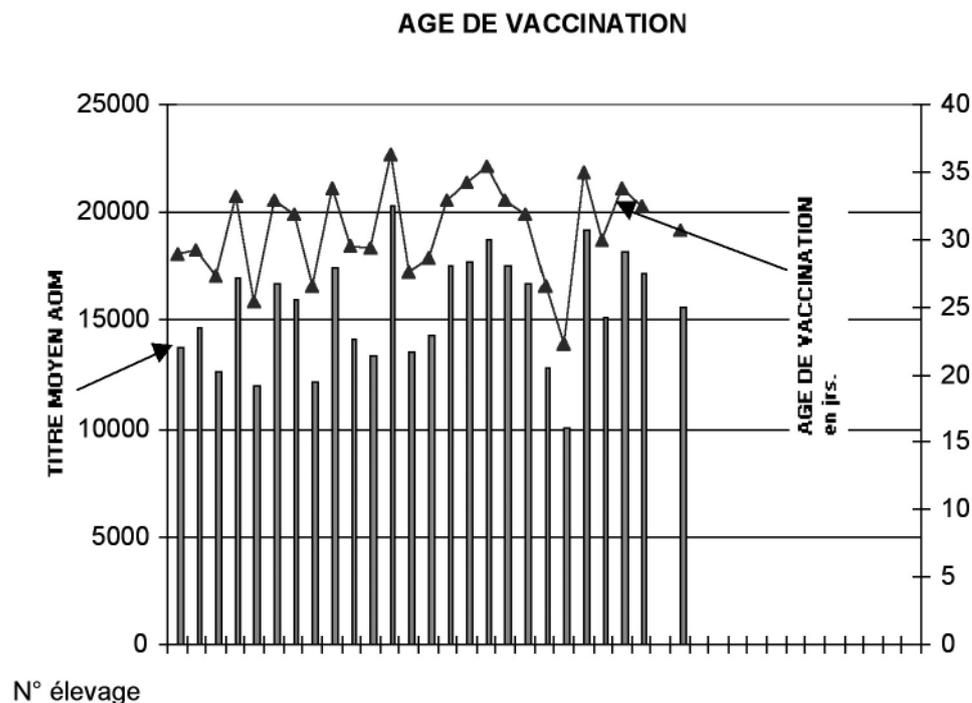
Répartition des titres d'anticorps d'origine maternelle (25 lots de dindes de chair).

Période : février 2003 à avril 2004.



**N° élevage**

Graphique 2 : Répartition des âges de vaccination pour les 25 même lots.

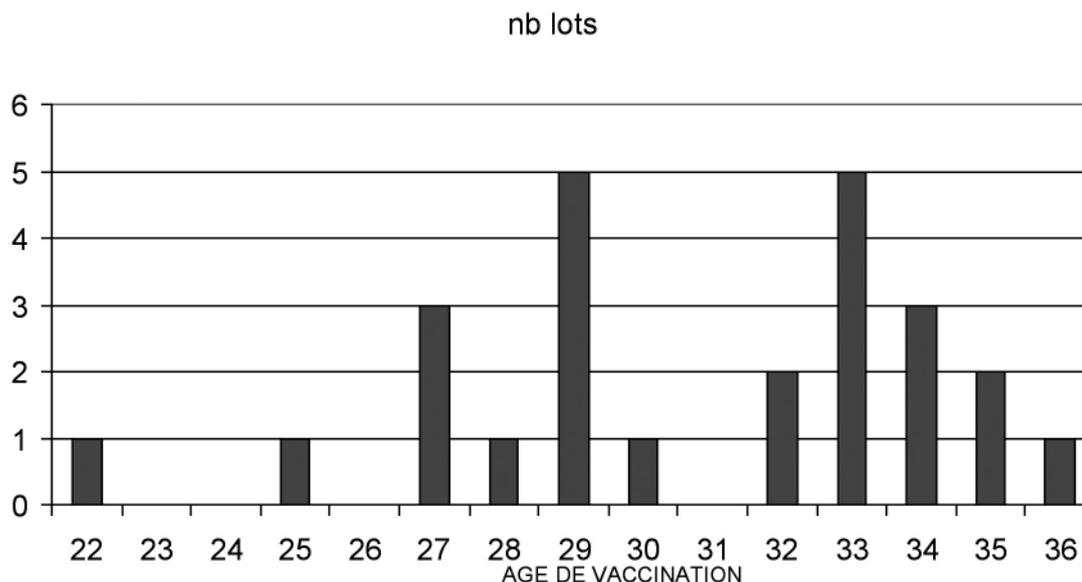


## **2- Variabilité.**

La moyenne des résultats est conforme à notre attente. Cependant la variabilité des résultats entre élevages est large : 14 jours séparent les lots 21 et 12. Le lot 21 a été vacciné le plus tôt à 22 jours d'âge, et le lot 12 a été vacciné le plus tardivement, soit à 36 jours.

La répartition des lots en fonction de la date de vaccination est représentée dans le graphique 3.

Graphique 3 : Répartition des lots en fonction de l'âge calculé de vaccination.



## Résultats terrain des 25 lots de dindes de chair.

La vaccination de ces lots en respectant la date de vaccination calculée a permis une réduction globale de la mortalité dans la période 45-60 jours, et une réduction de l'incidence des troubles respiratoires dans les élevages sujets à la pathologie respiratoire (surinfections colibacillaires principalement). Un seul lot sur 25 n'a pas montré d'amélioration, la date calculée était de 27 jours (moyenne titres 12628, CV 4 %).

La majorité des éleveurs ayant commencé cette démarche ont souhaité poursuivre sur les lots ultérieurs. Certains des éleveurs procèdent en réalité à la détermination systématique de la date de vaccination depuis 4 ans.

## Conclusion

Nous avons vu la variabilité individuelle des titres d'anticorps d'origine maternelle, et la variabilité des titres d'un lot à un autre, ainsi que la variabilité des dates de vaccination calculées. Il semble donc important de respecter une taille minimale pour l'échantillon : soit 10 à 15 prises de sang, pour un lot de 7000 à 9000 dindes. En cas de mélanges de parquets, le prélèvement doit concerner les différentes origines.

L'intérêt de la détermination de la date de vaccination a été probant sur l'échantillon de 24 lots sur 25.

Sans remettre en question la date de vaccination habituelle du Dindoral<sup>®</sup> vers 25-30 jours, la détermination de la date est donc un outil intéressant dans les élevages à syndrome gros foie – grosse rate, accompagné d'une forte mortalité. Cette synthèse préliminaire demande à être étoffée de cas plus nombreux, en particulier dans les secteurs concernés par du PMV1.

Elle est une étape dans l'amélioration globale de la vaccination, et doit être précédée d'un passage en revue des points clés de la vaccination.

# **NOUVEAUX ÉLÉMENTS PRONOSTIQUES ET DIAGNOSTIQUES SUR L'HISTOMONOSE DE LA DINDE.**

**Dr Lionel ZENNER, Dr Karine HUBER et Dr Claude CHAUVE**

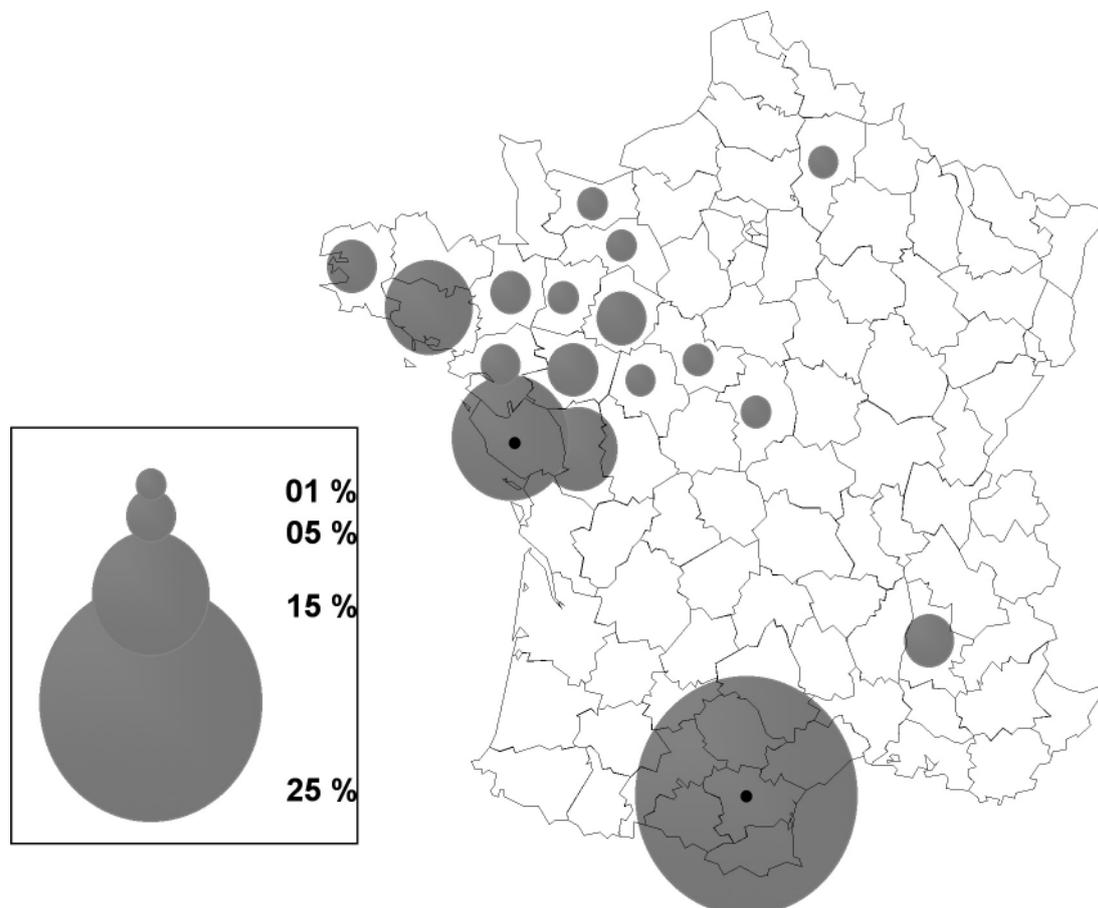
UNITÉ MIXTE DE RECHERCHE PEV ENVL/INRA 958,  
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

L'histomonose est une maladie parasitaire affectant les galliformes. Provoquée par un flagellé, *Histomonas meleagridis* à cycle très particulier, cette typhlo-hépatite s'était faite quelque peu oublier (5). En effet, les dindes recevaient en prévention une supplémentation systématique en Diméridazole ou Nifursol (1), mais depuis le 31 mars 2003 où le Nifursol a été interdit, il n'existe plus aucune molécule disponible dans la Communauté Européenne. Une telle décision a de graves conséquences et l'histomonose est devenue une pathologie très préoccupante pour toute la filière.

## **Prévalence des cas cliniques**

Les données épidémiologiques, des cas d'histomonose clinique, récoltées par le CIDEF (Comité Interprofessionnel de la Dinde Française) entre mai et décembre 2004 montrent bien la prévalence importante des cas d'histomonose chez la dinde (Figure 1).

Figure 1 :



effectifs atteints (nombre d'animaux) par rapport aux effectifs mis en place (Source CIDEF). Durant cette période, le CIDEF a enregistré plus de 50 cas déclarés (lots atteints) avec des taux de mortalité au sein des lots variant de 0 à près de 80%. Moins de 10% de mortalité ont été observés dans plus de la moitié des lots, alors que 20% des lots ont eu une mortalité de plus de 40%.

## Diagnostic de la maladie

Le diagnostic clinique de cette affection en élevage est basé sur les éléments épidémiologiques (jeunes animaux, allure épidémique) et les symptômes (diarrhée jaune souffre, anorexie, somnolence, démarche anormale,...).

Le diagnostic nécropsique permet d'observer des lésions caecales uni- ou bilatérales associées ou non à des lésions hépatiques. L'atteinte concomitante des deux organes, non systématique, est pathognomonique.

Le diagnostic différentiel doit envisager toutes les maladies à l'origine de typhlite et/ou d'hépatite (tuberculose aviaire, salmonellose, pasteurellose, maladie de Marek, trichomonose caecale,...). Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite par examen direct microscopique. Celui-ci présente des difficultés de lecture dans la mesure où la distinction avec d'autres protozoaires présents dans les caecums, à savoir *Tetratrichomonas gallinarum* et *Blastocystis sp.* est délicate. La mise en culture du parasite peut également être envisagée, mais elle implique d'être réalisée par un laboratoire maîtrisant la culture, difficile, du parasite (5).

Ainsi actuellement, deux obstacles doivent être levés :

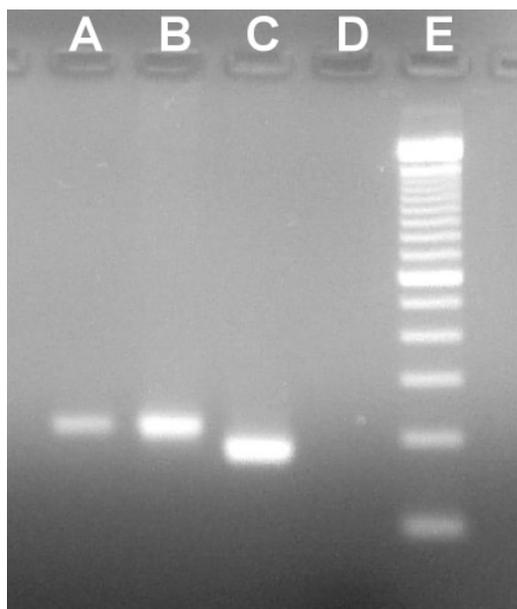
- celui d'un diagnostic coproscopique de certitude facile à réaliser et pouvant être effectué sur un grand nombre de volailles,
- celui de l'interprétation précise de l'autopsie permettant d'apprécier le degré d'évolution de la maladie dans l'élevage.

La mise au point d'outils adaptés serait également très intéressante pour faciliter les enquêtes sur le terrain et permettre une comparaison plus aisée des résultats.

## Technique PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire de plus en plus utilisée pour le diagnostic des maladies infectieuses. Elle permet de détecter du matériel génétique en quantité infime et l'amplifie considérablement en le multipliant jusqu'à un million de fois en quelques heures. Il est alors possible de l'identifier simplement pour confirmer la présence de l'ADN du pathogène.

Nous avons mis au point une technique PCR appliquée au diagnostic de l'histomonose. Cette technique actuellement en cours de validation dans l'unité devrait permettre un diagnostic de certitude plus simple et applicable à plus grande échelle que l'examen direct pour la recherche de parasite.



**A. Fiente cœcale positive Histomonas**  
**B. Témoin positif Histomonas**  
**C. Témoin positif Trichomonas**  
**D. Témoin négatif**  
**E. Marqueur de taille**

Cette PCR permet de détecter *Histomonas*, mais également *Tetratrichomonas*, ce dernier apparaissant comme une bande décalée vers le bas sur les gels d'agarose. Ainsi, nous pourrions établir un diagnostic de certitude quant à la présence du parasite chez un animal. Nous sommes en train de déterminer la sensibilité du test en fonction du type de prélèvement et d'étudier sa possible utilisation sur le terrain. Actuellement nous pouvons travailler sur des prélèvements congelés et envoyés au laboratoire.

Cet outil qui pourra très prochainement être utilisé à des fins diagnostiques sera aussi très utile pour déterminer la prévalence du portage sain dans les élevages en France (2). Ce portage sain pourrait être en effet un élément important pour le pronostic d'apparition de la pathologie au sein d'une bande et un élément déterminant pour la mise en place de mesures de suivi et de prophylaxie raisonnée.

## Définition des scores lésionnels cœcaux et hépatiques

Nous avons dans un premier temps élaboré des scores lésionnels permettant de noter les lésions macroscopiques caecales et hépatiques lors des autopsies. Leur utilisation systématique par toutes les personnes pratiquant des autopsies de dindes atteintes d'histomonose présenterait des avantages. D'une part, elle permettrait de comparer toutes les autopsies effectuées sur des critères objectifs et notamment la gravité des lésions observées. D'autre part, elle pourrait avoir un rôle d'évaluation du degré d'atteinte d'une exploitation, même si cette utilisation pronostique reste à valider sur le terrain.

Les lésions caecales affectent un ou les deux caecums. Elles peuvent intéresser la totalité de l'organe ou être localisées à l'extrémité borgne. Les parois caecales sont épaissies et congestionnées. Les caecums se présentent alors comme de gros boudins irréguliers, fermes à la palpation, à surface bosselée et à paroi épaisse. A l'ouverture, on observe des lésions ulcéraives et caséonécro-

tiques qui peuvent aboutir à une perforation de la paroi et à une péritonite généralisée (3). Nous avons défini 5 stades lésionnels des lésions caecales (0 à 4) en notant séparément les 2 caecums. Le score 0 correspond à un caecum sain sans aucune lésion macroscopique discernable : la paroi interne est fine avec des sillons longitudinaux caractéristiques, le contenu est homogène et uniquement constitué d'aliment de consistance liquide à crémeuse, de couleur foncée et ne contenant aucun flocon de caséum (Figure 2). Le score 4 correspond à un caecum à paroi très épaissie avec nécrose fibrinoïde avec soit présence soit d'un bouchon caséux soit absence de contenu. Une hémorragie peut également être décelée, ainsi qu'une perforation de la paroi entraînant une péritonite (Figure 3). Les scores intermédiaires 1, 2 et 3 sont définis par rapport à l'épaississement de la paroi, l'aspect du contenu caecal et la présence de sang.

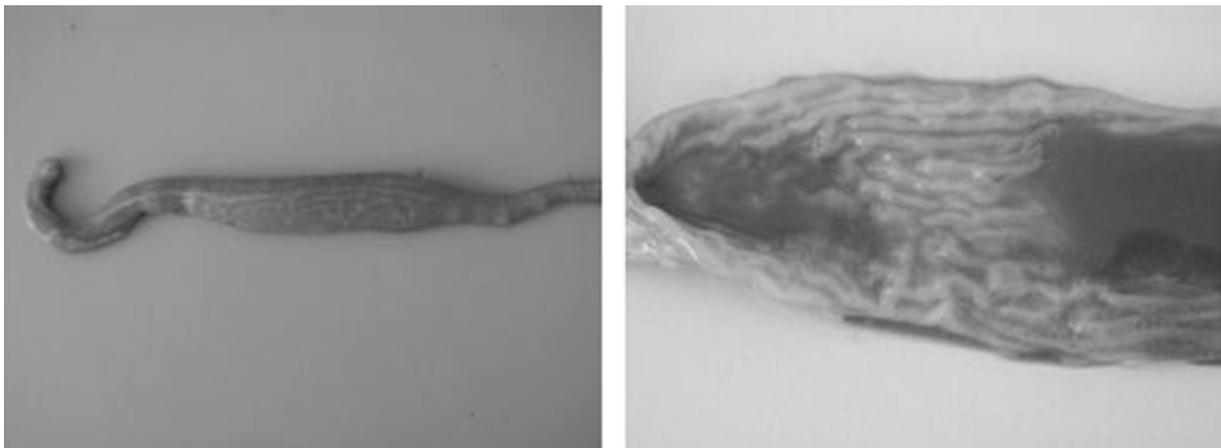


Figure 2 : caecums avec score lésionnel 0.

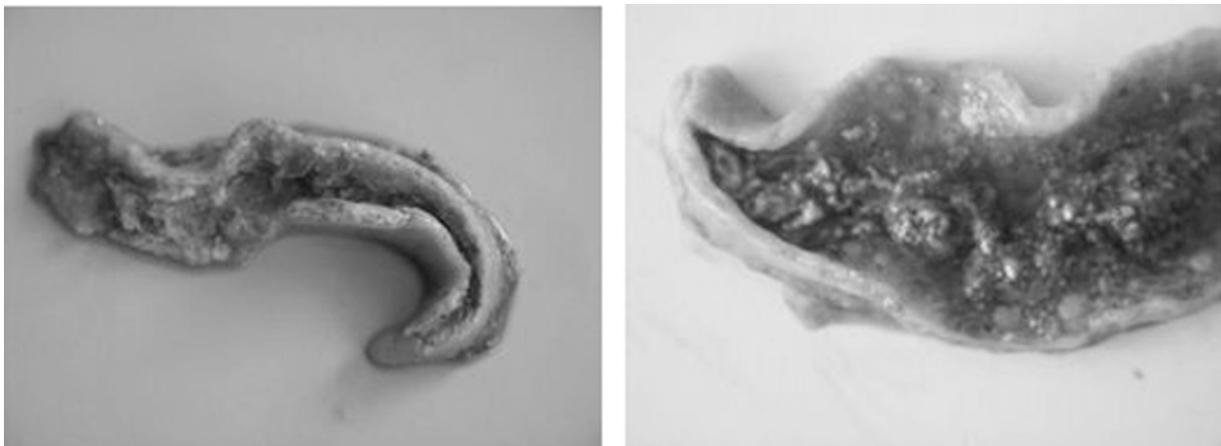


Figure 3 : caecums avec score lésionnel 4.

Les lésions hépatiques notables apparaissent en général chez la dinde vers le 9ème ou 10ème jour, mais peuvent être totalement absentes, ou très modérées comparativement aux lésions caecales. Elles sont variables en fonction de l'épisode clinique et de l'âge de la dinde (3, 4). Les lésions observées sont des foyers nécrotiques sous forme de tâches en cocarde, avec des bords surélevés et un centre en dépression. Leur nombre est variable et leur taille est de quelques millimètres à plusieurs centimètres, ce qui donne au foie un aspect tacheté très caractéristique. On peut également noter une hypertrophie et une décoloration du viscère.

Les lésions hépatiques ont aussi été notées de 0 à 5, le score 0 représentant un foie sain, sans aucune lésion en cocarde discernable et le score 4 un foie avec de nombreuses lésions dont un nombre important sont confluentes (Figure 4). Les scores intermédiaires 1, 2 et 3 sont déterminés par rapport au nombre de lésions en cocarde, leur taille et leur confluence.

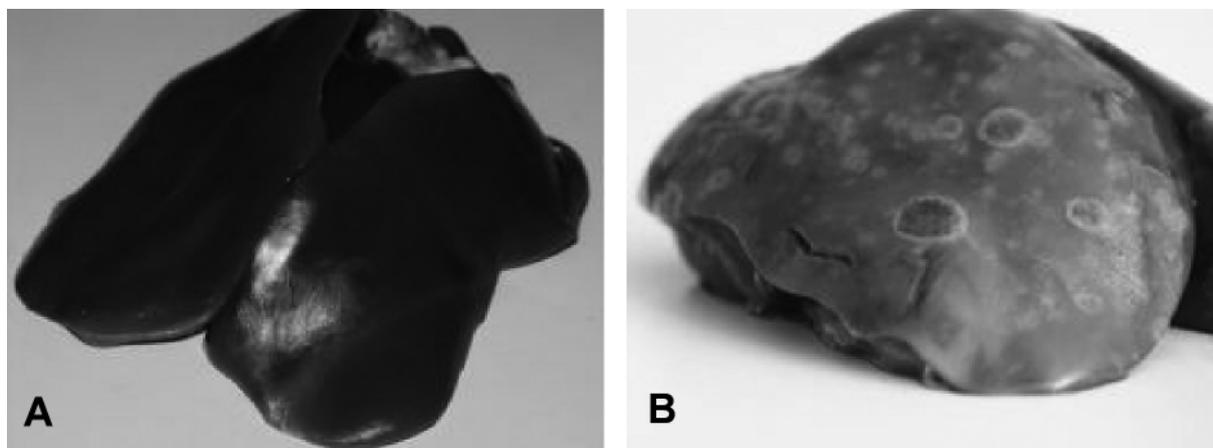


Figure 4 : A. Score lésionnel hépatique 0 ; B. Score lésionnel hépatique 4.

L'établissement des scores lésionnels lors des autopsies devrait se faire selon cette grille que nous proposons. Elle comporte des photos et est actuellement en phase de validation sur le terrain.

## Références

1. Callait MP. et al. 2002. *The in vitro activity of therapeutic drugs against Histomonas meleagridis (Smith 1895)*. *Poultry Sci.* 81 : 1122-1127.
2. Chossat L. 2002. *L'histomonose en production AOC "Dinde Fermière de Bresse". Essai de prévention par phytothérapie*. Thèse Vétérinaire, Lyon.
3. Lund EE. 1972. *Histomoniasis*. In: *Diseases of Poultry*. 6th edition, Ed Hofstad MS Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA; 990-1006.
4. McDougald LR. 1997. *Other protozoan diseases of the intestinal tract*. In: *Diseases of Poultry*. 10th edition, Ed Calnek BW, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA; 890-899.
5. Zenner L. et al. 2002. *L'histomonose de la dinde, une maladie d'actualité*. *Bull. GTV.* 15 : 155-158.

# **LUTTE INTÉGRÉE CONTRE LES HELMINTHOSES AVIAIRES.**

**Dr Maarten DE GUSSEM**

JANSSEN ANIMAL HEALTH INTERNATIONAL - BELGIQUE

**Dr Etienne MEISSONNIER**

JANSSEN SANTÉ ANIMALE - FRANCE

## **Résumé**

Les helminthes sont encore très fréquents chez les volailles, mais se voient accorder trop peu d'attention en raison de leur présence souvent subclinique. Ces infestations ont pourtant un réel impact sur la santé des animaux – et par conséquent sur la rentabilité de l'élevage. Le problème majeur, c'est que les œufs de vers résistent aux mesures de désinfection et sont donc régulièrement à l'origine de réinfestations.

Une bonne hygiène – notamment une désinfection rigoureuse des bâtiments et matériels lors du vide sanitaire, le renouvellement régulier de la litière, la désinsectisation des locaux et de leurs abords – est essentielle pour la prévention des infestations vermineuses. Lorsque les bâtiments sont contaminés, on ne contrôle efficacement les helminthoses qu'en appliquant un programme stratégique de vermifugation raisonnée sur la période prépatente du parasite ciblé. Ce programme doit être conduit de manière très stricte pour éviter l'apparition et l'entretien de l'histomonose.

## **Introduction**

Une des raisons qui a amené à l'élevage des poules en cages était de pouvoir maîtriser efficacement les maladies parasitaires. Le fait de limiter les contacts avec les autres animaux et avec les déjections permettait d'enrayer presque complètement la propagation de la coccidiose et des infestations vermineuses. Depuis quelques années pourtant, le souci du bien-être des animaux et la réglementation communautaire incitent les aviculteurs à opter pour les élevages sur litière et/ou en plein air. Ces initiatives sont cependant responsables d'une recrudescence des maladies infectieuses. Dans tous les cas, la coccidiose et les infestations vermineuses sont plus virulentes chez les poules élevées au sol que chez les poules en batterie. Dans une étude récente des Services vétérinaires des Pays-Bas, on observait la présence d'infestations vermineuses chez 68 % – et d'ectoparasites chez 55 % – des lots de poules pondeuses non élevées en batteries classiques (Van Niekerk et Bosch 1996).

Toutes les volailles maintenues sur litière ou sur terre battue et qui sont en contact avec leurs fientes ou des vecteurs animaux (arthropodes, mollusques) courent le risque d'être infestées par des vers.

Dans cet exposé, nous rappelons les différentes espèces de vers parasites qui sévissent chez nos volailles, leurs hôtes intermédiaires ou de transport et les bases des programmes sanitaires et médicaux de la lutte antiparasitaire. De plus, une attention particulière est accordée aux relations complexes entre le vers *Heterakis* et l'histomonose de la dinde.

## Les principales helminthoses aviaires

Les helminthes parasites sont des vers ronds (nématodes) ou des vers plats comme les ténias (cestodes). Ils peuvent perturber la santé, la croissance et la reproduction des volailles, et se localisent surtout dans les intestins. Les volailles non-vermifugées sont toujours les hôtes définitifs, mais la survie de nombreux parasites dépend aussi d'hôtes intermédiaires ou d'hôtes paraténiques qui sont souvent discrets et méconnus : vers de terre, fourmis, coléoptères... Il convient de bien en prendre conscience lors de la mise en œuvre du plan de prophylaxie.

### **Chez les poules et les poulets**

Les poules sont surtout victimes de trois espèces de vers : *Ascaridia galli* (le grand ascaris), *Capillaria obsignata* (le ver capillaire) et *Heterakis gallinarum* (le petit ascaris). Les poules infestées par des vers ont une croissance ralentie voire réduite et sont plus sensibles aux autres infections.

*Ascaridia* est le plus fréquent et le plus pathogène. Les vers adultes séjournent dans la lumière du duodénum, et les larves vivent dans la muqueuse, pouvant provoquer une entérite. C'est surtout lorsque les vers deviennent adultes et se mettent à produire des œufs, qu'ils handicapent leur hôte. De récentes études effectuées chez des poulets de chair ont démontré que les conséquences peuvent être très importantes en cas d'infestations lourdes par *Ascaridia*. Après 6 semaines, divers symptômes peuvent apparaître tels qu'un amaigrissement, une diarrhée, un plumage en mauvais état, des ailes pendantes et un affaiblissement musculaire. En raison de la carence en vitamine A, résultat d'une réduction de la prise alimentaire, les fanons, crêtes et pattes pâlisent.

Chez les poules pondeuses et les animaux reproducteurs, une contamination par *Ascaridia* peut entraîner une réduction de la ponte et, occasionnellement, une larve migrante peut se retrouver dans la grappe ovigère, via l'oviducte, et infester un œuf, cause de désagrément tant pour le consommateur que pour le fournisseur ! Si l'infestation entraîne une carence en vitamine A, les œufs des animaux infestés ont un jaune plus pâle et présentent une éclosabilité réduite.

Les vers capillaires sont moins fréquents, mais sont au moins aussi pathogènes que le grand ascaris. Les vers adultes se nichent dans la muqueuse, ce qui peut entraîner des inflammations de la paroi du tube digestif et une forte production de mucus. Un amaigrissement et une diarrhée s'observent également fréquemment.

Les oiseaux s'infestent en avalant des œufs de vers qui se trouvent dans les fientes et sur le sol dans les abords des poulaillers.

Les ténias *Raillietina cesticillus* et *Davainea proglottina* absorbent une partie des aliments dans l'intestin, avec pour conséquence une spoliation nutritionnelle pour l'oiseau infesté. Comme ils se fixent à la muqueuse à l'aide de leurs crochets, ils peuvent provoquer une hémorragie locale. Les stades infestants - les cysticercoïdes - sont ingérés par le biais d'hôtes intermédiaires tels que les limaces et les coléoptères (scarabée ou autres).

Le ver rouge *Syngamus trachea* constitue un danger dans les systèmes d'exploitation pratiquant l'élevage au sol sur parcours, son hôte intermédiaire étant le ver de terre (lombric). Dans les grandes volières à gibier, faisans et perdrix constituent les réservoirs de choix de parasites qui peuvent contaminer les animaux domestiques.

## **Chez les dindons**

Chez les dindons, le ver *Ascaridia dissimilis* est le plus important. Les nombreuses larves surtout sont nuisibles. Normalement, les larves se nourrissent de la muqueuse de l'intestin grêle, mais dans les infestations graves, la concurrence devient trop forte et les larves vont alors migrer ailleurs dans l'organisme. Les tissus peuvent réagir par une réaction immunitaire et un enkystement. Dans le foie - où les larves aboutissent en premier lieu via la circulation portale - cela peut donner lieu à des granulomes appelés "taches blanches". Elles sont de dimensions variables : d'une tête d'épingle à une pièce de monnaie. Ces lésions hépatiques peuvent entraîner la saisie de l'organe, de toute la carcasse, voire même de tout le lot à l'abattoir. Aux Etats-Unis, on estime que 43 % des élevages de dindons sont confrontés à ce problème (Norton 1997).

Elles affectent la résistance de l'animal : il s'affaiblit, devient plus vulnérable aux infections bactériennes dues à *E. coli* ou *Clostridium perfringens*. Cela peut donner lieu à une entérite nécrotique associée à une réduction de croissance et même à la mort de l'animal (Norton et al., 1992 ; Willoughby et al., 1995).

De même, la présence de vers capillaires dans l'estomac des dindons peut entraîner la saisie des carcasses à l'abattoir.

Chez les jeunes dindons, le petit ascaris *Heterakis gallinarum*, dans sa phase larvaire, peut lui aussi provoquer des lésions importantes, comme l'épaississement et une lacération des muqueuses dans les cæcums. Mais, l'*Heterakis* adulte est peu pathogène. Ce ver est l'hôte intermédiaire d'un flagellé *Histomonas meleagridis*.

Ce protozoaire est responsable de l'histomonose en infestant le foie et les cæca des dindons : il provoque parfois une cyanose de la tête (d'où son appellation anglaise de blackhead). Il s'agit d'une infection très virulente produisant des symptômes non-spécifiques comme la coloration rouge foncée de la peau et des muscles, et des fientes jaune soufre.

**La transmission d'*Histomonas* aux dindons a lieu par différentes voies :**

- via son hôte intermédiaire, l'*Heterakis* : le dindon peut s'infecter pendant plusieurs mois en ingérant des fientes qui contiennent ses œufs, eux-mêmes infectés par *Histomonas* ;
- via son hôte paraténique, le lombric : le dindon peut s'infecter pendant plusieurs années en ingérant des vers de terre qui eux-mêmes ont absorbé et concentré des œufs d'*Heterakis* infectés par *Histomonas* dans leur organisme ;
- ou directement par contamination de leur cloaque au contact de fientes fraîches (< 24 heures) infectées par *Histomonas*. Cette transmission directe devient importante surtout lorsque le sol ou la litière est lourdement contaminé par le flagellé (Hu et McDougald, 2003).

Il a été démontré récemment que les benzimidazoles présentaient une efficacité préventive vis-à-vis de l'histomonose chez des dindons placés sur une litière contaminée par des œufs infestés d'*Heterakis* (Hegnig et al, 1999)

## **Chez les faisans et les perdrix**

Les gibiers sont par nature relativement résistants aux infestations parasites, mais lorsqu'ils vivent en groupes très denses, ils sont fragilisés et les infestations ont souvent une évolution plus grave. Chez les perdrix et les faisans élevés en volières, *Ascaridia*, *Capillaria* et *Syngamus* sévissent assez fréquemment, entraînant des pertes importantes. Les jeunes faisandeaux et les poules faisanes en période de ponte sont souvent victimes de ces parasites.

Tableau I :

Principaux vers parasites des volailles et leurs hôtes intermédiaires ou de transport en France

Helminthe parasite	Hôte définitif		Hôte intermédiaire ou de transport
	Espèce	Localisation	
<i>Syngamus trachea</i> (ver rouge)	Dindon Faisan Perdrix	Trachée et poumons	Ver de terre Escargot, mouches Autres arthropodes
<i>Amidostomum anseris</i> (ver gastrique)	Canard Oie	Gésier, Proventricule, Oesophage	Aucun
<i>Ascaridia galli</i> (grand ascaris)	Poule Faisan Dindon	Intestin grêle Parfois oviducte	Ver de terre
<i>Ascaridia dissimilis</i>	Dindon	Intestin grêle Foie	Ver de terre
<i>Heterakis gallinarum</i> (petit ascaris)	Poule, faisan Dindon, pintade Canard, oie Perdrix, caille	Caecums	Ver de terre Mouches
<i>Capillaria obsignata</i> (ver capillaire)	Poule Dindon Faisan	Intestin grêle	Ver de terre
<i>Davaina proglottina</i> (petit cestode)	Poulet	Intestin grêle	Limace Autres mollusques
<i>Raillietina cesticillus</i> (grand cestode)	Poule Dindon Faisan	Intestin grêle	Fourmi Coléoptères Mouches

## Diagnostic

Une infestation vermineuse peut être envisagée en présence de symptômes tels qu'une mortalité accrue, une croissance médiocre ou très fluctuante dans le groupe, un mauvais état général, une ponte moins performante, un faible poids ou un mauvais rendement d'éclosion, ainsi qu'une diarrhée. On ne peut cependant prouver que les animaux sont infestés qu'en démontrant la présence d'œufs de ver dans les fientes, intestinales et cœcales, et surtout par autopsie sur des effectifs suffisamment représentatifs. Dans le cas de l'hétérakidose, ne pas oublier que les excréments de fientes cœcales sont de 9 à 11 fois moins fréquentes que celles des fientes rectales (Permin et Hansen).

Le moment des prélèvements dans le cycle de production est particulièrement important. Il faut toujours tenir compte de la période prépatente de chaque ver susceptible d'infester les volailles. Cette période se déroule entre le moment de l'ingestion des éléments infestants (œufs ou hôtes intermédiaires) et le moment où ils deviennent des vers adultes et commencent à excréter des œufs dans l'appareil digestif.

Il est donc toujours possible d'obtenir des résultats faux-négatifs pendant la période prépatente.

Tableau II : Périodes prépatentes des principaux vers parasites des volailles

Helminthe	Catégorie d'oiseaux	Période minimale œuf - forme infestante (jours)	Période prépatente (jours)
<b>Vers ronds</b>			
<i>Ascaridia galli</i>	Poulettes	10 - 20	35 - 42
	Poules	10 - 20	50 - 56
<i>Ascaridia dissimilis</i>	Dindes	10 - 20	30 - 35
<i>Syngamus trachea</i>	Faisans	2 - 7	18 - 20
<i>Capillaria obsignata</i>	Poules	9 - 14	20 - 26
<i>Heterakis gallinarum</i>	Dindes	14	24 - 30
<i>Capillaria contorta</i>	Poules	9 - 14	30 - 60
<i>Amidostomum anseris</i>	Oies	2 - 3	14 - 22
	Canards	2 - 3	35 - 49
<b>Vers plats</b>			
<i>Raillietina</i>	Poules	21 - 30	21
<i>Davainea</i>	Poules	21	14 - 21

### **Stratégie de lutte anthelminthique**

Etant donné les retards de production et les troubles pathologiques que les vers peuvent provoquer, la prévention des infestations est une source importante de bénéfices.

### **Évacuation complète des litières**

Il faut veiller à ce que les volailles ne puissent pas être contaminées par les œufs infestants. Ceci est relativement facile lorsque les volailles sont logées sur caillebotis ou dans des cages correctement nettoyées en période de vide sanitaire. Mais, c'est beaucoup plus compliqué lorsque les volailles vivent sur litière, avec ou sans parcours en plein air, notamment si les programmes de vermifugation ont été appliqués irrégulièrement au cours des bandes précédentes. Une infestation vermineuse dans un parquet de dindes se traduit par une émission fécale d'œufs de vers qui peut s'élever jusqu'à 38 000 œufs/g de litière (Norton et col., 1999). Il est donc primordial d'évacuer la litière et bien nettoyer le bâtiment et le matériel entre chaque lot. Il est également important de renouveler régulièrement la litière en cours d'élevage.

Pour les élevages en plein air, les abords des bâtiments ou les volières peuvent devenir, bande après bande, de véritables réservoirs d'œufs de vers.

Lorsqu'un groupe de volailles est exempt de vers, il faut être vigilant afin d'éviter l'introduction d'œufs infestants par des déjections collées aux bottes ou à d'autres matériaux, par le biais d'autres oiseaux domestiques ou sauvages beaucoup plus tolérants au parasitisme.

Les œufs de vers ne peuvent « mûrir » ou devenir infestants :

- dans une atmosphère très sèche ;
- à une température inférieure à 10-15°C ;
- à des hautes températures (plus de 34°C) ;
- en l'absence d'oxygène.

Les œufs des vers sont détruits par la sécheresse, la chaleur, une gelée forte et prolongée, et par une exposition directe au rayonnement ultraviolet du soleil.

## **Lutte contre les hôtes intermédiaires et hôtes paraténiques**

Les hôtes intermédiaires tels que coléoptères, limaces, lombrics, etc. ont des rôles de protection, concentration et dissémination des formes infestantes. La désinsectisation des bâtiments avec les produits homologués est indispensable en période de vide sanitaire : elle permet de rompre le cycle parasitaire dans les bâtiments avant toute nouvelle recontamination.

Dans le milieu extérieur, la lutte contre les vers de terre peut s'obtenir en étalant des graviers ou du sable aux abords des poulaillers. 45% des vers de terre hébergent des larves L2 d'*Ascaris* au printemps. Dans le cas des élevages de gibiers, le déplacement des volières peut être justifié si la pression parasitaire est intense.

La litière présente des conditions très favorables pour que les œufs de vers se développent pour donner des formes infestantes : l'humidité relative, la température ambiante, l'obscurité et une oxygénation minimale sont favorables à la survie des œufs pendant plusieurs mois.

Comme ces œufs prospèrent particulièrement dans des milieux humides, un impératif est de maintenir la litière la plus sèche possible, en la renouvelant régulièrement en particulier autour des abreuvoirs et en ventilant correctement le bâtiment.

Pour limiter le risque d'infestation par des cestodes, il est important de combattre les hôtes intermédiaires et de transport et d'éviter, autant que possible, que des oiseaux sauvages pénètrent dans le parquet d'élevage.

## **Vermifugation raisonnée**

Par ailleurs, il convient d'appliquer un programme de vermifugation raisonné, basé sur la période prépatente du ver le plus menaçant ; c'est la meilleure manière d'éviter que des œufs de vers soient encore excrétés dans la litière. En effet, si le traitement est occasionnel, les vers et leurs larves présents dans l'animal sont éliminés, mais il restera toujours un certain nombre d'œufs infestants dans la litière.

Dans le cadre d'un programme raisonné de vermifugation, on réapplique un traitement avant que la période prépatente du parasite ciblé ne soit écoulée, ce qui empêche les œufs infestants avalés de se développer en vers adultes, capables de produire des œufs. Ce type de programme doit être appliqué à l'ensemble de l'exploitation.

Après quelques traitements dans la période prépatente, on peut allonger les intervalles. A ce stade en effet, il ne subsiste plus qu'un risque minoré d'excrétion d'œufs infestants par les oiseaux ; le déparasitage ne sera alors plus nécessaire que pour venir à bout d'infestations ponctuelles, introduites par des agents extérieurs.

Si l'on contrôle régulièrement la présence d'infestations vermineuses en pratiquant des examens d'échantillons fécaux et des autopsies, il peut être suffisant d'appliquer des traitements de déparasitage occasionnels dès l'apparition des premiers signes de contamination.

## **Choix de l'anthelminthique**

Outre une activité contre les vers adultes, l'anthelminthique utilisé doit aussi être actif contre les stades larvaires. Pour *Ascaridia sp.*, ce sont principalement les larves qui occasionnent des lésions, et les vers adultes ne constituent qu'une fraction de la charge parasitaire totale.

Parmi l'arsenal anthelminthique disponible, le prémélange médicamenteux Flubenol à 0,6 % de flubendazole est particulièrement intéressant pour son spectre d'activité très large tant sur les espèces de vers que sur leurs stades (adultes, larves et œufs).

## **Étude sur le flubendazole**

Le flubendazole a été testé par Janssen International (Beerse, Belgique) chez 134 069 poules, 17 957 faisans, 4 921 dindons, 6 249 oies et 1 042 perdrix dans le cadre de 48 études contrôlées réalisées dans 10 pays.

### **Éfficacité**

Le flubendazole s'est avéré très efficace contre les espèces de vers qui sévissent chez la volaille. Chez des poules recevant 10 mg/kg PV sur 7 jours, l'activité contre les infestations par *Ascaridia*, *Heterakis* et *Capillaria* est de 100 %. Avec une augmentation de la posologie à 20 mg/kg PV, la molécule est également efficace contre les stades matures et immatures de *Raillietina cesticillus*. De même, chez les dindons, les oies, les faisans et les perdrix, le médicament est efficace contre les principaux parasites qui affectent ces volailles.

Le flubendazole a également un effet ovicide. C'est ce qui ressort d'une étude où des poules ont été infestées par des œufs *d'Ascaridia* et *d'Heterakis*. Avec un traitement à 10 mg/kg pendant 7 jours, les vers ont été totalement éliminés en 2 à 3 jours. En outre, on a observé à partir du deuxième jour une forte réduction du pourcentage d'œufs de vers embryonnés dans les fèces, ce qui prouve l'effet ovicide.

Yazwinski (1995) donne des résultats d'études effectuées chez des dindons, d'où il ressort que les benzimidazoles sont nettement plus efficaces que la pipérazine contre les infestations vermineuses.

### **Programmes de vermifugation stratégique**

Le prémélange médicamenteux Flubenol (flubendazole 0,6 %) est enregistré pour le traitement, par l'aliment, des infestations vermineuses chez les poules, dindes, oies et faisans. Pour les poulets, les dindes et les reproducteurs, la posologie habituellement nécessaire est de 10 mg/kg à distribuer sur 7 jours ; pour le déparasitage des faisans et des perdrix, il faut utiliser 20 mg/kg PV toujours répartis sur une période de 7 jours en prévention du risque de syngamose.

Les intervalles recommandés pour répéter le traitement sont fonction de la période prépatente du ver visé (cf. Tableau II).

Tableau III :

Programmes de vermifugation stratégique avec des aliments supplémentés en Flubénol 0,6 %

Catégorie d'oiseaux	Quand traiter ?	Flubendazole	
		Posologie / 7 jours	Concentration dans l'aliment pendant 7 jours
Poulettes de remplacement élevés sur litière	5, 10, 15 semaines d'âge et avant transfert	10 mg/kg	30 ppm
Poules pondeuses en batterie	Avant transfert	10 mg/kg	30 ppm
Poules pondeuses sur litière	- En cas de forte pression d'infestation, toutes les 3 ou 4 semaines en fonction du parasite visé (Heterakis ou Ascaridia) - En cas de faible pression d'infestation, toutes les 6 à 8 semaines	10 mg/kg	30 ppm 60 ppm en cas de Raillietina sp.
Reproducteurs chair	- En cas de forte pression d'infestation, toutes les 3 ou 4 semaines en fonction du parasite visé (Heterakis ou Ascaridia) - En cas de faible pression d'infestation, toutes les 6 à 8 semaines	10 mg/kg	30 ppm 60 ppm en cas de Raillietina sp.
Dindes chair	- A 5, 10 et 15 semaines d'âge (en fonction de l'âge d'abattage). - En cas d'hétérakidose, l'intervalle entre deux traitements doit être ramené à 3 semaines. - En cas de syngamose, l'intervalle entre deux traitements doit être ramené à 15 jours.	10 mg/kg	30 ppm
Poulets label	A 4 et 8 semaines d'âge en cas de forte pression d'infestation, en particulier à Heterakis ou Ascaridia	10 mg/kg	30 ppm
Faisans et perdrix	A 3, 7 et 11 semaines d'âge (l'intervalle maximal sera de 3 semaines entre deux traitements en raison du risque de syngamose). Protéger les mangeoires des intempéries.	20 mg/kg	60 ppm
Oies et canards	A 3, 7 et 11 semaines d'âge, avec un maximum de 3 semaines entre deux traitements	20 mg/kg	60 ppm

## Conclusion

Chez la volaille comme chez les autres espèces d'animaux, les vers peuvent réduire considérablement les performances zootechniques. Avec la réduction des outils thérapeutiques disponibles et les modifications des modes d'élevage, les mesures d'hygiène sont de plus en plus importantes. Dans ce cadre, le programme de vermifugation préventive doit être raisonné dans chaque exploitation avicole en fonction des risques helminthiques majeurs.

## Références

1. *Beasley JN, Norton RA, Skeeles JK, et al. Histologic study of hepatic lesions in two turkey flocks Avian Diseases, 1997,41(2) : 347-53.*
2. *Dunn PA. Enteritis and hepatitis associated with nematode larvae in market turkeys. AAVLD Histopathology Slide Conference, 1995, October 29, Sparks, Nevada.*
3. *Hegnig FN, Doer J et al. The effectiveness of benzimidazole derivatives for the treatment and prevention of histomonosis (blackhead) in turkeys, Vet. Parasitol., 1999 : 81, 29-37.*
4. *Hu J et McDougald LR. Direct lateral transmission of Histomonas meleagridis in turkeys. Avian Disease, 2003 : 47(2), 489-492.*
5. *Niekerk Th van, Bosch J. Gezondheid van volièrehennen op praktijkbedrijven. Praktijkonderzoek, 1996(1) : 13-17.*
6. *Norton RA. Hepatic foci in turkeys: some questions answered. Turkey World, 1997, May-June : 30-31.*
7. *Norton RA, Hopkins BA, Skeeles JK, et al. High mortality of domestic turkeys associated with Ascaridia dissimilis. Avian Diseases 1992;36(2) : 469-73.*
8. *Norton RA, Ricke SC, Beasley JN, et al. A survey of sixty flocks exhibiting hepatic foci taken at time of processing. Avian Diseases 1996, 40(2) : 466-72.*
9. *Permin A. et Hansen JW. The epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites.*
10. *A FAO Handbook, Internet, 2004, 149 p.*
11. *Van Wambeke F, Van Meirhaeghe P. The effect of meal and pelleted diets supplemented with Flubenol (flubendazole) and R 035475 on reproductive parameters in broiler breeders. Presented on the WPSA Congress, Jerusalem, 1998.*
12. *Willoughby DH, Bickfor AA, Charlton BR et al. Ascaridia dissimilis larval migration associated with enteritis and low market weights in meat turkeys. Avian Diseases, 1995 ; 39(4) : 837-43.*
13. *Yazwinski TA. Worming programs for turkeys in the field. Presented at the Pacesetter Conference at the National Turkey Federation Annual Meeting, USA, 1995.*



# ***MAITRISE DES FLORES DIGESTIVES***

**De l'équilibre de la flore digestive  
à la maîtrise de l'intégrité intestinale.**

DR CHRISTOPHE BOSTVIRONNOIS, LILLY FRANCE ELANCO.

**Intérêt des sulfamides dans la maîtrise simultanée  
des entérites non spécifiques  
et des coccidioses chez les volailles.**

DR BERNARD HESKIA, NOVARTIS SANTÉ ANIMALE.

**Importance de la viande de volaille  
dans la transmission de la camylobactériose humaine.**

DR GINETTE MARCHANT, INSTITUT DE LA SANTÉ PUBLIQUE BELGE  
ET INSTITUT SCIENTIFIQUE RÉGIONAL DE SERVICE PUBLIC.

**L'acidification de l'eau de boisson : intérêt et limites.**

DR ERIC CHATAIGNER, SELVET-CONSEIL.

# **DE L'ÉQUILIBRE DE LA FLORE DIGESTIVE À LA MAÎTRISE DE L'INTÉGRITÉ INTESTINALE.**

**Dr Christophe BOSTVIRONNOIS**

LILLY ELANCO

## **Introduction**

Les bouleversements de formules alimentaires liés à l'arrêt des produits animaux dans l'alimentation des volailles de chair ont particulièrement fragilisé l'équilibre de la flore digestive et l'intégrité intestinale des oiseaux, garante de leur santé, de leurs performances et de leur bien-être.

L'autre élément de risque adopté par une partie de la filière est de se passer des régulateurs de flores. Il faut donc reconstruire un mur de protection solide afin de recréer une bonne intégrité intestinale.

Après une description des différents types de diarrhée et mécanismes physiologiques, nous voyons plus en détails la description de la dysbactériose et l'explication de l'association intime que peut avoir deux types de pathogènes intestinaux majeurs : les coccidies parasites mucogènes et la flore mucolytique dont fait partie *Clostridium perfringens*.

La détection des phénomènes de déséquilibres digestifs passe par l'utilisation d'outils en élevage tels que l'ELANCOBOX qui permet de déceler les signes précoces de dysbactériose, mais d'autres outils de laboratoire permettent de mieux comprendre également la dynamique des infections bactériennes intestinales.

En effet, l'impact économique des affections subcliniques n'induisant pas de mortalité mais aux conséquences technico-économiques très importantes a pu être estimé à 5 centimes d'euro par oiseau.

## **1. Description des mécanismes de mise en place d'une dysbactériose**

Les dernières connaissances des mécanismes physiologiques et d'analyse des flores intestinales nous ont permis de mieux comprendre comment pouvait se mettre en place la flore bactérienne normale des volailles de chair.

Si, jusqu'à présent, les études bactériologiques de type pasteurien permettaient de penser qu'une flore normale de poulet était majoritairement de type Gram + avec une forte prédominance des lactobacilles à plus de 99,5 % ; les études menées par Lee ont montré une vision complètement différente de la réalité d'une flore normale de poulet . Elle a dû avoir recours pour cela à une technique d'amplification PCR quantitative sur l'ADN ribosomal 16S. Certes cette méthode a permis de confirmer que les lactobacilles constituent la flore majoritaire de l'intestin des volailles cependant le pourcentage normal ne serait que des 2/3 au lieu de 99,5 %. Le reste de la flore est très variable avec entre autres la démonstration de la possibilité pour un certain nombre de germes Gram positif (*Clostridiaceae*) de s'implanter au niveau intestinal et de manière durable dans l'intestin des volailles et ceci dès 3 jours d'âge. Les méthodes habituelles de bactériologie sur ce

type de germe sont extrêmement difficiles à réaliser par les méthodes classiques de laboratoire (milieu spécifique, anaérobiose stricte, culture longue) et parce que, très souvent, une flore dominante vient supplanter cette flore qui potentiellement a pu se mettre en place. Les flores de type streptocoque ou entérocoque font également partie de ces flores négligées par le passé. Quant aux flores colibacillaires, elles sont très faibles en conditions normales.

Les autres facteurs de compréhension des déséquilibres digestifs ont pu être amenés par Paneman qui a démontré que lors d'entérite et de dysbactériose, très fréquemment, une flore dominante indésirable supplantait la flore normale lactique. La méthode d'analyse de type 16S r ARN T-RFLP a permis de montrer que ces flores étaient de type Gram positif pouvant être du *Clostridium perfringens* mais non systématiquement. On peut donc avoir une perturbation complète de la flore normale due à un dérèglement de la flore lactobacillaire. En fait, si les entérites du jeune âge peuvent être dues fréquemment à des germes Gram négatif de type colibacille ou salmonelle, il en est tout autrement sur des oiseaux plus âgés (plus de 10-12 jours d'âge), entre autres les conditions du milieu intestinal (en particulier l'anaérobiose) font que les déséquilibres entériques sont majoritairement Gram positif.

Gaskins et Van der Klis ont pu montrer expérimentalement les processus de développement de ces flores Gram positif à travers un modèle expérimental reproduisant l'intégrité de la muqueuse. Ce modèle a ainsi prouvé l'étroite relation qu'il y avait entre coccidies et *Clostridium perfringens*. La présence en quantité importante de coccidies au niveau intestinal, provoque au contact de la muqueuse intestinale une réaction inflammatoire normale de la muqueuse. Celle-ci mobilise plusieurs moyens de défenses : des défenses spécifiques classiques via des IgA et des IgG et IgM, par un afflux de cellules de la lignée blanche (macrophages, polynucléaires,...) et par des défenses non-spécifiques, parmi lesquelles l'inflammation et la congestion qui amènera sur le site un afflux de cellules de défense et surtout une production de mucus par les cellules caliciformes ou cellules à gobelets.

Ce dernier moyen de défense revêt un caractère très important. Devant une agression, et les coccidies n'en sont qu'un exemple, la muqueuse intestinale va essayer de se protéger en sécrétant une quantité de mucus sur sa surface qui va créer une barrière cherchant à éloigner les agents agresseurs de la surface de l'épithélium. Ce moyen de défense non-spécifique peut paraître séduisant à première vue mais en fait ce mucus constitue un substrat nutritif pour des bactéries saprophytes appelées mucolytiques. En effet, cette flore est tout à fait capable de vivre, de se nourrir et de se multiplier dans ce mucus, sa multiplication perturbe alors les équilibres digestifs et peut provoquer une entérite de type dysbactériose. En outre, un point particulier est à noter : parmi ces bactéries mucolytiques il en existe une qui s'appelle *Clostridium perfringens*.

*Clostridium perfringens* est en effet capable de profiter de la multiplication de mucus pour se multiplier et se reproduire. Un autre élément intervient, c'est que *Clostridium perfringens* est capable de produire une toxine, la toxine alpha qui entre autre effet a la possibilité de stimuler les cellules caliciformes productrices de mucus. On aboutit à un effet pervers puisque *Clostridium perfringens* est ainsi capable de stimuler la production de sa propre source d'énergie et d'entretenir sa multiplication.

Il est donc impératif de lutter contre toute agression de la muqueuse qui inévitablement répondra par une production de mucus. Cette flore mucolytique qui trouve les conditions idéales de sa survie sera responsable d'entérite et devra être traitée par une antibiothérapie adaptée. Ces

démonstrations permettent de comprendre la bonne efficacité des antibiotiques à spectre gram positif en particulier des macrolides sur les dysbactérioses et entérites à *Clostridium* dont *Clostridium perfringens* est le chef de file.

## 2. Quels outils de diagnostic ?

Un des premiers outils de diagnostic a été l'ELANCOBOX. Un suivi sur de nombreux élevages a pu montrer que deux périodes à risque existaient au cours de la vie du poulet standard.

La première période se situe vers l'âge de 12 à 15 jours où on voit les scores d'humidité des fientes monter de manière très importante. Cet état de fait peut s'expliquer par la mise en place progressive de la flore normale à lactobacilles en lieu et place de la première flore aérobie du jeune poussin qui certes profite de la viduité du tube digestif à 1 jour et qui est la première à pouvoir s'installer car se multipliant le plus vite sans être pour autant la flore définitive. La bascule entre la première flore colonisatrice et la flore lactobacillaire va se faire vers cet âge de 13 à 15 jours. C'est donc une période très sensible pour le jeune poussin et une entérite peut tout à fait survenir si une flore indésirable prend le dessus sur la flore normale du jeune poulet.

La seconde période à risque apparaît à partir de 28 à 29 jours d'âge avec une remontée brutale et très importante des scores d'humidité des fientes mesurés par l'ELANCOBOX. Ici l'explication provient du passage à l'aliment retrait et de l'arrêt en particulier du coccidiostat dans l'aliment. On sait depuis les travaux de Watkins que les coccidiostats en particulier ionophores ont une activité sur une partie de la flore Gram positive et en particulier sur *Clostridium perfringens* : le narasin s'est révélé dans cette étude être le coccidiostat le plus efficace contre *Clostridium perfringens* et au niveau des sensibilités de certains antibiotiques tels que l'avilamycine ou l'avoparcine. Il est donc compréhensible que l'arrêt du coccidiostat laisse la place libre dans les élevages sensibles aux troubles digestifs et à la multiplication de la flore que celui-ci contrôlait auparavant. Il ne s'agit pas de coccidiose, par ailleurs bien contrôlée normalement à cet âge par l'immunité des oiseaux, mais bien de dysbactériose. Ceci a pu être montré par les suivis ELANCOBOX avec une augmentation de près de 10 points du pourcentage de fientes humides.

Ceci dit, d'autres outils existent pour mieux cerner l'occurrence et l'incidence de *Clostridium perfringens*. Parmi ceux-ci, il en existe un le Clostritest qui est un kit ELISA sur fientes ou contenu digestif et qui a le mérite de quantifier la présence de *Clostridium perfringens*. Cette approche doit, à notre sens, être réservée lors de volonté de compréhension de la dynamique de l'infection dans un élevage. Dans l'exemple démontré, il s'est avéré que le pic d'excrétion de *Clostridium perfringens* culminait autour du douzième jour puis baissait progressivement, par contre le pic de toxine alpha était beaucoup plus tardif autour de 22 jours. Dans cet élevage, les traitements antibiotiques se faisaient classiquement autour de 25 jours, période où l'éleveur s'alarmait pour « litière humide », mais cette approche a pu montrer que ce traitement était beaucoup trop tardif et qu'en fait il aurait fallu le positionner près de 10 jours plus tôt pour obtenir le meilleur résultat.

## 3. Quelles possibilités de traitement ?

Au-delà du choix de la molécule, l'expérience montre qu'il est extrêmement important de bien cibler et traiter au bon moment, on s'aperçoit trop souvent que l'on ne traite que tardivement alors

que des outils simples et peu onéreux sont disponibles pour mettre en oeuvre une thérapie de précision.

En fait une approche rationnelle nous permet de dire que le choix du coccidiostat est un facteur clef de maîtrise de l'intégrité intestinale. Dans les organisations à problème, l'utilisation de narasin est un des moyens simples de maîtrise de l'intégrité intestinale par sa double action sur coccidies et sur *Clostridium perfringens*, sans perturber l'installation de l'immunité naturelle des oiseaux comme peuvent le faire les anticoccidiens chimiques tels que amprolium, toltrazuril ou sulfamides.

Les approches de type P.C.R. ont montré que les déséquilibres de flore au-delà de 10 jours, sont majoritairement dus à une dysbactériose de flore Gram positif et que les antibiotiques à spectre ciblé Gram positif s'avèrent les plus efficaces. L'action de la tylosine à la fois sur *Clostridium perfringens*, sur son activité toxigène (par inhibition de l'activité ribosomale) mais également sur la flore mucolytique avec une baisse sensible des populations bactériennes lors de traitement à 10 mg/kg Poids Vif, les très bonnes C.M.I. in vitro (C.M.I. 90 de 0,25 µg/ml sur *Clostridium perfringens*), le cycle entéro-hépatique de la molécule sont les garants de l'efficacité de la tylosine en élevage.

## Conclusion

Au cœur de l'intégrité intestinale, il y a, nous l'avons vu, la maîtrise de la production de mucus par les cellules caliciformes, il est bien entendu que tout agent irritant viendra stimuler cette production qu'il soit d'origine virale, nutritionnelle, environnementale ou parasitaire.

L'approche thérapeutique nous amène à comprendre l'intérêt et la pertinence des traitements à spectre Gram positif avec deux axes de prévention :

- par la prévention avec un programme coccidiostat ionophore dont le narasin s'avère être le plus efficace ;
- par le traitement ciblé à base d'antibiotiques à spectre étroit dont la tylosine prouve son efficacité tant in vivo qu'in vitro.

Les outils de diagnostic comme l'Elancobox ou le Clostritest seront sans doute demain la clé de la prescription et de la valorisation de nos techniques d'élevages et de notre maîtrise sanitaire en volailles de chair.

Au-delà des clivages idéologiques, l'enjeu de ces pratiques est aussi la pérennité de nos modes de production raisonnés. Plus que jamais demain nous aurons besoin d'outils d'élevage et de laboratoire qui permettent de justifier nos pratiques de prévention et de traitement thérapeutique.

L'antibiothérapie doit être replacée à sa juste place : garante de la qualité sanitaire des animaux, du maintien de l'intégrité physiologique de ceux-ci et, par voie de conséquence, du bien-être animal.

## Bibliographie

1. Brennan J., et Al, *Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens*, *Poultry science*, volume 80, Issue 10, 2001, p. 1451-1454.
2. Collier, C.T., Van der Klis J.D., et Al. *Effects of tylosin on bacterial mucolysis, Clostridium perfringens colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Oct;47(10):3311-7.
3. Devriese L.A., et Al, *In vitro susceptibility of Clostridium perfringens isolated from farm animals to growth-enhancing antibiotics*, *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 75, 55-57.
4. Gaskins, H.R., *Pathophysiology of Clostridial Enteritis and the impact of treatment : lessons from a chick model*, *Proceedings of ELANCO Symposium, Cambridge 2002.*
5. Lee, M., *Microbial dynamics of the Broiler Intestinal Tract*, *Proceedings of ELANCO Symposium, Cambridge 2002.*
6. Mortimer, I. *The detection of dysbacteriosis. Proceedings of ELANCO Symposium, Cambridge 2002.*
7. Panneman, H. *Clostridial enteritis/dysbacteriosis. Fast diagnosis by T-RLFP, a novel diagnostic tool. Proceedings of ELANCO Symposium, Montreal 2000.*
8. Stevens, D.L. *Effect of antibiotics on toxin production and viability of Clostridium perfringens*, *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol 31, 1987, p213-218
9. Van der Strom, J. Geelen J Pipers A, *Mal-digested feces in relation to intestinal aspecific bacterial overgrowth in broilers. In press.*
10. Vissienon Th., *Effect of avilamycin, tylosin and ionophore anticoccidals on Clostridium perfringens enterotoxaemia in chickens*, *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, volume 113, Issue 1, 2000, p.9-13.
11. Watkins K.L., Shryock T.R., et Al, *In vitro antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens from commercial turkey and broiler chicken origin*, *Veterinary Microbiology* 54 (1997) 195-200.

# **INTÉRÊT DES SULFAMIDES DANS LA MAÎTRISE SIMULTANÉE DES ENTÉRITES NON SPÉCIFIQUES ET DES COCCIDIOSES CHEZ LES VOLAILLES**

**Dr Bernard HESKIA**

NORVARTIS Santé Animale

## **Introduction**

Les sulfamides ou plus exactement, si l'on veut respecter la nomenclature actuelle, les sulfonamides sont des principes actifs dont on connaît bien les propriétés anticoccidiennes, en élevage de volailles et de lapins. En raison de leur âge, peut-être, on semble avoir oublié que ce sont des antibactériens à large spectre. C'est sur cette double activité que nous revenons aujourd'hui, tout particulièrement chez les volailles.

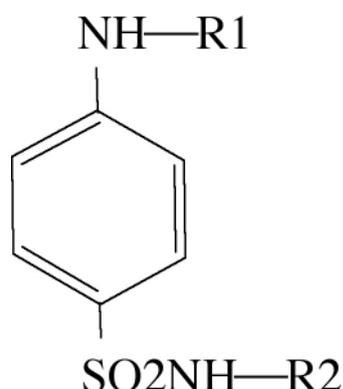
Après avoir évoqué les principales caractéristiques structurales, pharmacologiques de cette classe de molécules, nous évoquerons leur intérêt dans la maîtrise simultanée des coccidioses et des entérites non spécifiques au travers de données d'un de leur représentant, la sulfaclozine.

## **Définition**

On désigne sous le nom de sulfonamides antibactériens un ensemble de composés organiques artificiels :

- dérivés de la sulfanilamide;
- caractérisés par une fonction sulfonamide;
- doués d'une activité antibiotique bactériostatique à spectre large dirigée aussi bien contre les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif, ainsi que de propriétés anticoccidiennes.

Historiquement, les sulfonamides constituent le groupe d'antibactériens le plus ancien : ils sont apparus en thérapeutique en 1935, avant la pénicilline, à la suite de travaux sur des colorants, dérivés de l'aniline.



## **Structure**

- un noyau benzénique ;
- une fonction amine primaire aromatique parfois substituée par un groupement R1 (sulfamides aminosubstitués) ;
- une fonction sulfonamide -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> généralement substituée par un groupement R2 (sulfamides sulfamidosubstitués).

## Classification

### 1. Sulfonamides aminosubstitués

- Sulfachrysoïdine (Prontosil) : 1er colorant azoïque ayant montré des propriétés anti-infectieuses.

### 2. Sulfonamides sulfamidossubstitués

#### - Substituants aliphatiques :

- sulfacétamide ;
- sulfaguanidine ;
- sulfathiazole.

#### - Substituants hétérocycliques (cycle à 5 ou 6 chaînons) :

- sulfaméthoxazole (5) ;
- sulfaméthizole (5) ;
- sulfamérazine ;
- sulfadimidine ou sulfadimérazine ;
- sulfapyridine ;
- sulfadiazine ;
- sulfamonométoxine ;
- sulfadiméthoxine ;
- sulfadoxine ;
- sulfaméthoxy-pyridazine ;
- sulfaquinoxaline ;
- sulfaclozine ou sulfachloropyridazine.

### 3. Sulfonamides mixtes

- succinylsulfathiazole ;
- phtalylsulfathiazole.

## Pharmacocinétique

Il est intéressant d'insister sur quelques points qui permettent de mieux comprendre les propriétés de ces différents principes actifs.

1. **Résorption** : Administrés par voie orale, leur résorption est rapide et complète. Seuls la sulfaguanidine et des dérivés mixtes qui sont ionisés dans l'estomac ne sont pas résorbés.

2. **Fixation aux protéines plasmatiques** : liée à la liposolubilité, elle est importante pour les formes hétérocycliques plus liposolubles ; cette propriété explique un certain "effet retard" de ces molécules.

3. **Biotransformation** : les sulfonamides subissent peu de biotransformations. Des acétylations pour les formes les plus anciennes conduisent à des métabolites peu hydrosolubles pouvant avoir des conséquences toxicologiques sévères (néphrotoxicité). Les formes hétérocycliques, plus récentes, subissent des hydroxylations qui conduisent à des métabolites hydrosolubles facilement éliminables.

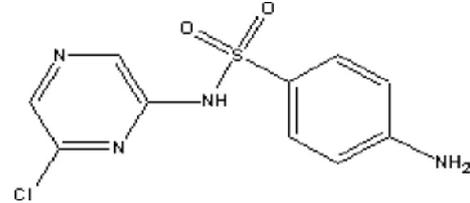
4. **Élimination** : elle est principalement rénale par filtration passive et surtout par sécrétion tubulaire active. Ce mécanisme explique que l'on atteigne des concentrations urinaires importantes.

## Activité antibactérienne

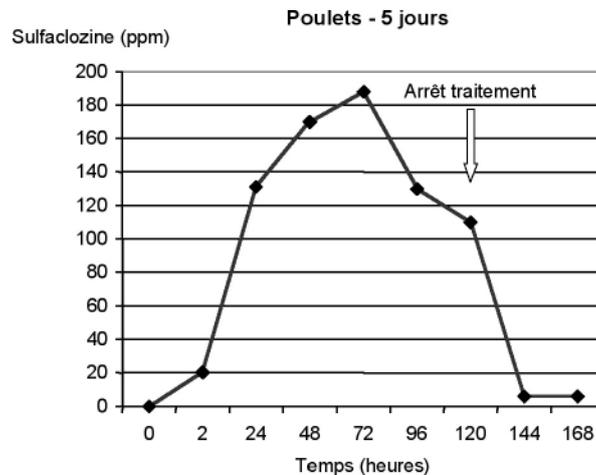
Les sulfonamides ont un spectre d'activité large. Ils sont actifs sur les bactéries à Gram positif (staphylocoques, streptocoques, Clostridium) comme à Gram négatif (Pasteurella, Salmonella, E. coli...). Intérêt tout particulier dans le traitement de l'entérite nécrotique due à Clostridium perfringens, en nette recrudescence depuis l'arrêt d'un certain nombre de facteurs de croissance.

Cas de la Sulfaclozine (COXISOL ND)

Sulfonamide sulfamidossubstitué, hétérocyclique.



Après 4 à 6 heures de contact minimum, on obtient un pic plasmatique >180 mg/litre



### 1. Sensibilité de Clostridium perfringens

34 souches aviaires isolées en France :

- la totalité des souches testées ont des CMI < ou = à 16 mg/l.

### 2. Sensibilité de Pasteurella multocida

30 souches de Pasteurella multocida isolées en Italie en 2000 et 2001 :

- 10 souches à CMI = 64 mg/l ;
- 20 souches à CMI < 64 mg/l.

### 3. Sensibilité de Salmonella enteritidis

54 souches de isolées en Hollande en 2001 :

- CMI90 = 128 mg/l (pic plasmatique > 180 mg/l).

## Activité anticoccidienne

Les sulfonamides, plus particulièrement les formes hétérocycliques ont une activité anticoccidienne. Ils sont coccidiocides à partir du stade schizontes de 2<sup>e</sup> génération.

Cette particularité est intéressante car elle permet :

- un renforcement de l'immunité (pas d'action sur la gamétogonie I);
- une élimination des phases délabrantes (schizontes II, gamètes, oocystes);
- une réduction de l'infestation de l'environnement (pas d'excrétion d'oocystes).

## Mécanisme d'action

Les sulfonamides sont des antibiotiques bactériostatiques qui agissent sur le métabolisme des acides foliques.

En raison d'une similitude structurale avec l'acide para-aminobenzoïque (P.A.B.), ce sont de véritables inhibiteurs compétitifs. Ils bloquent la synthèse des acides foliques, précurseurs de co-enzymes indispensables à la synthèse des acides nucléiques.

## Effets indésirables

Les sulfonamides possèdent globalement une toxicité très faible. Ils ont pourtant une mauvaise image liée aux accidents de néphrotoxicité observés avec les formes anciennes non hétérocycliques. Certains de leurs métabolites peu hydrosolubles ayant tendance à précipiter dans les tubules rénaux, on assistait à de véritables obstructions rénales et à des néphrites graves.

Ces accidents, fréquents autrefois, sont devenus rares avec l'utilisation de dérivés hétérocycliques à effet retard.

En élevage industriel de volailles, pour prévenir ce type d'accident l'été dans des poulaillers surchauffés, il est néanmoins prudent de veiller à ce que l'abreuvement soit correct.

## LMR

Les limites maximales de résidus définitives ont été fixées pour tous les sulfonamides. Elles sont valables dans toutes les espèces et dans toutes les productions.

## Utilisation

En général utilisés à la dose de 50 à 100 mg / kg PV dans l'eau de boisson.

Sulfaclozine :

- 60 mg/kg dans l'eau de boisson pendant 3 à 5 jours ;
- soit 2 g de Cosisol pour 10 kg de poids vif  
eau à pH neutre ou basique Ph > 5,5 (attention en Bretagne) ;
- Temps d'attente :
  - viandes et abats : 12 jours ;
  - œufs : 12 jours.

## Conclusion

Clostridies, salmonelles, coliformes, coccidies sont les principaux agents responsables de troubles entériques chez les volailles et les "Associations de malfaiteurs" sont fréquentes. Aujourd'hui, des solutions de plus en plus sophistiquées et onéreuses sont mises en œuvre. Pourtant face à ces choix, les sulfonamides dont les formes les plus récentes ont démontré leur innocuité, gardent un intérêt certain. Malgré leur grand âge, ils ont tout à fait leur place dans l'arsenal thérapeutique moderne.

## Bibliographie

Pr PUYT J.D., *Antibiotiques et Antibiogrammes (Notions de base) Département de Biologie et Pharmacologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes Septembre 1997*

# **IMPORTANCE DE LA VIANDE DE VOLAILLE DANS LA TRANSMISSION DE LA CAMPYLOBACTÉRIOSE HUMAINE.**

**Dr Ginette MARCHANT**

INSTITUT SCIENTIFIQUE DE LA SANTÉ PUBLIQUE - BELGIQUE

**Geneviève DUCOFFRE**

INSTITUT SCIENTIFIQUE DE LA SANTÉ PUBLIQUE - BELGIQUE

**Dr Robrecht FROYMAN**

BAYER HEALTHCARE SANTÉ ANIMALE - ALLEMAGNE

## **Introduction**

La campylobactériose est considérée comme une zoonose, maladie transmise à l'homme par les animaux ou les produits qui en dérivent. La présence de *Campylobacter* est démontrée chez les animaux destinés à l'alimentation comme la volaille et les porcs et chez les animaux de compagnie tels le chien et le chat.

On pense en général que la principale voie de transmission passe par l'alimentation : viandes ou produits carnés pas assez cuits, lait cru ou contaminé. La contribution relative de chacune de ces sources d'infection dans la charge totale de morbidité reste actuellement l'une des principales lacunes des connaissances actuelles.

Afin d'étudier le rôle de la viande de volaille dans la transmission de la campylobactériose, une étude a été réalisée en Belgique.

Cette étude est divisée en deux parties :

Première partie

1. Epidémiologie de la campylobactériose humaine ;
2. Surveillance des *Campylobacter* dans les denrées alimentaires ;
3. Consommation de viande de volaille en Belgique ;
4. Lien entre ces trois variables.

Deuxième partie :

Etude de différents facteurs influençant le taux d'incidence de campylobactériose humaine.

## **PREMIERE PARTIE**

### ***Introduction***

La Belgique est un état fédéral divisé en :

1. 3 régions : la Flandre, la Wallonie, Bruxelles Capitale.
2. 10 provinces ;
3. 43 arrondissements ;
4. 589 communes.

En 2002, l'ensemble de la population s'élevait à 10 309 725 habitants formant 4 319 000 ménages. La Flandre, région du nord du pays a une densité de population plus élevée que la Wallonie : 442 habitants/km<sup>2</sup> au Nord pour 199 habitants/km<sup>2</sup> au sud.

## **1. Epidémiologie de la campylobactériose humaine**

### • Transmission

A l'heure actuelle, la campylobactériose et la salmonellose sont les premières causes de diarrhée bactérienne en Belgique. Les infections à *Campylobacter* et à *Salmonella* sont du même ordre de grandeur. Les cas individuels de campylobactériose sont plus fréquents que les épidémies.

Les symptômes apparaissent en général deux à cinq jours après l'infection, mais l'incubation peut aller de un à dix jours. Les symptômes cliniques les plus courants sont la diarrhée, la fièvre et des céphalées. Ils durent en général de trois à six jours. L'excrétion de bactéries dans les selles dure en moyenne trois semaines (limites : 2 à 4 semaines). L'issue fatale est rare. Les complications post-infectieuses peuvent comprendre l'arthrite et des troubles neurologiques, comme le syndrome de Guillain-Barré, une forme de paralysie pouvant aboutir à des troubles respiratoires et neurologiques graves. L'incidence élevée des diarrhées à *Campylobacter*, leur durée et leurs séquelles éventuelles, donne à celles-ci une grande importance sur le plan socio-économique.

### • Surveillance des *Campylobacter* au niveau humain<sup>1</sup>

En Belgique, depuis 1983, la section d'Epidémiologie de l'Institut Scientifique de Santé Publique coordonne la surveillance nationale des maladies infectieuses par un réseau de laboratoires de microbiologie appelé Réseau des Laboratoires Vigies.

Les principaux objectifs de ce réseau sont :

- A. le suivi annuel et en cours d'année des tendances épidémiologiques des micro-organismes enregistrés ;
- B. la recherche de foyers d'infections ;
- C. la diffusion des données récoltées vers les laboratoires participants, vers les autorités et les institutions concernées par les problèmes de santé publique.

### • Méthode de surveillance

Ce réseau de surveillance était constitué de 121 laboratoires de microbiologie en 2002 dont 70 % sont hospitaliers et 30 % privés. Ces laboratoires représentaient 51 % de l'ensemble des laboratoires agréés pour la microbiologie et étaient répartis dans 34 des 43 arrondissements du pays. Ce réseau couvre 70 % des examens de selles réalisés dans le pays. Les laboratoires enregistrent sur une base volontaire les données épidémiologiques relatives à un certain nombre de micro-organismes et les transmettent chaque semaine à l'Institut.

Grâce à ce réseau, la surveillance des infections à *Campylobacter* est réalisée depuis 20 ans.

Depuis 1983 jusqu'en 1996, l'augmentation du nombre annuel de cas de *Campylobacter* s'explique par les phénomènes suivants :

- En 1990 : obligation légale de chercher les *Campylobacter* dans toute coproculture ;
- En 1993 : amélioration des milieux de culture ;
- En 1995/96 : standardisation des méthodes de recherche.

Après 1996, le nombre annuel de cas a continué à augmenter de manière statistiquement significative mais les raisons pour lesquelles cette augmentation est observée sont toujours inconnues.

Un pic est enregistré chaque année au mois d'août.<sup>1</sup>

## 2. Surveillance des *Campylobacter* dans les denrées alimentaires<sup>2</sup>

Le laboratoire national de référence en microbiologie des denrées alimentaires est responsable de l'application de la Directive Européenne "Zoonose : 92/1117/CEE, contrôle hygiène : 2001/471/EC". Les procédures d'échantillonnage sont standardisées depuis 1999 et le taux de contamination du poulet par des *Campylobacter* n'augmente pas depuis cette date.

## 3. Consommation de viande de volaille en Belgique<sup>3</sup>

L'Institut National de Statistiques (INS) et auparavant le Centre d'Economie Agricole réalisent chaque année, de façon standardisée, un bilan sur les abattages, les importations et les exportations de la viande des animaux de rente. Ce bilan permet de déterminer la consommation de viande de volaille par habitant et par année.

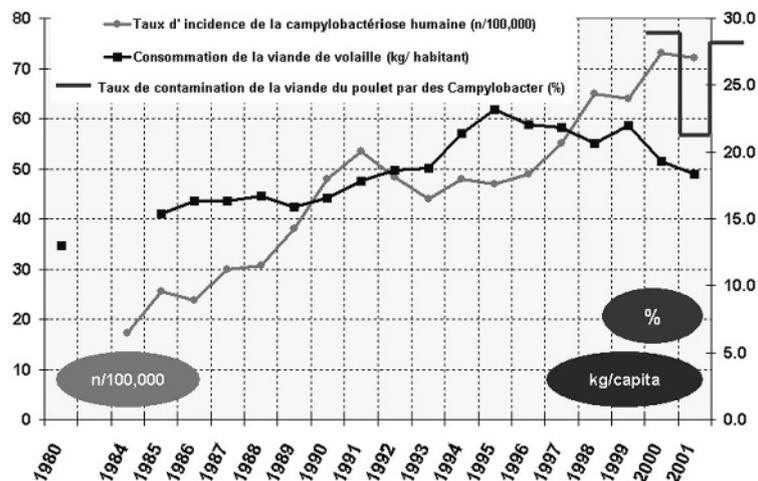
Les calculs montrent que depuis 1995 la consommation annuelle de kg de volaille par habitant diminue.

## 4. Lien entre ces trois variables

Le schéma ci-contre représentant :

- l'augmentation du nombre de cas de campylobactériose humaine ;
- la stabilité du taux de contamination de la viande de volaille ;
- la diminution de la consommation de viande de volaille.

montre que la viande de volaille n'est pas un élément majeur dans la transmission des *Campylobacter* à l'homme.



## DEUXIEME PARTIE

Etude de différents facteurs influençant le taux d'incidence de campylobactériose humaine (TICH) Afin d'analyser le rôle de quelques facteurs impliqués dans la transmission des *Campylobacter* à l'homme, chacun de ceux-ci a été analysé séparément.

## ***A. Recherche de facteurs de causalité expliquant le TICH plus élevé POUR LE PAYS***

Facteur densité de population (humaine et volaille)

La relation entre le taux d'incidence de la campylobactériose humaine (nombre de cas/100 000 habitants) et les différentes densités de population (volaille et humaine) a été analysée.

1. TICH et densité de population de volaille : pas de relation ;
2. TICH et proportion volaille/densité de population humaine : pas de relation ;
3. TICH et densité de population humaine par province : relation linéaire. Plus la province est peuplée, plus il y a de cas de campylobactériose.

On constate que le TICH est chaque année plus élevé en Flandre qu'en Wallonie et en particulier dans certains arrondissements. Une des caractéristiques des endroits avec un TICH élevé est d'avoir une densité de population plus élevée.

## ***B. Recherche de facteurs de causalité expliquant le TICH plus élevé PAR REGION***

1. Nombre d'examens de selles plus élevé en Flandre qu'en Wallonie : non.

Le nombre d'examens de selles réalisés dans chaque région est le même.

Nombre d'examens de selles/100 habitants/<sup>4</sup> :

- En Flandre : 3,5
- En Wallonie : 3,2

Données de l'INAMI.

2. Consommation plus élevée de poulets : non<sup>5</sup>.

Les Flamands consomment moins de poulets que les Wallons.

Données fournies par le GfK (Gesellschaft für Konsumentenforschung),

3. Présence plus importante d'animaux de compagnie (chiens, chats): non<sup>6</sup>.

Les Wallons ont plus d'animaux de compagnie que les Flamands.

## ***C. Recherche de facteurs de causalité expliquant le TICH plus élevé PAR ARRONDISSEMENT***

Pour étudier l'importance des variables suivantes, trois groupes d'arrondissement ont été créés :

- Arrondissements avec déclaration élevée de campylobactériose humaine (CH) ;
- Arrondissements avec déclaration basse de CH ;
- Arrondissements avec déclaration très basse de CH.

1. Densité de population humaine : oui.

Les arrondissements avec une déclaration élevée de CH ont une densité de population 1,6 fois plus élevée que les arrondissements avec une déclaration très basse de CH.

## 2. Manger de la volaille à l'extérieur de la maison : oui.

Les arrondissements avec une déclaration élevée de CH dépensent 40% en plus pour manger à l'extérieur. Cette observation confirme les résultats de plusieurs études cas-témoins : le fait de manger de la volaille à l'extérieur est un facteur de risque pour la campylobactériose humaine tandis que manger du poulet à la maison est un facteur protecteur.

## 3. Voyages : oui.

Un pic estival des infections à *Campylobacter* est enregistré au mois d'août chaque année en Belgique alors qu'il n'y a pas de pic de la consommation de poulet durant cette période.

La saisonnalité des infections à *Campylobacter* est comparable à la saisonnalité des voyages.

Les arrondissements à déclaration élevée de CH sont ceux où les gens passent plus de temps en voyage par rapport à ceux des autres arrondissements.

## Conclusion

D'après cette étude, d'autres facteurs que la viande de volaille sont impliqués dans la transmission de la campylobactériose à l'homme.

Des études épidémiologiques complémentaires sont nécessaires afin de préciser le poids des facteurs densité élevée de population humaine, voyages et repas à l'extérieur sur la transmission de la campylobactériose à l'homme.

## Sites Internet

1. *Surveillance des Campylobacter au niveau humain.*  
<http://www.iph.fgov.be/epidemio/epifr/INDEX.HTM>
2. *Surveillance des Campylobacter dans les denrées alimentaires*  
<http://mda04.fmv.ulg.ac.be/>
3. *Consommation de viande de volaille en Belgique<sup>3</sup>*  
[http://www.statbel.fgov.be/home\\_fr.htm](http://www.statbel.fgov.be/home_fr.htm)
4. *Nombre d'examen de selles/100 habitants*  
Données de l'INAMI, <http://inami.fgov.be/><sup>4</sup>
5. *Consommation plus élevée de poulets : non*  
<http://www.gfk.be/>
6. *Présence plus importante d'animaux de compagnie (chiens, chats): non*  
Données de l'INS, [http://www.statbel.fgov.be/home\\_fr.htm](http://www.statbel.fgov.be/home_fr.htm)

# **ACIDIFICATION DE L'EAU DE BOISSON : INTÉRÊTS ET LIMITES.**

**Dr Eric CHATAIGNER**

SELVET CONSEIL - CHÂTEAUBOURG

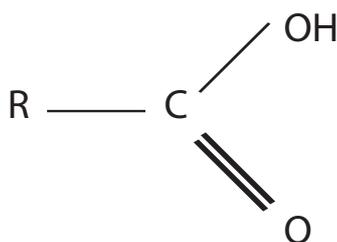
## **Introduction**

Depuis quelques années maintenant, les acides sont utilisés avec plus ou moins de succès dans l'eau de boisson des volailles pour la maîtrise des litières. Ce sont d'abord les acides organiques qui furent utilisés, puis des complexes d'acides organiques et de peroxyde d'hydrogène. Enfin, les acides minéraux et les complexes d'acides organique ont fait leur apparition. A l'origine de cette demande massive d'acide se trouve une volonté d'abaisser le pH de l'eau de boisson afin d'optimiser les capacités digestives des volailles pour améliorer les indices de consommation alimentaire (IC) et donc par voie de conséquence les marges de l'élevage. Qu'en est-il réellement ? Un pH acide est-il réellement corrélé avec des indices de consommation bas ? Nous aborderons dans un premier temps la notion du pH et quels sont les facteurs susceptibles de le faire varier. Nous essayerons d'analyser ensuite quels peuvent être les intérêts réels de l'abaissement du pH dans les eaux de boisson des volailles.

## **1. pH et acides.**

### **1.1. définitions**

D'une manière générale, on appelle acide toute molécule capable de libérer dans son milieu environnant des ions H<sup>+</sup> ou protons. Plus précisément, on appelle acide organique toute molécule pos-

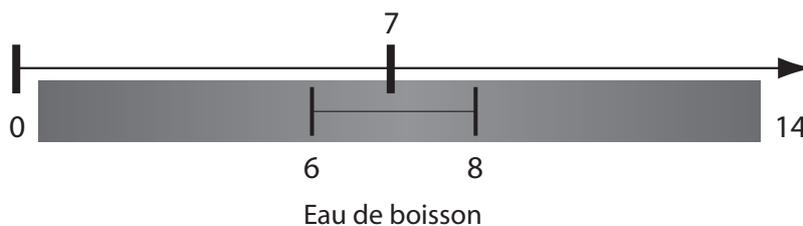


sédant la fonction chimique suivante :

Le proton qui sera libéré est le H<sup>+</sup> venant de la fonction OH.

Le pH d'une solution représente quant à lui la concentration en ion H<sup>+</sup> exprimée en Log (H<sup>+</sup>). Une valeur de pH à 6 par exemple signifie que l'on a 10<sup>-6</sup> moles (1 millionième) d'ion H<sup>+</sup> par litre de solution, ce qui est extrêmement faible. Dans une eau de boisson normale, les valeurs du pH oscillent entre 6 et 8, ce qui signifie que l'on trouve entre 10<sup>-6</sup> moles et 10<sup>-8</sup> moles de H<sup>+</sup> par litre d'eau.

Les valeurs de pH sont comprises entre 0 et 14. pour un pH =7, on se trouve dans la zone de neutralité acido-basique.



### 1.2. Les différents acides.

Les acides sont divisés en deux catégories : les acides forts et les acides faibles.

- Les acides forts.

Exemple : acide chlorhydrique, acide nitrique ou acide sulfurique.

Ce sont des acides qui mis en solution libèrent totalement leur proton  $H^+$  :



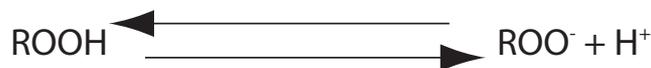
Il n'existe aucune réserve à proton  $H^+$  après leur mise en solution. Par contre ces acides provoquent une très forte baisse du pH à de très faibles concentrations.

- Les acides faibles ou acides organiques.

Exemples :

acide acétique (vinaigre), acide citrique, acide formique, acide lactique, acide propionique...

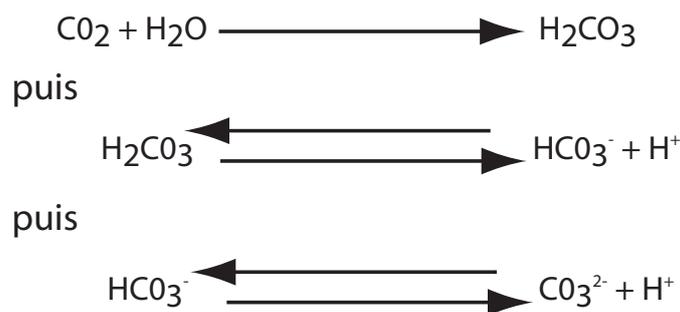
Ce sont des acides qui, mis en solution, libèrent partiellement leurs protons  $H^+$  selon la réaction réversible suivante :



Au contraire des acides forts, la dissociation est partielle et il reste une réserve à protons  $H^+$  à l'origine du pouvoir tampon de ces acides. Cela leur permet de garder un pouvoir acidifiant malgré une neutralisation (jusqu'à une certaine limite) par des sels basiques par exemple. Par contre leur pouvoir acidifiant est nettement inférieur à celui des acides forts, ce qui nécessite des concentrations d'acide plus importantes pour obtenir une même valeur de pH.

## 2. le pH de l'eau de boisson

L'eau de boisson contient plusieurs substances dissoutes qui vont modifier ses propriétés physico-chimiques. Les principales qui sont également responsables de la dureté totale de l'eau (Titre hydrotimétrique ou TH) sont les carbonates de calcium (dureté carbonatée ou KH) et les carbonates de magnésium (dureté magnésienne). Ils résultent de la combinaison du  $CO_2$  atmosphérique solubilisé et des ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ . Le  $CO_2$  est un acide faible qui se combine avec les molécules d'eau pour donner l'acide carbonique ( $H_2CO_3$ ) qui pourra ensuite libérer successivement 2 protons  $H^+$ .



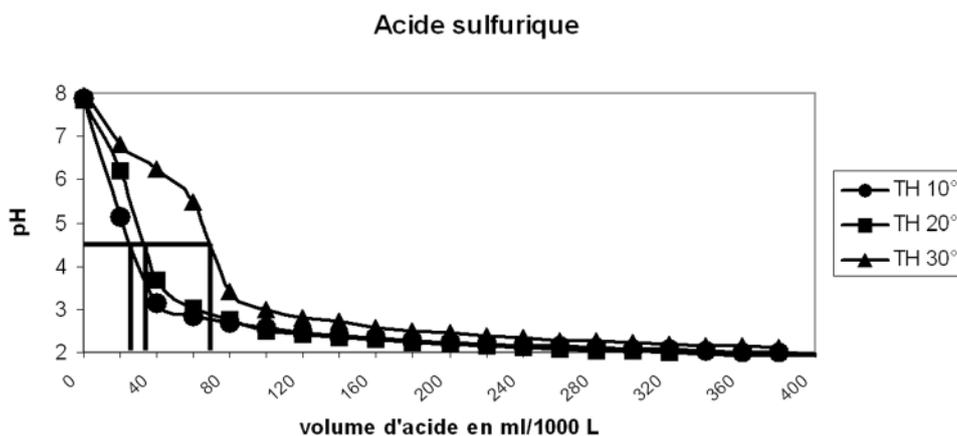
Le couple acido-basique  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{CO}_3^{2-}$  représente le principal système tampon de l'eau de boisson. Par conséquent, plus une eau sera dure, plus il faudra incorporer de l'acide pour faire baisser le pH. Il existe d'autres substances qui peuvent avoir une influence sur le pH d'une eau que l'on pourrait regrouper sous le terme générique de matières organiques (biofilm de canalisation ou autres polluants). La présence de ces substances peut être à l'origine d'une variation importante du pH (dans le sens d'une élévation) entre un début de ligne d'abreuvement et une fin de ligne (parfois jusqu'à 1,5 points de pH).

### 3. Modifications du pH de l'eau de boisson.

Dans certaines régions, la plupart des eaux de boisson se trouvent dans des zones de pH plutôt basiques (entre 7 et 8). D'autres part, certaines pratiques d'élevage préconisent des abaissements du pH de l'eau de boisson à des valeurs comprises entre 5 et 6, pouvant aller parfois jusqu'à des valeurs de 4. Différents acides peuvent être utilisés pour obtenir de telles valeurs.

Il a été réalisé en laboratoire (Bio-Chêne Vert) des mesures du pH de différentes eaux suite à des incorporations régulières d'acide. Les eaux étudiées ont été ajustées à 3 duretés de TH (10°TH, 20°TH et 30°TH).

#### 3.1. Acides forts et acidification.



Les mesures ont été réalisées avec des dilutions d'acide sulfurique pur (dit fumant) similaire aux préparations vendues dans le commerce.

#### Discussion :

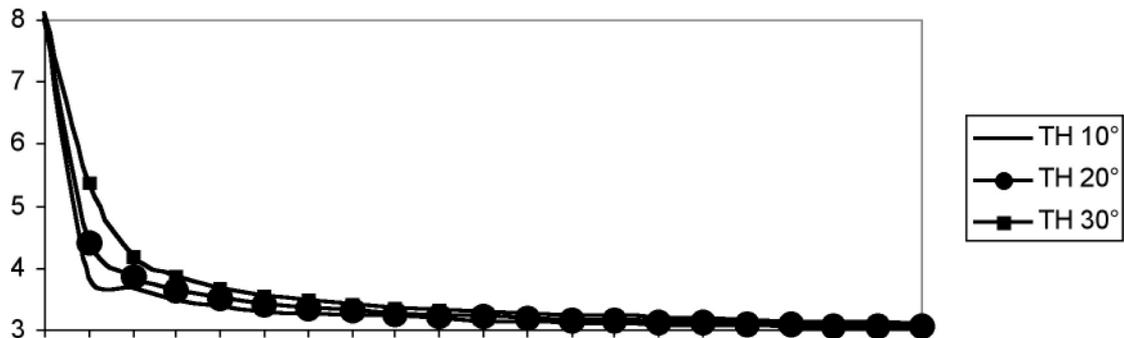
Un pH à 6 est obtenu très rapidement avec de très faibles concentrations d'acide sulfurique : 10 ppm à 10° de TH, 20 ppm à 20° de TH et 50 ppm à 30° de TH.

Il existe de fortes variations dans les concentrations d'acide sulfurique nécessaires pour obtenir

une même valeur de pH : 5 fois plus d'acide dans une eau à 30° de TH que dans une eau à 10° de TH. Cette variation est due à l'effet tampon des bicarbonates.

Les valeurs du pH se stabilisent assez rapidement vers des valeurs inférieures ou égales à 2, ce qui représente une acidité importante, avec tous les risques que cela représente pour les animaux.

### Acides organiques



### 3.2. Acides organiques et acidification :

Les mesures ont été réalisées avec un mélange d'acide organique du commerce (Acide lactique, Acide formique, Acide propionique).

#### Discussion :

Les valeurs de pH tombent moins rapidement que dans le cas des acides minéraux. Les fortes baisses s'observent entre 100 et 200 ppm de mélange d'acide organique contre 40 à 50 ppm en acide sulfurique.

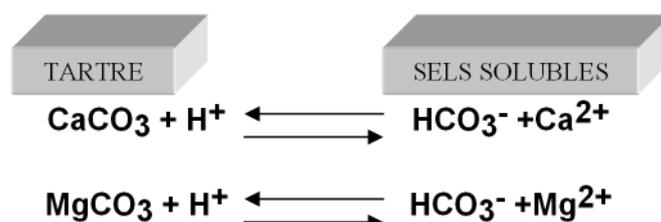
La dureté de l'eau exerce peu d'influence sur les quantités d'acide organique à rajouter pour obtenir une même valeur de pH.

Les valeurs du pH tendent vers une valeur plus élevée (donc moins acide) que dans le cas des acides forts (pH voisin de 3). Cela représente une sécurité en cas de surdosage.

## 4. Intérêts de l'acidification des eaux de boisson.

### 4.1. pH et tartre.

Selon les conditions du milieu ambiant, les carbonates de calcium et carbonates de magnésium se trouvent soit sous la forme de sels dissous, soit sous forme de cristaux qui précipitent sur les parois des canalisations. C'est ce que l'on appelle le tartre.

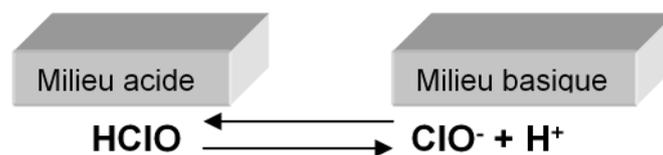


Comme le montrent ces équilibres chimiques, le tartre se trouve sous forme dissoute en milieu acide. Un ajout d'acide produira une augmentation de la concentration en protons  $H^+$ . Les équilibres chimiques seront donc déplacés vers la droite, c'est-à-dire vers la forme soluble des carbonates. Une eau de boisson acide sera donc moins entartrante qu'une eau alcaline.

## 4.2. pH et chloration.

Pour lutter contre les proliférations bactériennes dans les eaux de boisson, on utilise majoritairement du chlore sous différentes formes : Hypochlorite de sodium (eau de javel= $NaClO$ ), acide hypochloreux ( $HClO$ ), Dichloroisocyanurate de sodium....

Toutes ces formes de chlore permettent d'obtenir de l'acide hypochloreux qui est la forme du chlore la plus oxydante, c'est-à-dire la plus active. Par contre, l'acide hypochloreux ne reste pas naturellement sous cette forme en fonction des conditions de pH du milieu :



En milieu acide, l'équilibre ci-dessus se trouve déplacé vers la gauche de sorte que la forme  $HClO$  (acide hypochloreux) se trouve majoritaire. Inversement en milieu basique, c'est la forme  $ClO^-$  qui domine. Or cette forme est environ 100 fois moins active que l'acide hypochloreux. L'objectif de l'acidification est donc de maintenir une concentration maximale en acide hypochloreux et minimale en hypochlorite pour un traitement de l'eau optimal.

## 4.3. pH et bactéries.

Un abaissement du pH peut-il avoir un effet bactéricide ? certaines constatations faites sur le terrain auraient tendance à le confirmer : les litières seraient de meilleure qualité avec des eaux acidifiées à un pH de 4,5 à 6, au moyen d'acides minéraux ou organiques. Par contre d'autres expériences du terrain prouveraient le contraire. Qu'en est-il réellement ? les protons  $H^+$  ont-ils un effet sur les bactéries ?

- Les bactéries requièrent certaines conditions physico-chimiques pour pouvoir se multiplier normalement. tout écart par rapports à ces besoins se solde par une moindre multiplication voire même d'un arrêt complet de leur multiplication. Le pH représente une de ces conditions. Certaines bactéries sont dites basophiles (elles se multiplient de préférence en milieu basique), d'autres sont acidophiles (multiplication de préférence en milieu acide). Le pH peut donc jouer un rôle sélectif sur les multiplications bactériennes.

- Il a été réalisé en laboratoire (Bio-Chêne Vert) des déterminations de la concentration minimale bactéricide de l'acide sulfurique vis-à-vis d'une souche d'*Escherichia coli*. Aucun effet bactéricide n'a pu être constaté en dessous de la dilution au 1000<sup>ème</sup>, c'est-à-dire 1 ml/litre d'eau. Cela correspond à un pH un peu inférieur à 2.

- Des tests ont été effectués pour mesurer l'effet antibactérien (sur *Escherichia coli*) de différents acides (acide lactique, acide phosphorique et acide formique) en fonction de leur concentration dans des conditions de pH fixées (pH=5).

<b>Acide</b>	<b>50 mol/litre</b>	<b>100 mol/litre</b>	<b>200 mol/Litre</b>
<b>Acide formique</b>	<b>Bactériostatique</b>	<b>Bactériostatique</b>	<b>Bactériostatique</b>
<b>Acide lactique</b>	<b>Bactériostatique</b>	<b>Bactéricide</b>	<b>Bactéricide</b>
<b>Acide phosphorique</b>	<b>Non actif</b>	<b>Non actif</b>	<b>Non actif</b>

Ce tableau nous montre que pour une même valeur de pH, les effets sur un germe peuvent être différents. Ce n'est pas la valeur du pH qui est à l'origine d'un effet antibactérien, mais l'acide lui-même. Par contre, l'activité antimicrobienne de l'acide lactique a été testé à différentes valeurs de pH et à différentes concentrations :

<b>pH</b>	<b>50 mmol/litre</b>	<b>100 mol/litre</b>	<b>200 mol/Litre</b>
<b>7</b>	<b>Non actif</b>	<b>Non actif</b>	<b>Non actif</b>
<b>6</b>	<b>Non actif</b>	<b>Bactériostatique</b>	<b>Bactériostatique</b>
<b>5</b>	<b>Bactériostatique</b>	<b>Bactéricide</b>	<b>Bactéricide</b>

Ce tableau montre l'influence du pH dans l'effet antimicrobien de l'acide lactique : celui-ci acquiert des propriétés bactéricides vis-à-vis de *Escherichia coli* uniquement en milieu acide.

En résumé, nous retiendrons que l'effet antimicrobien d'un acide n'est pas dû au pH du milieu de culture c'est-à-dire à la concentration en proton  $H^+$ , mais à l'acide lui-même et placé dans certaines conditions de pH. Les protons  $H^+$  ne sont pas doués d'un pouvoir bactéricide, mais ils peuvent être à l'origine du pouvoir bactéricide d'un acide.

- Mode d'action des acides :

Les mécanismes d'action des acides organiques vis-à-vis des bactéries n'ont pas encore été élucidés. Deux théories sont aujourd'hui avancées :

- Action du radical de l'acide sur des organites bactériens (ribosome, ADN, enzymes, ...) comme peuvent le faire les antibiotiques ;

- Pénétration dans le cytoplasme bactérien de l'acide non dissocié (= non ionisée) à travers la membrane bactérienne, acidification du cytoplasme par relargage du proton  $H^+$ . Afin de maintenir le pH cytoplasmique constant, la cellule active ses pompes à protons, ce qui conduit à l'épuiser sur le plan énergétique. L'acidification du cytoplasme pourrait être à l'origine d'un blocage du métabolisme bactérien, lequel requiert des conditions de pH précises (Eklund, 1983 ; Baronofsky et al. 1984 ; Salmond et al., 1984 ; Kroll and Patchett, 1991). Cette théorie pourrait expliquer l'effet bactéricide de l'acide lactique en milieu acide : à pH=5, l'acide lactique se trouve plutôt sous forme non-ionisée, ce qui permet son passage à travers la membrane bactérienne.

## **5. Acide et physiologie digestive.**

Les études citées ci-dessus montrent un pouvoir bactéricide de certains acides organiques, mais dans des conditions de laboratoire. Or les acides incorporés dans l'eau de boisson ne vont pas se retrouver dans les mêmes conditions :

### ***5.1. Rappel sur la physiologie digestive***

Les aliments sont prélevés par le bec et stockés directement dans le jabot où ils subissent une première hydratation. Puis ils sont entraînés dans le proventricule où ils sont imprégnés d'acide chlorhydrique, lequel est sécrété quasiment en permanence dans le cas d'une alimentation ad libitum. C'est la première étape de la digestion. Le pH peut descendre jusqu'à des valeurs voisines de 1,4. Cela permet l'activation d'une enzyme digestive : la pepsine. Dans le gésier, les aliments sont réduits en fines particules puis transférés dans le duodénum où ils vont subir une imprégnation par les sels biliaires ainsi qu'une neutralisation basique. Le pH remonte à des valeurs de 5,5 à 6,5 et ce tout le long de l'intestin. Dans l'intestin, les aliments réduits en nutriments vont être absorbés par les villosités de la muqueuse, les autres seront transférés directement dans le cloaque, voire dans les cæcas avant d'être éjectés dans les fientes.

### ***5.2. Conséquence sur l'utilisation des acides.***

L'objectif de l'utilisation des acides est d'obtenir un effet bactéricide jusque dans les compartiments digestifs les plus éloignés, c'est-à-dire les cæcas. Les acides forts utilisés dans l'eau vont se mélanger dans le gésier à l'acide chlorhydrique sécrété par le proventricule. La conséquence de la présence d'un acide fort exogène sera une moindre sécrétion d'acide chlorhydrique endogène. Le bilan acide dans le proventricule sera, quant à lui, inchangé. De plus lors de la neutralisation de l'acide par les sels biliaires, les acides forts, n'étant pas pourvus d'un pouvoir tampon, se trouveront totalement neutralisés. L'action de ces acides forts ne pourra donc plus s'exercer dans l'intestin. Au contraire les acides organiques étant doués d'un pouvoir tampon plus ou moins important selon les molécules, seront capables de résister en partie à la neutralisation par les sels biliaires et donc d'exercer encore un pouvoir acidifiant dans l'intestin. Par contre, pour avoir une action tout le long de l'intestin, ces acides devront persister sous forme non dissociée (pouvoir de pénétration à travers l'enveloppe bactérienne) et surtout ne pas être détruit par les enzymes digestives. D'où l'intérêt de certaines molécules, comme l'acide formique par exemple, qui ne sont pas métabolisées chez les volailles.

## **6. Limite d'utilisations des acides.**

Les acides forts ou organiques ont chacun leur limite d'utilisation.

### ***6.1. Les acides forts.***

Les acides forts ou minéraux les plus utilisés sur le terrain sont l'acide sulfurique de qualité alimentaire. Si nous avons pu comprendre son grand intérêt dans l'acidification rapide de l'eau en vue d'une chloration ou d'une lutte éventuelle contre le tartre il demeure néanmoins quelques inconvénients majeurs :

- Produits dangereux : L'acide sulfurique est l'acide le plus dangereux à manipuler. Il est extrêmement irritant pour la peau et les muqueuses et provoque de très graves brûlures. De plus, les préparations du commerce contiennent de l'acide sulfurique pur, ou « fumant ».
- Corrosion sur le matériel : plusieurs cas de dégradation du matériel comme les turbines de pompe, les tuyaux en laiton ont été signalés.
- En cas de surdosage (même léger), le pH descend très bas (pH =2 à 200 ppm).
- L'effet des acides minéraux s'arrête à la sortie des canalisations, c'est-à-dire au bec des animaux.

### **6.2. Les acides organiques :**

- Les acides organiques sont des produits concentrés dangereux à manipuler. Ils provoquent également de graves brûlures en cas de contact avec la peau et les muqueuses.
- Leur utilisation en continu peut dans certains cas générer des formations d'algues.
- Leur pouvoir acidifiant dans les canalisations est moins fort que celui des acides minéraux ce qui nécessite des quantités plus importantes.

## **Conclusion**

Le pH de l'eau est un paramètre chimique relatif à sa concentration en ion H<sup>+</sup>. Il n'est que le reflet d'un équilibre acido-basique complexe entre tous les différents constituants de cette eau. En aucun cas ce n'est une entité physique douée d'un quelconque pouvoir bactéricide vis-à-vis de certains germes. Les pouvoirs antimicrobiens ne sont que la conséquence des molécules utilisées, et non de leur propriété acide. Une acidification de l'eau de boisson ne doit donc pas se fixer un pH comme objectif, mais plutôt dans un premier temps une concentration efficace de molécules acides. Ultérieurement, le pH associé à cette concentration d'acide efficace pourra être considéré comme un objectif, mais dans un deuxième temps seulement.

***Au cours d'une acidification de l'eau de boisson,  
Le pH est une conséquence, non un objectif.***



# **POSTERS**

## **La raillietinose chez les poules pondeuses**

E. MEISSONNIER ET M. DE GUSSEM

## **Études des stabilités chimiques de spécialités médicamenteuses orales dans l'eau de boisson additionnée de peroxyde d'hydrogène (Propérox®)**

JEAN-FRANÇOIS RICOULEAU ET JEAN-FRANÇOIS SOU.

## **Études des sensibilités de souches de *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale* et *riemerella anatipestifer* d'origine aviaire vis-à-vis de la Tiamuline**

THIERRY GAVERET, CLAIRE JACQUINET, DOMINIQUE BALLOY.

## **Détermination de concentrations minimales inhibitrices de l'Oxytétracycline-Tylosine, en milieu gélosé vis-à-vis de 18 souches référencées d'*Ornithobactérium rhinotrachéale***

CHRISTOPHE BOSTVIRONNOIS

## **Mise au point d'une technique PCR temps réel pour le diagnostic des affections à métapneumovirus aviaires (APV)**

STÉPHANE LEMIERE, EVELYNE CREUSOT, E. SELLAL.

# **LA RAILLIETINOSE CHEZ LES POULES PONDEUSES**

E. MEISSONNIER ET M. DE GUSSEM

## **Le ver parasite**

*Raillietina cesticillus* est un ver plat de la classe des Cestodes, qui est souvent isolé chez la poule et/ou la dinde, notamment chez les poules pondeuses ou les oiseaux reproducteurs.

Il se caractérise par une tête large, le scolex, et un corps segmenté en anneaux, le strobile.

Le scolex est muni d'une ventouse équipé de 400 à 500 petits crochets qui lui permettent de s'accrocher solidement à la muqueuse de l'intestin grêle et pouvant entraîner des petits nodules durs et blanchâtres. Le strobile est composé d'une série de segments remplis d'oeufs (segments ovigères), régulièrement expulsés avec les fientes intestinales.

## **Le cycle parasitaire**

La poule ou la dinde est l'hôte définitif du parasite. Mais, plusieurs hôtes intermédiaires assurent son développement et sa dissémination dans le milieu extérieur : les mouches, les fourmis et les coléoptères. Ces derniers ingèrent les oeufs présents dans les fientes, et permettent leur transformation en larves cysticercoïdes. Ainsi, on a pu trouver jusqu'à 930 cysticerques dans un scarabée. Les hôtes intermédiaires sont eux-mêmes ingérés par la poule : en présence des sels biliaires, les cysticerques se fixent aussitôt à la paroi intestinale. La période de développement de *Raillietina cesticillus* dans les hôtes intermédiaires dure au minimum 2 à 3 semaines et sa période prépatente est de 20 jours chez l'hôte définitif.

## **La maladie**

Le scolex fiché dans la paroi intestinale peut provoquer des lésions d'entérite nodulaire. Les poules infestées s'amaigrissent, deviennent émaciées avec un fléchissement de leur courbe de ponte. Elles sont alors plus sensibles aux maladies bactériennes et virales.

## **Stratégie thérapeutique**

Lorsque la parasitose survient en période de ponte, il convient d'agir au niveau de l'hôte définitif par des traitements cestocides réguliers pour éviter sa réinfestation, en tenant compte prioritairement de la période prépatente du ver. Le programme doit être adapté en fonction du type de production : ponte d'oeufs à couver ou ponte d'oeufs de consommation.

### **1. Poules reproductrices**

Plusieurs essais ont montré que l'aliment médicamenteux contenant 60 ppm de flubendazole (PM Flubenol 0,6 %) pendant 7 jours permettait d'éliminer 100 % du portage de *Raillietina cesticillus* dans des lots de poulets artificiellement infestés, en comparaison à des lots témoins non traités (Maes et Geenen, 1997a et b). Les degrés d'efficacité étaient respectivement de 100 %, 99,8 % et 92,7 % vis-à-vis des vers adultes, des larves de 2 semaines et de 1 semaine. Les posologies de flubendazole variaient de 9,9 à 12,9 mg/kg PV/jour. Les meilleurs résultats du traitement cestocide sont obtenus en fin de période prépatente.

### **2. Poules pondeuses**

Lorsque les oeufs sont destinés à la consommation humaine, la concentration de 60 ppm de flu-

bendazole dans l'aliment médicamenteux (PM Flubenol à 0,6 %) est inapplicable en raison du retrait obligatoire pendant la durée du traitement.

A 30 ppm, aucun délai d'attente n'est imposé car les résidus de flubendazole dans les oeufs sont toujours inférieurs à la Limite Maximale de Résidus (LMR) admise. Des essais ont été mis en oeuvre chez des pondeuses de 24 semaines d'âge, avec une concentration de 30 ppm de flubendazole dans l'aliment médicamenteux (Tableau I).

Distribué pendant 7 jours consécutifs, l'efficacité du flubendazole varie de 88 à 94,1 %, mais le pourcentage de poules exemptes n'était que de 30%. La période de traitement a été prolongée à 14 jours et, dans ce cas, l'efficacité du flubendazole est de 94,8 %, mais avec un meilleur taux d'assainissement de 58 %. Compte tenu du rationnement alimentaire, la quantité journalière de flubendazole n'était que de 4 mg/kg PV/j.

Tableau I : Efficacité du flubendazole (Flubenol™) sur Raillietina cesticillus chez le poulet.

Groupe	Nombre	Dose	Paramètres	Résultats
<b>O</b>	8	Groupe témoin autopsié au début de l'essai	<b>Taux d'infestation</b>	<b>63.3</b>
<b>A</b>	10	0 lot témoin	PV (g) à J0 Conso (g) / 7 js <b>Nb de scolex / poulet</b>	231.0 359.2 <b>67.1</b>
<b>B</b>	10	30 ppm pendant 7 jours	PV (g) à J0 Conso (g) / 7 js <b>Dose mg/kg/ 7 js</b> <b>Nb de scolex / poulet</b> <b>Efficacité (%)</b>	230.2 320 <b>4.8</b> <b>8.2</b> <b>88</b>
<b>C</b>	10	60 ppm pendant 7 jours	PV (g) à J0 Conso (g) / 7 js <b>Dose mg/kg/ 7 js</b> <b>Nb de scolex / poulet</b> <b>Efficacité (%)</b>	226.9 340 <b>9.9</b> <b>0</b> <b>100</b>

Pool de 48 poulets de 4 jours d'âge infestés en gavage par 150 cysticerques contenu dans 0.5 ml d'inoculum. A 18 jours d'âge, ces poulets sont répartis en 4 groupes homogènes (PV équivalent) de 10, les 8 restants étant euthanasiés et autopsiés pour confirmer le taux d'infestation. A J0, ces 4 groupes reçoivent un aliment médicamenteux contenant du flubendazole ad libitum et pendant 7 jours.

## Prévention

Les mesures sanitaires consistent d'abord à éviter la contamination des volailles par les litières des bandes antérieures ou celles d'autres oiseaux. Le curage des bâtiments doit être complet. En cas de sol en terre battu, le chaulage permet de détruire par dessiccation les oeufs de Raillietina, très résistants dans le milieu extérieur. Il faut également lutter contre les hôtes intermédiaires dans et autour des poulaillers, essentiellement en période de vide sanitaire : utilisation d'insecticides homologués contre les mouches et les coléoptères.

## Conclusion

L'aliment médicamenteux contenant 5 ou 10 kg du PM Flubenol 0,6% selon la concentration de flubendazole requise (30 ou 60 ppm) permet de lutter efficacement contre Raillietina cesticillus tant chez les pondeuses d'oeufs de consommation que chez les reproducteurs.

## Références

1. *Maes L. et Geenen F. (1997a)*

*Activity of flubendazole against immature forms of Raillietina cesticillus in artificially infected chickens: laboratory evaluation. Janssen Research Foundation. Parasitology research report V 9758, 9p.*

2. *Maes L. et Geenen F. (1997b)*

*Activity of flubendazole against adult Raillietina cesticillus in artificially infected layer : a laboratory evaluation. Janssen Research Foundation. Parasitology research report V 10011, 6p.*

# **ÉTUDES DES STABILITÉS CHIMIQUES DE SPÉCIALITÉS MÉDICAMENTEUSES ORALES DANS L'EAU DE BOISSON ADDITIONNÉE DE PÉROXYDE D'HYDROGÈNE (PROPÉROX®)**

JEAN-FRANÇOIS RICOULEAU ET JEAN-FRANÇOIS SOU (1),  
JEAN LÉORAT (2), JACQUES GOUTALIER ET THIERRY PARIS (3)

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence du peroxyde d'hydrogène stabilisé contenu dans Propérox® sur la stabilité chimique de différentes spécialités médicamenteuses dans l'eau de boisson et, le cas échéant, de formuler des recommandations dans le cadre des bonnes pratiques de l'administration d'un traitement.

## **Matériel et méthodes**

### **- Principes actifs – concentrations testées (substances testées) :**

acide oxolinique – 0,2 g/l (*spécialité A utilisée à 1 g/l*), lévamisole – 0,2 g/l (*matière première B, spécialité C utilisée à 4 ml/l et spécialité D utilisée à 4,65 ml/L*), doxycycline – 0,1 g/l (*spécialité E utilisée à 2 g/l*), colistine – 1200000 UI/l (*spécialité F utilisée à 0,6 ml/l*), triméthoprim – 49,95 mg/l et sulfadiazine – 250,05 mg/l (*spécialité G utilisée à 3 ml/l*), oxytétracycline – 0,5 g/l (*spécialité H utilisée à 1 g/l après la constitution d'une solution concentrée à 400 g/l*) et amoxicilline – (0,2g/l (*matière première I, spécialités J, K et L utilisées à 2 g/l, spécialité M utilisée à 1 g/l et spécialités N et O utilisées à 0,4 g/l*)).

### **- Peroxyde d'hydrogène :**

on utilise le Propérox® à hauteur de 0,1 ml/l (*soit 50 ppm de peroxyde d'hydrogène doté d'un stabilisant spécifique*).

### **- Eau :**

une eau standard (pH=7,2 ; Th=18) est utilisée pour tous les essais.

### **- Protocole :**

toutes les spécialités sont dissoutes de la manière suivante: agitation magnétique (5 minutes), passage aux ultrasons (2 minutes) puis agitation magnétique encore (2 minutes). On suit simultanément l'évolution de la substance testée dans l'eau seule et dans l'eau additionnée de Propérox® de manière à identifier l'effet du peroxyde stabilisé. Des échantillons sont prélevés d'abord suite à la mise en solution (T0) puis après 6, 11 et 24 heures.

### **- Phase analytique :**

les dosages des différents principes actifs sont réalisés par chromatographie liquide haute performance, par des méthodes spécifiques à chaque molécule et dont nous nous sommes assurés de la fiabilité.

## Résultats :

		T0	6 heures	11 heures	24 heures
<b>Acide oxolinique (A)</b>	Eau	100	96.5	99	98
	Eau + Propérox®	100	97.4	99.5	96.9
<b>Lévamisole (moyennes B, C et D)</b>	Eau	100	100.2	100	99.5
	Eau + Propérox®	100	97.7	96	88.9
<b>Doxycycline (E)</b>	Eau	100	101.6	102.7	100
	Eau + Propérox®	100	100.5	98.7	98.1
<b>Colistine (F)</b>	Eau	100	102	98.7	96.1
	Eau + Propérox®	100	97.3	94.4	89.1
<b>Triméthoprime (G)</b>	Eau	100	102.5	100.2	96.7
	Eau + Propérox®	100	102.7	101	97.5
<b>Sulfadiazine (G)</b>	Eau	100	98.9	100.3	92.7
	Eau + Propérox®	100	102	102.2	94.2
<b>Oxytétracycline (H)</b>	Eau	100	100.8	105.1	96.8
	Eau + Propérox®	100	103.9	101.2	94.9
<b>Amoxicilline (moyennes I, J, K, L M, N et O)</b>	Eau	100	98.3	100.2	96.12
	Eau + Propérox®	100	50.4	32.7	9.6

## Discussion et conclusion

L'acide oxolinique, la doxycycline, le triméthoprime, la sulfadiazine et l'oxytétracycline contenus dans les spécialités testées ne sont pas affectés par la présence de Propérox® à 0,1 ml/l et ce jusqu'à 24 heures. En ce qui concerne le lévamisole et la colistine, cette étude permet de recommander la distribution du traitement dans l'eau de boisson sur les 11 heures suivant sa préparation, ce qui n'est généralement pas contraignant en élevage avicole. Pour ce qui est de l'amoxicilline, seules les valeurs obtenues à T0 (soit 9 minutes après le premier contact substance/eau/Propérox® et au terme de la manœuvre complète de dissolution) sont conformes à l'attente. Les concentrations mesurées se révèlent insuffisantes dès le point de contrôle suivant, à 6 heures. La recommandation essentielle est donc d'arrêter l'utilisation du Propérox® lors de tout traitement à base d'amoxicilline. Dans ce cas, on peut alors utiliser un autre mode de traitement de l'eau, comme le chlore.

## Références

1. Virbac, 06515 Carros,
2. Selvet Conseil, 56500 Bignan,
3. Phatophy, 69280 Marcy l'Etoile.

# ETUDE DES SENSIBILITES DE SOUCHES DE PASTEURELLA MULTOCIDA, ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE ET RIEMERELLA ANATIPESTIFER D'ORIGINE AVIAIRE VIS-A-VIS DE LA TIAMULINE

Gavaret Thierry<sup>1</sup>, Jacquet Claire<sup>2</sup>, Balloy Dominique<sup>3</sup>

<sup>1</sup>SCP de vétérinaires, 53 route de Nantes, 85300 Challans - <sup>2</sup>Ceva Santé Animale, ZI la Ballastière, 33501 Libourne- <sup>3</sup>LABOVET, ZAC la Buzenière, 85500 Les Herbiers

Les sensibilités des souches de *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale* et *Riemerella anatipestifer* d'origine aviaire sont étudiées vis-à-vis de la tiamuline sur une période de trois ans. La constance des valeurs très basses de CMI, ainsi qu'une répartition des souches, homogène et de type unimodale, sont en faveur d'une excellente activité de la tiamuline, et de l'absence d'apparition de résistance.

La distribution intra-tissulaire de la tiamuline et les très fortes concentrations intracellulaires déterminent son efficacité dans le contrôle des pathologies respiratoires chroniques des volailles. Enfin, le statut particulier de cette molécule, réservée à la médecine vétérinaire, est un atout précieux dans le choix d'une antibiothérapie raisonnée.

Le but de cette étude est de valider l'intérêt de la tiamuline comme nouvelle alternative pour lutter contre les principaux germes impliqués dans les pathologies respiratoires des volailles, et plus précisément du canard et de la dinde. En effet, un spectre large adapté, une diffusion tissulaire et intracellulaire très importantes, semblent décisifs pour une meilleure maîtrise de ces germes compte tenu des formes chroniques de la pathologie respiratoire en élevage et des récurrences obtenues avec les thérapeutiques habituelles de première intention comme par exemple les tétracyclines ou l'amoxicilline.

## Matériel et méthodes

Les observations faites sont basées sur les résultats des analyses réalisées par le laboratoire de biologie vétérinaire LABOVET, situé en Vendée. Les techniques d'ensemencement, d'isolement, d'identification et de réalisation des antibiogrammes sont les techniques habituelles de la bactériologie. *Ornithobacterium rhinotracheale* et *Riemerella anatipestifer* sont isolés sur gélose au sang additionnée de gentamycine sous CO<sub>2</sub>. La mesure des CMI pour la tiamuline est réalisée sur gélose par transcription informatique (Toucan<sup>®</sup>) des diamètres d'inhibition mesurés au pied à coulisse électronique lors de la lecture des antibiogrammes.

\* logiciel TOUCAN version 6.0 BIORAD ND

Pour chaque germe étudié, on obtient une distribution, au sens statistique, des valeurs des CMI. La CMI 50 est estimée par la médiane de cette distribution, la CMI 90 par le centile 0,9. Une mise en forme graphique qui lisse les valeurs des CMI, en relativisant par rapport aux valeurs critiques de sensibilité et de résistance est proposée. Pour ce faire les CMI sont réparties par classes en fonction des critères suivants :

CMI ≤ C/4 : souches très sensibles

C/4 < CMI ≤ C/2 : souches sensibles  
C/2 < CMI ≤ c : souches moyennement sensibles  
c < CMI ≤ C : souches intermédiaires  
C < CMI ≤ 2C : souches faiblement résistantes  
2C < CMI ≤ 4C : souches résistantes  
CMI > 4C : souches très résistantes

c = B = concentration critique inférieure pour la tiamuline : CMI < c la souche est considérée sensible à l'antibiotique testé,  
C = 16 = concentration critique supérieure pour la tiamuline : CMI > C la souche est considérée résistante à l'antibiotique testé.

Un histogramme représente le pourcentage de chacune des catégories. Cette répartition par classe qui ne tient compte que des valeurs relatives des CMI par rapport aux limites de sensibilité et de résistance permet de suivre l'évolution dans le temps des CMI et de comparer les sensibilités des souches à des antibiotiques différents en élargissant un peu la notion simple de sensibilité et de résistance.

## Résultats

TABLEAU 1 : Répartition des isolaments sur l'année 2002, de *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale* et de *Riemerella anatipestifer* par espèce aviaire.

Nombres d'isolaments	barbare	mulard	mulard (orange)	pekin	dinde	poulet	poule	gibier
<i>Pasteurella multocida</i>	1	20	9	2	6		2	
<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>					78	4		5
<i>Riemerella anatipestifer</i>	74	19	1	9	22			

TABLEAU 2 : Pourcentage de sensibilité sur 3 années des souches de *Pasteurella multocida* vis-à-vis de la tiamuline.

<i>Pasteurella multocida</i>	2000	2001	2002
Nombre de souches testées	21	49	38
% de souches sensibles	57%	86%	87%
% de souches intermédiaires	24%	12%	8%
% de souches résistantes	19%	2%	5%

TABLEAU 3 : pourcentage de sensibilité sur 3 années des souches de *Ornithobacterium rhinotracheale* vis-à-vis de la tiamuline.

<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	2000	2001	2002
Nombre de souches testées	156	185	87
% de souches sensibles	99%	100%	99%
% de souches intermédiaires	0%	0%	0%
% de souches résistantes	1%	0%	1%

TABLEAU 4 : pourcentage de sensibilité sur 3 années des souches de *Riemerella anatipestifer* vis-à-vis de la tiamuline.

<i>Riemerella anatipestifer</i>	2000	2001	2002
Nombre de souches testées	184	193	125
% de souches sensibles	99%	98%	98%
% de souches intermédiaires	1%	1%	1%
% de souches résistantes	0%	2%	2%

TABLEAU 5 : estimation des CMI 50 et 90 pour *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale* et *Riemerella anatipestifer* sur l'année 2002.

	CMI 50 (2002)	CMI 90 (2002)
<i>Pasteurella multocida</i>	5,5	10,9
<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	0,06	0,4
<i>Riemerella anatipestifer</i>	0,08	0,48

FIGURE 1 : Représentation graphique de la répartition des CMI en classe de sensibilité à la tiamuline sur 2000 et 2002 pour *Riemerella anatipestifer*.

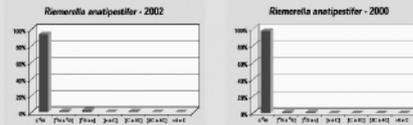


FIGURE 2 : Représentation graphique de la répartition des CMI en classe de sensibilité à la tiamuline sur 2000 et 2002 pour *Pasteurella multocida*.

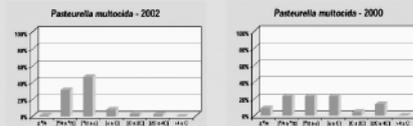
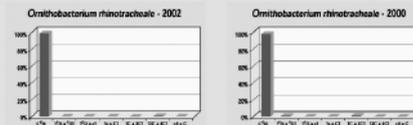


FIGURE 3 : Représentation graphique de la répartition des CMI en classe de sensibilité à la tiamuline sur 2000 et 2002 pour *Ornithobacterium rhinotracheale*.



## Discussion

Les résultats des sensibilités à la tiamuline pour *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale* et *Riemerella anatipestifer* montrent une activité très intéressante de cette molécule. Les CMI sont très basses vis-à-vis d'*Ornithobacterium rhinotracheale* et *Riemerella anatipestifer*, plus élevées mais néanmoins sensibles pour *Pasteurella multocida*.

De même, les valeurs des CMI 90 en-dessous de la concentration critique inférieure pour *Ornithobacterium rhinotracheale* et *Riemerella anatipestifer*, et en dessous de la concentration critique supérieure pour *Pasteurella multocida*, sont en faveur d'une très bonne sensibilité des populations bactériennes présentes sur le terrain.

Dans tous les cas, et sur trois ans, la répartition des souches reste de type unimodale, ce qui est en faveur de l'absence d'apparition de résistance.

La pathogénie des troubles respiratoires chroniques reste encore mal connue, notamment

chez le canard, et dans une moindre mesure chez la dinde. Il reste encore beaucoup d'inconnues quant aux implications respectives des mycoplasmes, pasteurelles, et riemerelles chez le canard (Kemp, 1990). Chez la dinde, les infections à *Ornithobacterium*, reconnues comme majeures dans cette espèce, sont sans doute sous-diagnostiquées en raison du portage chronique possible (respiratoire et articulaire) et des récurrences fréquentes observées en élevage (Chin et al., 1997).

La très forte concentration tissulaire et intracellulaire de la tiamuline, ainsi que son large spectre adapté aux germes respiratoires, laissent présager d'une efficacité in vivo sur ces pathologies respiratoires que des essais terrain pourront confirmer. Enfin, le statut particulier de cette molécule, réservée à la médecine vétérinaire, est un atout précieux dans le choix d'une antibiothérapie raisonnée.

# Détermination de concentrations minimales inhibitrices de l'Oxytétracycline, de la Tylosine et de l'association Oxytétracycline - Tylosine, en milieu gélosé vis-à-vis de 18 souches référencées d'*Ornithobacterium rhinotracheale*

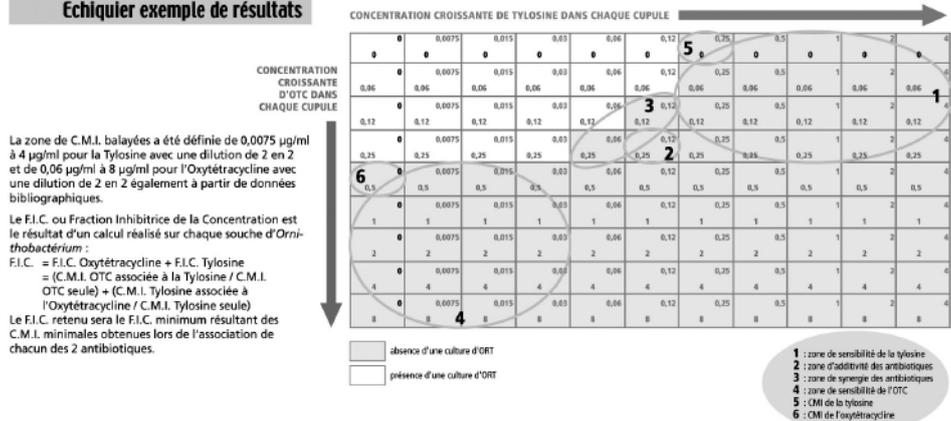
Par Christophe Bostuironnois  
LILLY France-ELANCO, 13 rue Pagès, 92158 SURESNES Cedex

La présence de plus en plus répandue d'*Ornithobacterium rhinotracheale*, en production de dindes de chair en particulier, en France amène certains prescripteurs à utiliser différentes solutions de type antibiotiques. Si plusieurs antibiotiques sont effectivement efficaces individuellement in vitro sur ce germe, les pratiques terrains font que parfois certains utilisateurs souhaitent conforter le pronostic thérapeutique en associant plusieurs antibiotiques sensibles vis-à-vis de ce germe.

L'objectif de cette étude est bien de valider in vitro si la synergie déjà démontrée entre la Tylosine et l'Oxytétracycline en pathologie respiratoire sur des germes et des espèces différentes est également valable dans le cadre d'une maîtrise d'*Ornithobacterium* de la dinde à partir de 18 souches référencées isolées dans le bassin de production "Grand Ouest".

Cette étude in vitro a confirmé et a permis de mieux cerner l'efficacité de la Tylosine sur *Ornithobacterium rhinotracheale* et la pertinence de l'association avec l'Oxytétracycline qui permet une réelle synergie entre les deux antibiotiques dans 89% des cas et une addition dans les 11% restant soit 100% des souches.

## Echiquier exemple de résultats



## Les résultats

L'interprétation des F.I.C. permet de donner les niveaux de compatibilité des deux antibiotiques sur *Ornithobacterium rhinotracheale*. Il s'avère qu'on observe au final sur les 18 germes :

- Une synergie entre la Tylosine et l'Oxytétracycline (F.I.C. < ou = à 0,75 ou apparition de zones d'inhibitions suffisantes sur l'échiquier des dilutions) dans 16 cas sur 18 soit 89% des cas.
- Une addition entre la Tylosine et l'Oxytétracycline (F.I.C. > 0,75 et < ou = à 1 ou apparition de zones d'inhibitions suffisantes sur l'échiquier) dans les 2 cas restant soit 11% et donc a fortiori sur les 16 autres souches soit 100% des souches testées.
- Aucun cas d'indifférence (1 < F.I.C. < ou = 2).
- Aucun cas d'antagonisme (F.I.C. > 2).

NUMERO DE LA SOUCHE	C.M.I.		DÉTERMINATION DU F.I.C. MINIMUM	INTERPRÉTATION
	OXYTÉTRACYCLINE	TYLOSINE		
1	0,5	0,25	0,75	Synergie
2	0,5	0,5	0,56	Synergie
3	0,5	0,25	0,75	Synergie
4	0,5	0,25	0,75	Synergie
5	8	0,25	0,62	Synergie
6	0,5	0,25	0,75	Synergie
7	> 8	> 4	NC	Synergie*
8	> 8	4	NC	Synergie*
9	> 8	4	NC	Synergie*
10	0,5	0,25	0,75	Synergie
11	8	0,25	0,62	Synergie
12	8	0,25	0,62	Synergie
13	> 8	0,25	NC	Synergie*
14	1	4	0,52	Synergie
15	8	0,25	0,75	Synergie
16	> 8	> 4	NC	Addition*
17	4	0,015	0,56	Synergie
18	> 8	> 4	NC	Addition*

NC : Non Calculable

\* : du fait de l'apparition de zones d'inhibitions sur l'échiquier lors des dilutions respectives

## Conclusions

1. Les diamètres d'inhibition des souches testées pour l'Oxytétracycline varient entre 13,75 mm et 40 mm, elles balayaient une large variété de sensibilité avec 3 souches résistantes, 3 souches intermédiaires et 12 souches sensibles. Pour la Tylosine par contre, toutes les souches testées étaient sensibles avec des diamètres d'inhibition variant entre 22,96 mm et 38,93 mm.

2. Sensibilité de la Tylosine sur *Ornithobacterium*

Cette étude nonobstant les autres résultats a permis de valider la très bonne sensibilité de la Tylosine sur *Ornithobacterium rhinotracheale* qui a par ailleurs été confirmée dans de nombreuses études. Les diamètres d'inhibition étaient tous dans la zone "sensible" et ceci a pu être confirmé par les C.M.I. in vitro qui se sont révélées très basses avec une C.M.I. 50 de 0,25 µg/ml ce qui est bien en deçà des niveaux atteignables au niveau tissulaire. Cette étude a permis de confirmer l'intérêt de la Tylosine dans la lutte contre ce germe en pathologie respiratoire des volailles.

3. Intérêt de l'association Oxytétracycline - Tylosine

Ce n'est qu'une demi-surprise que de voir qu'il existe une réelle synergie in vitro entre ces deux antibiotiques. Ceci a pu être démontré à de multiples reprises entre ces deux antibiotiques en pathologie respiratoire. Par contre, c'est la première fois que cela a pu être montré in vitro sur un germe spécifique des volailles. Les résultats ont montré une absence d'antagonisme, une absence d'indifférence, une addition dans 100% des cas et une synergie dans 89% des cas. L'association des deux antibiotiques est tout à fait sécuritaire quant au pronostic de l'infection et chacun des deux antibiotiques vient renforcer l'action de l'autre.

4. Indépendance des deux antibiotiques

Il a été comparé le profil de sensibilité à travers les diamètres de diffusion de ces deux antibiotiques afin de voir s'ils étaient comparables. En fait, cette analyse a conduit à une courbe de régression de faible R<sup>2</sup> (0,34). Ces deux antibiotiques ne possèdent pas au vu de ces souches une corrélation de sensibilité, ce qui va dans le sens d'un meilleur pronostic lors d'association et vers des modes de résistance différents envers l'Oxytétracycline ce qui correspond aux données bibliographiques.

LILLY FRANCE SAS - 13, rue Pagès - 92158 Suresnes Cedex  
Tél : 01 55 49 34 34 - Fax : 01 55 49 35 12  
E.mail : elanco.france@illy.com

**ELANCO**  
SANTÉ ANIMALE



# MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE PCR TEMPS REEL POUR LE DIAGNOSTIC DES AFFECTIONS A METAPNEUMOVIRUS AVIAIRES (APV)

Lemière S.<sup>1</sup>, Creusot Evelyne<sup>2</sup> & Sellal E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Merial 29 avenue Tony Garnier F-69348 Lyon cedex 07  
<sup>2</sup> LSI 1bis allée de la Combe F-69380 Lissieu

Le diagnostic au laboratoire des affections à Métapneumovirus aviaires est essentiellement basé sur les techniques sérologiques ELISA, largement mises en œuvre et donnant des résultats *a posteriori*. La technique PCR est une alternative intéressante dans le sens où elle peut être mise en œuvre sur des échantillons tels que des écouvillons secs. Le test utilisé est le test RT-PCR Taqman® Avian Pneumovirus A, B et C (APV) développé par le laboratoire LSI (Kit Taqvet APV A, B et C.) Il a été validé en spécificité pour les sondes et les primers. Aucune séquence codant pour des antigènes différents des Métapneumovirus (virus Gumboro, coronavirus aviaire, pneumovirus isolés de mammifères, etc...) n'a été détectée. Le test a été validé en détectabilité. Les prélèvements effectués en élevage proviennent de différents sites et ont été effectués sur plusieurs espèces aviaires entre octobre 2003 et avril 2004. Un protocole de suivi en clinique de passage de virus APV a de plus été mené dans un même secteur géographique du Sud-Est de la France dans trois élevages de poulets de chair sur trois bandes quasiment contemporaines. Disposer d'une technique RT-PCR en temps réel validée pouvant être utilisée comme aide au diagnostic dans les conditions de terrain des affections virales à Métapneumovirus aviaires est une avancée technologique décisive puisque la sérologie ne permet une confirmation d'un diagnostic qu'*a posteriori* et que l'isolement viral suivant les techniques de virologie classique n'est pas envisageable en routine.

## Introduction

Les affections à Métapneumovirus aviaires sont décrites dans différentes espèces aviaires élevées en France : *Gallus*, dinde, faisán, etc... Le diagnostic sérologique utilisant les techniques ELISA est largement utilisé. Il donne des résultats pouvant être utilisés *a posteriori*. L'isolement de virus à partir de prélèvements tels que écouvillons ou tissus d'animaux malades est une technique difficile à mettre en œuvre et difficile à envisager comme technique de routine. La technique PCR est une alternative intéressante dans le sens où elle peut être mise en œuvre sur des échantillons tels que des écouvillons secs prélevés sur les animaux vivants ou morts.

## 1. Matériel et méthodes

Le test utilisé est le test RT-PCR Taqman® Avian Pneumovirus A, B et C (APV) développé par le laboratoire LSI (Kit Taqvet APV A, B et C.) Sept protéines virales codées par le génome viral sont classiquement décrites, la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la protéine de matrice M, la protéine de fusion F, les protéines M2 (22k ou M2), la protéine SH (small hydrophobic protein) et la glycoprotéine G. La séquence schématisée des gènes codant est la suivante : 3' - N - P - M - F - M2 - SH - G - Polymerase - 5'. Quatre génotypes différents parmi les Métapneumovirus aviaires sont décrits : A : souches britanniques, B : souches continentales, C : souches américaines très proches de la souche canard française, D : non A - non B, pour l'instant uniquement caractérisée en France par le laboratoire de l'AFSSA de Ploufragan. Deux systèmes de RT-PCR en temps réel sur le gène codant pour la protéine G (Glycoprotéine) dans le cas des souches A et B et la protéine SH (Small Hydrophobic) pour la souche C ont été mis au point. Ce test est réalisé en multiplex et en bi-cupule.

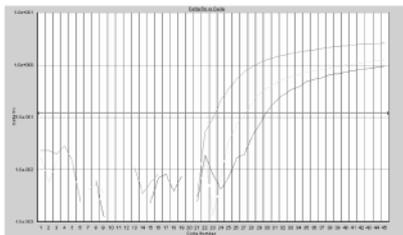


Figure n°1 : mix A = F Primer A (20 paires de bases (pb)), R primer A (27 pb), sonde TaqMan® A (FAM - TAMRA, 31 pb.)

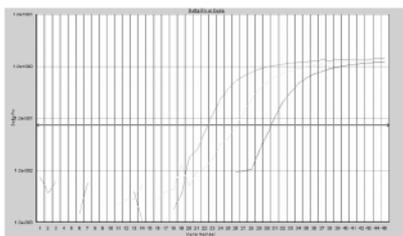


Figure n°2 : mix B = F primer B (25 pb), R primer B (27 pb), sonde TaqMan® B (VIC - TAMRA, 29 pb.)

Les mix A et B sont mélangés dans la 1<sup>ère</sup> cupule (Multiplex.)

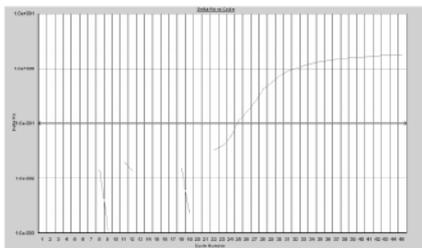


Figure n°3 : mix C = F primer C (23 pb), R primer C (26 pb), sonde TaqMan® C (FAM - TAMRA, 22 pb.)

Le mix IPC comprend une sonde VIC - TAMRA.

Un IPC est testé dans chaque échantillon. C'est le contrôle positif interne. Il permet de valider le bon déroulement de l'extraction et de l'amplification, surtout dans le cas d'un échantillon négatif. Il est extrait en même temps que la cible puisqu'il est ajouté à l'échantillon avant extraction. Les mix C et mix IPC sont mélangés dans la 2<sup>ème</sup> cupule (Multiplex.) Le test a été validé en spécificité pour

les sondes et les primers. Aucune séquence codant pour des antigènes différents des Métapneumovirus (virus Gumboro, coronavirus aviaire, pneumovirus isolés de mammifères, etc...) n'a été détectée. Le test a été validé en détectabilité (tableau n°1.)

Echantillon	Ct APV A	Ct APV B
Souche A 10 <sup>-4</sup>	33,00	> 45
10 <sup>-5</sup>	33,50	> 45
10 <sup>-6</sup>	36,20	> 45
10 <sup>-7</sup>	36,73	> 45
Efficacité	90,98%	-
Souche B 10 <sup>-4</sup>	> 45	32,37
10 <sup>-5</sup>	> 45	34,09
10 <sup>-6</sup>	> 45	36,70
10 <sup>-7</sup>	> 45	38,99
Efficacité	-	99,40%

Tableau n°1 : efficacité de détection avec gamme de dilutions.

Les prélèvements effectués en élevage proviennent de différents sites et ont été effectués sur plusieurs espèces aviaires entre octobre 2003 et avril 2004. Les écouvillonnages ont été mis en œuvre à l'aide d'écouvillons secs maintenus réfrigérés durant les phases de transport et congelés à -20°C durant leur stockage pour éviter toute dégradation anticipée des ARN viraux des échantillons. Pour toutes les séries de prélèvements effectuées les analyses sont effectuées sur des pools de plusieurs échantillons (3-4 le plus souvent.) Un protocole de suivi en clinique de passage de virus APV a été mené dans un même secteur géographique du Sud-Est de la France dans trois élevages de poulets de chair sur trois bandes quasiment contemporaines.

## 2. Résultats

Les résultats site par site sont synthétisés dans le tableau n°2.

France	Date	Espèce	Commémoratifs	Résultats
France	Octobre 2003	Canard de Barbarie	Présomption de pneumovirose	Positifs C
France	Octobre 2003	Dinde de chair	Syndrome respiratoire, mortalité	Positifs B
Royaume Uni	Octobre 2003	Poulet de chair	Syndrome respiratoire	Positifs A
France	Novembre 2003	Perdreix grise	Mortalité	Négatifs
France	Janvier 2004	Poulet de chair	Syndrome respiratoire, grosses têtes	Positifs B
Espagne	Janvier 2004	Poule pondeuse	Chute de ponte	Positifs B
France	Février 2004	Poulet de chair	Syndrome respiratoire, grosses têtes	Positifs B
France	Avril 2004	Poule pondeuse	Chute de ponte	Négatifs

Tableau n°2 : synthèse des résultats d'analyses en RT-PCR APV Taqman® site par site et espèce par espèce.

La cinétique de suivi de passage de virus APV mise en œuvre sur trois sites du Sud-est de la France est mise en œuvre sur un ensemble de trois sites d'élevage de poulets de chair standards situés sur le même secteur géographique et dans lesquels une bande a été sélectionnée. Les prélèvements par écouvillonnage d'environ 15 animaux ont été pratiqués tous les 3-4 jours. Deux bandes de poulets de chair sont élevées dans des sites à l'écart des facteurs de risque liés à la circulation virale (poules pondeuses, volailles sur parcours, route avec passage de camions de transport de volailles, sites multi-âges, etc...) Les prélèvements sur ces deux bandes sont tous négatifs. Sur le troisième site les prélèvements se sont avérés positifs en fin de lot, faiblement positifs en B à J35 (Ct de 43 et de 41 respectivement pour les deux pools d'échantillons) et positifs en B à J39 (Ct de 22 et de 29 respectivement pour les deux pools d'échantillons.)

## 3. Discussion

Le test RT-PCR Taqman® APV est validé dans les conditions d'utilisation au laboratoire. Dans les conditions de terrain le test permet de détecter des virus aussi bien A, B ou C. La cohérence entre données épidémiologiques et résultats obtenus dans différents pays européens est vérifiée, notamment le fait de trouver des résultats positifs en A pour des échantillons britanniques ou positifs en C pour des échantillons de canard. Le fait de ne montrer des résultats positifs en B chez des poulets de chair inclus dans l'essai de cinétique que dans un site sur trois, *a priori* d'après les données historiques, le plus susceptible d'être contaminé par le virus APV (proximité géographique de poules pondeuses et de volailles en plein air sur parcours), est tout à fait conforme aux attentes. Les deux autres sites retenus pour l'essai de cinétique ne présentaient pas de facteurs de risque particuliers.

## Conclusion

Disposer d'une technique RT-PCR en temps réel validée pouvant être utilisée comme aide au diagnostic dans les conditions de terrain des affections virales à Métapneumovirus aviaires est une avancée technologique décisive puisque la sérologie ne permet une confirmation d'un diagnostic qu'*a posteriori* et que l'isolement viral suivant les techniques de virologie classique n'est pas envisageable en routine.