

**ETUDE DE L'EFFET SYNERGIQUE DE LA TIAMULINE ASSOCIEE A LA
DOXYCYCLINE SUR LA FORME RESPIRATOIRE ORNITHOBACTERIUM
RHINOTRACHEALE CHEZ LA DINDE : VALIDATION DE L'EFFICACITE IN
VITRO ET IN VIVO**

C. Caudron¹, M.-A. Briffaud², V. Chevalereau², C. Goudeau³ et X. Chatenet⁴

¹*CEVA Santé Animale, ZI La Ballastière, BP 126, 33501 LIBOURNE cedex, France*

²*LABOVET- RESALAB, ZA la Buzenière, 85500 LES HERBIERS, France*

³*Réseau Cristal - MCVet Conseil, ZA St Laurent, 72300 Sablé sur Sarthe, France*

⁴*Réseau Cristal, ZAC La Buzenière, BP 539, 85505 Les Herbiers Cedex, France*

RESUME

Ornithobacterium rhinotracheale est présent en élevage de Dindes avec des incidences économiques importantes (coût des traitements, baisse des performances zootechniques, taux de saisies significatifs). Le panel thérapeutique étant relativement restreint il est important d'étudier l'efficacité d'autres approches qui répondent aux bonnes pratiques d'utilisation des antibiotiques (notamment vis à vis de l'émergence de résistances).

Dans ce contexte, a été évaluée la synergie de l'association tiamuline et doxycycline sur la forme respiratoire de l'*Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). L'efficacité en a été étudiée sur 18 lots de dindes présentant une toux depuis moins d'une semaine. Les lots inclus ont été traités en première intention (c'est-à-dire sans traitement antibiotique pendant au moins les deux semaines précédant la première visite d'inclusion) par une association de tiamuline à 5mg/kg et de doxycycline à 5mg/kg pendant 5 jours. Le diagnostic d'ORT a été confirmé par bactériologie réalisée à partir d'écouvillons et/ou d'organes lésés. Les réponses cliniques sont décrites, que ce soit sur le plan digestif ou le plan respiratoire. La reprise de croissance des lots malades est également mesurée. Les souches d'ORT isolées lors de cette étude terrain ont été conservées. L'association tiamuline et doxycycline in vitro a été démontrée additionnelle ou synergique sur ces souches. Les résultats obtenus au laboratoire et les résultats in vivo sont cohérents.

ABSTRACT

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is widely spread in turkey flocks, responsible for important economic lost (treatment cost, reduce zootechnical performances, carcass condemnation). The range of antibiotics is narrow. It appears important to evaluate new therapeutic approaches, complying with good practice of antibiotherapy, especially considering the emergence of resistant strains.

In this context, the synergy of the association of tiamulin and doxycyclin has been evaluated on respiratory forms of ORT infections. 18 turkey flocks suffering from dry cough since less than a week received an association of tiamulin at 5mg/kg of BW associated with Doxycyclin at 5mg/kg of BW. Flocks where selected at the condition that no other antibiotic treatment had been distributed almost during 2 weeks before. ORT presence has been confirmed by bacteriological examination. Then in vitro synergy has been tested on the isolated strains. Clinical responses of treated flocks are described, including respiratory, digestive responses and effect on, growth.

INTRODUCTION

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT), bactérie apparentée à la famille des pasteurelles, est à l'origine de troubles respiratoires et locomoteurs touchant plus particulièrement les élevages de dindes (Bazin et al, 2005). Sa prévalence et son incidence sont, en France, de plus en plus préoccupantes ces 10 dernières années. En élevage de chair, elle se manifeste plus fréquemment entre 8 et 11 semaines d'âge avec un certain nombre de contraintes pour le praticien. Tout d'abord, il faut guérir les animaux rapidement et durablement pour ne pas compromettre leurs performances zootechniques. Il faut donc être en mesure de proposer une approche thérapeutique économiquement acceptable par l'éleveur. Enfin, le praticien devra être particulièrement soucieux du respect des règles de santé publique, des contraintes d'abattage ainsi que de la prévention des risques d'émergence de résistance aux antibiotiques restreignant fortement ses choix.

Ainsi, toute nouvelle approche thérapeutique susceptible de répondre à ces contraintes se doit d'être validée.

La synergie entre la tiamuline et les tétracyclines est connue en particulier sur des germes respiratoires de l'espèce porc, comme *P. multocida*, *B. bronchiseptica* et *M. hyopneumoniae* (Miller et al, 1991, Fodor et al, 2004). On connaît également cet effet synergique entre tiamuline et doxycycline sur des germes spécifiques de la volaille et qui ont un tropisme respiratoire et articulaire comme notamment *M. gallisepticum*, *M. synoviae* et *M. meleagridis* (Burch et al, 1993).

L'objet de cette étude est de montrer l'efficacité thérapeutique de l'association tiamuline et doxycycline sur l'ORT en élevage de dinde (phase in vivo) et de confirmer cette efficacité en mesurant l'effet synergique de cette association en milieu de culture (phase in vitro).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Phase in vivo

1.1.1 Choix des élevages

18 bâtiments de dinde de chair (13 élevages), situés sur trois clientèles des cabinets du Réseau Cristal, répondant aux critères d'inclusion suivants, ont été retenus :

- Lots de dindes affectés par ORT sous sa forme respiratoire (toux < 1 semaine).
- Lots traités en première intention (absence de traitements dans les 15 jours précédents y compris dans l'aliment).
- Lots de dindes présentant des lésions respiratoires évocatrices d'ORT sur lesquelles une bactériologie a confirmé la présence de ce germe.

- Réalisation d'un antibiogramme testant en particulier les sensibilités à la tiamuline et à la doxycycline.

- Absence de surinfections colibacillaires ou aspergillaires au début du traitement.

- Absence d'anticoccidiens ionophores dans l'aliment (incompatibilité de type toxique du monensin avec la tiamuline).

Les élevages ont été inclus au fur et mesure des consultations. Par conséquent, cet échantillonnage était caractérisé par la diversité des profils techniques, des outils d'exploitation (bâtiments) et des contextes épidémiologiques (nombre de passages d'ORT sur les lots précédents, niveau de pression locale).

1.1.2 Protocole

Dès la suspicion clinique et nécropsique d'infection à ORT, un traitement associant tiamuline (Tiamvet®, Ceva Santé Animale) à 5mg/kg/j et doxycycline (Doxyvit®, Ceva Santé Animale) à 5 mg/kg/j était administré par voie orale aux animaux sur une durée de 5 jours.

1.1.3 Données enregistrées pour le suivi de l'étude

- Un commémoratif renseignant l'identification du lot, les antécédents d'élevage relatifs à cette pathologie, le descriptif des troubles, l'âge d'apparition et les analyses et traitements effectués.

- Une fiche de suivi du lot sur une période de 12 jours (J-2 avant mise en place du traitement à J+6 après la fin du traitement).

Etaient relevés quotidiennement les paramètres suivants :

- L'activité du lot
- Les consommations d'eau et d'aliments
- Les mortalités
- L'intensité de la toux
- L'apparition d'éventuelles lésions articulaires
- L'aspect de la litière
- Une pesée en début et fin de traitement

1.2 Réalisation des antibiogrammes

Les boîtes de Petri ont été préparées avec une gélose Mueller Hinton (Biorad 64884) additionnée de sang de mouton (laboratoire AEB) et d'une quantité croissante d'une solution de tiamuline et de doxycycline adaptée pour obtenir les valeurs de concentrations encadrant les valeurs cibles de CMI des souches à tester. Ces valeurs cibles ont été obtenues à partir de l'antibiogramme par la méthode classique de diffusion en milieu gélosé (norme AFNOR U47-107). Les ornithobactéries isolées des lots de dindes atteintes de maladies respiratoires ont été mises en suspension calibrée à 10⁶ bactéries/ml dont un inoculum de 10 microlitres a été déposé sur chaque boîte. Après 24h à 48h heures d'incubation à 37°C en atmosphère enrichie

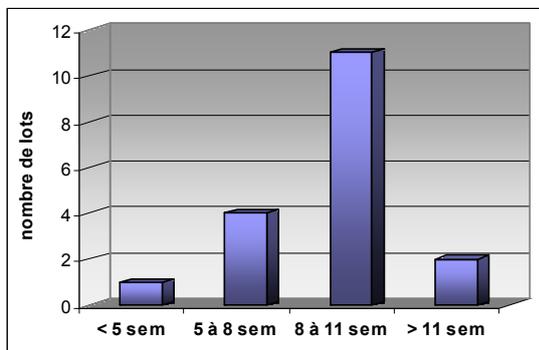
en CO₂, les valeurs de dilutions de la boîte sans poussa bactérienne contenant la plus faible concentration d'antibiotiques ont été retenues comme CMI.

2. RESULTATS

2.1. Résultats des observations menées en élevage

Les manifestations cliniques d'infection à *Ornithobacterium rhinotracheale* en élevage de dindes peuvent apparaître autour de la 5^{ème} semaine d'âge mais la majorité des cas se situe entre la 8^{ème} et la 11^{ème} semaine (11 cas sur 18) (Figure 1).

Figure 1. Répartition des âges d'apparition des problèmes respiratoires liés à l'ORT.



Les souches d'ORT isolées étaient sensibles à la tiamuline (10 souches au total) et 6 étaient également sensibles à la doxycycline sur les antibiogrammes obtenus par diffusion sur gélose (Tableau 1).

Tableau 1. Résultats des antibiogrammes sur les souches d'ORT isolées à partir d'écouvillons trachéaux ou de poumons. (S=Sensible, I=Intermédiaire, R=Résistant).

lot	CMI tiamuline	S	CMI doxycycline	I	R
Gi	0.4	S	6	I	
Ch. A1	0.25	S	6	I	
Ch B	0.16	S	1	S	
So	0.16	S	0.71	S	
Le	0.5	S	3	S	
Ma	0.5	S	16	R	
Bo	0.16	S	2	S	
Co	0.5	S	16	R	
Du	0.16	S	0.01	S	
Ro	0.4	S	1	S	

Des pesées ont été réalisées de manière habituelle par les éleveurs sur 12 des lots suivis afin de vérifier la prise de poids des animaux sur une période de 5 à 10 jours après la mise en place du traitement.

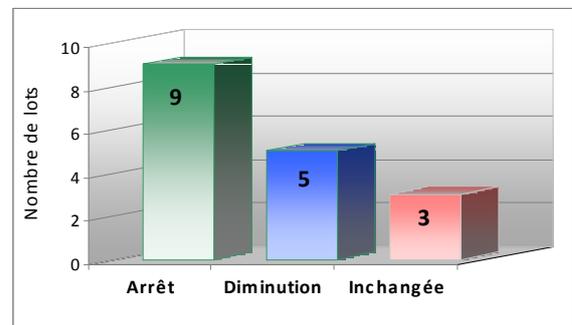
Les GMQ réels des mâles se sont avérés supérieurs aux GMQ théoriques sur la même période avec une

différence de + 19g de GMQ en moyenne. Pour les femelles cette différence est accrue, puisque le gain de GMQ réel par rapport au GMQ théorique est de + 35,5g.

Les paramètres de consommations n'ont pas pu être interprétés en raison de défauts ou d'imprécisions des enregistrements.

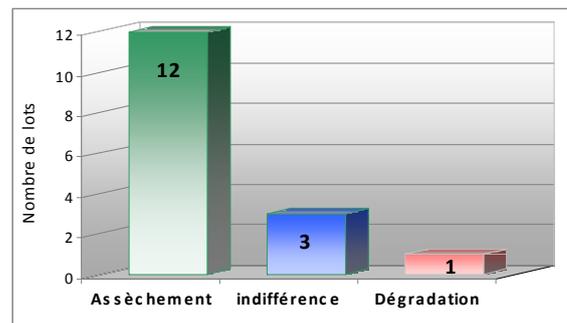
Le suivi de l'évolution de la toux a démontré un effet positif de l'association tiamuline et doxycycline sur 14 lots sur 17 renseignés (Figure 2). Dans 9 lots, cette efficacité a été totale, avec un arrêt de la toux. Dans 5 lots nous avons observé une réduction de la toux, sans guérison totale. Dans les 3 derniers lots, la toux n'a pas évolué.

Figure 2. Effets du traitement sur l'évolution de la toux



75% des lots (12 cas/16) ont noté une nette amélioration de l'aspect de leur litière. Seul 1 lot a vu l'état de sa litière se dégrader au cours du traitement (Figure 3).

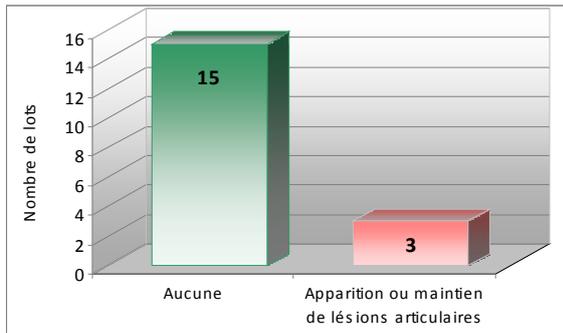
Figure 3. Effet du traitement sur l'aspect de la litière



10 lots sur les 18 présentaient des défauts d'activité (animaux peu mobiles ou prostrés) à la mise en place du traitement. Sur ces 10 lots, 6 ont retrouvé une activité normale au cours du traitement et 4 sont restés inchangés. Les 8 lots qui présentaient une activité normale avant la mise en place du traitement ont conservé leur bonne activité tout au long du suivi.

Dans 15 lots sur 18 (83%) il n'y eu aucune évolution de la maladie vers une forme articulaire (Figure 4). Dans 1 cas nous avons observé l'apparition de boiteries et tenosynovites dès le lendemain de la mise en place du traitement. Dans les 2 autres cas, des arthrites et des pododermatites sont apparues soit le lendemain de la fin du traitement soit 4 jours après.

Figure 4 . Evolution clinique de la maladie vers une forme articulaire



La mortalité a également été enregistrée, mais aucun lot n'a présenté de forme d'ORT aiguë avec de fortes mortalités liées à des pneumonies sévères. Par conséquent nous n'avons noté aucune évolution significative de ce critère.

2.2. Résultats de l'étude in vitro

Seules 8 des souches d'ORT isolées lors de l'étude *in vivo* ont pu être cultivées au laboratoire puis testées avec l'association tiamuline et doxycycline *in vitro* (tableau 2).

L'Indice de Fraction de la Concentration Inhibitrice (FIC-index) exprime le degré de synergie pour l'association de 2 antibiotiques en mesurant pour chaque antibiotique la réduction de sa CMI lorsqu'il est associé à l'autre antibiotique (*Antibiotics in Laboratory Medicine*).

F.I.C. index =

$$\frac{\text{CMI de la Tiamuline associée à la Doxycycline}}{\text{CMI de la Tiamuline}} + \frac{\text{CMI de la Doxycycline associée à la Tiamuline}}{\text{CMI de la Doxycycline}}$$

L'effet d'une association d'antibiotiques est synergique quand la concentration de chacun des antibiotiques au point le plus favorable est au moins 4 fois inférieure à la CMI de chacun des antibiotiques utilisés seuls.

L'index d'association est :

- FIC index ≤ 0,5 = Synergie
- 0,5 < FIC index < 1 = Addition
- 1 < FIC index ≤ 2 = Indifférence
- FIC index > 2 = Antagonisme

Tableau 2 : Résultats de l'association tiamuline + doxycycline in vitro sur 8 souches d'Ornithobacterium rhinotracheale. (Syn = Synergie, Add = Addition, Indif = Indifférence)

Souches	Tiamuline		Doxycycline		FIC index	Effet
	CMI	CMI associée à la Doxycycline	CMI	CMI associée à la Tiamuline		
Gi	0.08	0.04	16	4	0.75	Add.
Ch A1	0.08	0.005	8	4	0.5	Syn.
Le	0.04	0.04	8	4	1.5	Indif
Ma	0.08	0.03	1	0.5	0.8	Add.
L1245	0.08	0.04	8	4	1	Add.
L1246	0.1	0.04	8	4	0.54	Add.
L1247	0.1	0.05	8	4	1	Add.
Ro	0.1	0.01	2	0.5	0.35	Syn.

Le calcul du FIC index démontre un effet synergique sur 2 souches sur 8 testées et un effet additionnel sur 5 autres souches. Seule une souche présente une indifférence vis à vis de l'association tiamuline et doxycycline.

3. DISCUSSION

L'appréciation de l'efficacité d'un traitement pour le praticien se situe à deux niveaux :

- La rapidité de la réponse clinique mesurée par l'éleveur
- L'efficacité du traitement dans l'élimination des germes en cause

L'activité du lot a été jugée comme meilleure par les éleveurs. Ce critère essentiel conditionne la confiance de l'éleveur dans le protocole ainsi que l'observance du traitement au moins dans les premiers jours. Compte tenu de la rapidité de réaction en élevage rationnel et de la brièveté des cycles d'élevage, toute solution thérapeutique qui n'apporte pas une amélioration clinique en 24 à 36h est jugée comme insuffisante. Cela n'a pas été le cas ici.

Le deuxième paramètre retenu par les éleveurs est l'évolution des mortalités. Lors de cet essai, la réponse a été favorable excepté dans les lots concernés par une double contamination non identifiable lors de l'autopsie (Ornithobactérie associée à un colibacille ou un virus pathogène). Le recours aux examens complémentaires permet d'ajuster le traitement avant que l'état général du lot ne soit trop dégradé ou d'apporter une explication à *posteriori*. L'investissement dans un examen de laboratoire reste indispensable compte tenu de la multiplicité des germes pouvant être impliqués dans un syndrome infectieux. On notera l'absence de cas de mode d'évolution aiguë lors des tests qui aurait pu rendre la réponse thérapeutique plus aléatoire.

L'évolution de la toux est un très bon indicateur pour l'éleveur expérimenté ou le praticien. Au quotidien, il est plutôt utilisé comme critère d'alerte que comme critère de suivi. L'amélioration clinique obtenue ici est conforme au résultat attendu.

L'évolution de la consommation d'eau traduit à la fois la réaction des animaux face à l'ajout d'un traitement dans l'eau et l'amélioration clinique du troupeau. Elle repose sur la fiabilité des mécanismes d'enregistrement et sur la régularité de ceux-ci par l'éleveur. Il n'a pas été possible d'avoir des relevés fiables en quantité suffisante dans le présent test. Tout au plus nous pouvons conclure à la bonne acceptabilité du mélange pour les animaux. On notera également l'absence de réaction défavorable de bouchage des canalisations, en respectant la consigne de réaliser préalablement deux solutions mères différentes. Le mélange des produits s'est montré stable.

De même les enregistrements des consommations d'aliments n'ont pas été exploités.

L'apparition d'arthrite malgré le traitement en cours a été observée à trois reprises. Son mécanisme reste difficile à explorer, mais on peut suspecter soit des localisations articulaires des ORT avant mise en place du traitement soit une insuffisance de consommation de traitement liée à la prostration. Dans tous les cas, la diffusion intra-articulaire d'un antibiotique en quantité efficace reste difficile lors des traitements collectifs. On constate que l'évolution vers une infection articulaire des infections à *Ornithobactérie* peut se faire sur le mode aigu direct, sans passage par une pathologie respiratoire. Elle concerne en général des animaux âgés et est responsable de taux de pertes importants. L'évolution peut se faire sur un mode chronique au sein du lot, entraînant de l'amaigrissement et des saisies à l'abattoir.

Les pesées sont des indicateurs intéressants de la réponse à un traitement. Elles se font de façon hebdomadaire en élevage. Dans notre cas, sans que l'accent soit mis auprès de l'éleveur sur cet aspect particulier de la réponse thérapeutique, une croissance compensatrice est mise en évidence pendant la période de traitement. Il reste à mesurer si elle est pérenne.

L'un des points positifs de cet essai a été l'observation d'une amélioration des troubles digestifs des animaux. Les troubles digestifs sont depuis plusieurs années la préoccupation prioritaire des éleveurs de dindes de par le travail généré par l'entretien des litières. L'activité de la tiamuline sur *Clostridium perfringens* peut expliquer cette observation (Manco et al, 2007).

La synergie de la tiamuline et de la doxycycline a été vérifiée pour deux souches sur les 8 testées. Dans 5 cas on observe au moins un effet additif. L'association des deux molécules est donc favorable. Elle pourra être envisagée par exemple si des résistances apparaissent pour d'autres familles d'antibiotiques ou pour améliorer la réponse thérapeutique à l'une des deux molécules lors d'un incident sanitaire sévère.

CONCLUSION

Le nombre restreint de molécules thérapeutiques disponibles en médecine vétérinaire est parfois un handicap pour le praticien. Le présent travail confirme l'intérêt du recours à une association synergique. Cette voie mérite d'être plus complètement explorée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr Jocelyn Marguerie du Labo 79, Argenton Château, pour sa participation active, ainsi que Brigitte Manco (CEVA Santé Animale) pour son aide précieuse lors de cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Antibiotics in Laboratory Medicine. 5th edition. Lorian V. Chap.9: Antimicrobial combinations.
- Bazin, T., Balloy, D., Mercier, A., Paulet, P., Belloc, C., 2005. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole.
- Burch, D.G.S., Stipkovits, L., Miller, D.J.S., 1993. Proceedings of the Xth World Poultry Association Congress, Sydney.
- Devriese, L.A., De Herdt, P., Haesebrouck, F., 2001. Avian Pathology, 30, 197-200.
- Fodor, L., Stipkovits, L., Klein, U., 2004. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg
- Manco, B., Jacquinet, C., Caudron, C., Dupuy, N., Butty, P., 2007. Septièmes Journées de la Recherche Avicole.
- Miller, D.J.S., Stipkovits, L., 1991. Proceedings of the World Veterinary Congress, Brazil.